



Inquinamento outdoor e da fumo di tabacco: ossidanti e antiossidanti

Air pollution and tobacco smoke: oxidants and antioxidants

Stefano Picciolo, Vincenzo Zagà

Riassunto

Il polmone è continuamente soggetto all'azione di ossidanti inalati dall'ambiente o prodotti durante le reazioni biochimiche del nostro organismo. Le principali fonti di ossidanti esogeni sono rappresentate dall'inquinamento atmosferico e dal fumo di tabacco. Cellule infiammatorie come i polimorfonucleati, i macrofagi alveolari e gli eosinofili sono in grado di produrre ossidanti endogeni attraverso reazioni enzimatiche e non enzimatiche.

È noto come lo stress ossidativo sia capace di indurre danni a livello tissutale, cellulare e subcellulare ed in ultima analisi contribuire alla patogenesi della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) ed ai suoi effetti sistemici. Nel tessuto polmonare a questi agenti ossidanti si oppongono una serie di antiossidanti rappresentati da enzimi e sostanze non enzimatiche. È in discussione il ruolo degli antiossidanti nel prevenire tali danni e quindi contrastare lo sviluppo e la progressione della BPCO.

Parole chiave: inquinamento atmosferico, fumo di tabacco, sostanze ossidanti, broncopneumopatia cronica ostruttiva, N-acetil-L-cisteina, carbocisteina sale di lisina monoidrato.

Summary

Oxidants inhaled from the environment or produced during biochemical reactions exert their action on the lung continuously. The main sources of exogenous oxidants are air pollution and cigarette smoke.

Inflammatory cells like PLM, alveolar macrophages and eosinophils generate oxidants via enzymatic or non-enzymatic reactions. It is well known that oxidative stress can cause damage at the tissutal, cellular or subcellular level and eventually contribute to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and its systemic effects.

Several antioxidants, such as enzymes or non-enzymatic substances, counteract oxidant agents in lung tissue. The role of antioxidants to prevent those damages and contrast the development and progression of COPD is controversial.

Keywords: air pollution, cigarette smoke, oxidants, chronic obstructive pulmonary disease, N-acetyl-L-cysteine, carbocysteine lysine salt monohydrate.

INTRODUZIONE

Il polmone è sottoposto in maniera continua ad attacco di sostanze ossidanti. Loro caratteristica è la tendenza a strappare elettroni da altre molecole con cui vengono in contatto. Se una molecola **ossidante** sottrae elettroni ad un'altra **riducente** si realizza una coppia ossidoriduttiva. I **radicali liberi** sono porzioni di molecole in cui è presente un elettrone spaiato. Ciò rende il radicale libero molto instabile e reattivo e quindi pronto ad innescare nuovi fenomeni ossidoriduttivi. La fonte dello **stress ossidativo** può essere l'ambiente esterno, in primis l'inquinamento atmosferico e il fumo di tabacco (**ossidanti esogeni**), o le reazioni chimiche che si verificano nel nostro organismo, principalmente durante i fe-

nomeni flogistici (ossidanti endogeni). Queste sostanze derivano principalmente dall'ossigeno o dall'azoto, pertanto sono indicate come specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species* = ROS) o dell'azoto (*reactive nitrogen species* = RNS).

In questo articolo esamineremo alcune tra le fonti di ossidanti esogene ed endogene, il danno causato all'apparato respiratorio e quindi le difese di cui l'organismo dispone per contrastare l'attacco ossidativo. Infine discuteremo del ruolo di due farmaci antiossidanti nel prevenire il danno da stress ossidativo.

INQUINAMENTO ATMOSFERICO

La vasta superficie a contatto con l'ambiente esterno espone il polmone all'azione di sostanze inquinanti. Secondo

il DPR n. 203 del 24/5/88 l'inquinamento atmosferico può essere definito come "ogni modificazione della normale composizione o stato fisico dell'aria atmosferica, dovuta alla presenza nella stessa di una o più sostanze in qualità e caratteristiche tali da alterare le normali condizioni ambientali e di salubrità dell'aria; da costituire pericolo o pregiudizio diretto o indiretto per la salute dell'uomo; da compromettere le attività ricreative e gli altri usi legittimi dell'ambiente; alterare le risorse biologiche e gli ecosistemi, ed i beni materiali pubblici e privati". La composizione teorica dell'aria è riportata in **Tabella 1**.

Nelle *zone remote* sono da aggiungere altri 25 composti di origine antropica (cioè prodotti dall'uomo) con concentrazioni dell'ordine di µg/mc. L'atmosfera urbana

Tabella 1 – Composizione teorica dell'aria atmosferica

Sostanza	Concentrazione (ppm)
N ₂	780000
O ₂	209000
Gas rari	9344
H ₂ O	1000-3000
CO ₂	315
CH ₄	1,4
H ₂	0,5
CO	0,03-0,14
NO ₂	0,02-0,07
SO ₂	0,02
O ₃	0,02

contiene 48 ulteriori composti di origine antropica (µg/mc) e altri 88 presenti in concentrazioni dell'ordine di ng/mc. In totale 161 composti xenobiotici. Le sostanze inquinanti possono depositarsi per *fall out* (deposizione semplice – materiale particolare) o per *rain out* (deposizione umida).

Gli inquinanti poi, possono essere classificati in base alle sorgenti di emissione (fisse o mobili), lo stato fisico (aerosol, gas e vapori) e in primari e secondari. Primari sono gli inquinanti che vengono immessi direttamente nell'ambiente in seguito al processo che li ha prodotti. Gli inquinanti secondari sono invece quelle sostanze che si formano dagli inquinanti primari (sia antropogenici che naturali) a seguito di modificazioni di varia natura causate da reazioni che, spesso, coinvolgono l'ossigeno atmosferico e la luce. I principali inquinanti primari sono quelli emessi nel corso dei processi di combustione di qualunque natura, cioè il monossido di carbonio, il biossido di carbonio, gli ossidi di azoto (principalmente ossido nitrico), le polveri e gli idrocarburi incombusti. Nel caso in cui i combustibili contengano zolfo, si ha anche emissione di anidride solforosa. Dopo la loro emissione in atmosfera, gli inquinanti primari sono soggetti a processi di diffusione, trasporto e deposizione. Subiscono inoltre dei processi di trasformazione chimico-fisica che possono portare alla formazione degli inquinanti secondari, nuove specie chimiche che spesso risultano più tossiche e di più vasto raggio d'azione dei composti originari.

Fra i processi di formazione degli inquinanti secondari, particolare importanza è assunta dalla serie di reazioni che avvengono fra gli ossidi di azoto e gli idrocarburi in presenza di luce solare. Questa catena di reazioni porta all'ossidazione del monossido di azoto (NO) a biossido di azoto (NO₂), alla produzione di ozono (O₃) ed all'ossidazione degli idrocarburi, vi è formazione di aldeidi, perossidi, di acidi nitriloperacetici (PAN), acido nitrico, nitrati e nitroderivati in fase particellare, e centinaia di altre specie chimiche minori. L'insieme dei prodotti di queste reazioni viene definito **smog fotochimico**, che rappresenta una delle forme di inquinamento più dannose per l'ecosistema. L'uso del termine smog (da *smoke* e *fog*) è dovuto alla forte riduzione della visibilità che si determina nel corso degli episodi di inquinamento fotochimico, dovuta alla formazione di un grande numero di particelle di notevoli dimensioni.

Tabella 2 – Classificazione sostanze inquinanti

Sorgenti di emissione	- Fisse - Mobili
Stato fisico	- Aerosol - Vapori
Primari	- SO _x - NO _x - CO - CO ₂ - Idrocarburi - Metalli (Pb)
Secondari	- Acido solforico - Acido nitrico - Solfati - Nitrati - Perossidi - Aldeidi - Chetoni - Radicali instabili

Lo smog fotochimico è anche detto smog ossidante (tipo Los Angeles). Come già detto, esso è costituito prevalentemente da ossidi di azoto e da ozono, che da questi deriva (**Figura 1**), nonché da idrocarburi ed è peculiare delle città soleggiate e con intenso traffico veicolare. È necessaria anche una ridotta ventilazione che renda l'aria stagnante.

Figura 1 – Ciclo fotochimico degli ossidi di azoto

- NO₂ + radiazioni solari → NO + O
- O₂ + O → O₃
- O₃ + NO → NO₂ + O₂

Infine, esiste uno *smog riducente* (tipo Londra) o invernale. Questo smog è caratterizzato dalla presenza contemporanea di anidride solforosa e particolato. È presente nelle prime ore del mattino, mentre il primo è presente verso le 15, ora in cui è massimo l'irraggiamento solare. Normalmente gli inquinanti tendono ad andare verso l'alto trasportati dall'aria calda. Quando, durante l'inverno, si hanno le cosiddette gelate, accade il contrario e l'aria staziona (*inversione termica*). L'inversione termica si crea nelle città costiere con alle spalle le colline con conseguente innalzamento della temperatura nelle zone alte.

L'esposizione massiccia e concentrata nel tempo determina degli effetti acuti che richiamano l'inquinamento di Londra del 1952. In tale inverno, le condizioni meteorologiche stagnanti causarono un brusco incremento della concentrazione degli inquinanti nell'aria per parecchi giorni, il risultato fu l'aumento di più di tre volte della mortalità (circa 4000 morti in più). Le concentrazioni del biossido di zolfo raggiunsero concentrazioni di parecchie migliaia di µg/mc (1).

Attualmente si riscontrano più facilmente effetti a lungo termine. Questi comprendono BPCO (2), tumori polmonari (3), malattie dell'apparato cardiovascolare (4), etc.

Inquinanti di maggiore interesse: ozono, particolato, biossido d'azoto

Attualmente la concentrazione di biossido di zolfo è fortemente diminuita, cosicché l'attenzione si è spostata sull'ozono, il biossido d'azoto e il particolato.

Uno dei principali agenti ossidanti dell'inquinamento è rappresentato dall'ozono (5). Esso è un forte agente ossidante che si forma nella troposfera. Le concentrazioni nei centri cittadini tendono ad essere più basse di quelle riscontrabili nei sobborghi, principalmente come risultato dello scavenging dell'ozono da parte dell'ossido nitrico che si origina nel traffico.

La principale fonte di emissioni antropogeniche di **ossidi nitrosi** nell'atmosfera è la combustione fossile da fonti fisse (riscaldamento, produzione di energia) e veicolare (6). In condizioni ambiente, l'ossido nitrico è rapidamente trasformato in biossido d'azoto da ossidanti atmosferici come l'ozono.

L'inquinamento da particolato è una miscela di particelle solide, liquide o solide e liquide sospese nell'aria (7). È noto come l'apparato respiratorio disponga di filtri che si oppongono alla penetrazione di sostanze e particelle esogene. In termini pratici si distingue tra PM_{10} (particelle toraciche di diametro inferiore a 10 μm , che possono penetrare nelle basse vie respiratorie), $PM_{2.5}$ (particelle respirabili più piccole di 2.5 μm che possono penetrare nella regione polmonare in cui avvengono gli scambi gassosi), e particelle ultrafini più piccole di 100 nm che contribuiscono in poca misura alla massa del particolato, ma che sono abbondanti in termini numerici e offrono un'ampia superficie di contatto, che aumenta la penetrazione polmonare.

FUMO DI TABACCO

Il fumo del tabacco è una miscela gassosa contenente minute particelle liquide e solide in sospensione e può quindi essere definito un aerosol concentrato, nel quale si trova disperso materiale corpuscolato di piccolissime dimensioni, composto da una fase gas e una fase tar. Dalla grandezza delle particelle e dalla forza d'aspirazione del fumo dipende la deposizione delle particelle stesse: quelle di dimensioni più piccole penetrano profondamente nell'albero respiratorio fino ai bronchioli e agli alveoli, mentre quelle più grandi si fermano nelle prime vie respiratorie. Il fumo di tabacco viene definito come l'**aerosol ideale** in quanto gran parte della componente corpuscolata ha un diametro medio tale da raggiungere le medie e piccole vie respiratorie.

La composizione chimica del fumo del tabacco è complessa e variabile e dipende dalla qualità del tabacco, dalle lavorazioni cui è stato sottoposto e dal modo in cui viene fumato. Sono stati isolati circa 12.000 composti di cui circa 3.800 sono stati identificati. I principa-

li composti sono: l'ossido di carbonio, l'acido cianidrico, gli ossidi d'azoto, le aldeidi, i fenoli, gli alcaloidi (come la nicotina), l'arsenico, gli elementi radioattivi, gli idrocarburi aromatici policiclici.

I componenti del fumo di tabacco non sono tutti preesistenti nelle foglie di tabacco, ma per la massima parte si formano durante la combustione alla temperature che variano dai 600 agli 850 gradi, da altri composti presenti nelle foglie e che sono detti precursori.

La composizione chimica del fumo perciò dipende sostanzialmente da due ordini di fattori: la composizione chimica delle foglie del tabacco e le condizioni della combustione. Entrambi questi elementi sono a loro volta condizionati da molteplici altri fattori.

Per quanto concerne la composizione chimica delle foglie sono da tenere in particolare considerazione la selezione dei tabacchi e i metodi di coltivazione, i disinfettanti utilizzati, i processi di cura e di concia, l'aggiunta di sostanze a scopo umettante od aromatizzante.

Per quanto riguarda le condizioni della combustione, particolare importanza rivestono la temperatura di combustione, la forza e la durata dell'aspirazione (che condizionano l'ossigenazione della combustione e indirettamente anche la temperatura della combustione), la lunghezza della sigaretta e del mozzicone, la presenza o meno del filtro e il tipo di filtro che ha una notevole importanza nel trattenere una parte dei costituenti del fumo.

Anche nel fumo che si disperde nell'aria dell'ambiente nel periodo in cui il fumatore non aspira la sigaretta, e che va a costituire il fumo passivo, si trovano gli stessi composti che sono contenuti nel fumo aspirato. Anzi si può affermare che per quanto riguarda la nicotina e il catrame totale (catrame è tutto ciò che si deposita facendo raffreddare il fumo o disciogliendolo in adatti solventi e facendo poi evaporare il solvente) i valori presenti nel fumo che va nell'ambiente sono doppi o addirittura quadrupli di quelli presenti nel fumo aspirato; anche l'ossido di carbonio e gli altri gas sono presenti nel fumo dell'ambiente in quantità elevate. Si può pertanto affermare che respirando l'aria contaminata

dal fumo di tabacco, anche il non fumatore può assumere i componenti del fumo in quantità notevoli, anche se non pari a quelle introdotte dal fumatore, che naturalmente assomma alle sostanze inalate col fumo aspirato anche quelle assunte con il fumo respirato.

Il fumo di sigaretta contiene abbondanti quantità di radicali liberi dell'ossigeno, perossidi e perossinitriti, tutte molecole ossidanti (8), sia in forma gassosa che particolata. Si stima che la quantità di radicali introdotta sia nell'ordine di 10^{13} - 10^{18} radicali/sigaretta fumata (9).

Si possono distinguere due differenti gruppi di radicali liberi del fumo: radicali a lunga emivita presenti nella fase corpuscolata (fase tar) e radicali a breve emivita della fase aeriforme (fase gas). Il principale radicale della "fase tar" è costituito dal complesso chinone-idrochinone, un sistema redox molto attivo ed in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido e quindi a perossido di idrogeno e a radicale idrossilico (10). Il ciclo può essere sostenuto da equivalenti riducenti biologici (ascorbato, NAD(P)H e glutatione) che riducono le sostanze chinonoidi ossidate ai loro stati ridotti, rendendole capaci di riprodurre il radicale superossido. La fase acquosa del condensato del fumo di sigaretta può essere sottoposto al ciclo redox per un periodo di tempo considerevole nel fluido di rivestimento epiteliale dei fumatori. La fase tar è anche un efficace chelante metallico in cui il ferro viene chelato per produrre tar-semichinone+tar- Fe^{2+} , che può generare continuamente perossido di idrogeno.

La "fase gas" del fumo di sigaretta contiene alte concentrazioni di ossidanti/radicali liberi ($>10^{15}$ molecole per puff) (11), come piccoli radicali alchilici e alcossilici, dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata, O_2^- ed ossido nitrico. L'ossido nitrico e l' O_2^- reagiscono immediatamente a formare la molecola altamente reattiva del perossinitrito.

Il fumo di sigaretta **sidestream** contiene più di 10^{17} composti organici reattivi per puff, come monossido di carbonio, nicotina, ammoniaca, formaldeide, acetaldeide, crotonaldeide, acroleina, N-nitrosamine, benzo(a)pirene, benzene, iso-

prene, etano, pentano e altri composti organici genotossici e cancerogeni. Sono state anche calcolate le concentrazioni di questi composti reattivi presenti nel fluido di rivestimento epiteliale dopo inalazione di fumo di sigaretta (12).

RUOLO DEI RADICALI LIBERI NELLA PATOLOGIA UMANA

La vita dei radicali liberi è molto breve e si svolge nelle immediate vicinanze della sede di produzione. Tuttavia, se non sono subito neutralizzati da un accettore fisiologico, i radicali attaccano i diversi costituenti endocellulari entro un raggio d'azione variabile a seconda del tipo di radicale stesso (46). I radicali liberi esplicano la loro attività tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in una quantità tale da non poter essere inattivati dai sistemi di difesa della cellula. In questo caso sono in grado di reagire con tutti i costituenti della cellula e della matrice cellulare, determinando un condizione chiamata "stress ossidativo". Tutte le classi di molecole biologiche sono potenziali "targets" per l'attacco dei radicali liberi. Particolarmente dannosa è l'azione sul DNA che va incontro a scissione delle catene polinucleotidiche con eventuale formazione di ponti che possono provocare fenomeni di mutazione, carcinogenesi o morte cellulare (44).

Altra importante azione di ossidoriduzione i radicali liberi la esercitano nella genesi dell'enfisema polmonare. Infatti l'esposizione a sostanze ossidoriducanti, come quelle presenti nel fumo di sigaretta, determina una ossidazione del sito 358-metionina della molecola dell'alfa-1 antitripsina che viene inattivata, con conseguente squilibrio del sistema di difesa antielastasi polmonare (45). L'alfa-1 antitripsina è il principale rappresentante di un sistema di difesa antiproteasico. La detossificazione dei composti reattivi dell'ossigeno è uno dei prerequisiti della vita in condizioni aerobiche costituendo un importante sistema di difesa antiossidante di prevenzione, intercettazione e riparazione, che comprende agenti non enzimatici, noti come antiossidanti (*tocoferoli, antiproteasi, β-carotene, acido ascorbico, ubiquinolo, bilirubina, acido urico*, etc.) ed enzimatici (superossido-dismutasi, glutazione perossidasi e catalasi) (42).

OSSIDANTI ENDOGENI E DANNO TISSUTALE

È noto come il processo di fagocitosi dei leucociti polimorfonucleati sia associato alla formazione di perossido di idrogeno (13); quest'ultimo è il risultato di una reazione a due stadi: in un primo momento si forma anione superossido (O_2^-), a partire da ossigeno molecolare utilizzando NAPDH come donatore di equivalenti riducenti. Da due molecole di anione superossido, in presenza di protoni, si forma ossigeno molecolare e perossido di idrogeno; quest'ultimo, a sua volta, può essere trasformato in radicale ossidrilico ($-OH$). Il perossido di idrogeno, rappresenta il substrato per la reazione della mieloperossidasi; quest'ultimo enzima, presente nei granuli dei polimorfonucleati e liberato in seguito a stimolazione cellulare, riveste una notevole importanza per l'attività battericida dei leucociti.

Radicali liberi possono anche essere generati a partire dagli idroperossidi (PGG₂, 5-, 12- e 15-HPETE) che rappresentano il prodotto primario di ossigenazione dell'acido arachidonico ad opera della cicloossigenasi e di varie lipossigenasi. L'auto-inattivazione della cicloossigenasi e della lipossigenasi viene comunemente attribuita alla produzione di tali specie ossidanti (14).

Il danno indotto dall'anione superossido e dai suoi derivati ai costituenti extracellulari del tessuto connettivo può essere considerato il più significativo danno tissutale di tutto il processo infiammatorio. Esso infatti è in grado di depolimerizzare l'acido ialuronico (15) e di frammentare proteoglicani e collagene (16). Ossida proteine, lipidi, basi del DNA, enzimi del metabolismo intermedio. Inoltre l' α_1 -antitripsina viene rapidamente inattivata mediante ossidazione di un residuo di metionina (17), il che, associato ad un'attivazione dell'elastasi, espone i tessuti all'attività non controllata di questo enzima.

L' H_2O_2 è una molecola dotata di stabilità maggiore rispetto alle altre specie reattive dell'ossigeno. Rispetto agli altri ROS si è visto che causa specificamente un danno al DNA attraverso un meccanismo ferro e rame dipendente (18), questi ultimi ioni metallici sono indispensabili per la produzione di ROS dannosi.

In base all'entità dello stress ossidante, le cellule possono andare incontro a necrosi o apoptosi. A livello delle cellule endoteliali ed epiteliali, il danno da ossidanti può deteriorare anche la funzione di barriera alle macromolecole. Infine l' H_2O_2 e l' O_2^- possono causare la produzione di potenti chemotassine o aumentare l'adesione dei leucociti all'endotelio attraverso l'attivazione della trascrizione genica delle integrine mediata dal fattore nucleare (NF)-κB. Nei fumatori, quindi la produzione localizzata di ossidanti può dar origine ad una cascata che propaga la risposta infiammatoria e culmina nella distruzione del tessuto e nel malfunzionamento d'organo che accompagna la BPCO. Numerosi studi suggeriscono che i fagociti dei fumatori producano, in certe condizioni, quantità maggiori di specie reattive dell'ossigeno. Sia i macrofagi alveolari che i PMN del sangue periferico dei fumatori rilasciano più O_2^- di quelli dei non fumatori. È stata riscontrata una correlazione tra quest'ultimo fenomeno e l'iperreattività bronchiale dei pazienti con BPCO (19); tale rilascio è aumentato nelle riacutizzazioni della BPCO.

Diversi mediatori dell'infiammazione come citochine, radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto sono capaci di indurre l'emeossigenasi-1, che catalizza la degradazione dell'eme a biliverdina (e poi bilirubina) e monossido di carbonio. La bilirubina è un antiossidante. L'emeossigenasi-1 viene quindi vista come una protezione del danno cellulare ossidanti-mediato. Anche la iNOS (ossido nitrico sintetasi inducibile) è un enzima contenente eme e può essere indotto dagli stessi stimoli ossidativi.

La perossidazione lipidica è una fase importante del fenomeno dello stress ossidativo. Gli isoprostani e gli isoeicosanoidi sono composti simili alle prostaglandine prodotte dall'azione dei radicali liberi su di esse, indipendentemente dalla cicloossigenasi. Questi composti si formano in situ sui fosfolipidi di membrana, da cui sono derivati, presumibilmente dalla fosfolipasi A_2 (20). Gli isoprostani F_2 sono la serie più studiata. Almeno due isoprostani (8-epi-prostaglandina $F_2\alpha$ e 8-epi-prostaglandina E_2) hanno una potente attività biologica.

L'8-isoprostano è un potente vasocostrittore a livello renale e dell'arteria polmonare negli animali (21). Causa anche

Antiossidanti non-enzimatici	Antiossidanti enzimatici
Vitamina C	Superossido dismutasi
Vitamina E	Catalasi
Gas rari	Glutazione perossidasi
β -carotene	Eme ossigenasi-1
Acido urico	Tioredoxine
Glutazione	Perossiredossine
L-glutamyl-L-cisteinil-L-glicina	Glutaredossine

I principali enzimi antiossidanti dei polmoni, le loro localizzazioni e funzioni sono indicate nella seguente Tabella.

Enzima	Localizzazione polmonare	Funzione
Cu,Zn superossido dismutasi	Bronchiale, epitelio alveolare, macrofagi, fibroblasti, pneumociti	Elimina O ₂
Superossido dismutasi extracellulare	Epitelio bronchiale, macrofagi, neutrofili, pareti vasali, pneumociti	Elimina O ₂
Mn superossido dismutasi	Epitelio bronchiale, macrofagi, neutrofili, pareti vasali, pneumociti	Elimina O ₂
Catalasi	Macrofagi, fibroblasti, pneumociti	Da perossido d'idrogeno ad acqua
Glutazione perossidasi	Cellule di lavaggio, epitelio, macrofagi, altre cellule polmonari	Da idroperossidi organici a idrossidi organici
Eme ossigenasi-1	Alveolare, epitelio bronchiale, macrofagi, cellule infiammatorie polmonari	Da eme a monossido di carbonio, biliverdina
Perossiredossina	Alveolare, epitelio bronchiale, macrofagi	Antiossidante, meccanismi del segnale, eliminazione perossido d'idrogeno
Tioredoxina	Epitelio bronchiale, macrofagi	Modulazione trascrizionale, scambio tiolo-ditiolo Da Prot-S-S-Prot a Prot-SH
Glutaredossina	Alveolare, epitelio bronchiale, macrofagi	Da Prot-S-S-Prot a Prot-SH
Subunità catalitica della glutammato Cisteina ligasi	Alveolare, epitelio bronchiale, macrofagi	Sintesi di glutazione

broncoostrizione nei ratti e contrazione della muscolatura liscia bronchiale umana in vitro (22). Gli isoprostani hanno importanti attività in vitro che possono essere rilevanti nella fisiopatologia dell'aterosclerosi (23). Gli 8-isoprostani modulano l'attività piastrinica e inducono la mitogenesi nelle cellule muscolari lisce vasali. Un altro isoprostano 12-epi-prostaglandina F₂ α stimola la risposta proliferativa nei fibroblasti. Il meccanismo di azione degli isoprostani non è chiaro. Si pensava inizialmente che interagissero con i recettori dei trombociti. Prove farmacologiche dimostrano che questi

composti si comportano come agonisti del recettore dei trombociti nella muscolatura renale e delle arterie carotidi, ma come agonisti parziali o antagonisti nelle piastrine (24).

Infine, si è visto che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono essenziali per la trasduzione del segnale intracellulare e sono implicate in molte funzioni intracellulari che includono l'attivazione della proteinchinasi attivata dai mitogeni (MAP), l'espressione della ciclossigenasi 2, l'attivazione della proteinchinasi C, la fosforilazione della tiroxina e il rilascio di istamina (25).

DIFESE POLMONARI ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti rappresentano il principale meccanismo di difesa in vivo e in situ delle cellule contro lo stress ossidativo. Si conoscono due classi di antiossidanti (Tabella 3): antiossidanti non-enzimatici come vitamina E, C, β -carotene, glutazione e antiossidanti enzimatici come il sistema redox del glutazione che comprende glutammato cistein ligasi, glutazione reductasi, glutazione perossidasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi ed inoltre superossido dismutasi, catalasi, eme ossigenasi-1, perossiredossine, tioredossine e glutaredossine. Le due classi di antiossidanti spesso lavorano in tandem.

I polmoni e diverse cellule infiammatorie mostrano diversi profili antiossidanti. In base allo stato degli antiossidanti in una particolare regione e il loro peso specifico può iniziare uno specifico processo patologico. Tutte le principali varietà di malattie infiammatorie come asma, BPCO, fibrosi polmonare idiopatica, ARDS, interstiziopatie e displasie broncopulmonari condividono la caratteristica comune di un alterato rapporto ossidanti/antiossidanti.

FARMACI ANTIOSSIDANTI N-Acetilcisteina

La N-acetil-L-cisteina (NAC) è una sostanza dotata di azione mucolitico-fluidificante sulle secrezioni depolimerizzando i complessi mucoproteici e gli acidi nucleici. Tuttavia, la NAC possiede anche proprietà antiossidanti dirette ed indirette. È indicata infatti come trattamento antidotico nell'intossicazione da paracetamolo e nell'uropatia da iso- o ciclofosfamide. Il gruppo tiolico libero è capace di interagire con gruppi elettrofili dei ROS. (26,27). Inoltre ha un effetto antiossidante indiretto in quanto implicata nel metabolismo del glutazione (GSH). Il GSH è un tripeptide formato da acido glutammico, cisteina e glicina. Protegge contro agenti tossici endogeni (respirazione cellulare aerobica e metabolismo dei fagociti) ed esogeni (NO, ossido solforico e altri componenti del fumo di tabacco e dell'inquinamento). Il gruppo sulfidrilico della cisteina neutralizza questi agenti. Il GSH si forma principalmente nel fegato e nei polmoni. La NAC agisce come precursore del GSH dato che penetra facilmente nelle cellule ed è in seguito deacetilata a formare cisteina. I livelli cellulari di acido

glutammico e glicina sono elevati, per cui è la cisteina a rappresentare il fattore limitante nella sintesi del GSH. Non si può somministrare direttamente la L-cisteina a causa del basso assorbimento intestinale, la scarsa idrosolubilità ed il rapido metabolismo epatico. Alcune delle attività antiossidanti della NAC sono state studiate in polmoni di topo. È stato visto che essa ripristina i livelli di GSH ridotti dal fumo di sigaretta, attenua il danno da perossido d'idrogeno delle cellule epiteliali (28) e riduce l'attivazione dell'NF- κ B in alcune cellule (29).

È noto come i pazienti BPCO spesso presentino un aumento delle alterazioni morfologiche dei globuli rossi. Il trattamento con 1200 o 1800 mg/die di NAC per 2 mesi ha migliorato la forma dei globuli rossi, ridotto le concentrazioni di H_2O_2 dal 38 al 54% ed aumentato i livelli di tioli dal 50 al 68% (30). Nei pazienti con BPCO stabile si osservano livelli aumentati di H_2O_2 nell'esalato condensato, con un ulteriore incremento durante le riacutizzazioni (31). Il trattamento con NAC 600 mg/die per 12 mesi ha ridotto le concentrazioni di H_2O_2 rispetto al placebo dopo 6 mesi di trattamento (32). A dosi di 1200 mg/die la riduzione è stata osservata dopo 30 giorni, suggerendo un effetto dose-dipendente (33).

Sono stati condotti altri studi su pazienti BPCO focalizzati su outcome clinici quali il declino del FEV_1 o il numero di riacutizzazioni. Uno dei principali è rappresentato dal trial BRONCUS (34) che ha coinvolto 50 centri e reclutato 523 pazienti BPCO trattati con NAC 600 mg/die e seguiti per 3 anni. In questo studio affermano che non si sono registrate differenze, rispetto al placebo, sul declino annuo del FEV_1 , né sul numero delle riacutizzazioni. Si è avuto un effetto sull'iperinflazione dei pazienti non trattati con corticosteroidi inalatori. Resta da indagare l'efficacia di dosi superiori di NAC (1200 o 1800 mg/die). Un'ulteriore strada da percorrere è rappresentata dallo studio dell'azione della NAC sugli effetti sistemici della BPCO. Infatti, come ribadito anche nella recente definizione ERS/ATS (35), la BPCO determina conseguenze su organi extra-polmonari. Infiammazione e stress ossidativo non si limitano al polmone, ma coinvolgono l'intero organismo con ripercussioni a livello muscolare, nutrizionale, osteo-scheletrico, cardiovascolare, neurologico e quindi sulla qualità della vita del paziente. Se fossero di-

mostrati i benefici di un antiossidante sugli effetti sistemici della BPCO, questi sarebbero di maggiore importanza rispetto al miglioramento della funzionalità respiratoria.

Carbocisteina sale di lisina

Diversi studi hanno preso in considerazione le proprietà antiossidanti della carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys). Quest'ultimo è un farmaco mucoattivo la cui efficacia terapeutica è comunemente attribuita alla capacità di normalizzare le caratteristiche reologiche del muco incrementando le sialomucine rispetto alle fucomucine. Tuttavia essa avrebbe anche effetti antiossidanti quale scavenger di radicali liberi.

In questa molecola l'atomo di zolfo non è di natura tiolica, ma è impegnato in un legame tioetereo che non lo rende disponibile per l'equilibrio tiolo-disolfuro (vedi coppia glutatione-glutatione ridotto). D'altra parte anche i tioeteri presentano notevole reattività nei confronti degli ossidanti, generando solfossidi e solfuri. Uno studio (36) ha evidenziato il ruolo antiossidante dei residui di metionina (un tioetere come la carbocisteina). Inoltre, è stato dimostrato l'effetto antiossidante della carbocisteina nei confronti dell'acido ipocloroso (37), quest'ultimo capace direttamente di ossidare i residui di metionina presenti nell' α 1-antitripsina, inattivando così il principale meccanismo di regolazione dell'elastasi. Analoga azione di scavenger verrebbe esercitata sul radicale idrossilico, come dimostrato, in seguito al trattamento con SCMC-Lys, dalla riduzione di IL-8 (38), citochina chemiotattica la cui sintesi sarebbe mediata dal radicale idrossilico. La carbocisteina si è dimostrata inoltre in grado di proteggere la funzione mucociliare dal danno provocato dall'azione ossidoriducente dell'ozono (39). Come già detto in precedenza, l'ozono, come molte altre sostanze ad azione ossido-riducente, è responsabile del danno che si estrinseca a carico di molte componenti dell'apparato respiratorio determinando alterazioni morfologiche e funzionali fra cui modificazioni della clearance-mucociliare. Un recente studio ha inoltre evidenziato che SCMS-Lys è in grado di stimolare la secrezione di glutatione ridotto, uno dei principali agenti antiossidanti endogeni in linee cellulari di epitelio respiratorio. Infine, è noto come nell'esalato condensato di pazienti con BPCO si riscontrino concentrazioni au-

mentate di 8-isoprostano e interleuchina-6.

A conferma degli studi sperimentali, uno studio clinico condotto su 40 soggetti con BPCO riacutizzata, di cui 15 trattati con SCMC-Lys 2,7 g/die per via orale per 6 mesi, ha dimostrato una marcata riduzione dello 8-isoprostano, un marcatore dello stress ossidativo, e della interleuchina 6 (IL-6), un marcatore dell'infiammazione, nell'esalato condensato dei pazienti trattati con SCMC-Lys, rispetto ai livelli riscontrati al momento della riacutizzazione ed ai controlli non trattati. In questo studio è stata anche evidenziata una correlazione tra i livelli di 8-isoprostano e IL-6 (40). Questo è il primo studio clinico che ha messo in evidenza le proprietà non solo mucoregolatrici, ma anche anti-ossidanti della SCMC-Lys. Dato il riconosciuto ruolo oncogenetico dei ROS contenuti nel fumo di tabacco (41) queste osservazioni sul ruolo antiossidante, oltre che mucoregolatore ed antinfiammatorio, della SCMC-Lys rivestono una particolare importanza nell'ottica di una possibile prevenzione della BPCO e del cancro del polmone nei soggetti fumatori ed ex-fumatori (42).

CONCLUSIONI

Inquinamento atmosferico e fumo di tabacco rappresentano le principali fonti di ossidanti esogeni. Questi, insieme alle fonti ossidative endogene, possono essere responsabili di danni a livello broncopolmonare. In questo contesto si impongono due sostanze farmacologiche con proprietà mucolitiche ed antiossidanti con possibili interessanti effetti protettivi. Una volta dimostrati gli effetti antiossidanti di tali molecole in vitro o su variabili biologiche, la sfida per il futuro sarà dimostrarne l'efficacia sulla storia naturale della malattia e i loro effetti sistemici nell'ottica del miglioramento della qualità della vita del paziente. Lo studio di Scala e coll. dimostra che una concentrazione di SCMC-Lys uguale a 10^{-4} M permette il recupero del 77% dell'attività antielastica. Questi dati risultano particolarmente interessanti se confrontati con l'attività di NAC. Se l'attività protettiva di NAC e SCMC-Lys alle concentrazioni più elevate (10^{-4} M) sembra paragonabile, l'effetto antiossidante di SCMC-Lys risulta più marcato alle dosi più basse: alla concentrazione di farmaco di $2,5 \times 10^{-5}$ M, il recupero di attività antielastica è pari al 67% per SCMC-Lys ed è descritto essere del 45% per NAC. ■

Bibliografia

1. Ministry of Health. Mortality and morbidity during the London fog of December 1952. Reports on Public Health and Medical Subjects No 95. London: HMSO, 1954.
2. Sunyer J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Eur Respir J* 2001; 17:1024-33.
3. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287: 1132-41.
4. Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect* 2001; 109 (suppl 4):483-86.
5. Thurston GD, Ito K. Epidemiological studies of acute ozone exposure and mortality. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; 11: 286-94.
6. Twigg MV. Controlling automotive exhaust emissions: successes and underlying science. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2005 Apr 15;363(1829):1013-33.
7. Nyberg BF, Pershagen G. Epidemiologic studies on the health effects of ambient particulate air pollution. *Scand J Work Environ J Health* 2000; 26 (suppl 1): 49-89.
8. Pryor WA. Biological aspects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 659-676.
9. Zagà V, Gattavecchia E. Radicali liberi e fumo di sigaretta. *Giorn. It. Mal. Tor.* 2002; 56, 5: 375-391.
10. Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 7:9-15.
11. Church DF, Pryor WA: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 1985; 64: 111-126.
12. Eiserich JP, van der Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1490S-1500S.
13. Iyer G.Y.N. et al.: Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature (London)* 1961; 192:535-537.
14. Egan R.W. et al.: Mechanism for irreversible selfdeactivation of prostaglandin synthetase. *J.Biol.Chem.* 1976; 251:7329-7336.
15. Mc Cord J.M.: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974; 185:529-531.
16. Greenwald R.A. et al.: Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. *Arthritis Rheum*1976; 9: 799-806.
17. Brot N. e Weissbach H.: The biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1982; 7: 137-140.
18. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J* 1998; 335: 85-94.
19. Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 57-61.
20. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LK. Non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10721-10725.
21. Bannerjee M, Kang HK, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-F_{2α}, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol* 1992; 263: H660-H663.
22. Kawikowa I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkari-mi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-F_{2α} novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 590-596.
23. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2309-2315.
24. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ. The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet receptor antagonists. *Prostaglandins* 1992; 44: 155-163.
25. Giannella E, Pistelli A, Palmerani B, Gambassi F, Mannaioni PE. Histamine release by free radicals: relationship with the signal transduction system. *Agents Actions* 1989; 27: 131-140.
26. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50: 31-42.
27. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-597.
28. Cotgreave IA, Moldeus P. Lung protection by thiol containing antioxidants. *Bull Eur Physio-pathol Respir* 1987; 23: 275-277.
29. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor κB: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 221-237.
30. Schmid G, Li Bianchi E, Straface E, et al. N-acetylcysteine (NAC) counteracts erythrocyte damage and is useful in the management of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: A227.
31. Dekhuijzen PNR, Aben KKH, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813-816.
32. Kasielski M, Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2001; 95: 448-456.
33. De Benedetto F, Aceto A, Formisano S, et al. Long-term treatment with N-acetylcysteine (NAC) decreases hydrogen peroxide level in exhaled air of patients with moderate COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: A725.
34. Decramer M, et al. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 1552-60.
35. Celli BR, MacNee W, and committee members. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932-946.
36. Vogt W. Oxidation of Methionyl residues in proteins: tools, targets and reversal. *Free Radical Biology and Medicine* 1995; 18 (1): 93-105.
37. Scala A, Allegretti M. Carbocisteina sale di lisina (SCMC-Lys): azione antiossidante in vitro nei confronti dell'acido ipocloroso (HClO) e mantenimento dell'equilibrio elastasi-antielastasi. *Giorn. It. Mal. Tor.* 54, Supp. 3, 2000.
38. Brandolini L, Allegretti M, Berdini V, Cervellera MN, Mascagni P, Rinaldi M, Melillo G, Ghezzi P, Mengozzi M, Bertini R. Carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-LYS) is a selective scavenger of reactive oxygen intermediates (ROIs). *Eur Cytokine Netw.* 2003 Jan-Mar; 14(1): 20-6.
39. Rampoldi C, Caminiti G, Centanni S, Noavero NE, Abraham WM, Allegra L. Contributo personale sulla protezione da esposizione all'ozono da parte della Carbocisteina (SCMC). *Giorn. It. Mal. Tor.* 2000; 54, Supp. 3.
40. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Stefano A, Di Gioia G, Servidio G, Gramiccioni E. Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *Eur J Pharmacol.* 2004 Nov 28;505(1-3):169-75.
41. Zagà V, Mura M, Fabbri M. Ruolo oncogenetico dei radicali liberi nel fumo di tabacco. *Tabaccologia* 2003; 2:27-32.
42. Mura M. Mucolitici e mucoregolatori nel trattamento della broncopneumopatia cronica ostruttiva. *Tabaccologia* 2005; 2: 27-30.