

Ruolo oncogenetico dei radicali liberi nel fumo di tabacco

Oncogenic role of reactive oxygen species in tobacco smoke

V. Zagà, M. Mura, M. Fabbri

Riassunto

I radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species - ROS) sono specie molto reattive poiché possiedono un numero dispari di elettroni e tendono facilmente ad accoppiare l'elettrone spaiato nell'orbita esterna, dando origine a reazioni a catena in grado di automantenersi e amplificarsi. Lo stress ossidativo deriva da uno squilibrio tra specie ossidanti e difese antiossidanti all'interno dell'organismo e può essere definito come una aumentata esposizione agli ossidanti e/o una ridotta capacità di difesa degli antiossidanti. Il fumo di sigaretta rappresenta una formidabile sorgente di ROS (10^{15-17} per aspirata), i quali si possono suddividere in due differenti gruppi: radicali a lunga emivita nella fase corpuscolata (fase tar) e radicali ad emivita breve 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. I ROS infatti non agiscono solo danneggiando direttamente l'epitelio polmonare, ma possono anche modificare il DNA, inducendo mutazioni che comportano un aumento del potenziale neoplastico.

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, due to an odd number of electrons and they easily tend to couple the unmatched electron, giving rise to chain reactions that are able to automaintain and amplify themselves. The oxidative stress results from an imbalance between oxidative species and antioxidants defences in the human organism, and it can be defined as an increased exposure to oxidants and/or a reduced defensive capacity of the antioxidants. Cigarette smoke is an extraordinary source of ROS (10^{15-17} 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. ROS in fact do not operate only by damaging directly the pulmonary epithelium, but also causing alterations of DNA, and therefore inducing mutations that imply an increased neoplastic potential.

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

Introduzione

Il crescente interesse in campo medicoscientifico e lo studio dei meccanismi patogenetici mediati dai radicali liberi costituisce oggi un argomento di viva attualità ed interesse per le recenti e numerose conferme di una loro implicazione nella patologia umana, anche neoplastica.

Le prime osservazioni sulla riduzione dell'ossigeno molecolare e delle sue

capacità di ossidare composti organici ed enzimi risalgono al 1931, ad opera di Haber e Willstatter. In seguito Haber e Weiss nel 1934 spiegarono la conversione dell'ossigeno in radicali idrossilici. Ma la reale portata di queste reazioni fu compresa soltanto in seguito alla scoperta nel 1969, da parte di McCord e Fridovich, dell'enzima superossido dismutasi (SOD) e della descrizione della reazione di trasformazione (1). Ciò permise di spiegare

come i metaboliti dell'ossigeno siano prodotti normalmente nella cellula vivente e che una famiglia di superossido dismutasi, di catalasi e di perossidasi agisca come meccanismo di difesa intracellulare nei confronti della trasformazione di potenti composti ossidanti. In seguito apparve chiaro che estesi danni tissutali potessero riferirsi sia ad una sovrapproduzione di prodotti intermedi dell'ossigeno che ad una diminuzione di questi

Vincenzo Zagà: Presidio Pneumotisiologico, Azienda ASL Città di Bologna

Marco Mura: Dottorato di Ricerca in Scienze Pneumo-cardio-toraciche, UNIBO

Mario Fabbri: Direttore della Scuola di Specializzazione in Malattie dell'Apparato Respiratorio, UNIBO

enzimi intracellulari, che con un termine piuttosto colorito sono stati chiamati scavenger (spazzini). Nel 1976 fu evidenziato da Babior et al. che i neutrofili, attivati in seguito ad uno stimolo come il fumo di tabacco o una infezione microbica, producono una quantità notevole di radicali liberi dell'ossigeno (2).

I radicali liberi dell'ossigeno: origine e meccanismo d'azione

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 perossidrilico (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 ROS svolgono un ruolo fondamentale in molte reazioni utili all'interno dell'organismo, come le ossidazioni mediate dal citocromo P450, distruggendo i microrganismi e consentendo un buon funzionamento della muscolatura liscia (3).

Il citocromo P450 è una proteina contenente il complesso eme e trae vantaggio dalla reattività della combinazione ferro-ossigeno per catalizzare l'ossidazione di vari composti endogeni e xenobiotici. Il citocromo P450, inoltre, agisce come una perossidasi in cui i perossidi

vengono utilizzati come donatori di ossigeno. Quando l'ossidazione di un substrato viene catalizzata dal citocromo P450, con NADPH/O₂ o perossidi come donatori, i ROS svolgono un ruolo fondamentale nel ciclo della reazione (3).

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 come una aumentata esposizione agli ossidanti e/o una ridotta capacità di difesa degli antiossidanti (Tab.1).

TAB. 3. Principali ROS e sostanze antiossidanti nell'organismo umano (Del Donno et al 1999, modificata).

specie reattive all'ossigeno (ROS) coinvolte nei processi ossidoriduttivi		sostanze antiossidanti: concentrazioni nel plasma e nel fluido di rivestimento epiteliale		
radicale anione superossido	O_2^-		plasma	ELF
radicale idrossile	OH^\cdot	acido ascorbico	40	100
radicale perossidrossile	HO_2^\cdot	glutazione	1,5	100
perossido d'idrogeno	H_2O_2	acido urico	300	90
acidi ipotalosi	HOCl	bilirubina	10	-
	HOBr	α -tocoferolo	25	2,5
radicali perossili	$R-OO^\cdot$	β -carotene	0,4	-
radicali alcossili	$R-O^\cdot$	albumina SH	500	70
idroperossidi	$R-OOH$			

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 (5).

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 (6).

Il GSH svolge un ruolo importante nei meccanismi di detossificazione e nella protezione delle cellule contro gli ossi-

danti. 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 (7)

Le specie radicaliche sono molto reattive perché possiedono un numero dispari di elettroni e tendono facilmente ad accoppiare l'elettrone spaiato, sia prelevando un elettrone da un'altra molecola sia cedendo il proprio elettrone. Qualunque sia la reazione che si verifica (cessione o acquisizione dell'elettrone), la specie non-radicalica si trasforma in radicale libero capace di estendere e propagare il danno, in una reazione a catena in grado di automantenersi e amplificarsi. La reazione termina in una fase in cui i radicali liberi vengono "consumati" attraverso una ricombinazione in prodotti stabili, detto processo di arresto della reazione a catena (8).

I processi quantitativamente più

importanti nell'innesco e mantenimento di queste reazioni sono la riduzione mono-elettronica dell'ossigeno e la perossidazione lipidica.

Infatti l'azione catalitica di una grande quantità di enzimi cellulari implica il trasferimento di singoli elettroni con la conseguente produzione di intermedi radicalici; allo stesso risultato porta l'attività delle catene respiratorie di trasporto elettronico (4).

Numerose sono quindi le fonti intracellulari di radicali liberi: la membrana plasmatica, il reticolo endoplasmatico, i mitocondri, i perossisomi e la frazione citoplasmatica solubile (4).

Oltre a questo molti idrocarburi aromatici policiclici (PAH), presenti nel fumo di tabacco, vengono trasformati nel corso del loro metabolismo cellulare in intermedi radicalici del sistema microsomiale, che dipende dagli isoenzimi del citocromo P450 (4). L' O_2^- viene generato da reazioni di autoossidazione, come l'ossidazione dei chinoni e dei polifenoli, da rea-

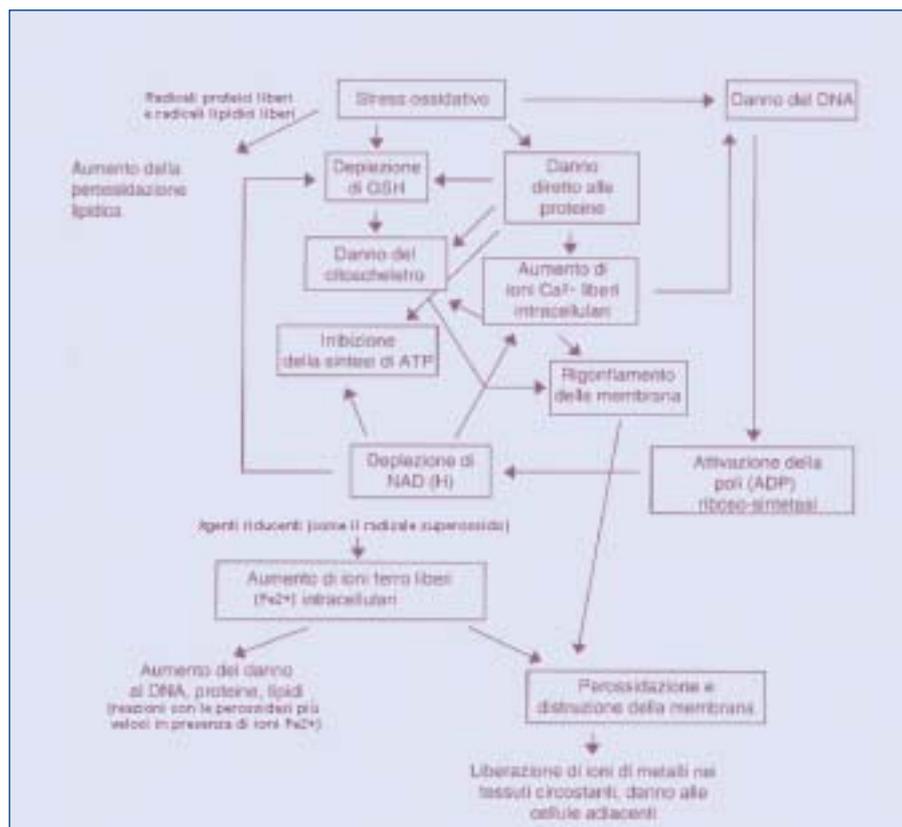


FIG. 1: Meccanismi di interazione che causano un danno ossidativo cellulare (Halliwell in Allegra et al 1992, modificata).

zioni enzimatiche, come la dissociazione della xantina da parte della xantina ossidasi, da fattori ambientali, come le radiazioni ultraviolette e gli ioni metallici o dall'attivazione metabolica dei polimorfonucleati neutrofilici (PMN) e dei macrofagi, attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi, un complesso enzimatico legato alla membrana (9,10).

Infatti la vita dei radicali liberi è molto breve e si svolge nelle immediate vicinanze della sede di produzione. Tuttavia, se non sono 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 (13). Qualunque sia il meccanismo d'azione attraverso cui si formano, i radicali idrossilici reagiscono velocemente con la maggior parte delle molecole che incontrano nelle cellule viventi, soprattutto con le proteine, con i carboidrati e con il DNA, dando origine a radicali proteici liberi, radicali lipidici liberi e radicali DNA liberi. I primi due tipi di radicali sono responsabili rispettivamente di inattivazioni enzimatiche metaboliche di ogni tipo e di interazioni con le membrane cellulari e formazione di lipidi perossi-

di. I radicali DNA liberi, attraverso la formazione di mutageni, sono in grado di provocare rotture e modificazioni.

L'OH[•] è il ROS più reattivo e può essere generato attraverso la radiolisi dell'acqua da parte delle radiazioni ionizzanti; tuttavia la maggior parte del radicale idrossilico si origina in vivo dalla dissociazione dell'H₂O₂. Tale molecola è estremamente reattiva ed è in grado di danneggiare o modificare biomolecole quali acidi nucleici, proteine, polisaccaridi, acidi grassi insaturi di membrana; l'emivita dell'OH[•] è pari a 10⁻⁹ secondi e pertanto la formazione dell'OH[•], per poter causare danni, deve avvenire nelle vicinanze del target (DNA o altro) ed essere quindi "site-specific". Se l'OH[•] reagisce col DNA, questo può portare alla formazione di basi del DNA idrossilate o a strand breaks (11,12).

Per quanto riguarda la quantificazione dello stress ossidativo in vivo, la scoperta degli isoprostani (IsoPS) quali prodotti della perossidazione lipidica non enzimatica, ha aperto nuove prospettive nello studio del ruolo dei ROS nella fisiopatologia e nello studio della patogenesi di varie malattie. Gli F₂-isoprostani sono del-

le prostaglandine che si originano dalla perossidazione dell'acido arachidonico; la loro valutazione quantitativa nel plasma sanguigno mediante spettrofotometria di massa si è dimostrata essere una accurata misura dello stress ossidativo in vivo (14).

Nei soggetti fumatori, infatti, i livelli di IsoPS sono significativamente più elevati che nei controlli, mentre si riducono altrettanto significativamente dopo astinenza dal fumo per 2 settimane (14).

Il surfattante polmonare, le cellule epiteliali e le cellule endoteliali del polmone contengono substrati per gli agenti ossidanti in elevate concentrazioni.

Il fumo di sigaretta contiene altrettanto elevate concentrazioni di ROS (40), 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 PMN nel fluido broncopulmonare e i particolati del fumo possono attivare queste cellule, che quindi produrranno maggiori quantità di ROS (15).

Ciò è stato evidenziato in una diminuzione dei livelli di Vitamina C e di glutazione e in un aumento dei livelli di perossidazione lipidica nel sangue in un gruppo di fumatori adulti (16).

Anche il materiale estratto dal catrame contenuto nel fumo si è dimostrato in grado di produrre H₂O₂ e conseguente danno al DNA (4-17). Un radicale semichinone contenuto nel catrame, infatti, è indefinitamente stabile e può essere osservato con metodi ESR (electron spin resonance); estratti acquosi di catrame, che contengono questo radicale, riducono l'ossigeno a O₂^{•-} e perciò producono H₂O₂ e OH[•] (18).

Fumo di sigaretta e danno al DNA

Pryor e collaboratori 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 chinoneidrochinone (10¹⁷ spin/g), un sistema

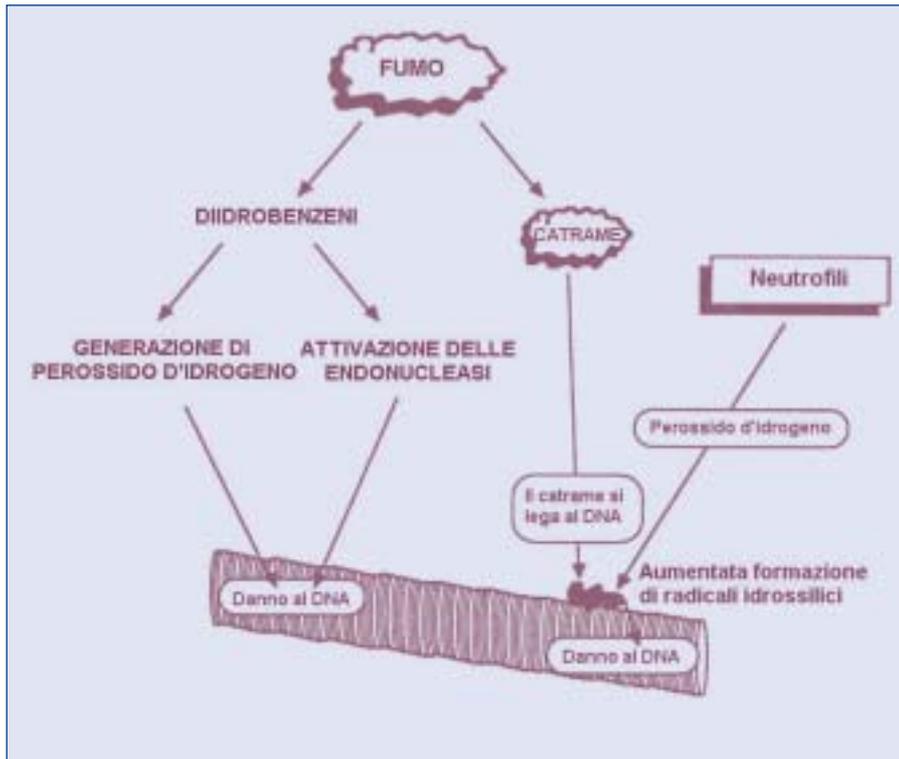


FIG.2: Meccanismi di interazione che causano un danno ossidativo cellulare (Halliwell in Allegra et al 1992, modificata).

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^{15-17} per aspirata di fumo di sigaretta) dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata (8,19,20). Anzi, recenti studi hanno evidenziato che il carico sequenziale di ROS che si sviluppa ad ogni aspirata di sigaretta è di gran lunga superiore a quello finora conosciuto, a causa di una reazione *buia*, che per essere evidenziata con la tecnica di chemiluminescenza ha bisogno della presenza di uno scintillante come il 2,5-difenilossazolo (40).

Il fumo di sigaretta è una miscela carcinogena completa, dal momento che può agire sia come iniziatore che come promotore, e contiene numerosi composti cancerogeni, quali PAH, diidrobenzene, N-nitrosamine, amine eterocicliche, Polonio 210, aldeidi e appunto i ROS (21).

Il danno al DNA può essere causato sia da sostanze mutageniche dirette e indirette prodotte dall'uomo con il fumo di tabacco, che da agenti endogeni come i ROS, o ancora può essere dovuto all'azione di endonucleasi DNA-specifiche (22).

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

La formazione di strand-breaks indotti dall'esposizione al fumo su DNA cellulare isolato viene inibita parzialmente dalla catalasi, suggerendo che l' H_2O_2 e l' $OH\cdot$ rivestono un ruolo importante nel danno genotossico (23).

L' H_2O_2 ha di recente mostrato di indurre metaplasia squamosa in un modello colturale di trachea di criceto. Visto che la metaplasia squamosa è associata con lo sviluppo del carcinoma broncogenico, la presenza di H_2O_2 nel fumo di tabacco può rivestire un ruolo rilevante per le sue proprietà carcinogeniche (24).

Secondo le osservazioni di Leanderson, che ha studiato la formazione di DNA-single strand breaks (DNA-SSB) e della base modificata 8-idrodeossiguanosina (8-OH-dG), entrambi marker di danno ossidativo del DNA, in cellule polmonari umane in coltura dopo esposizione al fumo di tabacco, la formazione di DNA-SSB osservata era dose- e tempo-dipendente dall'esposizione. Lo stesso accadeva dopo esposizione a H_2O_2 ed a idrochinone (un diidrobenezene), ma in

questo caso il danno non aumentava col passare del tempo (25). Anche Kiyosawa e coll. hanno riscontrato un aumento di 8-idrossi-ossiguanosina, uno dei prodotti del danno ossidativo a carico del DNA, in leucociti umani periferici (26).

La catalasi annullava quasi totalmente la formazione di DNA-SSB dopo esposizione all' H_2O_2 e ne causava una riduzione anche dopo esposizione a fumo di tabacco; anche l'agente chelante lipofilico del ferro o-fenantrolina e lo scavenger dell' $OH\cdot$ (altamente permeabile e non tossico) dimetiltiourea si sono dimostrati in grado di ridurre la formazione di DNA-SSB in entrambi i casi, mentre il trattamento con acido aurintricarbossilico (AT) (un composto noto per le sue capacità di ridurre l'attività endonucleasica) era efficace solo dopo la esposizione al fumo di tabacco (25).

La formazione dell'addotto 8-OH-dG veniva osservata solo successivamente ad esposizione al fumo di tabacco; si ritiene che questo tipo di mutazione del DNA sia mediata dall' $OH\cdot$. La ragione per cui non si osservava formazione di 8-OH-dG dopo esposizione all' H_2O_2 forse è costituita dal fatto che l'esposizione ad un singolo agente quale l' H_2O_2 non disturba i sistemi riparativi intracellulari del DNA e che quindi l'8OHdG eventualmente formato si viene immediatamente riparato (25).

L'incorporazione di un gruppo OH nella posizione C-8 della guanosina modifica il campo elettrostatico della molecola e può pertanto modificare i sistemi riparativi del DNA o l'azione della DNA polimerasi durante la replicazione. Recentemente la formazione di addotti 8-OH-dG si è dimostrata mutagenica nel genoma del fago M13mp19 (1-41) ed in grado di causare sostituzioni guanosina_timina e adenosina_citosina nel DNA M13mp2 dell'E. Coli (27).

Lo stesso Leanderson ha studiato anche il danno al DNA prodotto su cellule polmonari umane in coltura dal catrame delle sigarette, e in particolare la formazione di DNA-SSB indotte da PMN e dall' H_2O_2 (25).

L'estratto di catrame da solo non causava alcun danno genotossico, ma si osservava un significativo aumento di DNA-SSB quando le cellule venivano anche esposte all' H_2O_2 dopo l'estratto di

catrame. Lo stesso fenomeno si osservava anche nelle cellule esposte a PMN attivati con forbolo miristato acetato (PMA) (25).

È possibile che le cellule il cui DNA è stato "impresso" dal catrame o altri composti organici unipolari derivati dal fumo siano più sensibili al danno genotossico causato dai ROS generati dai PMN durante l'infiammazione (25).

Nessuna formazione di DNA-SSB veniva osservata invece in presenza di catalasi, indicando che l' H_2O_2 è importante per il danno al DNA indotto dai PMN (25).

Questi risultati suggeriscono che la formazione di DNA-SSB fumo-indotta sia legata all'azione dell' OH^{\cdot} generato dopo la dissociazione di H_2O_2 sito-specifica e forse all'azione delle endonucleasi che possono essere attivate dai diidrobenceni quali l'idrochinone. Quest'ultimo agisce in senso genotossico probabilmente non solo attivando le endonucleasi ma anche attraverso la sua azione autoossidante e generante H_2O_2 (25).

In effetti l'idrochinone ha mostrato di poter indurre foci caratterizzati da alterazioni enzimatiche nei ratti e scambi di materiali tra coppie di cromatidi nei linfociti umani (28-29); può inoltre legarsi al DNA e formare addotti deossiguanosina-idrochinone (30).

Il condensato di fumo di sigaretta, ed in primo luogo la frazione acida che contiene diidrobenceni quali l'idrochinone e il catecolo (o pirocatechina), si è dimostrato essere direttamente mutageno, portando alla inattivazione di geni soppressori importanti nella carcinogenesi polmonare (31).

Recenti studi in vivo effettuati utilizzando il metodo TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labeling) e le microscopia a trasmissione elettronica (TEM) hanno confermato i risultati in vitro, vale a dire che **la formazione di DNA-SSB e la necrosi sono i meccanismi preminenti del danno prodotto dal fumo sulle cellule epiteliali polmonari** (32).

Un'altra ipotesi sul potenziale di danno genotossico del fumo è quella legata al recettore aril-idrocarbore (AhR), che sembra potenziare in vivo la tossicità genetica del benzopirene (un PAH) e del condensato di fumo di sigaretta.

Utilizzando un antagonista di tale recettore, il 3'-metossi-4'-nitroflavone (3'M4'NFR), a varie dosi sui topi esposti al benzopirene, il danno cromosomico è stato valutato mediante uno score della frequenza di micronuclei nei reticolociti del sangue periferico delle cavie; è stata così confermata l'azione protettiva dell'antagonista sul danno citotossico e genotossico indotto dal benzopirene (33).

Una documentata azione del benzopirene, tra l'altro, è costituita dalla formazione di addotti non solo del DNA nucleare (nDNA) ma soprattutto del DNA mitocondriale (mtDNA); la formazione di addotti, che sono ritenuti essere gli iniziatori della carcinogenesi polmonare, è stata misurata in vari organi di ratto, tra cui il polmone, attraverso tecniche molecolari dosimetriche, quali la spettrofotometria a fluorescenza sincrona. Ad ulteriore riprova di questo, lo stesso fenomeno è stato osservato anche dopo esposizione al fumo di sigaretta (34).

In uno studio condotto su organi isolati di ratto esposti per 5 giorni alla settimana e 6 ore al giorno al fumo di sigarette Kentucky 2R1 (particolato totale pari a 73-93 mg/m) la formazione di DNA addotti è stata misurata mediante (32)P-postlabelling. Le modificazioni del DNA raggiunsero i massimi livelli dopo 4-5 settimane di esposizione, non solo nel polmone ma anche a livello dell'epitelio tracheale, delle cellule del lavaggio broncoalveolare (BAL), del cuore, fegato, vescica e testicolo (35).

Il danno ossidativo correlato al fumo fu dimostrato attraverso il rilievo di un significativo incremento della 8-idrossi-2'-deossiguanosina nel DNA polmonare; contemporaneamente venivano riscontrate una induzione progressiva nel tempo dell'attività delle aril-idrocarbore idrossilasi microsomiale, un aumento dell'attività della glutatione-S-transferasi citosolica e una moderata ma progressiva deplezione del glutatione ridotto. Interrompendo l'esposizione per una settimana, i livelli di DNA-addotti si riducevano significativamente nel polmone ma non nel BAL. La selettiva localizzazione e la differente persistenza di queste modificazioni nucleotidiche nei vari organi di ratto suggeriscono che l'esposizione al



Cristallografia della struttura della Vitamina C

fumo ad elevate concentrazioni espone al rischio di sviluppare malattie legate alle mutazioni genetiche (36).

L'esposizione sistemica a carcinogeni derivati dal tabacco è dimostrata dalla osservazione di elevati livelli di DNA addotti anche in tessuti non direttamente esposti al fumo di tabacco (37).

Anche altri tipi di addotti contribuiscono all'instabilità genomica ed all'aumentato rischio di carcinoma polmonare; gli addotti O4-etilimidina (O4-etT), infatti, mostrano una correlazione altamente significativa con gli addotti PAH-DNA (35).

Un'altra interessante metodica per valutare il danno al DNA indotto dal fumo di sigaretta è rappresentata dalla elettroforesi su gel a singola cellula (SCG, o Comet assay); questa rapida e sensibile indagine fluorescente microscopica potrà in futuro essere impiegata nella sorveglianza contro la cancerogenesi (38).

La contemporanea ingestione di etanolo sembra inoltre determinare un incremento degli addotti di DNA fumo-indotti attraverso un aumento della biodisponibilità dei componenti del fumo che si legano al DNA, favorendone anche la distribuzione sistemica (39).

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 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e gli idroperossidi lipidici (7).

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 (7).

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 O_2^- , che può portare alla formazione di H_2O_2 , che si dissocia quindi in OH^- (25).

Conclusione

Il fumo di sigaretta rappresenta una importante sorgente di ROS. Questi non

solo agiscono danneggiando direttamente l'epitelio polmonare, ma, attraverso la formazione di DNA-single strand breaks e la necrosi, possono anche modificare il DNA, inducendo mutazioni che comportano un aumento del potenziale neoplastico.

Bibliografia

1. McCord SM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969 Nov;244(22):6049-55.
2. Babior BM, Curnutte JT, McMurrich BJ. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest*. 1976 Oct;58(4):989-96.
3. 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.
4. Del Donno M, Verduri A. I radicali liberi ed i meccanismi ossido-riduttivi. *European Respiratory News* 1999; n.3: pp.238-43.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Pryor WA.: Free radicals in biology. Vol. 1, 3. Academic press, New York, 1976.
9. Di Guiseppi J, Fridovich I. The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 12 :315-342.
10. Fisher AB. Oxidants and antioxidants : Transatlantic Airway Conference 2002 – Chairman's Summary. *Am J Respir Crit Care Med* Vol.166.pp.S2-S3, 2002.
11. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Damage to bases in DNA by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* 1989; 264:20509-12.
12. Bradley MO, Erickson LC. Comparison of the effect of hydrogen peroxide and X-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells (V-79). *Biochem Biophys Acta* 1981;654:134-41.
13. Bielski B.H.J.: Reactivity of H_2O_2/O_2^- radicals in aqueous solution. *J Phys Chem Ref Data*, 1985; 14: 1041-1100
14. Morrow JD, Jackson Roberts L. The Isoprostanes - Their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* Vol.166; pp.S25-S30, 2002.
15. Moldeus P, Berggren M, Gravström 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;139:123-129.
16. Banerjee KK, Marimuthu P, Sarkar A, Chaudhuri RN. Influence of cigarette smoking on Vitamin C, glutathione and lipid peroxidation status. *Indian J Public Health* 1998;42(1):20-3.
17. Izzotti A, Balansky RM, Blagoeva PM, Mircheva ZI, Tumilero L, Cartiglia C, De Flora S. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J* 1998 Jun;12(9):753-8.
18. Pryor WA. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1992 Dec;13(6):659-76.
19. Church D.F., Pryor WA.: Free radicals chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985; 64: 111-126.
20. 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: 425-427.
21. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol.38. Tobacco smoke. 1986 IARC. Lyon France.
22. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988;10:281-5.
23. Borish ET, Cosgrove JP, Church DF, Deutsch A, Pryor WA. Cigarette tar causes single strand-breaks in DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133:780-6.
24. Radosevich CA, Weitzman SA. Hydrogen peroxide induces squamous metaplasia in a hamster tracheal organ explant culture model. *Carcinogenesis* 1989;10:1943-6.
25. Leanderson P. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells. *Annals New York Academy of Sciences. Ann N Y Acad Sci.* 1993 May 28;686:249-59; discussion 259-61.
26. Kiyosawa H, Suka M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, Chung HH, Kasai H, Nishimura S: Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine, one of the oxidative products of DNA damage in human peripheral leukocytes. *Free Radical Res Commun* 1990; 11: 1-3.
27. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage causes G_T and A_C substitutions. *J Biol Chem.* 1991;267:166-72.
28. Stenius U, Warholm M, Rannug A, Walles S, Lundberg I, Hogberg J. The role of GSH depletion and toxicity in hydroquinone-induced development of enzyme-altered foci. *Carcinogenesis* 1989;593-9.
29. Morimoto K, Wolff S, Koizumi A. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by microsomal activation of benzene metabolites. *Mutat Res.* 1983;119:355-60.
30. Jowa L, Wits G, Snyder R. Synthesis and characterization of deoxyguanosine-benzoquinone adducts. *J Appl Toxicol* 1990;10:47-54.
31. 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;12:685-9.
32. Jung M, Davis WP, Taatjes DJ, Churg A, Mossman BT. Asbestos and cigarette smoke causes increased DNA strand breaks and necrosis in bronchiolar epithelial cells in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000 Apr 15;28(8):1295-9.
33. Dertinger SD, Nazarenko DA, Silverstone AE, Gasiewicz TA. Aryl hydrocarbon receptor signaling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke condensate-induced cytogenetic damage in vivo. *Carcinogenesis* 2001 Jan;22(1):171-7.
34. Balansky R, Izzotti A, Scatolini L, D'Agostini F, De Flora S. Induction by carcinogens and chemoprevention by N-acetylcysteine of adducts to mitochondrial DNA in rat organs. *Cancer Res* 1996 Apr 1;56(7):1642-7.
35. Godschalk R, Nair J, Van Schooten FJ, Risch A, Drings P, Kayser K, Dienemann H, Bartsch H. Comparison of multiple DANN adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis* Dec 2002; vol.23(12):2081-6.
36. Izzotti A, Bagnasco M, D'Agostini F, Cartiglia C, Kelloff GJ, De Flora S. Formation and persistence of nucleotide alterations in rats exposed whole-body to environmental cigarette smoke. *Carcinogenesis* 1999 Aug;20(8):1499-505.
37. Phillips DH. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* Dec 2002;vol.23(12), 1979-2004.
38. Poli P, Buschini A, Spaggiari A, Rizzoli V, Carlo-Stella C, Rossi C. DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using Comet assay. *Toxicol Lett* 1999 Sep;108(2-3):267-76.
39. Van Schooten JV, Besarati N, 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 Feb;11(2):167-75.
40. Zagà V, Gattavecchia E. Radicali liberi e fumo di sigaretta. *Giorn It Mal Tor* 2002; 56, 5: 375-391.