

Strategie di oncoprevenzione con antiossidanti nei confronti dei radicali liberi del fumo di tabacco

Strategies of oncoprevention with antioxidants towards reactive oxygen species in tobacco smoke

M. Mura, V. Zagà, M. Fabbri

Riassunto

I radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species - ROS) sono specie molto reattive che danno origine a reazioni a catena in grado di automantenersi e amplificarsi. Il fumo di sigaretta rappresenta una formidabile sorgente di ROS (1015 per aspirata, i quali si possono suddividere in due differenti gruppi: radicali a lunga emivita nella fase corpuscolata (fase tar) e radicali a breve emivita nella fase aeriforme (fase gas). Essi contribuiscono a rendere il fumo di sigaretta un carcinogeno completo, dal momento che può agire sia come iniziatore che come promotore. La strategia terapeutica e preventiva pertanto deve essere volta ad aumentare le difese antiossidanti degli organi colpiti, in modo da ristabilire l'equilibrio tra ossidanti ed antiossidanti a favore di questi ultimi. Numerosi agenti sono attualmente allo studio, ed in questo ambito la sostanza più promettente risulta essere la N-acetil-L-cisteina (NAC), che in numerosi studi in vitro, sugli animali e recentemente anche sull'uomo, si è dimostrata in grado di ridurre e prevenire il danno genotossico indotto dai ROS del fumo di tabacco.

Parole chiave: radicali liberi, stress ossidativo, fumo di sigaretta, danno genotossico, N-acetil-L-cisteina.

Abstract

Reactive Oxygen Species (ROS) are very reactive molecules and atoms, giving rise to chain reactions that are able to maintain and amplify themselves. Cigarette smoke is an extraordinary source of ROS (1015 for every aspiration), that can be subdivided in 2 groups: radicals with long half-life in the corpuscular phase (tar phase) and radicals with short half-life in the aeriform phase (gas phase). These radicals contribute to make cigarette smoke a complete carcinogen agent, as it can act both as initiator and promoter. Consequently, therapeutic and preventive strategy should aim at increasing the antioxidants defences of the damaged organs and restoring the balance between oxidants and antioxidants. A large amount of protective agents are being studied at the moment, and the most promising substance in this area is N-acetylcysteine (NAC). In numerous studies in vitro, in animals and recently also in human beings, NAC has shown the capacity of reducing and preventing the genotoxic damage induced by ROS of tobacco smoke.

Keywords: free radicals, oxidative stress, cigarette smoke, genotoxic damage, N-Acetyl-Cysteine.

Introduzione

Il fumo di sigaretta rappresenta una importante sorgente di radicali liberi sia nella sua componente gassosa (fase gas) che corpuscolata (fase tar). Essi contribuiscono a rendere il fumo di sigaretta un carcinogeno completo, dal momento che può agire sia come iniziatore che



Cristallografia della struttura della Vitamina E



Cristallografia della struttura del Betacarotene

Marco Mura
Dottorato di Ricerca in Scienze Pneumo-cardio-toraciche
Università degli Studi di Bologna,
Research Fellow - University of Toronto

Vincenzo Zagà
Presidio di Pneumotisiologia - AUSL Città di Bologna,
Società Italiana di Tabaccologia-SITAB

Mario Fabbri
Direttore della Scuola di Specializzazione in
Malattie dell'Apparato Respiratorio
Università degli Studi di Bologna

come promotore della carcinogenesi. I radicali liberi infatti non agiscono solo danneggiando direttamente l'epitelio polmonare, ma possono anche modificare il DNA, inducendo mutazioni che comportano un aumento del potenziale neoplastico (32).

I ROS e il danno genotossico polmonare prodotto dal fumo di tabacco

I radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species - ROS) sono atomi e molecole che possiedono un elettrone spaiato nell'orbita esterna ed includono l'anione superossido (O_2^-), il radicale idrossile ($OH\cdot$) e il radicale perossidrile ($HO_2\cdot$); il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e gli acidi ipotalosi, come l'acido ipocloroso ($HOCl$), non sono ROS ma vengono classificati come tali, in quanto derivano dall'ossigeno e prendono parte alla tossicità dell'ossigeno. Esistono inoltre anche altri metaboliti derivati dall'ossigeno, come l'ossigeno singoletto, l'ozono e i radicali perossili ($R-OO\cdot$) ed alcossili ($R-O\cdot$).

I radicali liberi esplicano la loro azione tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in una quantità tale da non poter essere inattivati dai sistemi di difesa cellulare.

Gli organismi aerobi infatti sono dotati di valide difese antiossidanti che bilanciano la produzione radicalica legata al metabolismo di sostanze endogene ed esogene: esiste quindi un equilibrio tra sostanze ossidanti ed antiossidanti; lo stress ossidativo può essere definito quindi come una aumentata esposizione agli ossidanti e/o una ridotta capacità di difesa degli antiossidanti.

Con il termine di antiossidante si definisce qualunque sostanza che, presente in basse concentrazioni rispetto alle concentrazioni di un substrato ossidabile, ritarda o previene in misura significativa l'ossidazione del substrato in questione. Il termine "substrato ossidabile" comprende quasi tutto ciò che si trova nelle cellule viventi, comprese le proteine, i lipidi, i carboidrati e il DNA (1).

Il fumo di sigaretta contiene concentrazioni di ROS estremamente elevate, in grado di deteriorare il patrimonio di

agenti antiossidanti contenuti nelle cellule epiteliali del parenchima polmonare attraverso meccanismi legati all'aumentato stress ossidativo. Inoltre l'abitudine al fumo di sigaretta determina un incremento del numero di polimorfonucleati neutrofili (PMN) nel fluido broncopolmonare e i particolati del fumo possono attivare queste cellule; l'attivazione metabolica dei PMN porta così alla produzione di abbondanti quantità di anione superossido (2,3,4). In più il materiale estratto dal catrame contenuto nel fumo si è dimostrato in grado di produrre perossido d'idrogeno (5,6).

Pryor e Coll. hanno identificato nel fumo di sigaretta due differenti gruppi di radicali liberi: radicali a lunga emivita nella fase corpuscolata (**fase tar**) e radicali ad emivita breve nella fase aeriforme (**fase gas**). Il principale radicale della fase tar è costituito dal complesso chinone-idrochinone (10^{17} spin/g), un sistema redox molto attivo e in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido e quindi a perossido di idrogeno e a radicale idrossilico. La fase gas del fumo di sigaretta contiene invece una gran quantità di piccoli radicali alchilici e alcossilici (10^{15-18} per aspirata di fumo di sigaretta) dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata (7, 8, 9, 31, 39).

Il fumo di sigaretta contiene inoltre numerosi composti cancerogeni, quali idrocarburi aromatici policiclici (PAH), diidrobenceni, N-nitrosamine, amine eterocicliche, Polonio 210, aldeidi e appunto i ROS (10).

Recentemente è stato evidenziato da più parti che i ROS sono coinvolti sia nell'iniziazione che nella promozione e/o progressione della carcinogenesi chimica (32).

Il perossido d'idrogeno è infatti in grado di indurre metaplasia squamosa in un modello colturale di trachea di criceto. Visto che la metaplasia squamosa è associata allo sviluppo del carcinoma broncogeno, la presenza di perossido d'idrogeno nel fumo di tabacco può rivestire un ruolo rilevante per le sue proprietà carcinogeniche (11).

Inoltre il condensato di fumo di sigaretta, ed in primo luogo la frazione acida che contiene diidrobenceni quali l'idro-

chinone e il catecolo (o pirocatechina), si è rivelato essere direttamente mutageno, portando alla inattivazione di geni soppressori importanti nella carcinogenesi polmonare (12).

I ROS sembrano essere in definitiva un importante fattore nella carcinogenesi indotta dall'infiammazione: l'attivazione dei PMN e dei macrofagi dà origine ad una aumentata produzione di anione superossido, che può portare alla formazione di perossido d'idrogeno, che si dissocia quindi in radicale ossidrile (15, 32, 39).

Le difese antiossidanti del polmone

Le difese antiossidanti sono incentrate sul sistema del glutatione, che rappresenta il principale donatore tiolico intracellulare a basso peso molecolare; questo tripeptide è caratterizzato da un gruppo tiolico e da un legame peptidico gamma-glutamilico peptidasi-resistente. Il pool cellulare del glutatione è il risultato di un equilibrio dinamico fra la sua sintesi ed il turnover correlato; quest'ultimo consiste principalmente nella liberazione di glutatione ridotto (GSH) della cellula (14).

Il GSH svolge un ruolo importante nei meccanismi di detossificazione e nella protezione delle cellule contro gli ossidanti. La rimozione dei ROS viene catalizzata dalla GSH-perossidasi, che utilizza come substrato il GSH; quest'ultimo viene rigenerato dalla forma ossidata (GSSG) per azione della GSH-reduttasi con il NADPH, i cui livelli vengono mantenuti dal ciclo dei pentoso-fosfati (15).

Nel polmone esistono diversi meccanismi antiossidanti intracellulari ed extracellulari di difesa, destinati al mantenimento della normale funzionalità cellulare polmonare. Il muco respiratorio possiede proprietà antiossidanti che forniscono uno schermo protettivo contro il fumo di sigaretta e i inquinanti atmosferici. La SOD, la catalasi e la GSH-perossidasi sono i principali sistemi di difesa antiossidante intracellulare che eliminano i radicali anione superossido, perossido d'idrogeno e gli idroperossidi lipidici (15).

Il mantenimento di un bilancio adeguato dei livelli intracellulari di GSH è critico per il sistema di difesa antiossidante.

La mancanza di precursori, principalmente di L-cisteina, può provocare uno squilibrio del delicato sistema di difesa intracellulare (15).

Strategie terapeutiche e preventive

La **prevenzione primaria** dei tumori e di altre patologie legate a mutazioni genetiche si basa su due strategie complementari:

1. la possibilità di evitare l'esposizione ai fattori di rischio riconosciuti, come il fumo di tabacco
2. il potenziamento delle difese dell'ospite tramite misure chemiopreventive

Diversi studi sono stati condotti e sono in corso per ricercare sostanze, somministrabili giornalmente o per determinati periodi, che siano in grado di limitare, annullare o prevenire l'azione mutagena e quindi cancerogena dei ROS.

Una farmacoterapia antiossidante dovrebbe idealmente disporre di farmaci ad azione specifica. Gli antiossidanti agiscono bloccando le reazioni avviate dai radicali, ma non sono in grado di distinguere tra radicali con ruoli fisiologici e radicali dannosi; è pertanto necessaria cautela nell'impiego degli antiossidanti poiché questi composti non sono dotati solo di attività antiossidante, ma secondo Bast potrebbero agire anche come pro-ossidanti (16).

Per esempio un antiossidante riconosciuto come il GSH, appartenente al gruppo dei tiolici (SH), può manifestare in certe condizioni attività pro-ossidante. In modelli sperimentali, l'attività pro-ossidante del gruppo SH del GSH può spiegarsi facilmente sulla base della riduzione del Fe_2^+ , ed è stata ipotizzata anche la formazione di ROS (16):



dove:

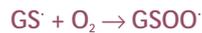
GSH = glutazione ridotto

R^{\cdot} = specie radicalica

GS^{\cdot} = radicale tiilico

RH = specie radicalica ridotta

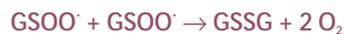
Il radicale tiilico (GS^{\cdot}) può reagire con l'ossigeno:



dove:

$GS\dot{O}O^{\cdot}$ = radicale perossilsulfenile

Le reazioni finali, in cui il radicale perossilsulfenile ($GS\dot{O}O^{\cdot}$) reagisce con un secondo radicale, formano ossigeno che può trovarsi allo stato di ossigeno singoletto:



dove:

GSSG = glutazione ridotto

Va comunque sottolineato che il lavoro di Bast è l'unico presente in Letteratura a mettere in evidenza questo ruolo potenzialmente pro-ossidante, in certe condizioni, degli antiossidanti.

N-acetil-L-cisteina

In ambito chemiopreventivo la N-acetil-L-cisteina (NAC), molecola appartenente al gruppo dei donatori tiolici, risulta essere uno degli agenti protettivi più promettenti.

La NAC è un agente mucolitico utilizzato nella bronchite cronica e nella fibrosi cistica sin dagli anni '60, oltre che come antidoto per la intossicazione da acetaminofene; più recentemente l'utilizzo della NAC è stato proposto per prevenire o attenuare la tossicità polmonare da ROS e anche nel trattamento della Sindrome da Distress Respiratorio Acuto (ARDS), della sintomatologia simil-influenzale e delle malattie ostruttive croniche polmonari (17).

L'azione chemiopreventiva della NAC è legata alle sue proprietà nucleofile e ad antiossidanti; la NAC infatti è in grado di attraversare facilmente la membrana sarcolemmatica ed essere secreta nei liquidi bronchiali, e viene utilizzata dall'organismo come analogo della cisteina e come precursore del GSH, così da aumentare l'attività della glutazione-S-transferasi, della GSH-perossidasi, della GSH-reduttasi, della NADH- e NAD(P)H-chinone reduttasi; probabilmente essa è anche in grado di promuovere la riparazione del DNA proteggendo l'attività della ADP-ribosiltransferasi (18,19).

Dal punto di vista biochimico la NAC agisce sulle reazioni biologiche coinvolgono i ROS in due modi: mediante il suo

gruppo sulfidrilico ridotto e mediante il metabolismo del gruppo idrossilico del glutazione (L- γ -glutamyl-L-cisteina-glicina, GSH) (20).

Il risultato pratico è l'aumento delle riserve di glutazione, sia all'interno delle cellule che nel plasma, il che permette di fronteggiarne l'aumentato fabbisogno in situazioni di stress ossidativo.

In un recente studio multicentrico di Van Shooten e Coll., in doppio cieco e placebo-controlled, la NAC è stata somministrata per os (2 x 600mg/die) per un periodo di 6 mesi a 21 fumatori sani, nei quali sono stati misurati i livelli dei marker di dose interna (cotinina plasmatica e nel BAL, mutagenicità urinaria), dei marker di dose biologicamente efficace (DNA-addotti correlati al fumo, danno ossidativo del DNA ed addotti di emoglobina) e dei marker di risposta biologica (frequenza dei micronuclei e capacità scavenger degli antiossidanti) sia pre che post-trattamento (17).

La somministrazione di NAC ha significativamente inibito la formazione dei DNA addotti nelle cellule del BAL (rilevati con spettrofotometria a fluorescenza sincrona), ma non gli addotti dell'emoglobina (Hb) e PAH-DNA; ciò può essere dovuto al fatto che la NAC viene deacetilata a L-cisteina in quei tessuti che possiedono i necessari requisiti metabolici per la deacetilazione, determinando così un notevole aumento della biosintesi del GSH; così avviene per le cellule del BAL, che sono capaci di deacetilare e metabolizzare gli agenti xenobiotici, e presentano anche una maggiore sensibilità e accessibilità agli agenti contenuti nel fumo di sigaretta che inducono la formazione di addotti (17).

Risultati simili sono stati riportati anche in studi sugli animali: la NAC, somministrata per os, ha attenuato la formazione di DNA addotti nel polmone, cuore, reni ed aorta di ratti esposti su tutta la superficie corporea al fumo di sigaretta (18, 19); la NAC inoltre ha determinato un incremento del metabolismo epatico degli agenti mutageni negli stessi animali (21).

Anche dopo che il DNA è stato danneggiato è possibile esercitare effetti protettivi, attraverso la modulazione della replicazione del DNA e dei processi

riparativi. Questo delicato intervento può essere realizzato rallentando la proliferazione cellulare, in modo da lasciare tempo sufficiente per la riparazione del DNA, aumentando la fedeltà della replicazione del DNA, inibendo i meccanismi di riparazione più esposti ad errori e stimolando la riparazione e/o la reversione del danno al DNA

I tioli, e tra di essi in particolare il GSH, la NAC, il ditiotreitolo, il β-mercaptoetanololo e l'-mercaptopropionilglicina, esercitano un effetto protettivo in vitro sul DNA di epatociti in coltura, nei confronti dell'attività lesiva esercitata da radiazioni X (22).

La combinazione di NAC (1000 mg/kg/die) con **Oltipraz** (un analogo dell' 1,2-ditiole-3-tione, usato in passato nel trattamento nella schistosomiasi) (400 mg/kg/die), in un altro studio dagli stessi Autori, è risultata particolarmente efficace nell'inibire la formazione di DNA-addotti nel polmone ed Hb-addotti in un gruppo di ratti esposti per 28 giorni consecutivi su tutta la superficie corporea al fumo di tabacco (23).

Quando un composto del **selenio** (esbelen), che si comporta come la GSH-perossidasi, ma in modo non specifico riguardo al substrato, viene somministrato insieme alla NAC, consentendole così di agire in modo simile al GSH, si osserva un potenziamento degli effetti antiossidanti della NAC stessa (20).

Tutti i dati disponibili forniscono buo-

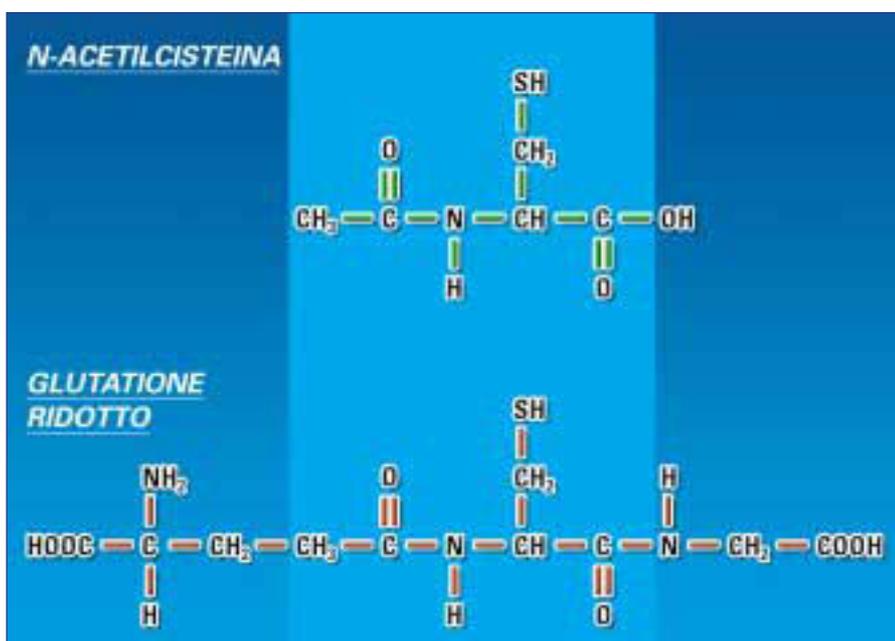
ne evidenze che la NAC possa rappresentare uno strumento concretamente utile nella chemioprevenzione del cancro polmonare e probabilmente di altre patologie che presentano analoghi meccanismi patogenetici, quali alcune patologie cardiovascolari. Sebbene al momento non vi siano ancora evidenze sufficienti per un suo uso estensivo nella popolazione generale, soprattutto ex-fumatrice, potrebbero tuttavia essere presi in considerazione dei trial clinici al dosaggio di 1200 mg/die nei soggetti ad alto rischio, come gli ex forti fumatori.

Sono da ricordare anche alcuni studi condotti su animali, che hanno dimostrato un promettente ruolo della NAC nel prevenire la carcinogenesi polmonare indotta dall'uretano (etilcarbamato) (34), dalla doxorubicina (35), dall'estratto di fumo di sigaretta (36) e di benzopirene (37). In quest'ultimo studio, l'azione chemiopreventiva della NAC si esercitava mediante la formazione di coniugati con i **fenil-isotiocianati** (glucosinilati presenti nelle verdure crocifere). Questa osservazione è stata recentemente confermata da un altro studio, che ha suggerito una favorevole interazione anche con il **miositolo** in un modello murino di cancro polmonare indotto dal benzopirene (38).

5,6-benzoflavone e fenil isotiocianato

Il 5,6-benzoflavone è un flavonoide sintetico che interagisce con il recettore Ah, un fattore di trascrizione che controlla l'espressione del citocromo P4501A1 (CYP1A1);

Il 5,6-benzoflavone è un induttore delle fasi I (reazioni di ossidazione: che introducono nella molecola del farmaco nuovi gruppi idrofili e/o protidici) e II (reazioni di idrolisi: che liberano detti gruppi idrofili da eteri, esteri, ammidi, acetali, emiacetali, epossidi) del metabolismo degli xenobiotici, mentre il fenil isotiocianato, come gli altri isotiocianati organici, inibisce gli enzimi della fase I coinvolti nella attivazione dei carcinogeni ed attiva allo stesso tempo gli enzimi di fase II che accelerano la rimozione cellulare dei carcinogeni attivati (18). Tale effetto è stato dimostrato anche nei confronti di composti tipici del fumo di sigaretta, come la nitro-



samina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (24).

Il fenil isotiocianato e il 5,6-benzoflavone, inoltre, somministrati entrambi alla dose di 500 mg/kg/die ai ratti esposti al fumo di tabacco, hanno mostrato un significativo effetto protettivo verso tutti i marker di danno genotossico misurati: danno ossidativo al DNA polmonare e DNA-addotti nelle cellule del BAL, nell'epitelio tracheale, nel polmone e nel cuore (18).

α-tocoferolo acetato ed acido ascorbico

In un recente studio il trattamento per via orale con α-tocoferolo (100 mg/kg) 1 ora prima della inalazione di fumo di tabacco in un gruppo di topi ha ridotto in maniera significativa a livello del polmone la formazione di DNA-addotti.

Il pre-trattamento con α-tocoferolo per 5 giorni consecutivi (100 mg/kg/die) e anche quello con acido ascorbico (agli stessi dosaggi) ha completamente prevenuto la formazione di DNA-addotti a livello del polmone, stomaco e fegato (24).

Polifenoli del tè verde

L'effetto dei polifenoli del tè verde (GTP) sulla formazione di DNA-addotti e di prodotti della perossidazione lipidica (LLP) è stato studiato su cellule umane in coltura esposte a diversi tipi di agenti ossidanti.

Le cellule sono state pretrattate per 2 ore con GTP e quindi esposte per 30 minuti ad una soluzione di fumo di sigaretta od a perossido d'idrogeno. Il pre-trattamento con GTP ha bloccato la formazione di rotture di legami tra le 2 eliche del DNA e di LLP indotti sia dal fumo di sigaretta che dal perossido d'idrogeno. I GTP inoltre hanno ridotto la tossicità globale del perossido d'idrogeno determinata in base alla crescita delle cellule dopo l'esposizione. Questi risultati indicano quindi che i GTP inibiscono la formazione di DNA-addotti (25).

Il tè nero si ricava dalla biotrasformazione delle catechine del tè verde in teaflavine e tearubigine ed ha anch'esso mostrato proprietà antiossidanti. Sia il tè nero che le sue singole catechine hanno inibito, in maniera ancora più efficiente rispetto al tè verde, la produzione di ossido nitrico ed anione superossido di in

macrofagi peritoneali murini attivati (26).

Vitamina E

I lipidi costituiscono il 90% del surfattante polmonare e sono estremamente sensibili alla ossidazione; il più importante antiossidante lipofilo nel polmone è la vitamina E (Vit.E). La Vit.E inoltre protegge le cavie di laboratorio dal danno polmonare indotto dalla iperossia (27).

La Vit.E raggiunge lo spazio alveolare come costituente integrale del surfattante prodotto dalle cellule epiteliali di II tipo, mentre viene trasportata nel plasma dalle lipoproteine. Non è tuttavia ancora chiaro a quale concentrazione cellulare la vit.E rifletta uno stress ossidativo o una sufficiente protezione dei lipidi e delle proteine di membrana (27).

Comunque la pre-somministrazione di vit.E succinato a ratti successivamente esposti ad estratto acquoso di fumo di tabacco (STE) ha determinato una diminuzione significativa della produzione di ossido nitrico (NO) in risposta all'STE nei macrofagi peritoneali isolati in coltura (28).

Licopene

E' stata riportata l'azione protettiva del licopene, un pigmento retinoide rosso contenuto nei pomodori, nei linfociti umani nei confronti dei ROS ossigeno singoletto e biossido d'azoto dopo il mantenimento di una dieta ricca di licopene per un periodo di 14 giorni (29). Questo studio rafforza l'interesse corrente verso i carotenoidi della dieta rispetto alle loro possibili proprietà preventive.

Idrossitirosole

Le acque "a perdere" derivanti dalla macinazione delle olive sono ricche di antiossidanti fenolici, tra cui l'idrossitirosole; la somministrazione di un estratto di questo bioprodotto (5 mg/kg per 4 giorni) a ratti esposti a fumo di tabacco per 20 minuti al giorno ha determinato una notevole diminuzione del marker di stress ossidativo preso in considerazione, vale a dire la concentrazione di iso-prostaglandina (PG) F(2alpha) (un prodotto della perossidazione lipidica di membrana) nelle urine (30).

Conclusioni

La chemioprevenzione dei tumori si

basa sulla possibilità di interferire con una o più fasi della cancerogenesi.

I vari composti chimici passati in rassegna hanno mostrato attività potenzialmente anti-inizianti e/o anti-promuoventi la cancerogenesi e, in futuro, potrebbero pertanto essere utilizzati come agenti chemiopreventivi.

Obiettivo degli agenti chemiopreventivi è prevenire la formazione di quelle alterazioni a carico del DNA che rappresentano le fasi più precoci della patogenesi del carcinoma polmonare e forse anche delle malattie degenerative croniche del polmone, in cui alterazioni degli stessi biomarker possono essere rilevate.

Fino ad ora i trial clinici non hanno mostrato risultati positivi (33); tuttavia diversi studi preliminari e alcuni studi animali pongono l'attenzione sulla NAC come uno dei più promettenti sistemi antiossidanti nella prevenzione oncologica nei soggetti a rischio. E' pertanto auspicabile che le future sperimentazioni cliniche si concentrino su popolazioni di soggetti ex-fumatori, che continuano ad essere ad alto rischio per lo sviluppo del cancro del polmone anche dopo aver cessato di fumare.

Un'altra interessante prospettiva è quella di combinare diversi componenti antiossidanti allo scopo di potenziare l'effetto chemiopreventivo globale.

Bibliografia

1. Halliwell B. Le specie reattive dell'ossigeno nei sistemi viventi: origine, biochimica e ruolo nelle malattie dell'uomo. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.24-38.
2. DiGiuseppi J, Fridovich I. The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984;12:315-42.
3. Fisher AB. Oxidants and antioxidants: Transatlantic Airway Conference 2002 - Chairman's Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S2-S3.
4. Moldeus P, Berggren M, Gravstrom R. N-acetylcysteine protection against the toxicity of cigarette smoke and cigarette smoke condensate in various tissues and cells in vitro. *Eur Respir Dis* 1985;139:123-29.
5. Del Donno M, Verduri A. I radicali liberi ed i meccanismi ossido-riduttivi. *European Respiratory News* 1999;3:238-43.
6. Izzotti A, Balansky RM, Blagoeva PM, Mircheva ZI, Tumillero L, Cartiglia C, De Flora S. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J* 1998;12(9):753-58.
7. Pryor W.A.: Free radicals in biology. Vol. 1, 3. Academic press, New York, 1976.
8. Church D.F., Pryor W.A.: Free radicals chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64:111-26.
9. Pryor W.A., Hales B.J., Pnemovic P.I., Church D.F.: The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science* 1983;220:425-27.
10. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol.38. Tobacco smoke. 1986 IARC. Lyon France.
11. Radosovich CA, Weitzman SA. Hydrogen peroxide induces squamous metaplasia in a hamster tracheal organ explant culture model. *Carcinogenesis* 1989;10:1943-46.
12. Matsukura N, Willey J, Miyashita M, Taffe B, Hoffmann D, Waldren C, Puck TT, Harris CC. Detection of direct mutagenicity of cigarette smoke condensate in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1991;12:685-89.
13. Albertini A. Ossidanti e antiossidanti: determinanti fisiopatologici e agenti terapeutici. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.20-23.
14. Grassi C. Specie reattive dell'ossigeno e malattie polmonari. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.59-62.
15. Leanderson P. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells. *Annals New York Academy of Sciences*. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:249-59.
16. Bast A, Haenen GRMM, Doelmann CJA. Ossidanti e antiossidanti: stato dell'arte. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.5-19.
17. Van Schooten JV, Besarati Nia A, De Flora S, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A, Balm AJM, Dallinga JW, Bast A, Haenen GRMM, Van't Veer L, Baas P, Sakai H, Van Zandwijk N. Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(2):167-75.
18. Izzotti A, Balansky RM, D'Agostini F, Bennicelli C, Myers SR, Grubbs CJ, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke-exposed rats. *Cancer Research* 2001;61:2472-79.
19. Tsuda S, Matsusaka N, Ueno S, Susa N, Sasaki YF. The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol Sci* 2000;54(1):104-09.
20. Bernard GR. N-acetilcisteina e danno polmonare acuto: aspetti sperimentali e clinici. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.86-97.
21. De Flora S, Astengo M, Serra D, Bennicelli C. Inhibition of urethan-induced lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine. *Cancer Lett* 1986;32:235-41.
22. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Attività antiossidante ed altri meccanismi dei tioli nella prevenzione chimica di mutazioni e neoplasie. In: Allegra L, Crystal RG, Grassi C. GSH System - Glutathione in antioxidant defense. 1992 Excerpta Medica, ed. italiana; pp.111-26.
23. Albano E, Poli G, Tomasi G, Bini A, Tannini V, Dianzani MU. Toxicity of 1,2-dibromoethane in isolated hepatocytes: role of lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 1984;50:255-65.
24. Hecht SS. Chemoprevention of lung cancer by isothiocyanates. *Adv Exp Med Biol* 1996;401:1-11.
25. Leanderson P, Faresjo AO, Tagesson C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Radic Biol Med* 1997;23(2):235-42.
26. Sarkar A, Bhaduri A. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 1:284(1):173-78.
27. Kollek I, Sinha P, Rustow B. Vitamin E as an antioxidants of the lung - Mechanism of vitamin E delivery to alveolar type II cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S62-S66.
28. Hassoun EA, Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. Effect of vitamin E succinate on smokeless tobacco-induced production of nitric oxide by rat peritoneal macrophages and J774A.1 macrophage cells in culture. *Free Radic Biol Med* 1995;18(3):577-83.
29. Bohm F, Edge R, Burke M, Truscott TG. Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide - ROS components from cigarette smoke. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64(2-3):176-78.
30. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C, Sala A. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation* 2000;1002(18):2169-71.
31. Zagà V, Gattavecchia E. Radicali liberi e fumo di sigaretta. *Giorn It Mal Tor* 2002;56,5:375-391.
32. Zagà V, Mura M, Fabbri M. Ruolo oncogenetico dei radicali liberi nel fumo di tabacco. *Tabaccologia* 2003; 2:27-32.
33. Khuri FR, Lippman SM. Lung cancer chemoprevention. *Semin Surg Oncol* 2000;18:100-5.
34. Balansky B, De Flora S. Chemoprevention by N-acetylcysteine of urethane-induced clastogenicity and lung tumors in mice. *Int J Cancer* 1998;77:302-5.
35. D'Agostini F, Bagnasco M, Giunciglio D, Albini A, De Flora S. Inhibition by oral N-acetylcysteine of doxorubicin-induced clastogenicity and alopecia, and prevention of primary tumors and lung micro-metastases in mice. *Int J Oncol* 1998;13(2):217-24.
36. Witschi H, Espiritu I, Yu M, Willitts NH. The effects of phenethyl isothiocyanate, N-acetylcysteine and green tea on tobacco smoke-induced lung tumors in strain A/J mice. *Carcinogenesis* 1998;19(10):1798-94.
37. Yang YM, Conaway CC, Chiao JW, et al. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice by dietary N-acetylcysteine conjugates of benzyl and phenethyl isothiocyanates during the postinitiation phase is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and p53 activity and induction of apoptosis. *Cancer Res*. 2002 Jan 1;62(1):2-7.
38. Hecht SS, Upadhyaya P, Wang M. et al. Inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice by N-acetyl-S-(N-2-phenethylthiocarbonyl)-L-cysteine and myo-inositol, individually and in combination. *Carcinogenesis*. 2002;23(9):1455-61.
39. Bowler RP, Balkisson RC, Crapo JD. Oxidative stress in chronic pulmonary disease. *Minerva Pneumol* 2003; 42: 101-14.

www.ecm-sanita.it
— Educazione Continua in Medicina —

Educazione Continua in Medicina

www.ecm-sanita.it

HotMinds s.r.l. - Via Speranza 35 - 40068 San Lazzaro di Savena (Bo) Italia - Tel. 051 6271163 - Fax 051 6271399 - info@ecm-sanita.it