

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

**Dottorato di ricerca in
Patologia e Tossicologia Ambientale
XX ciclo**

**Attività antiossidante dei capsinoidi
in diversi modelli sperimentali di stress
ossidativo**

Coordinatore:
Prof. Amedeo Columbano

Responsabile Scientifico:
Prof.ssa M.Assunta Dessì

Candidata:
Dott.ssa Angela Atzeri

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

Ringraziamenti

Al termine del corso di Dottorato di Ricerca vorrei ringraziare le persone che mi sono state vicine durante questi anni.

Ringrazio in particolar modo la Prof.ssa M.Assunta Dessì per avermi consentito di svolgere la ricerca nel laboratorio di Patologia Sperimentale, dove ho potuto apprendere dei metodi di ricerca per sviluppare questa tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Antonella Rosa, che mi ha seguito con attenzione e professionalità durante il periodo di dottorato con pazienza e disponibilità, incoraggiandomi a portare avanti la mia ricerca in questi tre anni.

Vorrei inoltre porgere un sincero ringraziamento alla Dott.ssa Monica Deiana, alla Dott.ssa M.Paola Melis, alla Dott.ssa Silvana Vargiolu e a Giacomo Satta per la loro utile e quotidiana collaborazione e per aver reso più piacevoli con la loro amicizia questi tre anni di lavoro.

Un ringraziamento speciale va alle mie “colleghe di scrivania”, la Dott.ssa Giulia Corona, la Dott.ssa Alessandra Incani e la Dott.ssa Debora Loru che mi hanno sostenuto moralmente e che hanno contribuito a rendere migliori questi anni.

In fine grazie anche a Stefano, mio marito, che con estrema pazienza mi ha sostenuto e sopportato nei momenti di stress!!!

Riassunto

Un adeguato apporto di antiossidanti naturali con la dieta svolge un ruolo importante nella prevenzione delle malattie causate dai radicali liberi e nell'invecchiamento cellulare.

La specie *Capsicum annuum* L. è una specie vegetale molto interessante che comprende due varietà: la varietà *grossum*, rappresentata dai peperoni, e la varietà *longum*, rappresentata dal peperoncino.

Il frutto del *Capsicum annuum* è una buona fonte di antiossidanti naturali e tra questi vi sono dei composti esclusivi di questo genere: i capsaicinoidi presenti principalmente nella varietà piccante (*longum*) e i capsinoidi, presenti in maggiore quantità nei frutti di una *cultivar* non piccante chiamata CH-19 Sweet. I principali capsinoidi naturali, capsinato e diidrocapsinato, hanno mostrato diverse attività biologiche, in particolare una notevole attività antiossidante *in vitro*.

In questo lavoro di tesi l'attenzione è stata rivolta verso il vanillil nonanoato, analogo chimico del capsinato, composto che ha mostrato un'attività di protezione comparabile a quella del composto naturale.

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata comparata con quella di due analoghi chimici semplificati, l'alcol vanillico e la vanillina, che presentano lo stesso residuo vanilloide nella molecola, onde stabilire una relazione struttura-attività, per poter valutare quindi quale porzione del composto, il residuo acilico o la porzione vanilloide, sia maggiormente implicata nell'attività antiossidante.

Le tre molecole sono state testate nel sistema dell'autossidazione dell'acido linoleico e durante l'ossidazione del colesterolo, semplici sistemi che permettono di valutare la capacità di una molecola di inibire la perossidazione lipidica indotta dai radicali lipoperossilici ROO \cdot .

Dai risultati ottenuti soltanto il vanillil nonanoato e l'alcol vanillico hanno mostrato una notevole efficacia come *scavenger* di radicali lipoperossilici e uno spostamento del rapporto *cis*, *trans/trans*, *trans* degli idroperossidi, correlato alle concentrazioni crescenti di tali composti, indicando un meccanismo di donazione di atomi d'idrogeno e un effetto protettivo nei confronti del consumo del colesterolo e della produzione di 7-cheto, principale prodotto di ossidazione del colesterolo. In questi sistemi la vanillina è risultata meno efficace.

I dati ottenuti indicano che l'attività antiossidante del vanillil nonanoato in questi sistemi *in vitro*, è probabilmente dovuta alla donazione di atomi di idrogeno dal gruppo idrossilico presente nella porzione vanilloide della molecola, e non alla catena laterale. L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata quindi valutata in un sistema *in vitro* più complesso, durante l'ossidazione delle LDL per 2 ore in presenza di Cu^{2+} , in quanto lo studio dell'ossidazione delle particelle lipoproteiche in presenza di questo metallo è un modello importante per la comprensione dei fenomeni ossidativi che avvengono in alcune patologie.

In questo modello sono stati considerati come indici del danno ossidativo le variazioni dei componenti lipidici delle LDL, quali acidi grassi insaturi e colesterolo e la formazione dei loro rispettivi prodotti di ossidazione, gli idroperossidi e il 7-cheto; il vanillil nonanoato ha esercitato una significativa attività di protezione nei confronti della degradazione ossidativa indotta dal Cu^{2+} dei principali acidi grassi poliinsaturi e del colesterolo presenti nelle LDL e una corrispondente diminuzione dei prodotti di ossidazione dei lipidi considerati.

È stata inoltre studiata l'attività antiossidante del vanillil nonanoato in un modello di stress ossidativo in cellule VERO, una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia, indotto da due concentrazioni non citotossiche di terz-butildidroperossido (tBH 750 μM e 2.5 mM). L'ossidante, alla dose di 2.5 mM, è in grado di determinare una variazione dei principali acidi grassi, del colesterolo e della vitamina E presenti nelle cellule, e un incremento dei prodotti di ossidazione (idroperossidi e 7-cheto).

Il fenolo ha esercitato una riduzione della formazione di MDA indotta da tBH 750 μM e, a concentrazioni più elevate, ha mostrato un'attività di protezione dalla degradazione ossidativa degli acidi grassi poliinsaturi e del colesterolo indotta da tBH 2.5 mM, riducendo sensibilmente i prodotti di ossidazione.

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato mostrata nei sistemi sperimentali *in vitro* è stata in fine confermata *in vivo* nel modello sperimentale del FeNTA.

L'iniezione intraperitoneale di una dose sub letale di FeNTA (15 mg Fe/Kg di peso corporeo) induce un notevole stress ossidativo causando nei ratti l'ossidazione della frazione lipidica, in particolare acidi grassi poliinsaturi, colesterolo e vitamina E nel rene e nel plasma dopo 1 ora dal trattamento con il complesso.

Il pretrattamento con il vanillil nonanoato ha esercitato un effetto protettivo sulla riduzione dei lipidi totali, degli acidi grassi insaturi, della vitamina E e del colesterolo, e

sull'incremento degli idroperossidi e del 7-cheto; l'attività antiossidante è risultata meno evidente nel rene, rispetto a quella osservata nel plasma, probabilmente correlabile alla minore suscettibilità ossidativa di questo organo.

Dai risultati ottenuti, nei modelli sperimentali utilizzati, il vanillil nonanoato si è mostrato un interessante antiossidante *in vitro* e *in vivo*. Considerando che la somministrazione sistemica dei capsinoidi risulta essere ben tollerata sia negli animali che nell'uomo e tenendo conto che il vanillil nonanoato possiede le stesse attività biologiche del capsinato naturale, sarebbe interessante valutare l'assorbimento e la biodisponibilità di questo capsinoide.

INDICE

1	<u>INTRODUZIONE</u>	1
1.1	I LIPIDI: TARGET DI STRESS OSSIDATIVO	4
1.2	PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DEI LIPIDI BIOLOGICI E PATOLOGIE	9
1.2.1	MDA: PRODOTTO TERMINALE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	9
1.2.2	OSSISTEROLI	10
1.2.3	LDL OSSIDATE	12
1.3	MISURA DELLO STRESS OSSIDATIVO	18
1.3.1	MISURA DI SPECIE REATTIVE <i>IN VIVO</i>	18
1.3.2	MISURA DI MARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO	20
1.3.2.1	Lipidi	20
1.4	MODELLI SPERIMENTALI DI STRESS OSSIDATIVO	23
1.4.1	OSSIDAZIONE DELLE LDL	23
1.4.1.1	Ossidazione delle LDL mediata dal rame	25
1.4.2	COLTURE CELLULARI	28
1.4.2.1	Ossidazione mediata dal tBH in colture cellulari	29
1.4.3	MISURA DEL DANNO OSSIDATIVO <i>IN VIVO</i> : MODELLO SPERIMENTALE DEL FeNTA	31
1.5	ANTIOSSIDANTI	34
1.5.1	ANTIOSSIDANTI NELLA DIETA E SALUTE	36
1.6	<i>CAPSICUM ANNUUM</i> L. COME FONTE DI ANTIOSSIDANTI NATURALI	40
1.6.1	CAPSAICINOIDI	42
1.6.2	CAPSINOIDI	47
1.7	VANILLIL NONANOATO O CAPSIATO SINTETICO	51
2	<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	53
3	<u>MATERIALI E METODI</u>	57
3.1	SISTEMI CHIMICI <i>IN VITRO</i>	58
3.1.1	REAGENTI E SOSTANZE CHIMICHE	58
3.1.2	APPARECCHIATURE	59
3.1.3	SISTEMA DELL'ACIDO LINOLEICO: AUTOSSIDAZIONE DELL'ACIDO GRASSO IN PRESENZA DI VANILLIL NONANOATO, ALCOL VANILLICO E VANILLINA	60
3.1.3.1	Ossidazione	60
3.1.3.2	Analisi in HPLC	61
3.1.4	SISTEMA DEL COLESTEROLO: OSSIDAZIONE IN PRESENZA DI VANILLIL NONANOATO, ALCOL VANILLICO E VANILLINA	62
3.1.4.1	Ossidazione	62
3.1.4.2	Analisi in HPLC	63
3.1.5	ANALISI STATISTICHE	64
3.2	OSSIDAZIONE DELLE LDL	65
3.2.1	REAGENTI E SOSTANZE CHIMICHE	65
3.2.2	APPARECCHIATURE	66
3.2.3	DIALISI	67

3.2.4	OSSIDAZIONE DELLE LDL MEDIATA DAL Cu^{2+} IN PRESENZA DI VANILLIL NONANOATO...	68
3.2.5	ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA	69
3.2.6	ANALISI IN HPLC	70
3.2.7	ANALISI STATISTICHE	71
3.3	COLTURE CELLULARI	72
3.3.1	REAGENTI E SOSTANZE CHIMICHE	72
3.3.2	MATERIALI PER LE COLTURE CELLULARI	73
3.3.3	APPARECCHIATURE	74
3.3.4	MANTENIMENTO DELLA COLTURA CELLULARE	76
3.3.5	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA DEL tBH E DEL VANILLIL NONANOATO ..	77
3.3.6	OSSIDAZIONE DELLE CELLULE VERO IN PRESENZA DI tBH	78
3.3.6.1	Ossidazione	78
3.3.6.2	Estrazione dei lipidi	79
3.3.6.3	Analisi in HPLC	79
3.3.6.4	Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi	80
3.3.6.5	Analisi gascromatografica	81
3.3.7	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL VANILLIL NONANOATO IN COLTURE CELLULARI NEI CONFRONTI DELL'OSSIDAZIONE MEDIATA DAL tBH	82
3.3.7.1	Metodo TBARS	82
3.3.7.2	Valutazione dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato tramite l'analisi della frazione lipidica.	83
3.3.7.2.1	Ossidazione delle cellule VERO in presenza di tBH	83
3.3.7.2.2	Estrazione e quantificazione dei lipidi	84
3.3.8	ANALISI STATISTICHE	85
3.4	ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL VANILLIL NONANOATO <i>IN VIVO</i> NEL MODELLO SPERIMENTALE DEL FeNTA	86
3.4.1	REAGENTI E SOSTANZE CHIMICHE	86
3.4.2	APPARECCHIATURE	87
3.4.3	PREPARAZIONE DEL FeNTA	88
3.4.4	ANIMALI E LORO TRATTAMENTO	89
3.4.5	ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEI LIPIDI	90
3.4.6	ANALISI STATISTICHE	91
4	<u>RISULTATI</u>.....	92
4.1	SISTEMI CHIMICI <i>IN VITRO</i>.....	93
4.1.1	SISTEMA DELL'ACIDO LINOLEICO	93
4.1.2	SISTEMA DEL COLESTEROLO	95
4.2	OSSIDAZIONE DELLE LDL MEDIATA DAL Cu^{2+} IN PRESENZA DI VANILLIL NONANOATO	97
4.2.1	ANALISI DELLA FRAZIONE LIPIDICA	97
4.3	COLTURE CELLULARI	99
4.3.1	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA DEL tBH E DEL VANILLIL NONANOATO ..	99
4.3.2	OSSIDAZIONE DELLE CELLULE VERO IN PRESENZA DI tBH	101
4.3.2.1	Analisi della frazione lipidica	101
4.3.3	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL VANILLIL NONANOATO IN COLTURE CELLULARI	106
4.3.3.1	TBARS	106
4.3.3.2	Analisi della frazione lipidica	108
4.4	ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEL VANILLIL NONANOATO <i>IN VIVO</i> NEL MODELLO SPERIMENTALE DEL FeNTA	112

5	<u>DISCUSSIONE</u>	<u>119</u>
6	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>126</u>

1 Introduzione

Lo stress ossidativo è una condizione patologica dovuta ad una sovrapproduzione di radicali liberi (R^{\bullet}), specie chimiche altamente instabili, in grado di alterare le principali classi di biomolecole come lipidi, proteine e acidi nucleici, modificandone struttura e funzione.

Gli organismi viventi hanno perciò sviluppato un complesso sistema di antiossidanti per contrastare l'azione di queste molecole, che risultano essere dannose per l'organismo (Prior and Cao, 1999); tra questi ricordiamo i sistemi enzimatici superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi, e quelli non-enzimatici come gli antiossidanti idrosolubili glutazione e acido ascorbico (Vitamina C), e liposolubili α -tocoferolo (Vitamina E) e β -carotene (Vitamina A) (Therond et al., 2000).

Un adeguato apporto di antiossidanti tramite la dieta può essere, inoltre, un fattore importante nella prevenzione dell'invecchiamento (Rice-Evans et al., 1995) e di alcune patologie causate dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come patologie cardiovascolari (Fuhrman et al., 1995), diabete, cancro (Thole et al., 2006) e patologie degenerative come il Parkinson e l'Alzheimer (Zamaria, 2004).

In letteratura sono numerosi gli studi in cui viene messa in evidenza una correlazione inversa tra il consumo di alimenti di origine vegetale, come frutta e verdura, e l'incidenza di patologie cardiovascolari e cerebrali.

Le molecole antiossidanti presenti principalmente in questi alimenti sono i polifenoli, tra cui i flavonoidi sono quelli maggiormente studiati, le vitamine A, B, C, i tocoferoli e i carotenoidi, principalmente presenti nella frutta e nella verdura. Queste molecole assunte con la dieta possono agire indipendentemente le une dalle altre o in sinergia, mediante diversi meccanismi d'azione.

Il consumo degli alimenti di origine vegetale viene inoltre spesso associato ad una bassa incidenza di diversi tipi di tumori (Willett, 1994); l'attività antitumorale degli antiossidanti naturali, presenti in questi alimenti, è stata ampiamente studiata in diverse linee cellulari tumorali (Maeda et al., 1992) e in diversi modelli sperimentali *in vivo* (Bresnick et al., 1990).

Dai dati disponibili in letteratura è possibile osservare che le proprietà antiossidanti di un alimento sono generalmente valutate considerando la quantità di antiossidanti presenti nell'alimento stesso o misurando la capacità antiossidante delle molecole presenti in esso, tramite l'utilizzo di test spesso non specifici, che danno poche

informazioni sul meccanismo d'azione che le molecole possono esplicare (La Vecchia et al., 2001).

Per questo motivo nasce la necessità di utilizzare sistemi sperimentali *in vitro*, supportati da modelli *in vivo*, utilizzando come *marker* prodotti specifici del processo ossidativo che permettano di valutare i possibili meccanismi d'azione che un composto antiossidante può esercitare.

1.1 *I lipidi: target di stress ossidativo*

Lo stress ossidativo è implicato nell'eziopatogenesi di diverse malattie e nei processi di invecchiamento cellulare. Fra i *targets* biologici dello stress ossidativo, i lipidi di membrana sono la classe di biomolecole maggiormente colpite (Del Rio et al., 2005).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno un ruolo fondamentale nella mediazione del danno tissutale poiché l'ossigeno, oltre ad essere indispensabile alla vita, è anche tossico. Tra i più importanti ROS (Halliwell, 1996) ricordiamo:

- HO^\cdot , radicale idrossile
- $\text{O}_2^{\cdot-}$, anione superossido
- H_2O_2 , perossido di idrogeno
- $^1\text{O}_2$, ossigeno singoletto.

Queste molecole sono in grado di innescare la perossidazione dei lipidi biologici, processo che può essere implicato in diverse patologie (Tribble, 1999).

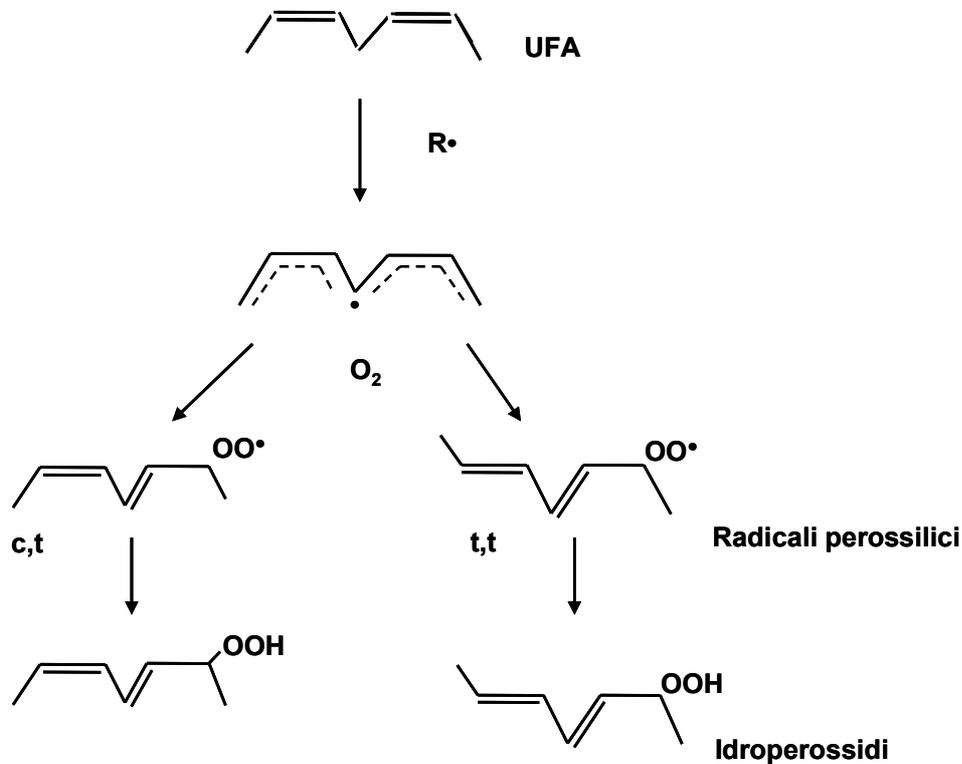
L'attacco da parte dei radicali liberi (R^\cdot) ai lipidi poliinsaturi presenti nelle membrane biologiche determina l'avvio del processo di perossidazione lipidica, un processo di deterioramento O_2 -dipendente (schema 1) che porta alla compromissione dell'integrità delle membrane biologiche (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Questo processo è implicato inoltre nella modificazione ossidativa delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e gioca un ruolo fondamentale nell'aterogenesi (Tribble, 1999).

I principali costituenti delle membrane biologiche sono i lipidi e le proteine; la quantità di queste ultime, nei diversi tipi cellulari, dipende dalle funzioni specifiche che le cellule rivestono nell'organismo.

I lipidi di membrana sono generalmente definiti come delle molecole anfipatiche, che contengono una regione idrocarburica che possiede una bassa affinità per l'acqua, e una porzione polare con elevata affinità per l'acqua. Nelle membrane cellulari animali i lipidi presenti in maniera predominante sono i fosfolipidi (fosfatidilcolina) e molecole idrofobiche come il colesterolo, ma in alcuni tipi di membrana, in particolar modo nelle membrane plasmatiche delle cellule nervose, sono presenti in quantità significative gli sfingolipidi. Le molecole lipidiche più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi (UFA), in particolare i poliinsaturi (PUFA) presenti nei fosfolipidi e il colesterolo.

L'ossidabilità degli acidi grassi cresce con il numero dei doppi legami; quelli saturi e monoinsaturi sono poco ossidabili, quelli con due o più doppi legami sono tra le molecole più ossidabili presenti nei sistemi biologici.



Schema 1: Ossidazione degli acidi grassi insaturi.

Il processo di perossidazione lipidica (schema 1) inizia con l'estrazione dell'atomo d'idrogeno dal carbonio metilenico di un acido grasso poliinsaturo (LH) che porta alla formazione di un radicale libero centrato nel carbonio (L[•]), che richiama un elettrone da uno dei doppi legami adiacenti. Si genera così un sistema a doppi legami coniugati ed un nuovo radicale a livello dell'atomo di carbonio che precedentemente partecipava al doppio legame; questo radicale reagisce istantaneamente con l'ossigeno per formare un radicale lipoperossilico (LOO[•]) (Ursini, 1990).

Questa è una reazione rapidissima, ma non è comunque da escludere che, in particolari condizioni, si possa avere un trasferimento dell'elettrone da parte di un'altra molecola, come un composto *scavenger*, che disattiva il radicale L[•]. Normalmente avviene la formazione del radicale lipoperossilico, che può estrarre un atomo di idrogeno da un altro acido grasso poliinsaturo trasformandosi in LOOH e formando un nuovo L[•], che si

comporta esattamente come il precedente, continuando la reazione a catena. La perossidazione lipidica, da questo punto di vista, dovrebbe progredire indefinitamente a seguito di una singola iniziazione, fino al completo consumo degli acidi grassi poliinsaturi. Ciò non avviene poiché i cicli di propagazione nelle membrane biologiche sono raramente più di due o tre, in quanto gli acidi grassi poliinsaturi non sono disposti in maniera contigua, ma generalmente sono distanziati da altri acidi grassi saturi, monoinsaturi o da colesterolo, che interrompono la catena (Ursini, 1990).

La suscettibilità degli acidi grassi poliinsaturi all'attacco radicalico è particolarmente evidente nella distruzione delle membrane biologiche e nella formazione delle lipoproteine ossidate, con la produzione di perossidi lipidici e dei loro sottoprodotti come le aldeidi. Tra queste la malonildialdeide (MDA) e i 4-idrossi-2-alchenali come il 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE), rappresentano i maggiori prodotti terminali derivanti dalla rottura degli acidi grassi e dei relativi esteri (Uchida, 2000). La stabilità e l'elevata reattività sono caratteristiche che rendono queste molecole dannose verso altri costituenti presenti all'interno e all'esterno della cellula, come gli acidi nucleici e le proteine, causando alterazione della funzionalità cellulare (Del Rio et al., 2005).

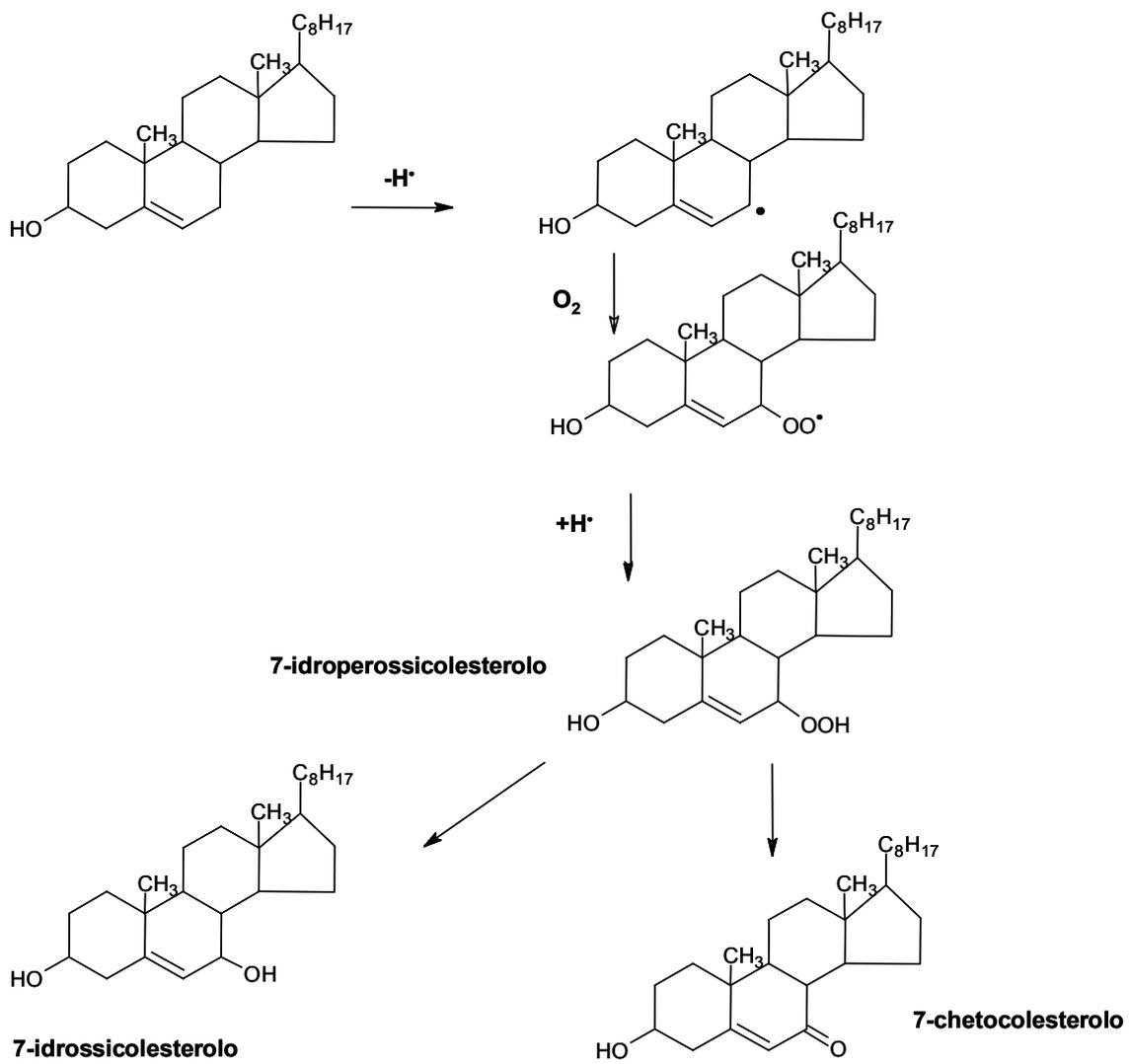
Un altro *target* della perossidazione lipidica è rappresentato dal colesterolo.

Essendo uno dei lipidi insaturi maggiormente diffusi nel corpo umano, il livello di prodotti di ossidazione del colesterolo (ossisteroli) nei tessuti e nei fluidi umani è relativamente alto. Gli ossisteroli sono generati *in vivo* in seguito al processo di perossidazione lipidica nelle membrane biologiche e nelle lipoproteine (Lyons and Brown, 1999; Salonen, 2000), o enzimaticamente durante il catabolismo del colesterolo (Salonen, 2000). Possono inoltre provenire dall'alimentazione; una dieta eccessivamente ricca di colesterolo comporta anche una maggiore esposizione dell'organismo agli ossisteroli, che si possono formare durante la lavorazione e la conservazione dei cibi quali carni e prodotti lattiero-caseari (Lercker, 2005).

Gli ossisteroli vengono prodotti nell'organismo attraverso la degradazione ossidativa del colesterolo (schema 2) mediata da radicali liberi (ossidazione non enzimatica), e possono essere considerati degli indicatori molecolari del processo perossidativo (Miyajima et al., 2001).

L'attacco radicalico al colesterolo, simile a quello subito dagli altri lipidi, determina l'estrazione di un atomo di idrogeno e la formazione di un sito radicalico sul carbonio 7, che reagisce successivamente con l'O₂ molecolare producendo un radicale

perossilico. Questo radicale conserva la capacità di estrarre un ulteriore atomo di idrogeno da una molecola lipidica, generando l'idroperossido 7α -idroperossicolesterolo (7α -OOH), che per successiva epimerizzazione si trasforma in 7β -idroperossicolesterolo (7β -OOH), isomero con una conformazione più stabile che si forma in modo predominante. I due idroperossidi sono prodotti instabili, che vengono rapidamente ridotti nei corrispondenti idrossiderivati come il 7α -idrossicolesterolo (7α -OH) e il 7β -idrossicolesterolo (7β -OH), o disidratati con formazione di un oxo-derivato, il 7-chetocolesterolo (7-cheto) (Adachi et al., 2001; Salonen, 2000). Gli ossisteroli 7-ossigenati (7α -OOH, 7β -OOH, 7α -OH, 7β -OH e 7-cheto) sono i principali ossisteroli che si formano in relazione alla perossidazione lipidica delle membrane biologiche e delle lipoproteine (Salonen, 2000); in particolare durante l'ossidazione delle lipoproteine, c'è una sostanziale formazione di 7β -OH e 7-cheto (Salonen, 2000; Zieden et al., 1999).



Schema 2: Ossidazione del colesterolo.

1.2 Prodotti di ossidazione dei lipidi biologici e patologie

1.2.1 MDA: prodotto terminale della perossidazione lipidica

La malonildialdeide (MDA) è il principale prodotto terminale della perossidazione lipidica; si può inoltre originare dall'attacco dei radicali liberi al deossiribosio e all'acido sialico (Halliwell and Whiteman, 2004) e da processi enzimatici coinvolti nella sintesi delle prostaglandine (Del Rio et al., 2005).

L'MDA e diversi idrossialchenali sono tossici e mutagenici; possono infatti reagire con i gruppi funzionali delle proteine e del DNA, modificando la loro struttura molecolare (Burcham, 1998).

Negli ultimi 20 anni la misura dell'MDA nei campioni biologici è stata ampiamente utilizzata come parametro di perossidazione lipidica nei soggetti affetti da diverse patologie (Del Rio et al., 2005).

È ormai noto che la perossidazione lipidica è un fenomeno implicato nell'eziologia del cancro. In questo caso la molecola dell'MDA costituisce sia un *marker* che la causa del processo di iniziazione (Del Rio et al., 2005).

Elevati livelli di MDA sono stati trovati nel plasma di soggetti affetti da tumore al seno e al polmone, tumore alla cervice uterina, tumori gastrici e in pazienti affetti da leucemia cronica (Del Rio et al., 2005).

Fra le malattie altamente diffuse, in cui risulta implicato lo stress ossidativo, ricordiamo il diabete. Livelli altamente significativi di MDA sono stati trovati nel plasma di pazienti affetti da diabete mellito non-insulino dipendente (NIDDM) rispetto a soggetti sani; in questi pazienti è stato inoltre osservato un aumento dei livelli di MDA che è risultato correlato ad una diminuzione dei livelli di glutatione ed acido urico (Dierckx et al., 2003). Inoltre la quantità di MDA misurata nel plasma è risultata essere più elevata in pazienti diabetici che mostravano delle complicanze come neuropatia, nefropatia o retinopatia, rispetto a soggetti diabetici che non mostravano alcuna complicazione (Martin-Gallan et al., 2003).

Un'elevata quantità di MDA è stata trovata anche nel plasma di pazienti affetti da aterosclerosi (Tamer et al., 2002) e da cirrosi (Loguercio and Federico, 2003).

1.2.2 Ossisteroli

Gli ossisteroli, prodotti di ossidazione del colesterolo, mostrano diverse azioni nocive, come citotossicità, angiotossicità, carcinogenicità, mutagenicità, inibiscono la mitosi, incrementano l'apoptosi hanno effetti pro-ossidanti (Adachi et al., 2001; Smith and Johnson, 1989).

Un aumento di ossisteroli è stato osservato in diverse condizioni patologiche.

La loro presenza nelle placche aterosclerotiche umane suggerisce che giochino un ruolo attivo nel loro sviluppo (Adachi et al., 2001). In particolare il 7-cheto è uno dei più abbondanti ossisteroli trovati nelle placche ateromatose umane (Brown et al., 1997), probabilmente prodotto non-enzimaticamente *in vivo* (Lyons and Brown, 1999).

Nel cervello e negli organi viscerali di pazienti affetti da aceruloplasminemia, malattia associata all'accumulo di ferro, è stato osservato un aumento di ossisteroli (7 α -OH, 7 β -OH e 7-cheto) (Miyajima et al., 2001). Nei pazienti affetti da aceruloplasminemia il danno cellulare osservato è una conseguenza dello stress ossidativo causato dall'accumulo di ferro; è stato dimostrato che un incremento nella concentrazione di ferro in questi soggetti è associato ad un aumento dei prodotti della perossidazione lipidica nel siero e nel liquido cerebrospinale (Miyajima et al., 1998). La concentrazione degli ossisteroli nei pazienti affetti da questa patologia è risultata maggiore nel cuore piuttosto che negli altri organi e questo lo si può imputare al fatto che il cuore è un organo altamente ossigenato. La regione cerebrale in cui è stato osservato un minor accumulo di ossisteroli è il ganglio basale, mentre la concentrazione del 7-cheto è risultata essere circa quattro volte maggiore nel fegato, nel rene e nel plasma di questi pazienti rispetto ai controlli.

In letteratura è stato riportato che il paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina), composto comunemente utilizzato come erbicida, è stato causa di molte morti per ingestione accidentale. Questa molecola induce perossidazione lipidica (Barabas et al., 1984; Hara et al., 1991), infatti all'interno della cellula entra in un ciclo ossido-riduttivo e può portare alla produzione di specie reattive dell'ossigeno come anione superossido, perossido d'idrogeno e radicali idrossilici (Autor, 1974; Winterbourn, 1981; Youngman and Elstner, 1981).

Ishii e collaboratori hanno valutato il livello di ossisteroli nei polmoni, nei reni e nel fegato di individui che avevano ingerito paraquat (Ishii et al., 2002). Dopo

intossicazione acuta, subacuta e cronica, è stato osservato nell'uomo edema polmonare, necrosi dei tubuli renali e necrosi delle cellule lobulari epatiche, con incremento nei livelli degli ossisteroli (7α -OH, 7β -OH e 7-cheto), in particolare con valori di 7-cheto significativamente più alti rispetto ai controlli e rispetto agli altri ossisteroli.

In un modello sperimentale di intossicazione cronica da etanolo (6/7 settimane) è stato osservato un notevole danno tissutale epatico, con un decremento di colesterolo ed un correlato e significativo incremento di 7-cheto, dovuto allo stress ossidativo. È noto che l'aumento degli ossisteroli epatici (7α -OH, 7β -OH e 7-cheto) ha delle implicazioni importanti nel danno epatico indotto da alcol, dovuto al loro effetto citotossico (Ariyoshi et al., 2002).

Un aumento di ossisteroli, come 7α -OH, 7β -OH e 7-cheto, è stato anche osservato nel muscolo cardiaco di ratti alimentati cronicamente con etanolo, come risposta allo stress ossidativo e/o al processo di perossidazione lipidica, e in cuori di ratti diabetici; l'aumento degli ossisteroli in tale organo ha un ruolo importante nella patogenesi delle cardiomiopatie (Adachi et al., 2001; Matsui et al., 1997).

1.2.3 LDL ossidate

Nel plasma i lipidi sono trasportati all'interno di particelle quasi sferiche denominate lipoproteine, dove si associano a proteine idrofiliche chiamate apolipoproteine (apo), le quali hanno una funzione strutturale, come apoB, A-1 e A-2, e fungono da ligandi di recettori di membrana, come apoB e apoE. Tra i costituenti lipidici ricordiamo i fosfolipidi e il colesterolo libero, i quali formano lo scheletro esterno, mentre i lipidi più idrofobici come i trigliceridi e il colesterolo esterificato formano il *core* delle lipoproteine (figura 1). In base al loro diametro, composizione, mobilità elettroforetica e, in particolare, alla loro densità, le lipoproteine possono essere classificate principalmente in: chilomicroni, lipoproteine a bassissima densità (VLDL), a densità intermedia (IDL), a bassa densità (LDL), ad elevata densità (HDL) e infine lipoproteine "a" (Lp(a)) (May et al., 1980).

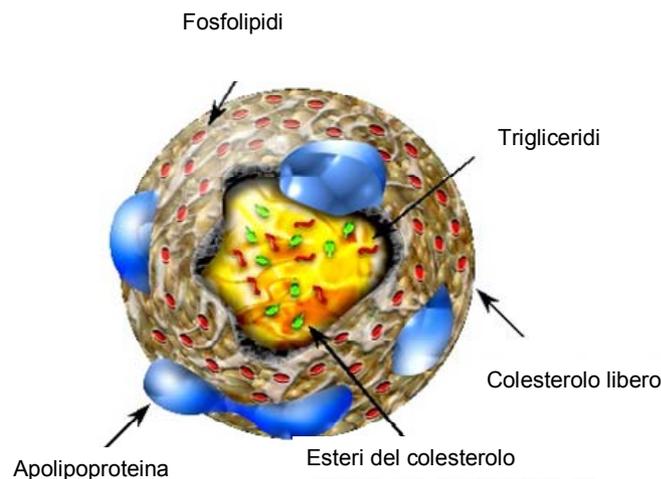


Figura 1: Lipoproteina.

In particolare le LDL, che si formano dalla lipolisi delle IDL per azione della lipoprotein lipasi e dalla lipasi epatica, possiedono un rapporto lipidi e proteine che si riduce durante il loro metabolismo rendendo le particelle più aterogene.

Il danneggiamento strutturale e funzionale delle LDL è considerato una delle cause principali dell'aterosclerosi e delle patologie coronariche. Alcuni degli effetti biologici delle LDL ossidate possono contribuire all'aterogenesi; tra questi ricordiamo l'effetto chemiotattico su monociti e cellule muscolari lisce, l'induzione dell'adesione dei monociti all'endotelio, la promozione di cellule schiumose, l'effetto proliferativo sulle

cellule muscolari lisce (Vannini, 2005), oltre che l'espressione di un certo numero di chemochine, liberate dalle cellule endoteliali, come la MCP-1 (proteina chemiotattica dei monociti) e il fattore di crescita M-CSF (fattore stimolante la crescita dei macrofagi) (Berliner et al., 1995). Inoltre le LDL ossidate possono provocare l'alterazione del tono vascolare in parte tramite l'inibizione della produzione di ossido nitrico, biodisponibile nella parete arteriosa, provocando fenomeni di vasocostrizione (Jialal and Devaraj, 1996; Reaven et al., 1999).

Le modificazioni delle LDL possono verificarsi *in vivo* attraverso interazioni delle lipoproteine con le cellule della parete arteriosa, con i costituenti plasmatici come gli immuno complessi e inoltre con i componenti della matrice della parete arteriosa (Aviram, 1993).

Le LDL possono essere ossidate mediante due vie, enzimatica e non-enzimatica.

Studi condotti su colture di cellule normalmente presenti nella parete arteriosa, come macrofagi, cellule muscolari lisce e epiteliali, hanno mostrato come questi tipi cellulari possono indurre l'ossidazione delle LDL; infatti, le LDL possono essere immobilizzate all'interno delle pareti vasali e questo le rende suscettibili a fenomeni ossidativi, trasformandole in LDL ossidate (Reaven and Witztum, 1996). Uno degli agenti ossidanti presente nei fagociti e nelle cellule muscolari lisce è l'anione superossido generato per opera della NADPH ossidasi di membrana presente nei fagociti attivati; l'aggiunta della superossido dismutasi e di chelanti metallici inibisce l'ossidazione della componente lipidica delle LDL mediata da queste cellule (Jialal and Devaraj, 1996).

Inoltre all'interno dell'intima si creano dei microdomini dove le LDL risultano isolate dagli antiossidanti, maggiormente presenti nei compartimenti acquosi, ed aumenta così la loro suscettibilità all'ossidazione; probabilmente questo è il motivo per cui l'ossidazione delle LDL nel compartimento plasmatico e nel liquido extracellulare dell'intima è irrilevante, in quanto questi due ambienti risultano essere ricchi di molecole antiossidanti (Reaven and Witztum, 1996).

All'interno dello spazio subendoteliale, i monociti si possono differenziare in macrofagi, i quali esprimono un gran numero di prodotti genici tra cui i recettori per le lipoproteine ossidate (*recettori scavenger*) che ne attivano la fagocitosi, formando le caratteristiche cellule schiumose presenti nelle placche ateromatose (Reaven and Witztum, 1996).

Le cellule della parete arteriosa contengono diversi enzimi, quali lipoprotein lipasi (LPL), colesterolo esterasi (CEase), fosfolipasi (PLase) A₂, PLase C, PLase D e lipossigenasi (LPO), che possono indurre delle modificazioni dei costituenti lipidici delle LDL (Aviram, 1993).

I colesteril esteri, i fosfolipidi e i trigliceridi presenti nelle LDL possono essere soggetti all'idrolisi dei loro acidi grassi e alla formazione di nuovi prodotti; l'idrolisi dei colesteril esteri porta alla formazione di colesterolo libero, mentre l'idrolisi dei trigliceridi porta a digliceridi, monogliceridi, glicerolo e acidi grassi. L'idrolisi dei fosfolipidi a causa della PLase A₂ e della PLase C produce rispettivamente lisolecitina, inositolo fosfato e diacilglicerolo; la PLase D promuove il rilascio di gruppi alcolici e di acido fosfatidico sulla superficie della lipoproteina (Aviram, 1993).

L'azione della LPO, in particolare la 15-LPO prodotta dalle cellule endoteliali della parete arteriosa, dai monociti e dai macrofagi, può causare la formazione di idroperossidi lipidici, inducendo l'ossidazione delle LDL. Infatti, studi *in vitro* hanno mostrato che gli inibitori della LPO contrastano l'ossidazione delle LDL, mediata da queste cellule (Aviram, 1993; Mertens and Holvoet, 2001). In topi *knockout* per apo E, nel caso in cui si induca l'inattivazione dei geni che esprimono la 12/15-LPO, diminuisce l'insorgenza dell'aterosclerosi, senza indurre modificazioni significative dei livelli di colesterolo, trigliceridi e lipoproteine plasmatiche.

La mieloperossidasi, enzima secreto dai fagociti attivati, genera specie reattive come l'acido ipocloroso (HClO), clorammine, radicali tirosilici e biossido di azoto (NO₂), che ossidano i lipidi, le proteine e gli antiossidanti presenti nelle LDL. Le specie reattive dell'azoto, prodotte dal sistema della mieloperossidasi-H₂O₂-NO₂ presente nei monociti, convertono le LDL in forme aterogeniche che sono intrappolate e degradate dai macrofagi, processo che porta alla formazione delle cellule schiumose.

L'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per LDL modificate da HClO, hanno rilevato la presenza di queste in prossimità di cellule endoteliali, monociti e macrofagi in lesioni aterosclerotiche umane (Mertens and Holvoet, 2001).

Anche la *p*-idrossi-fenil acetaldeide (pHA), il principale prodotto di ossidazione della L-tirosina, prodotta dal sistema mieloperossidasi-HClO-H₂O₂ presente nei neutrofili attivati, è coinvolta nell'aterogenesi; infatti i livelli di fosfolipidi ossidati dalla pHA presenti nelle LDL isolate da lesioni aterosclerotiche umane sono risultati

significativamente più elevati rispetto a quelli misurati nelle LDL plasmatiche (Mertens and Holvoet, 2001).

Anche il colesterolo dei colesteril esteri presenti nel *core* e il colesterolo libero presente nella superficie delle lipoproteine può subire delle modificazioni ossidative per via enzimatica; l'azione enzimatica della colesterolo ossidasi (CO) sul colesterolo non esterificato presente nelle LDL, porta alla formazione di prodotti ossidati con proprietà aterogene (Aviram, 1993).

Tra i fattori che inducono modificazioni delle LDL che si verificano tramite la via non enzimatica ricordiamo i legami che si possono instaurare con immuno complessi, proteoglicani e carboidrati (Aviram, 1993).

Anche i prodotti di ossidazione dei lipidi, che si possono formare durante la conservazione o la cottura dei cibi e che vengono assunti con la dieta, rivestono un ruolo importante nella fisiopatologia dell'aterogenesi; questi prodotti, tra cui gli ossisteroli, una volta assorbiti nell'intestino sono poi trasportati in circolo dalle lipoproteine causando quindi la formazione di LDL ossidate (Salonen, 2000).

L'ossidazione dei gruppi tiolici, dovuta alla presenza di ioni metallici, porta alla formazione di radicali tiolici e superossido, che sono in grado a loro volta di promuovere l'ossidazione delle LDL (Jialal and Devaraj, 1996). Heinecke e collaboratori hanno ipotizzato che le cellule muscolari lisce delle arterie siano in grado di ridurre i gruppi disolfurici in tioli, i quali vengono esportati nello spazio extracellulare; l'ossidazione dei tioli induce la produzione dell'anione superossido in grado di promuovere l'ossidazione delle LDL. L'ossidazione *in vitro* delle lipoproteine mediata dai tioli, prodotti dalla riduzione della cisteina, omocisteina e GSH, in presenza di ioni metallici (Cu^{2+} e Fe^{3+}), ha supportato questa ipotesi (Heinecke et al., 1993).

Anche lo stato iperglicemico degli individui affetti da diabete mellito può essere una condizione che induce modificazioni ossidative delle LDL; diverse indagini epidemiologiche hanno rilevato che gli individui diabetici hanno dei livelli di rischio di contrarre patologie cardiovascolari da aterosclerosi significativamente più elevati rispetto ad individui non-diabetici (Anderson et al., 1999).

Lo stress ossidativo riscontrato nel diabete mellito potrebbe risultare dall'azione dei radicali liberi generati dall'autossidazione del glucosio, presente in eccesso nel sangue (Lipinski, 2001); evidenze sperimentali mostrano come ci sia un aumento significativo dei livelli di MDA nel plasma e nei globuli rossi di pazienti diabetici e in soggetti

imparentati, in cui esiste una certa predisposizione genetica alla patologia, rispetto ai soggetti sani (Matteucci and Giampietro, 2000).

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che l'aumentata suscettibilità all'ossidazione delle LDL valutata nei soggetti diabetici può essere un fattore che contribuisce allo sviluppo dell'aterosclerosi; è stato infatti osservato che alcuni parametri misurati durante l'ossidazione *in vitro* delle LDL isolate da pazienti diabetici risultano significativamente alterati rispetto a quelli misurati nelle LDL di pazienti non diabetici (Anderson et al., 1999): la *lag phase* misurata durante l'ossidazione delle LDL, isolate da questi pazienti, a 37 °C in presenza di rame risulta essere più breve del 10% rispetto a quella misurata durante l'ossidazione delle LDL isolate da soggetti sani, nelle stesse condizioni sperimentali; inoltre in questi pazienti è stato osservato un aumento significativo dei livelli delle specie reattive all'acido tiobarbiturico e una marcata riduzione dei livelli dei gruppi amminici misurata mediante la metodica del TNBS (acido trinitrobenzen sulfonico) rispetto ai soggetti sani. Anche l'*uptake* di LDL isolate da pazienti diabetici e minimamente modificate mediante la conservazione a 4 °C per diversi mesi, da parte di macrofagi isolati dal peritoneo di topo, è risultato più elevato rispetto a quello osservato in presenza di LDL isolate da soggetti sani (Anderson et al., 1999).

I prodotti terminali della glicazione avanzata (AGE), che si formano tramite una serie di reazioni chimiche non-enzimatiche tra zuccheri ridotti, lipidi, proteine e acidi nucleici, vengono utilizzati come *marker* di stress ossidativo nell'aterosclerosi e nel diabete (Imanaga et al., 2000; Wautier and Schmidt, 2004). La perossidazione lipidica e la glicossidazione sono due fenomeni strettamente correlati e hanno un ruolo importante nel danno tissutale nell'aterogenesi, nel diabete e nell'invecchiamento. È stato infatti dimostrato che i lipidi e le proteine presenti nelle LDL glicate sono più suscettibili alle modificazioni ossidative, fenomeno che suggerisce l'implicazione della glicossidazione nella formazione delle LDL ossidate.

La pentosidina e l'addotto N^ε-(carbossi metil)lisina (CML), principali prodotti della glicossidazione, sono ampiamente utilizzati come *marker* di modificazioni ossidative delle proteine glicate nell'aterosclerosi e nel diabete. I superossidi hanno probabilmente un ruolo importante nel meccanismo con il quale la glicossidazione provoca modificazioni ossidative delle LDL; è stato dimostrato che prodotti terminali della glicazione avanzata, come i composti di Amadori, e i composti intermedi della reazione

di imbrunimento causano la formazione di superossidi. La CML è un prodotto derivato dalla scissione ossidativa dei composti di Amadori in presenza del radicale idrossile, il quale si genera dalla reazione di Fenton tra i composti di Amadori e il Fe^{2+} (Imanaga et al., 2000).

La suscettibilità al processo ossidativo delle LDL, *in vivo*, può dipendere da diversi fattori classificati in “intrinseci” e “estrinseci” (Reaven and Witztum, 1996).

Tra i fattori intrinseci ricordiamo:

- il contenuto di antiossidanti quali l' α -tocoferolo, presente in maggiore quantità, carotenoidi, criptoxantina e ubiquinolo-10 (Mertens and Holvoet, 2001);
- la quantità degli acidi grassi poliinsaturi e la loro distribuzione nella particella lipoproteica (nei fosfolipidi, presenti nello scheletro esterno, e nei trigliceridi e colesteril esteri nel *core*);
- la dimensione della lipoproteina, proprietà inerente all'apoB-100;
- il grado di glicazione non enzimatica.

I fattori estrinseci comprendono:

- il contenuto di proossidanti (metalli presenti in tracce e ceruloplasmina) e antiossidanti, come l'ascorbato, la bilirubina e l'urato, presenti nel plasma e nel fluido extracellulare;
- la concentrazione di HDL e il contenuto di enzimi ad esse associati che degradano i lipidi ossidati, come la paraxonasi e la PAF (fattore attivante le piatrine)-acetilidrolasi. Diversi studi hanno evidenziato la capacità delle HDL di inibire l'ossidazione delle LDL *in vitro*;
- i fattori che inducono la permanenza delle LDL nel plasma e nell'intima (Reaven and Witztum, 1996);
- la dieta, che può essere un fattore importante: diete arricchite in acidi grassi monoinsaturi (MUFA), piuttosto che in PUFA, potrebbero conferire una certa protezione mediante la formazione di particelle più resistenti all'ossidazione, ottimizzando i livelli di colesterolo nelle HDL e nelle LDL (Reaven and Witztum, 1996).

1.3 *Misura dello stress ossidativo*

Per stabilire il ruolo dello stress ossidativo nelle diverse patologie è necessario utilizzare dei metodi che siano in grado di valutare in modo corretto il danno ossidativo in riferimento a diversi parametri chiaramente misurabili.

La maggior parte delle specie reattive generate *in vivo* ha un'emivita breve e per questo motivo non si può effettuare una loro misura diretta nei tessuti; fanno eccezione alcune molecole come l' H_2O_2 (Oldreive and Rice-Evans, 2001).

Generalmente, per rilevare queste specie reattive, vengono seguite due vie (Halliwell and Whiteman, 2004):

- diretta, tramite “l'intrappolamento” mediante specifiche sonde (tecnica *spin trap*);
- indiretta, misurando i livelli del danno ossidativo causato dalle specie reattive.

1.3.1 *Misura di specie reattive in vivo*

L'unica tecnica che segnala la presenza dei radicali liberi direttamente e specificamente *in vivo* è la risonanza elettronica di spin (ESR), in quanto rileva molecole con elettroni spaiati. Tuttavia il metodo permette soltanto di misurare, in maniera “pulita”, specie non reattive in quanto quelle reattive, non accumulandosi in elevata quantità a causa della loro emivita breve, sono difficilmente rilevabili. Questo problema è stato risolto utilizzando “trappole” o “sonde” in grado di reagire con le specie interessate rendendole più stabili e quindi più facilmente misurabili con la tecnica dell'ESR (Halliwell and Whiteman, 2004).

L'ESR è una tecnica ampiamente utilizzata sull'animale ma non ancora applicabile sull'uomo, in quanto non ci sono delle sonde prive di rischi per la salute umana (Berliner et al., 2001; Utsumi and Yamada, 2003). In ogni caso alcune sonde sono state utilizzate sui fluidi biologici e sui campioni di tessuto umani. Per esempio il DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-ossido) è stato utilizzato per misurare i radicali liberi in biopsie di pelle umana e l'idrossilamina in biopsie di fegato (Halliwell and Whiteman, 2004). Naturalmente le specie altamente reattive, come il radicale OH^\bullet , che si formano *in vivo*, non possono essere misurate sui campioni *ex vivo* a causa della loro emivita breve; in questo caso le sonde rilevano i radicali secondari, per esempio alcossile e

perossile, derivanti dalle reazioni che si verificano tra le specie reattive e le biomolecole.

Anche l'acido ascorbico reagisce con un elevato *range* di radicali liberi e altre specie reattive, e uno dei prodotti derivanti dall'ossidazione della vitamina in presenza di specie reattive è il radicale semideidroascorbato, facilmente rilevabile con l'ESR. La misura di questo radicale secondario è stata utilizzata per valutare la presenza di radicali in organi, plasma e cute (Halliwell and Whiteman, 2004).

Un problema che si incontra quando si impiega questa tecnica è che la maggior parte delle sonde che si utilizzano possono allontanare le specie reattive dal sistema che si sta analizzando, e se queste specie sono la causa del danno cellulare o tissutale che si sta osservando, queste sonde potrebbero avere un'attività di protezione nei confronti del danno stesso. Infatti, alcuni composti, che derivano dall'attività di *scavenging* di sonde utilizzate nello *spin trap*, sono inseriti in studi clinici (Halliwell and Whiteman, 2004).

In diversi studi condotti *in vivo* si utilizza la misura dell' H_2O_2 nell'urina umana come indice di stress ossidativo (Long and Halliwell, 2000).

L'analisi dei livelli di H_2O_2 è semplice e rapida, ma non è certo che i livelli misurati nelle urine umane si formino *in vivo* a causa di uno stress ossidativo presente nell'organismo. L' H_2O_2 presente nel fluido biologico potrebbe derivare dal tipo di alimentazione, come ad esempio dall'autossidazione dell'idrossi-idrochinone, composto presente nel caffè, facilmente assorbito dall'organismo (Halliwell et al., 2004).

Nell'urina di pazienti affetti da tumore sono stati misurati livelli significativi di H_2O_2 (Banerjee et al., 2003). Nonostante ciò i dati presenti in letteratura sono insufficienti per considerare l' H_2O_2 come un buon *marker* dello stress ossidativo generato *in vivo* (Halliwell et al., 2004).

1.3.2 Misura di marcatori di stress ossidativo

I prodotti derivati dall'attacco delle specie reattive alle molecole biologiche sono importanti indici di un danno ossidativo (Halliwell and Gutteridge, 1989).

1.3.2.1 Lipidi

I lipidi possono essere ossidati, clorinati e nitrati da diverse specie reattive, ad eccezione dell' H_2O_2 , NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$, che generalmente non reagiscono direttamente con essi (Halliwell and Gutteridge, 1989). Sono state sviluppate alcune tecniche per la misura dei lipidi clorinati e nitrati, in grado di evidenziare composti come il linoleato nitrato, misurato per esempio nel plasma umano (Thukkani et al., 2003).

Esistono svariate metodiche per la misura dei prodotti della perossidazione lipidica, ma viene comunemente utilizzata la misura dei dieni coniugati e delle specie reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), come l'MDA e altre aldeidi (Halliwell and Gutteridge, 1989).

La maggior parte delle metodiche utilizzate per determinare l'MDA, e in generale le specie reattive al TBA, sono state sviluppate sulla base della sua derivatizzazione con l'acido tiobarbiturico (TBA), in quanto la condensazione di queste due molecole da origine ad un addotto facilmente rilevabile spettrofotometricamente. Nonostante ciò, la specificità del test è bassa perché il TBA può reagire con diversi composti che, oltre all'MDA, si originano dall'ossidazione di biomolecole. È stato osservato che le concentrazioni di MDA o TBARS trovate nel plasma umano, misurate con questo metodo, sono piuttosto variabili (0-50 $\mu\text{mol/L}$), probabilmente a causa dell'ossidazione che i campioni subiscono durante l'analisi (Del Rio et al., 2005).

Tuttavia questo test continua ad essere utilizzato in studi clinici, dando spesso dei risultati positivi e fornendo un'indicazione sui livelli di stress ossidativo presenti in alcune condizioni patologiche (Del Rio et al., 2005). Inoltre, in sistemi chimici il test è spesso utilizzato per valutare l'ossidabilità, piuttosto che l'ossidazione dei campioni.

La reazione di condensazione, per l'analisi di campioni biologici, viene fatta avvenire ad elevate temperature (100 °C), procedura che può dare origine ad un'ulteriore ossidazione della matrice che si sta analizzando e quindi ad una conseguente sovrastima del risultato; generalmente, per minimizzare questo errore, viene effettuata la precipitazione delle proteine prima dell'aggiunta del TBA (Del Rio et al., 2005).

Le sostanze reattive al TBA danno origine ad un composto colorato che può essere misurato per via colorimetrica o fluorimetrica, ma a causa della sua non specificità, per la misura dell'MDA in campioni biologici viene preferibilmente utilizzata la lettura in HPLC mediante rilevatore spettrofotometrico o fluorimetrico (Agarwal and Chase, 2002; Chirico, 1994; Del Rio et al., 2003), in quanto tutti i parametri analitici, come la linearità del metodo, il limite di rilevamento, la specificità, la precisione, la stabilità del campione e le interferenze, permettono di fornire un valore più accurato.

Anche la misura del 4-HNE, principale prodotto dell'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi, risulta essere importante per studiare gli effetti citopatologici che questa molecola è in grado di indurre in diverse patologie. Le metodiche principalmente utilizzate per la determinazione di questa molecola nei campioni biologici si basano soprattutto su tecniche cromatografiche, come l'analisi in HPLC, la cromatografia su strato sottile, l'analisi fluorimetrica e la gascromatografia associata a spettrometria di massa, quest'ultima tecnica recentemente utilizzata per quantificare il 4-HNE nel plasma, nell'urina e nel liquido cerebrospinale (Therond et al., 2000).

La formazione dei dieni coniugati, strutture molecolari caratterizzate da due doppi legami intervallati da un legame semplice, è una delle reazioni preliminari della perossidazione lipidica. Questa struttura assorbe nell'ultravioletto a 230-235 nm e questo *range* di assorbanza viene utilizzato per la sua misura. Un gran numero di sostanze assorbono nell'ultravioletto (es. purine, pirimidine, composti carbonilici e eme-proteine), perciò la misura dei dieni nei fluidi biologici come il plasma e il siero, non può essere effettuata direttamente, ma solo dopo l'estrazione della frazione lipidica con l'utilizzo di solventi organici (ad es. cloroformio/metanolo); inoltre l'utilizzo della tecnica spettrofotometrica in derivata seconda migliora la sensibilità del metodo e l'HPLC permette la separazione delle diverse forme dei dieni coniugati. Tuttavia interpretare l'aumento dell'assorbimento a circa 234 nm nei campioni biologici non è facile (Banni et al., 1996b), rispetto alla loro determinazione in semplici test di perossidazione lipidica di lipidi puri o di lipoproteine (Esterbauer et al., 1989).

Un altro parametro misurato *in vivo* e *in vitro* in presenza di stress ossidativo è il livello degli idroperossidi dei lipidi, come gli idroperossidi dei colesterilesteri abbondantemente presenti nel plasma (Bowry et al., 1992; Frei et al., 1988), oltre a quelli che si formano dagli acidi grassi poliinsaturi.

Gli isoprostani, famiglia di eicosanoidi, si formano nei tessuti, per via non enzimatica, dall'attacco dei radicali liberi sui fosfolipidi. Ad esempio l'8-isoprostano (8-epi-prostaglandina $F_{2\alpha}$) è un *marker* utilizzato *in vivo* per stabilire un deficit antiossidante e stress ossidativo. Esso deriva dall'ossidazione dell'acido arachidonico inizialmente presente nelle membrane fosfolipidiche e successivamente rilasciato dalla fosfolipasi nei liquidi biologici (Roberts and Morrow, 2000).

Questi composti sono inoltre prodotti terminali stabili della perossidazione lipidica nei fluidi e nei tessuti umani e sono interessanti in quanto, misurati nelle urine, sono un importante indice quantitativo dello stress ossidativo *in vivo*. I metodi principalmente utilizzati per quantificare gli isoprostani nei fluidi biologici sono la spettrometria di massa e metodi immunologici; anche la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa risulta essere un metodo accurato e sensibile (Nourooz-Zadeh et al., 1995).

1.4 Modelli sperimentali di stress ossidativo

1.4.1 Ossidazione delle LDL

La scoperta delle diverse attività biologiche, soprattutto aterogene, delle LDL ossidate diede inizio ad una serie di studi finalizzati a capire il contributo del processo ossidativo nella patogenesi dell'aterosclerosi. L'ossidazione delle LDL *in vivo* è stata studiata utilizzando dei modelli sperimentali che hanno permesso di estendere le ipotesi sui possibili meccanismi che scatenano le modificazioni ossidative delle particelle lipoproteiche in condizioni patologiche.

I modelli principalmente utilizzati sono (Jialal and Devaraj, 1996):

- l'ossidazione delle LDL mediata da diversi tipi cellulari;
- l'ossidazione indotta da vari agenti ossidanti.

Le LDL possono essere ossidate *in vitro* mediante diversi tipi cellulari della parete vasale, come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e macrofagi.

Alcuni studi sperimentali hanno riportato che le LDL sono tossiche in colture di cellule vascolari in determinate condizioni; questa caratteristica può essere dovuta all'ossidazione della porzione lipidica delle lipoproteine, ad esempio, durante un calo di difese antiossidanti nel compartimento plasmatico. L'utilizzo di cellule endoteliali di vena ombelicale umana e cellule muscolari lisce vascolari ha mostrato che tali cellule possono modificare le LDL, aumentandone la mobilità elettroforetica, riducendo il rapporto tra colesterolo totale e proteine e aumentando la degradazione da parte dei macrofagi (Morel et al., 1984).

È stato inoltre dimostrato che i neutrofilii umani attivati e i monociti sono in grado di ossidare le LDL attraverso un meccanismo che viene inibito dalla superossido dismutasi e da chelanti metallici (Jialal and Devaraj, 1996).

Le LDL possono inoltre essere ossidate da alcuni enzimi cellulari come la 15-lipossigenasi, che converte gli acidi grassi poliinsaturi in lipidi idroperossidi. La lipossigenasi e la fosfolipasi A2, isolate dai semi di soia, sono state utilizzate per ossidare le LDL in assenza di cellule (Sparrow et al., 1988).

L'ossidazione delle LDL *in vitro* può anche essere indotta utilizzando l'AAPH (2,2-azobis[2-amidinopropano]diidroclore), un azocomposto solubile in acqua la cui

decomposizione termica porta alla formazione di carbonili in grado di reagire con l'ossigeno molecolare per dare radicali perossilici (Liegeois et al., 2000; Ross, 1993).

La ceruloplasmina, la mieloperossidasi e la lactoperossidasi H_2O_2 -dipendente e il perossinitrito sono altri agenti ossidanti utilizzati per effettuare l'ossidazione delle LDL (Burkitt, 2001), oltre all'impiego di tioli ossidati in presenza di ioni metallici, che inducono la formazione di radicali tiolici e superossido (Jialal and Devaraj, 1996).

Tra i sistemi *in vitro* più adottati per ossidare le LDL ricordiamo inoltre l'ossidazione mediata da metalli di transizione (Abuja and Albertini, 2001; Jialal and Devaraj, 1996).

In questo modello ossidativo *in vitro* sono considerati diversi parametri, come la *lag phase* o *lag time*, il tempo di propagazione e lo stato massimo dell'ossidazione delle LDL. Il *lag time* viene definito come il tempo che intercorre tra l'aggiunta del metallo, o di altri ossidanti, alle LDL e il tempo di inizio dell'ossidazione. Questa misura riflette lo stato degli antiossidanti presenti nella struttura lipoproteica, infatti, un lungo *lag time* indica una elevata resistenza all'ossidazione dovuta all'azione protettiva degli antiossidanti (Lapointe et al., 2006; Pedersen et al., 2003). Un altro parametro ampiamente impiegato per valutare la suscettibilità all'ossidazione delle LDL durante l'ossidazione indotta da metalli è la misura dei dieni coniugati (Pedersen et al., 2003).

Le LDL incubate per 8-16 ore in presenza di rame (Cu^{2+}), alle concentrazioni di 5-10 μM presentano un elevato grado di ossidazione e proprietà biologiche importanti, quali la stimolazione del rilascio del fattore MCP-1 e M-CSF da parte delle cellule endoteliali, rispetto ad altre lipoproteine con un grado di ossidazione più basso, dette lievemente modificate. Il grado di ossidazione dipende dalle condizioni sperimentali utilizzate ma anche dalla composizione iniziale delle LDL: le LDL ricche in acidi grassi poliinsaturi verranno maggiormente ossidate rispetto a particelle che hanno una quantità più elevata di acidi grassi saturi e monoinsaturi (Morel et al., 1984).

Le LDL ossidate possono essere determinate nel plasma umano con metodi immunochimici, tramite l'impiego di anticorpi monoclonali come FOH1a/DLH3 (Itabe et al., 1996) e 4E6 (Holvoet et al., 1998), generalmente tra i più utilizzati.

1.4.1.1 Ossidazione delle LDL mediata dal rame

Il Cu^{2+} è in grado di indurre perossidazione lipidica nelle LDL. I meccanismi chimici proposti in letteratura con i quali il Cu^{2+} induce questo processo sono diversi; lo studio dell'ossidazione delle LDL *in vitro* in presenza del metallo può essere utile per l'importante rilevanza fisiologica che può rivestire in alcune condizioni patologiche (Burkitt, 2001).

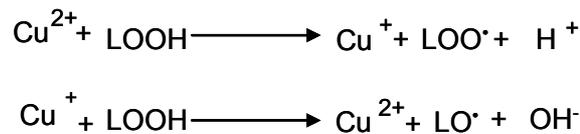
Per esempio in lesioni aterosclerotiche umane sono stati trovati ioni metallici, come il ferro e il rame, in forme catalitiche in grado di catalizzare la formazione di radicali liberi; anche il rame trasportato nel sangue dalla ceruloplasmina può portare, in determinate condizioni *in vitro*, all'ossidazione delle LDL (Smith et al., 1992).

La presenza nel plasma di metalli in eccesso potrebbe anche portare all'ossidazione di alcune biomolecole ed essere quindi la causa di patologie legate all'ossidazione del compartimento plasmatico (Frei and Gaziano, 1993). Come precedentemente descritto, studi epidemiologici dimostrano come l'ossidazione delle LDL può avere, nell'uomo, un ruolo causale nell'aterosclerosi e in condizioni patologiche ad essa connesse, come patologie cardiovascolari e ischemia (Reaven et al., 1999). Colture di cellule endoteliali o di cellule muscolari lisce dei vasi possono indurre modificazioni ossidative delle LDL, e le LDL modificate possono essere riconosciute dal recettore per le LDL acetilate; la modificazione mediata da queste cellule è di tipo ossidativo, essendo dovuta alla perossidazione lipidica indotta dai radicali liberi, fenomeno che può essere mimato impiegando come modello sperimentale l'ossidazione delle LDL in presenza di forme metalliche attive come il rame (Steinbrecher, 1987).

Le LDL sono presenti anche nel cervello, in questo sito possono essere esposte ai prodotti della perossidazione lipidica, che si formano nelle cellule neuronali, a causa delle specie reattive dell'ossigeno presenti in questo ambiente. Uno studio condotto su questi tipi cellulari ha mostrato che le LDL ossidate risultano essere citotossiche nei confronti dei neuroni, ed è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento nella degenerazione neuronale e quindi nelle patologie neurodegenerative. Inoltre elevati livelli di ROS e tracce di metalli di transizione come il rame e il ferro, sono stati misurati in alcuni disordini neurodegenerativi (Keller et al., 1999).

Tra i meccanismi proposti in letteratura con i quali il rame ossida le LDL ricordiamo: l'interazione con gli idroperossidi dei lipidi, e l'azione sull' α -tocoferolo e tioli (Burkitt, 2001).

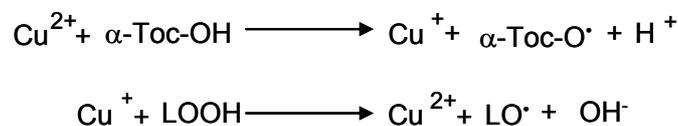
Il rame Cu^{2+} può reagire con gli idroperossidi dei lipidi (agenti riducenti) presenti nelle LDL (schema 3) (Burkitt, 2001) e dare origine al radicale perossile (LOO^\bullet) e alcossile, (LO^\bullet) che possono causare l'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi attraverso l'estrazione di un atomo di idrogeno, dando inizio al processo di propagazione ossigeno dipendente.



Schema 3: Reazione tra gli idroperossidi dei lipidi e il rame.

La forma ridotta Cu^+ può generare specie chimiche altamente reattive, mediante una reazione simile alla reazione di Fenton, in grado di iniziare il processo ossidativo (Lin et al., 2006).

L' α -tocoferolo è l'antiossidante liposolubile più abbondante presente nelle LDL umane; la sua attività antiossidante di *scavenging* nei confronti del radicale perossile sopprime la perossidazione lipidica che si può verificare nelle lipoproteine, e porta alla formazione del radicale tocoferile. È stato dimostrato che in determinate condizioni sperimentali e in presenza di Cu^{2+} , l' α -tocoferolo può anche agire da proossidante causando la riduzione del rame, che a sua volta porta alla riduzione dell'idroperossido in radicale alcossile (schema 4) (Burkitt, 2001).



Schema 4. Reazione tra l' α -tocoferolo e il rame.

Un altro agente riducente presente all'interno delle lipoproteine è rappresentato dai gruppi tiolici (RSH) della cisteina dell'apoB. L'apoB delle LDL contiene 25 residui di cisteina, alcuni dei quali sono presenti nella superficie della lipoproteina sotto forma di tioli liberi, mentre i restanti sono localizzati principalmente nella regione idrofobica. Considerando che all'interno delle LDL sono presenti soltanto 6 molecole di α -

tocoferolo, è più probabile la riduzione del Cu^{2+} da parte dei residui tiolici dell'apoB (Burkitt, 2001).

In soluzione libera, la riduzione del Cu^{2+} mediata da RSH porta alla formazione del corrispondente disulfide (RSSR) (schema 5):



Schema 5: Riduzione del rame in presenza di tioli.

Il metodo *in vitro* descritto è stato messo più volte in discussione, in quanto le quantità di rame utilizzate non rispecchiano la concentrazione fisiologica molto più bassa, risultando quindi in eccesso rispetto a quanto riscontrabile *in vivo* (Lapointe et al., 2006), anche se potrebbero essere importanti per valutare la condizione da accumulo di rame che si verifica in alcune patologie.

È stato ampiamente dimostrato che l'aumento della produzione dei radicali liberi e il danno ossidativo, generato dall'alterazione dell'omeostasi del rame, sono coinvolti in processi neurodegenerativi caratteristici di alcuni disordini genetici del sistema nervoso centrale, come la patologia di Menke e di Wilson, e in patologie neurodegenerative quali la patologia di Alzheimer (Rossi et al., 2006).

1.4.2 Colture cellulari

Le colture cellulari rappresentano un modello relativamente semplice per la misura dell'ossidazione dei lipidi di membrana (Kehrer, 2000); il danno ossidativo di questa componente cellulare può avere un ruolo fondamentale in numerosi processi patologici (Halliwell and Gutteridge, 1989).

I fenomeni conseguenti ad uno stress cellulare acuto includono:

- alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare;
- attivazione di proteasi Ca^{2+} -dipendenti;
- alterazione della quantità di proteine tioliche;
- danni al DNA;
- variazioni delle funzioni mitocondriali;
- perossidazione dei lipidi di membrana (Masaki et al., 1989).

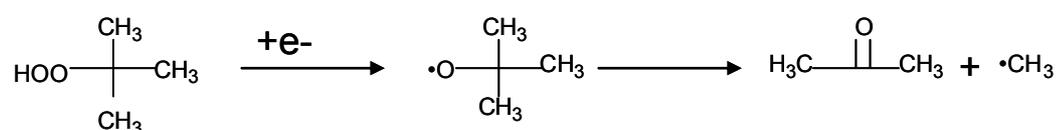
Una comune classe di composti ossidanti ampiamente utilizzati per indurre perossidazione dei lipidi di membrana sono i metalli di transizione. È noto che i metalli di transizione agiscono come catalizzatori del danno ossidativo delle macromolecole biologiche; diverse evidenze sperimentali hanno mostrato che i metalli come il rame, il ferro, il cadmio e altri metalli di transizione hanno la capacità di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno e conseguentemente perossidazione lipidica, danno al DNA, deplezione di sulfidrilici e alterazione dell'omeostasi del calcio (Stohs and Bagchi, 1995).

Un altro agente ossidante particolarmente utilizzato nei modelli di stress ossidativo in colture cellulari è l' H_2O_2 . L' H_2O_2 attraversa la membrana cellulare, utilizzando canali ionici idrofili, e all'interno della cellula induce la produzione di radicali idrossilici, altamente reattivi nei confronti di DNA, proteine e lipidi, causando un danno cellulare (Halliwell et al., 2000). La sua proprietà ossidante viene anche utilizzata per valutare le proprietà antiossidanti di molecole naturali in colture cellulari; recentemente è stata valutata l'attività antiossidante di due diterpeni presenti nel caffè in una linea di fibroblasti di topo (NIH3T3) ossidati con H_2O_2 (Lee and Jeong, 2007).

Tra le sostanze utilizzate per indurre l'ossidazione dei lipidi di membrana in colture cellulari, ricordiamo il *tert*-butilidroperossido (Alia et al., 2006; Goya et al., 2007).

1.4.2.1 Ossidazione mediata dal tBH in colture cellulari

Il terz-butilidroperossido (tBH) è un idroperossido organico in grado di stimolare la perossidazione lipidica in un sistema biologico contenente membrane, come quello delle colture cellulari (Masaki et al., 1989). Il tBH può subire una reazione di frammentazione radicalica, chiamata β -scissione, con formazione del radicale alcossile che comporta la formazione di un radicale centrato sul carbonio e di un composto carbonilico (schema 6).



Schema 6: Frammentazione radicalica del terz-butilidroperossido.

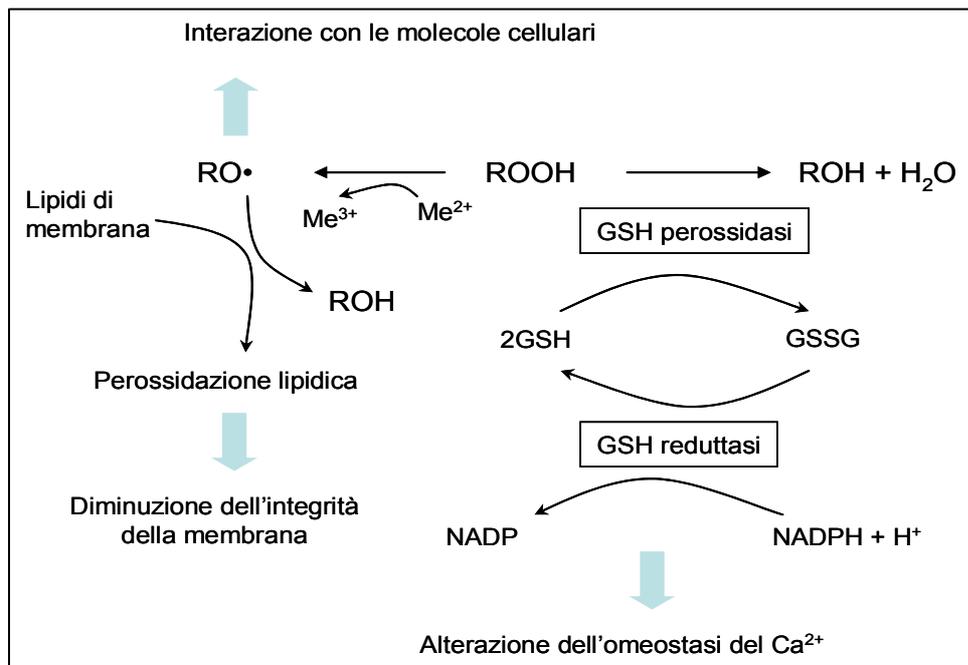
Il radicale alcossile formato può iniziare la perossidazione dei lipidi di membrana per estrazione di un atomo di idrogeno da un acido grasso poliinsaturo presente nei fosfolipidi di membrana. Il radicale lipidico generato può reagire con l'ossigeno molecolare per iniziare la decomposizione dei lipidi di membrana, innescando quindi il processo perossidativo della cellula.

La sua azione ossidante può essere esplicitata attraverso altri meccanismi d'azione (schema 7):

- decomposizione catalizzata da metalli, disponibili nel sistema biologico in una forma redox-attiva; per ottenere la decomposizione del tBH vengono aggiunte quantità catalitiche di ferro (10-100 μM) in quanto, generalmente, all'interno della cellula questo metallo viene chelato in modo tale da rendere difficile la sua entrata in un ciclo redox (Davies and Slater, 1987; Younes and Wess, 1990);
- decomposizione mediata da eme, che funge da perossidasi, con formazione del radicale perossile. In un sistema biologico, qualsiasi tipo di eme è in grado di indurre la decomposizione del tBH (Davies, 1988);
- decomposizione mediata dal citocromo P-450, attraverso una reazione di tipo perossidasi o attraverso una reazione di riduzione (Blake and Coon, 1980). In questo

ultimo caso si ha la formazione di un radicale alcossile e non del perossile prodotto dalla reazione perossidasi (Davies and Slater, 1987).

Inoltre il tBH determina l'ossidazione del glutatione ridotto (GSH) e diminuzione della vitalità cellulare. Il meccanismo di citotossicità viene spiegato in quanto l'idroperossido viene metabolizzato dalla glutatione perossidasi (GSH-px) determinando la deplezione del GSH e formazione del disolfuro (GSSG), che ad opera della glutatione reduttasi provoca l'ossidazione del NADPH a NADP (schema 7). La deplezione del GSH e l'ossidazione del NADPH provocano l'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , evento critico nella formazione dei *blebs* (Rush et al., 1985), caratteristici rigonfiamenti della membrana cellulare che si formano quando la cellula è sottoposta a stress ossidativo in presenza di tBH (Chen et al., 2000).



Schema 7: Meccanismo di morte cellulare indotto dal terz-butilidroperossido.

1.4.3 Misura del danno ossidativo *in vivo*: modello sperimentale del FeNTA

Il modello sperimentale del nitrilotriacetato ferrico (FeNTA) è un interessante modello per valutare lo stress ossidativo indotto dal radicale idrossilico OH^\bullet , prodotto *in vivo* in presenza di ferro (Inoue and Kawanishi, 1987).

Il FeNTA, $(\text{CH}_2\text{CNCOO})_3\text{Fe}$, è un complesso dove il ferro in forma Fe^{3+} è legato a tre molecole di acido nitrilotriacetico (NTA), un composto che si trova in diversi tipi di detergenti utilizzati nelle case e negli ospedali (Iqbal et al., 2003). Questo composto viene inoltre ampiamente utilizzato per prevenire l'accumulo dei minerali nel campo della fotografia, nell'industria tessile e nella produzione della carta e della cellulosa (Khan et al., 2004).

Nel FeNTA, l'NTA forma con il metallo un complesso dove solo tre siti di legame sono occupati e l'attività catalitica è particolarmente elevata (Toyokuni and Sagripanti, 1992). Il Fe così legato viene indicato come Fe chelato "catalitico" (Toyokuni, 1996). Lo stato redox-attivo del ferro nel composto è responsabile della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno, ritrovati nel siero dei ratti trattati con il FeNTA (Liu et al., 1991; Zhang et al., 1995).

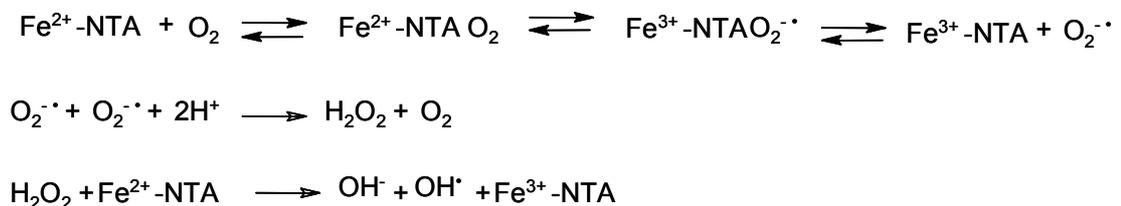
È stato dimostrato che il FeNTA è un potente nefrotossico e una somministrazione ripetuta del composto, tramite iniezione intraperitoneale, è in grado di indurre carcinoma renale nei topi e nei ratti (Ebina et al., 1986). Inoltre nel rene di ratti trattati con il FeNTA sono stati misurati elevati livelli di MDA, HNE e proteine modificate dall'HNE, altre specie reattive all'acido tiobarbiturico e prodotti derivati dall'ossidazione del DNA, come l'8-idrossideossiguanosina (8-OH-dG), indici di un forte danno ossidativo (Umemura et al., 1990a, b). Tra i possibili meccanismi con i quali viene esplicita l'azione tumorigenica nel rene, vi è l'implicazione della cicloossigenasi, stimolata dallo stress ossidativo indotto dal FeNTA, che determina la produzione di prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$, responsabili dell'induzione e del mantenimento di un processo iperproliferativo nell'organo (Iqbal et al., 1997).

È stato dimostrato che nei roditori il FeNTA è diabetogenico e induce rapidamente iperglicemia (Awai et al., 1979; May et al., 1980; Yamanoi et al., 1984). Il modello del FeNTA è stato anche proposto per lo studio dell'emocromatosi, in quanto il composto viene prevalentemente accumulato nelle cellule parenchimali del fegato (Parmley et al.,

1981). Il FeNTA agisce come potente promotore tumorale a livello epatico in seguito a somministrazione cronica (Iqbal et al., 1995).

L'iniezione intraperitoneale (IP) di una dose sub-letale di FeNTA induce un notevole stress ossidativo, causato da un'elevata produzione di radicali liberi a causa dell'eccesso di ferro. La nefrotossicità indotta da FeNTA è in parte dovuta alla produzione di radicali, principalmente OH[•], stimolata da ferro (Qi et al., 1999).

Dopo IP, il complesso Fe³⁺NTA attraversa il mesotelio e tramite la vena porta arriva al fegato (Awai et al., 1979). Una parte del ferro viene trasferita dal Fe³⁺NTA alla transferrina ed entra quindi negli epatociti (Bates and Schlabach, 1973); il resto entra in circolo e viene filtrato attraverso i glomeruli nel lume dei tubuli prossimali renali, dove è ridotto a Fe²⁺NTA dalla cisteina presente come prodotto di degradazione del glutatione (Okada et al., 1993; Toyokuni et al., 1990; Toyokuni and Sagripanti, 1993). Il complesso così ridotto è in grado di catalizzare la formazione di radicali, mediante la reazione di Fenton e di Haber-Weiss (Preece et al., 1988; Toyokuni, 1996) (schema 8), e scatenare una intensa perossidazione lipidica nelle membrane dei microvilli, con conseguente danno al DNA. Il Fe²⁺NTA è infatti in grado di catalizzare diverse reazioni con l'O₂ o con le sue specie radicaliche (Kimoto et al., 2000; Preece et al., 1988):



Schema 8: Reazione di Fenton e di Haber- Weiss.

In seguito alla degenerazione delle cellule del tubulo prossimale renale si osserva, nel tempo, una necrosi: i reni appaiono bianchicci con piccole placche diffuse (Toyokuni et al., 1994).

In questo modello sperimentale i topi si sono mostrati più suscettibili dei ratti ai danni provocati dallo stress ossidativo ed i maschi più delle femmine (Li et al., 1987; Toyokuni et al., 1990).

Inoltre, nei ratti, si ha un incremento nel fegato di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), mentre nel plasma si osserva un aumento dei livelli di

transaminasi come indice di danno epatico (Suzumura et al., 2000). È stato osservato che il livello di idroperossidi aumenta nel fegato e nel rene dei ratti dopo 2 ore dall'IP di FeNTA (Ikeda et al., 1998).

L'estensione del danno ossidativo è stata inoltre valutata mediante la misura del "potenziale antiossidante" a livello cellulare, come l'attività degli enzimi antiossidanti (ornitina decarbossilasi, glutatione perossidasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, glutatione reductasi, glutatione-S-transferasi e catalasi) e la concentrazione di molecole antiossidanti come il glutatione. In corrispondenza del momento di massimo danno ossidativo, si è osservato un forte calo dell'attività enzimatica e della quantità di antiossidanti disponibili (Ansar et al., 1999; Athar and Iqbal, 1998; Iqbal and Athar, 1998; Iqbal et al., 1998).

In seguito all'esposizione dei ratti ad una dose sub-letale di FeNTA è stato osservato un consumo di acidi grassi poliinsaturi (PUFA), un incremento del valore dei dieni coniugati e un decremento degli antiossidanti cellulari (α -tocoferolo e glutatione) nel fegato e nel rene (Deiana et al., 2001); inoltre è in grado di causare l'ossidazione della frazione lipidica del plasma, probabilmente il primo *target* del processo ossidativo indotto dal complesso (Deiana et al., 2005).

Il danno ossidativo della frazione lipidica del plasma è stato osservato dopo un'ora dal trattamento, con un significativo consumo dei principali acidi grassi insaturi e un corrispondente aumento degli idroperossidi degli acidi grassi; è stata anche evidenziata una diminuzione di α -tocoferolo.

Il trattamento in acuto con una dose sub-letale induce anche la variazione del colesterolo e un aumento del suo principale prodotto di ossidazione 7-cheto, nel plasma, rene e fegato (Rosa et al., 2005b). È stato osservato un significativo incremento con il tempo della concentrazione del 7-cheto nel plasma, nel rene e nel fegato degli animali trattati con il FeNTA, con un andamento inversamente correlato al consumo di colesterolo.

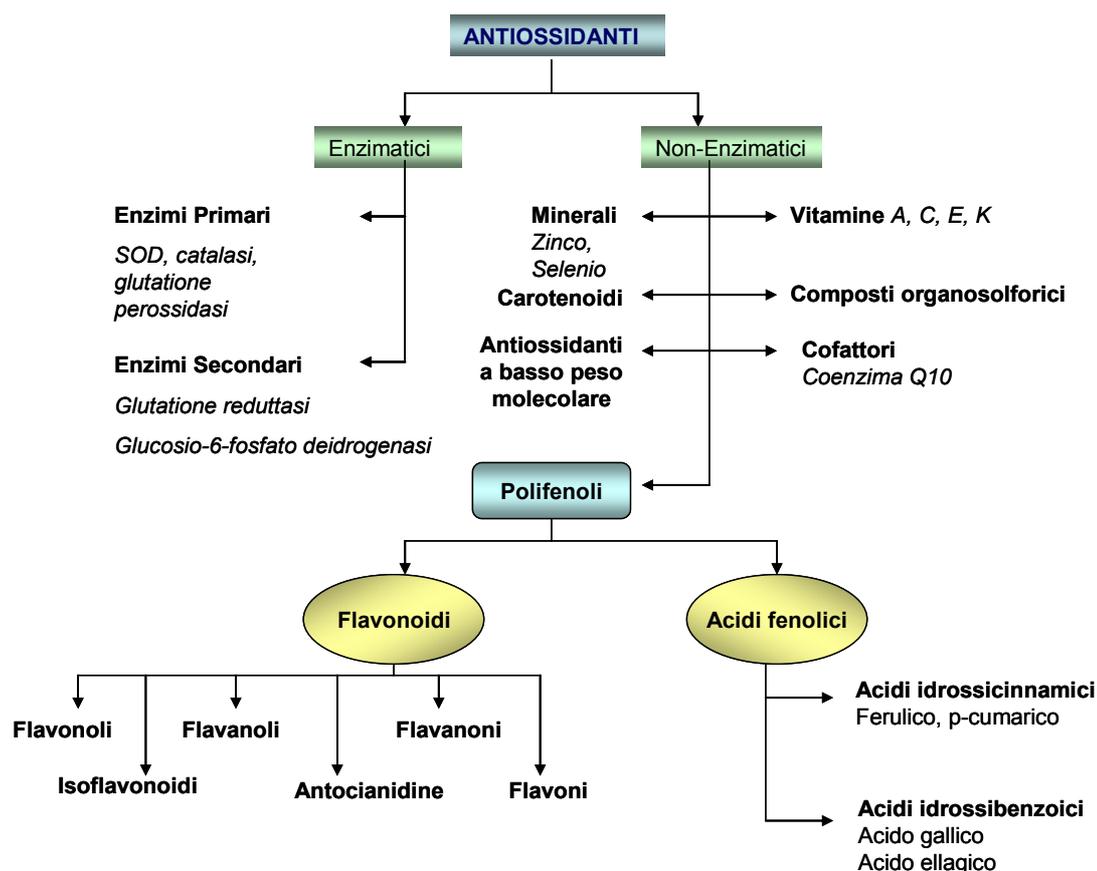
In questo modello sperimentale il plasma ed il rene sono risultati i primi e principali *target* della perossidazione lipidica indotta dal FeNTA. Nel fegato la progressione del processo ossidativo è risultata inferiore e di minore entità.

1.5 Antiossidanti

Gli antiossidanti sono sostanze in grado prevenire il danno ossidativo, interagendo con i radicali liberi, sopprimendone la loro formazione (antiossidanti preventivi o *preventive antioxidants*), contrastando l'attacco ai *target* biologici (*radical scavenging* o *chain breaking antioxidants*) o partecipando ai meccanismi di riparazione cellulare (Rice-Evans et al., 1995).

All'interno del nostro organismo sono presenti diversi tipi di antiossidanti, molti dei quali derivano dalla dieta; questi ultimi hanno il compito di coadiuvare l'azione degli antiossidanti endogeni nella difesa dall'attacco radicalico.

Gli antiossidanti vengono classificati in due gruppi principali: antiossidanti enzimatici e non-enzimatici (schema 9) (Ratnam et al., 2006).



Schema 9: Classificazione degli antiossidanti.

Gli antiossidanti enzimatici, come la catalasi, la glutatione perossidasi e la superossido dismutasi, vengono sintetizzati all'interno delle cellule, mentre quelli non-enzimatici, come le vitamine e i polifenoli, provengono principalmente dalla dieta, ad eccezione degli antiossidanti a basso peso molecolare e i cofattori enzimatici. I polifenoli rappresentano la maggior parte degli antiossidanti introdotti tramite la dieta e vengono a loro volta classificati in diversi gruppi, tra cui gli acidi fenolici e i flavonoidi (Ratnam et al., 2006).

1.5.1 Antiossidanti nella dieta e salute

Il mondo vegetale fornisce una serie di sostanze chimiche che esercitano potenti attività biologiche; tali componenti vengono denominati genericamente sostanze fitochimiche (Carratu and Sanzini, 2005). Un elevato numero di queste sostanze esercita un'attività biologica così marcata da poterla definire farmacologica, mentre altri possono produrre effetti avversi o effetti tossici.

Studi epidemiologici hanno accertato che diete ricche di alimenti di origine vegetale contribuiscono alla prevenzione di diverse patologie (Kaur and Kapoor, 2001), quali malattie cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative, patologie infiammatorie (Carratu and Sanzini, 2005) e alcuni tipi di tumore, tra cui il tumore della bocca e della faringe, dell'esofago, del polmone, dello stomaco e del colon (Glade, 1999).

In particolare la frutta e la verdura contengono livelli significativi di molecole antiossidanti, che possono contribuire al mantenimento della salute umana; è stato infatti dimostrato che il loro consumo aumenta la capacità antiossidante nel plasma, fattore importante per la prevenzione dell'aterosclerosi (Cao et al., 1998).

La dieta mediterranea è un modello nutrizionale ispirato alle abitudini alimentari tradizionali dei paesi del bacino del Mar Mediterraneo, in particolare Italia meridionale, Grecia e Spagna. Questo modello è caratterizzato da un elevato consumo di frutta e verdura, pane, cereali, olio extravergine di oliva e pesce, elementi importanti nella prevenzione di patologie quali l'obesità e il diabete di tipo 2 (Schroder, 2007). I primi studi risalgono al fisiologo americano Ancel Keys che condusse uno studio epidemiologico denominato *Seven Countries Study*, nel quale definì il concetto di dieta mediterranea (Keys et al., 1986).

In modelli animali è stato dimostrato che gli antiossidanti, in particolare la vitamina E, sono in grado di migliorare la resistenza insulinica, fenomeno causato dalla forte condizione di stress ossidativo che si verifica nel diabete di tipo 2; infatti bassi livelli di vitamina E nel plasma possono essere un fattore di rischio nell'insorgenza di questa patologia (Salonen et al., 1995).

Una dieta ricca in carotenoidi e la presenza di carotenoidi nel plasma sono stati inversamente associati alla concentrazione di glucosio e alla resistenza insulinica,

misurati nel plasma di soggetti che presentavano un elevato rischio di contrarre il diabete di tipo 2 (Ford et al., 1999; Ylonen et al., 2003).

In diversi studi epidemiologici è stato osservato come il consumo di frutta e verdura può essere un fattore importante nel contrastare l'insorgenza del tumore: da un'indagine epidemiologica effettuata in Finlandia è emerso che le persone che consumano una dieta ricca in flavonoidi hanno una minore probabilità di contrarre la malattia.

Inoltre da uno studio condotto su persone che consumano alimenti di origine vegetale ricchi in quercetina, come la cipolla e la mela, è emerso che hanno una minore probabilità di contrarre il cancro al polmone. I possibili meccanismi d'azione che i fitochimici, presenti nella frutta e nella verdura, possono svolgere per prevenire i diversi tipi di tumore sono molteplici: l'inibizione della proliferazione cellulare, l'inibizione dell'adesione e dell'invasività delle cellule tumorali e l'induzione e aumento degli enzimi detossificanti; anche l'attività antiossidante di *scavenging* di radicali liberi viene proposta come possibile meccanismo d'azione (schema 10) (Liu, 2004).

- ✓ Attività antiossidante
- ✓ Inibizione della proliferazione cellulare
- ✓ Induzione del differenziamento cellulare
- ✓ Diminuzione dell'espressione oncogenica
- ✓ Induzione dell'arresto del ciclo cellulare
- ✓ Induzione dell'apoptosi
- ✓ Inibizione delle vie di trasduzione del segnale
- ✓ Induzione e aumento degli enzimi detossificanti:
 - Glutazione perossidasi*
 - Catalasi*
 - Superossido dismutasi*
- ✓ Antiangiogenesi
- ✓ Inibizione enzimatica:
 - Ciclossigenasi*
 - Xantina ossidasi*
 - Enzimi della fase 1*
- ✓ Inibizione dell'adesione e dell'invasività cellulare
- ✓ Inibizione dei legami al DNA
- ✓ Regolazione del metabolismo di ormoni steroidei
- ✓ Regolazione del metabolismo degli estrogeni
- ✓ Attività antibatterica e antivirale

Schema 10: Possibili meccanismi d'azione con i quali i fitochimici possono prevenire il cancro.

Una dieta ricca di frutta e verdura viene spesso associata ad un ridotto rischio di contrarre patologie cardiovascolari; in letteratura sono presenti diversi studi epidemiologici dove viene mostrato che l'apporto di antiossidanti, come α -tocoferolo e flavonoidi, sono in grado di inibire l'ossidazione delle LDL. Ciò suggerisce che il consumo di alimenti in cui queste molecole sono principalmente presenti, può essere importante per la prevenzione delle lesioni aterosclerotiche, in quanto agiscono diminuendo la suscettibilità ossidativa delle LDL (Lapointe et al., 2006). È stato inoltre dimostrato che, nell'uomo, l'assunzione di β -carotene (60 mg/giorno) per tre settimane è in grado di aumentare, in maniera significativa, la *lag phase*, indicando un'attività di prevenzione nei confronti dell'ossidazione delle LDL.

I principali componenti antiossidanti maggiormente assunti con la dieta sono i polifenoli, i carotenoidi e le vitamine (Liu, 2004).

I fenoli sono molecole organiche caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti idrossilici (-OH). Oltre alle forme più semplici, caratterizzate dalla presenza di un solo anello aromatico, vi sono anche delle forme più complesse denominate **polifenoli**. I polifenoli sono metaboliti secondari delle piante e risultano coinvolti in diverse funzioni come quella di trasportatori di elettroni, regolatori dell'attività metabolica, pigmentazione ed impollinazione (Liu, 2004).

I frutti abitualmente presenti nella dieta che contengono la quantità più elevata di polifenoli totali sono il mirtillo, seguito dalla mela, l'uva rossa, la fragola, l'ananas, la banana, la pesca, il limone, l'arancia, la pera e il pompelmo (Sun et al., 2002); mentre per le verdure ricordiamo i broccoli seguiti dagli spinaci, le cipolle, il peperone, le carote, il cavolo, le patate, la lattuga, il sedano e il cetriolo (Chu et al., 2002). È stato approssimativamente stimato che i due terzi dei fenoli assunti con la dieta sono rappresentati dai flavonoidi, il restante dagli acidi fenolici.

I **flavonoidi**, presenti in alimenti come i cavoli, i broccoli, l'uva e i mirtilli, hanno un ruolo importante nella cardioprotezione, in quanto molti studi riportano che diete ricche in flavonoidi riducono il rischio di malattie cardiovascolari. Esercitano, inoltre, un ruolo fondamentale nella neuroprotezione, infatti frutti ricchi di antocianine (forme che derivano dagli agliconi antocianidine) svolgono un ruolo protettivo contro il declino della funzione cognitiva legata all'invecchiamento. Il numero e le specifiche posizioni dei gruppi idrossilici o la natura dei gruppi funzionali determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti

mutageni, attività biologiche dimostrate in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* (Carratu and Sanzini, 2005).

I **carotenoidi** sono i pigmenti più diffusi in natura e le loro attività biologiche, come provitamine e antiossidanti, li rendono dei composti estremamente interessanti. Chimicamente sono costituiti da uno scheletro isoprenico con una struttura ciclica, come il β -carotene, o aciclica, come il licopene, con diversi livelli di idrogenazione o gruppi funzionali legati (Britton, 1995).

La verdura e la frutta, quali la carota, la patata, la papaia, il mango e il melone, sono ricche fonti di β -carotene, mentre il pomodoro, l'anguria, l'albicocca sono più ricche in licopene.

I pigmenti carotenoidi svolgono ruoli importanti durante la fotosintesi e nella fotoprotezione dei tessuti vegetali, grazie alla capacità di queste molecole di inattivare le specie reattive dell'ossigeno, come l'ossigeno singoletto. Anche l'effetto protettivo che queste sostanze svolgono nella prevenzione del cancro e delle patologie cardiache è in parte dovuto all'azione antiossidante (Britton, 1995).

1.6 *Capsicum annuum* L. come fonte di antiossidanti naturali

Il *Capsicum annuum* L. è una pianta appartenente alla famiglia delle Solanacee che viene coltivata nelle regioni a clima temperato e caldo (Bianchi, 2004). È una pianta annuale, che importata dal Sud America, dove è originaria, viene comunemente coltivata nella regione mediterranea e nell'Europa centrale, soprattutto in Ungheria, considerata la patria della "paprika" (Maugini, 1994).

Il *Capsicum annuum* viene anche considerato una pianta medicinale, in quanto viene ampiamente utilizzato nella medicina tradizionale per le diverse proprietà stimolanti, antisettiche, digestive, disinfettanti e antinfiammatorie (Agradi et al., 2005).

Il suo frutto, il peperone, rappresentante della varietà *grossum*, e il peperoncino della varietà *longum* (figura 2), è un ortaggio che iniziò a diffondersi in Europa solo dopo la scoperta dell'America. Mentre la varietà *longum* ha comunque proprietà piccante, la varietà *grossum* può essere sia piccante che dolce.

I peperoni sono un'ottima fonte di vitamine A e C, flavonoidi e carotenoidi; il loro consumo può quindi essere importante per le diverse proprietà biologiche, tra cui quella antiossidante, che queste sostanze possiedono.

I flavonoidi presenti in maggiore quantità sono la quercetina e la luteolina, quantità che può variare nelle diverse varietà del *Capsicum*.

È stato dimostrato che la quantità dei due flavonoidi, quercetina e luteolina, variano nelle specie e in relazione a diversi stadi di maturazione, arrivando alla concentrazione di 800 mg/Kg in seguito ad idrolisi; questo valore è risultato strettamente correlato all'attività antiossidante della frazione fenolica ottenuta dal frutto (Lee et al., 1995).



(a)



(b)

Figura 2: *Capsicum annuum* L. varietà *grossum* (a) e *longum* (b).

Anche le vitamine A, C ed E sono presenti in elevate concentrazioni: la vitamina C varia da 46 a 243 mg/100 g di peso fresco, la vitamina E tra 3.7 e 236 mg/100 g di peso secco. Le diverse quantità riportate in letteratura sono attribuibili alle differenze nella *cultivar*, nel grado di maturazione, nelle condizioni di crescita e nel clima (Osuna-García et al., 1998).

I pigmenti carotenoidi sono stati ampiamente studiati per migliorare il mantenimento del colore durante la lavorazione e lo stoccaggio del frutto; inoltre, durante la maturazione, il frutto subisce una serie di cambiamenti dovuti alla conversione dei pigmenti. Il colore verde del frutto è principalmente dovuto alla presenza di clorofilla e di carotenoidi nel cloroplasto, come i carotenoidi ossigenati o xantofille (violaxantina, neoxantina e luteina), e il β -carotene, presente in elevate quantità nel peperone rosso. Il colore rosso del frutto è principalmente dovuto a pigmenti carotenoidi, quali la capsantina, la capsorubina e la capsantina 5,6-epossido tipici del genere *Capsicum* (Marin et al., 2004).

In particolare la capsantina rappresenta il 30-60% dei carotenoidi totali presenti nel frutto maturo, trovandosi esterificata parzialmente o totalmente con acidi grassi come l'acido laurico (12:0), miristico (14:0) e palmitico (16:0). Tale esterificazione avviene progressivamente durante la maturazione del frutto. È stato visto che la forma monoesterificata e diesterificata hanno proprietà antiossidanti simili a quelle della forma nonesterificata; inoltre l'attività antiossidante della capsantina è risultata superiore rispetto a quella esercitata dal β -carotene, luteina, zeaxantina e α -tocoferolo durante l'ossidazione del linoleato di metile (Matsufuji et al., 1998).

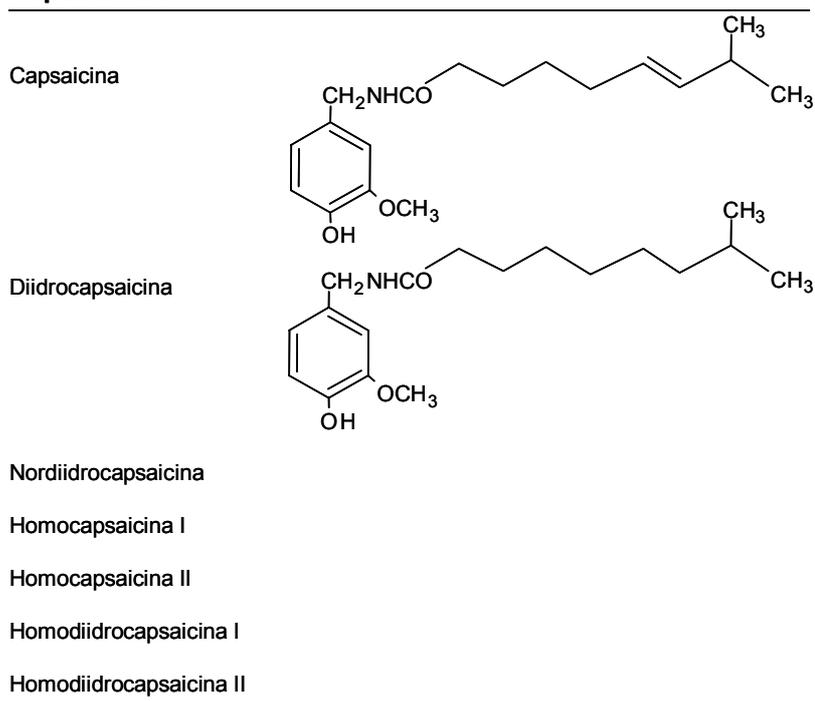
Tra le sostanze antiossidanti presenti nel frutto del genere *Capsicum annum*, vi sono dei composti esclusivi di questo genere: i capsaicinoidi.

1.6.1 Capsaicinoidi

Il sapore piccante dei frutti di alcune specie del genere *Capsicum* è principalmente dovuto ad una classe di composti chiamata capsaicinoidi; la proprietà piccante rende questa specie importante dal punto di vista economico, ampiamente utilizzata nell'industria alimentare come spezia, ma anche come pianta medicinale (Iorizzi et al., 2001).

Chimicamente sono delle ammidi con una porzione molecolare fenolica simile alla vanillilamina. Il sapore piccante del frutto è strettamente correlato alla presenza di sette capsaicinoidi (schema 11), ma i principali responsabili del sapore piccante sono la capsaicina [(E)-N-4-idrossi-3-metossibenzil-8-metil-6-nonenamide] e la diidrocapsaicina (6,7-diidroderivato della capsaicina) (schema 11) (Kobata et al., 1998).

Capsaicinoidi



Schema 11: Principali capsaicinoidi presenti nel frutto del genere *Capsicum*.

La nordiidrocapsaicina è il terzo maggiore componente di questa classe di composti, ed è un omologo della diidrocapsaicina (Kobata et al., 1999).

È stato dimostrato che la biosintesi dei capsaicinoidi avviene nella zona placentare del frutto tramite la via dell'acido cinnamico. La produzione dei capsaicinoidi aumenta con il grado di maturazione del frutto fino a raggiungere un valore massimo, dopodichè si ha un calo dei composti fino al 60% (Contreras-Padilla and Yahia, 1998). Studi *in vitro* hanno suggerito che la degradazione dei capsaicinoidi è dovuta all'azione di un enzima (perossidasi), presente nella zona placentare del frutto, in grado di ossidare la capsaicina e la diidrocapsaicina (Contreras-Padilla and Yahia, 1998).

La capsaicina e la diidrocapsaicina vengono facilmente assorbite nel tratto gastrointestinale, mediante un meccanismo di trasporto passivo, e arrivano alla vena porta, subendo una parziale idrolisi durante l'assorbimento (Kawada et al., 1984).

Studi effettuati *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la diidrocapsaicina viene idrolizzata a vanillilamina e acido 8-metil nonanoico; la vanillilamina viene poi trasformata, tramite deaminazione ossidativa, a vanillina, la quale viene trasformata in acido vanillico, se subisce una reazione di ossidazione, o in alcol vanillico, se subisce una riduzione. Nel ratto è stato dimostrato che l'enzima (idrolasi), che idrolizza la diidrocapsaicina, è distribuito in vari organi, principalmente nel tratto digestivo e nel fegato (Kawada and Iwai, 1985).

Dai dati presenti in letteratura, la capsaicina ha evidenziato numerose proprietà biologiche. È in grado di stimolare neuroni sensibili, tramite l'attivazione dei recettori vanilloidi, responsabili della trasmissione di sensazioni dolorifiche di tipo meccanico, termico e chimico. I recettori per i vanilloidi, detti VR-1 (*vanilloid receptor-like 1*) o TRPV-1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), sono recettori canale non selettivi e, per la capacità di rispondere a stimoli di varia natura, vengono chiamati "polimodali"; le vie effettrici per esposizioni ripetute all'agonista, vanno incontro a fenomeni di desensibilizzazione, che sono alla base dell'impiego, apparentemente paradossale, della capsaicina come antidolorifico (Tognetto et al., 2001).

Diversi autori si sono occupati dello studio delle proprietà antitumorali, antinfiammatorie e antiossidanti della capsaicina, in modelli animali e in diverse linee cellulari (Surh, 2002). La capsaicina è in grado di contrastare la formazione dell'edema nell'orecchio dei topi, indotto dall'olio di croton, ed esercita un'azione protettiva nei confronti del danno indotto da etanolo nella mucosa gastrica di ratti; inoltre ha mostrato la capacità di inibire l'aggregazione piastrinica, probabilmente attraverso il blocco della fosfolipasi A₂, enzima responsabile della liberazione dell'acido arachidonico dalla

membrana lipidica. La capsaicina è in grado di inibire alcune risposte pro-infiammatorie, come la generazione dell'anione superossido, l'attività della fosfolipasi A₂ e la perossidazione lipidica nella membrana dei macrofagi (Surh, 2002).

È stato dimostrato che la capsaicina è in grado di bloccare la proliferazione delle cellule T in maniera dose-dipendente e di inibire l'attivazione del fattore NF-κB, un regolatore della trascrizione di citochine, chemochine ed enzimi chiave del processo infiammatorio, risultato importante per un eventuale utilizzo del composto nel trattamento dei disordini dell'infiammazione (Sancho et al., 2002).

La capsaicina è in grado di indurre apoptosi in vari tipi di cellule cancerogene, come in cellule di epatocarcinoma umane (HepG2), tramite l'induzione della generazione di specie reattive dell'ossigeno, correlata all'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi; è stato perciò valutato un possibile utilizzo della capsaicina per il trattamento di epatomi umani (Lee et al., 2004b). L'attività apoptotica è stata evidenziata anche in cellule tumorali della vescica di topo (MBT-2), dovuta a un meccanismo di alterazione del rapporto delle proteine pro-apoptotiche ed anti-apoptotiche Bax e Bcl-2, al rilascio del citocromo c e all'attivazione della caspasi-3 (Lee et al., 2004a); nelle stesse cellule ha mostrato la capacità di indurre la produzione di ROS e la perossidazione lipidica.

In diverse cellule leucemiche umane (HL-60, K562 e KU812), l'attività apoptotica della capsaicina è stata esplicitata tramite l'induzione della fosforilazione del residuo di serina (Ser-15) della proteina p53, mediante la produzione dei ROS durante il trattamento con la molecola (Ito et al., 2004).

Un'altra interessante proprietà biologica esercitata da questo vanilloide è la promozione del metabolismo energetico e l'aumento della secrezione di catecolamine nei ratti. È stato infatti osservato che una somministrazione orale di capsaicina (10 mg/Kg p.c.) determina negli animali un significativo incremento del consumo di ossigeno dopo 30-60 minuti dal trattamento, senza differenze significative nel quoziente respiratorio; inoltre dopo 30 minuti dal trattamento, è stato misurato un aumento significativo della concentrazione di adrenalina nel sangue, rispetto a quella dei ratti di controllo, e una diminuzione significativa dei trigliceridi nel plasma dei ratti trattati dopo 1 e 2 ore dalla somministrazione di capsaicina. Il trattamento cronico con 10 mg/Kg p.c per due settimane per via intragastrica, è in grado di ridurre l'accumulo di grasso nei ratti (Ohnuki et al., 2001a).

La capsaicina è risultata essere un composto con una buona attività antiossidante in diversi sistemi sperimentali *in vitro*. Nel sistema dell'ossidazione dell'acido linoleico indotta da un iniziatore radicalico, il 2,2'-azobisisobutirronitrile (AIBN), la concentrazione di capsaicina, utilizzata nel sistema sperimentale, e la produzione degli idroperossidi lipidici, formati durante l'ossidazione, sono risultati inversamente correlati; durante l'ossidazione dell'acido grasso il composto ha mostrato di favorire la formazione degli isomeri "cis, trans" rispetto agli isomeri "trans, trans", predominanti in assenza dell'antiossidante (Henderson et al., 1999). Inoltre la capsaicina ha mostrato un'azione di *scavenging* nei confronti dei radicali 1,1'-difetil-2-picrilidrazile (DPPH) sia in soluzione, acqua ed etanolo, che nelle membrane; durante il test l'attività di *scavenger* è risultata comparabile a quella dell' α -tocoferolo e l'attività antiossidante mostrata sembrerebbe dovuta principalmente al carbonio benzilico presente nella posizione 7 della molecola, in quanto i maggiori prodotti della reazione della capsaicina con i radicali DPPH sono risultati la vanillina e l'8-metil-6-nonenamide, indicando che la capsaicina viene tagliata a livello del legame tra il C7 legato all'anello benzilico e l'N8 presente nella porzione amidica (Kogure et al., 2002). Gli stessi autori hanno inoltre mostrato che la capsaicina è in grado di inibire l'ossidazione dei lipidi della membrana mitocondriale di fegato di ratto, indotta da ADP/Fe²⁺.

La capsaicina è anche in grado di esercitare una notevole attività antiossidante durante l'ossidazione delle LDL indotta da ferro (Murakami et al., 2001) e rame, e *in vivo* in ratti nutriti con una dieta ricca di colesterolo, mostrando un effetto ipocolesterolemico, azione correlata alla capacità di inibire la perossidazione lipidica (Kempaiyah et al., 2005).

Recentemente è stato preso in considerazione un possibile uso topico della capsaicina per il trattamento di pazienti affetti da deficienza dell'ormone della crescita GH, che mostrano cambiamenti della morfologia della pelle, come la diminuzione dello spessore e della quantità di collagene nel tessuto. Anche la diminuzione dell'espressione genica del mediatore del fattore di crescita I simile all'insulina (IGF-I), importante per la funzione del tessuto, pare sia coinvolta nell'eziologia della patologia. L'applicazione di capsaicina sulla pelle dei topi è in grado di aumentare in maniera significativa i livelli di IGF-I dopo 30 e 60 minuti dal trattamento; lo stesso effetto è stato esplicito anche da altri due capsaicinoidi, la diidrocapsaicina e la nordiidrocapsaicina, che hanno ugualmente indotto un aumento significativo di IGF-I dopo 30 minuti dal trattamento.

L'effetto esercitato dalla capsaicina potrebbe essere dovuto alla risposta neuroendocrina che si genera in seguito all'induzione dell'attivazione dei neuroni sensoriali. Gli autori hanno poi esteso lo studio sull'uomo, osservando un aumento significativo dell'elasticità della pelle di 17 volontarie, alla stessa dose utilizzata negli animali (Harada and Okajima, 2007).

1.6.2 Capsinoidi

Nei frutti di una *cultivar* non piccante di *Capsicum annuum*, denominata CH-19 Sweet, sono presenti, in quantità apprezzabili, delle sostanze simili ai capsaicinoidi, chiamate capsinoidi, prive del potere piccante ed irritante, caratteristica che le rende interessanti dal punto di vista nutrizionale e farmaceutico (Kobata et al., 1998).

I principali capsinoidi presenti nel *Capsicum* sono il capsiato [4-idrossi-3-metossibenzil(E)-8-metil-6-nonenoato] e il diidrocapsiato (6,7-diidroderivato del capsiato), esteri analoghi della capsaicina e della diidrocapsaicina (figura 3). La struttura chimica del capsiato è simile a quella della capsaicina, tutte e due le molecole presentano lo stesso residuo acilico e differiscono per la porzione aromatica, la vanillilamina nei capsaicinoidi e l'alcol vanillico nei capsinoidi (Kobata et al., 1998).

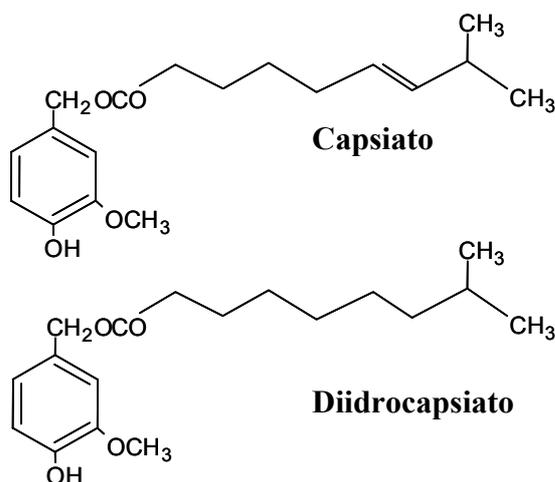


Figura 3: Struttura chimica del capsiato e del diidrocapsiato.

Le quantità di capsiato e diidrocapsiato presenti nella varietà CH-19 Sweet sono rispettivamente di 98 e 59 mg/Kg di frutto fresco (Kobata et al., 1998). Tra i capsinoidi presenti nella varietà non piccante ricordiamo anche il nordiidrocapsiato, il terzo maggiore componente presente nella *cultivar* (Kobata et al., 1999). Queste tre molecole, capsiato, diidrocapsiato e nordiidrocapsiato, sono presenti nel frutto approssimativamente nel rapporto di 5:3:1.

È stato dimostrato che la somministrazione orale della varietà CH-19 Sweet, 10 g/Kg p.c., nei topi induce un aumento significativo della temperatura corporea dopo 54-66 minuti dall'ingestione, rispetto agli animali nutriti con una varietà di *Capsicum*

chiamata California–Wandar priva di capsaiato e capsaicina. L'effetto termogenico è risultato significativo anche dopo 40-60 minuti dall'ingestione di capsaiato e capsaicina (10 mg/Kg p.c.) (Ohnuki et al., 2001b), considerando inoltre che la quantità di capsaiato presente nel frutto della varietà CH-19 Sweet è di circa 0.3-1 mg/g, è ragionevole affermare che l'effetto termogenico sia principalmente dovuto a questo componente. L'aumento della temperatura sembrerebbe dovuto alla stimolazione dei recettori vanilloidi da parte delle molecole, in quanto il pretrattamento con uno specifico antagonista dei recettori vanilloidi, la capsazepina, induce una diminuzione dell'effetto termogenico sugli animali trattati.

In uno studio successivo condotto sull'uomo è stato osservato che l'ingestione dei frutti della varietà del *Capsicum annuum* CH-19 Sweet determina un aumento significativo della temperatura corporea dopo 10-60 minuti dall'ingestione e un incremento significativo del consumo di ossigeno dopo 40 minuti dall'ingestione; dai risultati ottenuti gli autori suggeriscono che i frutti della varietà CH-19 Sweet inducono un aumento della termogenesi e del metabolismo energetico, proprietà che potrebbe essere utile nel trattamento dell'obesità (Ohnuki et al., 2001c).

Lo studio condotto sull'effetto del capsaiato sul metabolismo energetico è stato poi esteso valutando la misura di alcuni parametri. La somministrazione orale di capsaiato (10 mg/Kg p.c.) ha mostrato indurre nei topi un aumento significativo del consumo di ossigeno, dopo 2 ore dal trattamento, e della concentrazione di adrenalina nel sangue, dopo 1 ora; è stata inoltre osservata, dopo 1-2 ore dalla somministrazione orale di capsaiato, una diminuzione della concentrazione dei trigliceridi. Inoltre il trattamento per via orale effettuato in cronico (10 e 50 mg/Kg p.c.) nei topi per due settimane ha determinato la soppressione dell'accumulo di grasso negli animali (Ohnuki et al., 2001a).

Per chiarire il meccanismo d'azione del composto alla base di questo effetto, Masuda e i suoi collaboratori hanno analizzato le proteine disaccoppianti (UCP), le quali svolgono un ruolo importante nella spesa energetica, nel mantenimento del peso corporeo e nella termoregolazione. È stato osservato che la somministrazione di capsaiato (10 mg/Kg p.c.), nei topi, per due settimane, determina un aumento dei livelli di mRNA delle proteine UCP1 nel tessuto adiposo bruno, UCP2 nel tessuto adiposo bianco e UCP3 nel muscolo scheletrico, senza incrementare il livello di ormoni tiroidei nel sangue (Masuda et al., 2003).

Inoltre in ratti maschi nutriti per 4 settimane con una dieta a base di colesterolo (1%) e arricchita con capsinoidi, capsiato e diidrocapsiato (0.1 e 1 mmoli/Kg p.c.), è stato osservato sia una riduzione del livello di colesterolo totale nel sangue e nel fegato sia un aumento dell'attività dell'enzima lipoprotein lipasi nel tessuto adiposo (Tani et al., 2004).

A differenza della capsaicina, il capsiato è privo delle proprietà piccanti ed irritanti, probabilmente grazie alla sua elevata lipofilità e instabilità in ambiente acquoso, che non gli permette di raggiungere i nervi terminali nocicettori; inoltre la presenza, *in vivo*, di esterasi o di lipasi può portare all'idrolisi del capsiato, dato che questi enzimi sono stati trovati nella cavità orale e nella cornea. È stato infatti dimostrato che l'applicazione di una soluzione di capsiato nei ratti a livello della bocca, degli occhi e della pelle, non induce una significativa risposta irritante, mentre l'iniezione subcutanea di una soluzione di capsiato nelle zampe del ratto induce una risposta nocicettiva, indicando la sua caratteristica di agonista del recettore per la capsaicina TRVP1 (Iida et al., 2003).

Il capsiato e il diidrocapsiato hanno mostrato una significativa attività antiossidante, comparabile a quella dei corrispondenti capsaicinoidi, capsaicina e diidrocapsaicina.

La capacità di inibire la perossidazione lipidica è stata studiata in sistemi *in vitro* durante l'autossidazione e l'ossidazione dell'acido linoleico indotta da FeCl₃ o EDTA a 37°C in assenza di solvente. Durante l'autossidazione dell'acido linoleico, il capsiato e il diidrocapsiato hanno esercitato un'attività antiossidante paragonabile a quella degli antiossidanti naturali luteolina e α -tocoferolo (Rosa et al., 2002a). In questi sistemi sperimentali in particolare il capsiato ha mostrato uno spostamento della formazione degli idroperossidi verso gli isomeri "cis, trans" (HPODE c,t) all'aumentare delle concentrazioni, indice di un meccanismo d'azione che consiste nella donazione di atomi di idrogeno (Rosa et al., 2002a).

Nell'uomo, durante un moderato esercizio fisico, i muscoli utilizzano principalmente gli acidi grassi liberi circolanti, il glucosio extramuscolare e le riserve muscolari di trigliceridi e glicogeno. È stato dimostrato che una somministrazione per via orale in acuto di capsiato (10 mg/Kg p.c.) è in grado di aumentare la resistenza natatoria in ratti maschi. Dopo 30 minuti dal trattamento, sono stati misurati elevati livelli di acidi grassi liberi nel sangue e bassi livelli di acido lattico negli animali trattati con capsiato. L'effetto è stato annullato in presenza della capsazepina, risultato che indica come

l'aumento della capacità natatoria sia dovuto alla stimolazione dei recettori vanilloidi (Haramizu et al., 2006).

1.7 Vanillil nonanoato o capsiato sintetico

Il vanillil nonanoato, o capsiato sintetico, è un analogo chimico del capsiato naturale (figura 4), che ha mostrato interessanti proprietà biologiche e viene considerato un composto in grado di mimare il comportamento del capsiato naturale.

Questo composto viene sintetizzato tramite la reazione di esterificazione dell'alcol vanillico con l'acido nonanoico (reazione di Mitsunobu) (Appendino et al., 2002).

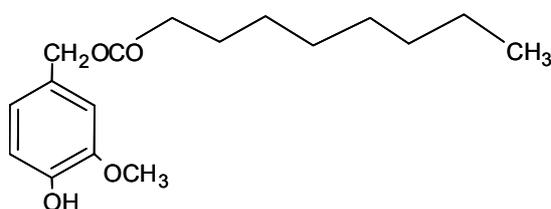


Figura 4: Struttura del vanillil nonanoato o capsiato sintetico.

Il vanillil nonanoato è in grado di modulare la risposta infiammatoria *in vivo*; è un inibitore, più potente della capsaicina, del fattore NF- κ B e dell'attivazione delle cellule T alla concentrazione di 100 μ M.

L'attività antinfiammatoria *in vivo* è stata dimostrata utilizzando il modello del destrano sodio solfato (DSS), un modello utile per lo studio di patologie ulcerative. I topi trattati per via orale per 6 giorni con il DSS al 5% in acqua presentano un esteso danno epiteliale al colon, accompagnato da una massiva infiltrazione delle cellule infiammatorie. Nei topi trattati con una iniezione intraperitoneale di vanillil nonanoato (6 mg veicolati in 200 μ l di olio d'oliva) è stata osservata una protezione al danno dell'epitelio ghiandolare e la presenza di poche cellule infiammatorie. In un secondo modello è stata anche valutata la capacità del composto di proteggere dallo shock settico letale indotto nei topi dalla somministrazione di lipopolissaccaridi; il pretrattamento con il vanillil nonanoato è in grado di determinare il 29% di sopravvivenza degli animali trattati (Sancho et al., 2002).

È stata inoltre studiata la capacità del vanillil nonanoato di indurre apoptosi nelle cellule tumorali Jurkat. Gli esperimenti hanno mostrato che la molecola, alla concentrazione di 50 μ M per 4 ore, è in grado di mediare la produzione dei ROS, dopo

il successivo trattamento con la diidroetidina (2 μM) per 20 minuti. I ROS prodotti all'interno della cellula, generati dal trattamento con il vanilloide, sono risultati provenienti dall'ossidazione della diidroetidina, la cui colorazione fluorescente rossa è stata rivelata attraverso la citometria a flusso. Le cellule trattate con il vanillil nonanoato hanno mostrato un'elevata percentuale di fluorescenza (91%), indicando la presenza di una elevata quantità di ROS all'interno della cellula. L'attività del vanillil nonanoato è risultata inoltre più efficace rispetto a quella della capsaicina, che ha mostrato un'attività comparabile ad una dose più alta (200 μM) e a tempi più lunghi (Macho et al., 2003b). Successivamente è stato osservato che l'attività apoptotica del vanillil nonanoato, nei confronti delle cellule tumorali, viene annullata dalla metilazione del gruppo fenolico -OH, dimostrando l'importanza di tale gruppo nell'attività proossidante.

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata valutata in diversi sistemi sperimentali *in vitro*. La capacità di inibire la perossidazione lipidica è stata valutata durante il sistema dell'autossidazione e l'ossidazione dell'acido linoleico in presenza di FeCl_3 o EDTA a 37° C in assenza di solvente, sistema in cui la molecola ha mostrato un'attività antiossidante comparabile a quella dei composti naturali, capsaiato e diidrocapsaiato.

Nel sistema dell'autossidazione dell'acido linoleico l'andamento dell'ossidazione è stato seguito misurando il consumo dell'acido grasso e la formazione dei suoi principali prodotti di ossidazione, gli idroperossidi isomeri “*cis, trans*” e “*trans, trans*” (HPODE c,t e t,t). Come i composti naturali, anche il vanillil nonanoato ha determinato uno spostamento della formazione degli idroperossidi verso gli isomeri *cis, trans* dipendente dalla concentrazione, indicando l'azione di questo composto come donatore di atomi di idrogeno (Rosa et al., 2002a).

L'attività antiossidante del composto, alle concentrazioni non citotossiche di 1.5 e 2.5 μM , è stata osservata anche nelle colture cellulari durante l'ossidazione mediata da FeCl_3 (200 e 400 μM) nelle cellule HELF (fibroblasti polmonari umani), valutando come parametro della perossidazione lipidica l'MDA prodotta dopo 1 ora dal trattamento (Rosa et al., 2002a).

2 Scopo del lavoro

Per cercare di stabilire i possibili meccanismi d'azione che gli antiossidanti potrebbero esplicare nel contrastare l'azione dei radicali liberi, specie chimiche altamente reattive prodotte in numerose patologie, risulta di estrema importanza l'utilizzo di diversi modelli sperimentali di stress ossidativo (Kaur and Kapoor, 2001).

Tra le molecole di origine vegetale che hanno mostrato importanti proprietà biologiche ricordiamo il capsaiato, presente in quantità apprezzabili nei frutti di una *cultivar* non piccante di *Capsicum annuum*, denominata CH-19 Sweet; il capsaiato essendo privo di potere piccante ed irritante, risulta essere interessante dal punto di vista nutrizionale e farmaceutico (Faraut et al., 2007; Iida et al., 2003; Kobata et al., 1998).

In questo lavoro di tesi l'attenzione è stata rivolta verso il vanillil nonanoato, analogo chimico del capsaiato naturale, del quale è in grado di mimare il comportamento; in un lavoro precedente (Rosa et al., 2002a), l'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata valutata in alcuni sistemi sperimentali *in vitro* nei quali la molecola ha mostrato un'attività di protezione comparabile a quella esercitata dal composto naturale.

Per approfondire il meccanismo dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata effettuata la comparazione dell'attività antiossidante di questo composto fenolico con quella di due analoghi chimici semplificati, l'alcol vanillico e la vanillina (figura 5), che presentano lo stesso residuo vanilloide nella molecola, onde stabilire una relazione struttura-attività, per poter valutare quindi quale porzione del composto, il residuo acilico o la porzione vanilloide, fosse maggiormente implicata nell'attività antiossidante.

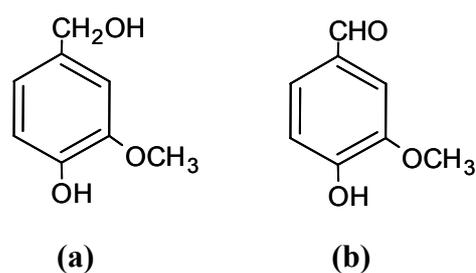


Fig. 5: Struttura dell'alcol vanillico (a) e della vanillina (b).

L'alcol vanillico (4-idrossi-3-metossibenzil alcol) possiede uno scheletro benzenico trisostituito ed è un componente della *Gastrodia elata*, una tradizionale erba cinese utilizzata nei disordini convulsivi come l'epilessia (Hsieh et al., 2000), mentre la vanillina, un'aldeide aromatica (4-idrossi-3-metossibenzaldeide), è la molecola che

impartisce alla vaniglia il suo tipico profumo, studiata per i suoi effetti antimicrobici (Delaquis et al., 2005).

L'effetto protettivo delle tre molecole è stato valutato in sistemi *in vitro* durante l'ossidazione dell'acido linoleico a 37°C e del colesterolo a 140°C in assenza di solvente. L'andamento dell'ossidazione è stato seguito monitorando il consumo dell'acido linoleico e del colesterolo e la formazione dei loro principali prodotti di ossidazione, gli idroperossidi isomeri per l'acido linoleico e il 7-cheto per il colesterolo. L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata poi valutata in un sistema *in vitro* più complesso, durante l'ossidazione delle LDL in presenza di Cu²⁺, considerando come indici del danno ossidativo i componenti lipidici più suscettibili all'azione ossidante, quali acidi grassi insaturi e colesterolo e i loro rispettivi prodotti di ossidazione. Lo studio dell'ossidazione di queste lipoproteine *in vitro* in presenza del metallo può essere utile per la rilevanza fisiologica che questo processo riveste in alcune condizioni patologiche (Burkitt, 2001), in particolare quelle legate all'ossidazione del compartimento plasmatico (Frei and Gaziano, 1993) e valutare l'effetto che i capsinoidi esplicano durante l'ossidazione delle LDL fornisce preziose informazioni.

In letteratura sono infatti presenti diversi studi epidemiologici dove viene mostrato che l'apporto di antiossidanti, presenti nella frutta e nella verdura, può essere un fattore importante per la prevenzione delle lesioni aterosclerotiche, in quanto agiscono diminuendo la suscettibilità ossidativa delle LDL (Lapointe et al., 2006).

Anche le colture cellulari sono ampiamente utilizzate come modello sperimentale per le importanti informazioni che forniscono in un sistema biologico relativamente semplice. Gli studi sulle colture cellulari rappresentano un passaggio importante nella valutazione dello stress ossidativo e dei composti che ne modulano l'andamento, che precede l'utilizzo di modelli sperimentali più complessi, come quelli *in vivo*.

In questo lavoro è stato messo a punto un modello sperimentale per monitorare in modo specifico l'andamento della perossidazione lipidica nelle colture cellulari, considerando che il processo ossidativo inizia fondamentalmente a livello della frazione lipidica della membrana cellulare e porta alla produzione di prodotti di ossidazione intermedi di grande rilevanza biologica.

Sono state utilizzate le cellule VERO, una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia, ed è stato indotto un danno ossidativo tramite l'utilizzo dell'ossidante tBH.

Onde valutare le modificazioni ossidative a livello della membrana cellulare sono state analizzate le variazioni dei livelli dei principali acidi grassi insaturi e saturi, del colesterolo e della vitamina E.

Lo stesso modello sperimentale è stato inoltre utilizzato per testare l'attività antiossidante del vanillil nonanoato durante l'ossidazione indotta dal tBH; l'effetto protettivo è stato valutato sulla produzione di MDA, utilizzando la metodica del TBARS e in maniera più specifica sulla diminuzione dei componenti lipidici di membrana.

Al fine di valutare l'attività antiossidante del vanillil nonanoato *in vivo* è stato utilizzato il modello sperimentale del FeNTA, modello di danno ossidativo acuto indotto per reazione di Fenton in presenza di Fe, misurando gli stessi parametri lipidici valutati nei modelli precedenti.

L'esposizione dei ratti ad una dose sub-letale di FeNTA è in grado di causare l'ossidazione della frazione lipidica del plasma (Deiana et al., 2005) e del rene (Deiana et al., 2001); l'azione antiossidante del vanillil nonanoato è stata quindi valutata considerando la variazione della componente lipidica che avviene nel compartimento plasmatico e nella struttura renale per azione del FeNTA.

3 Materiali e metodi

3.1 Sistemi chimici in vitro

3.1.1 Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza analitica, sono stati acquistati dalla Merck (Darmstad, Germania).

Il colesterolo, il 5-colesten-3 β -ol-7-one (7-cheto), l'acido linoleico (18:2), l'alcol vanillico e la vanillina sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli acidi grassi c,t-13-idroperossi-ottadeca-dienoico (c,t-13-HPODE) e c,t-9-idroperossi-ottadeca-dienoico (c,t-9-HPODE) sono stati acquistati dalla Cascade Biochem (Ltd., Londra).

Il vanillil nonanoato è stato gentilmente fornito dal Professor Giovanni Appendino (Discaff, Università del Piemonte Orientale, Novara).

Tutti gli altri reagenti e prodotti chimici sono stati utilizzati al più elevato grado di purezza.

3.1.2 Apparecchiature

- Sistema HPLC 1100, Agilent Technologies (Deutschland GmbH, Waldbronn, Germania) dotato di rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.
- Colonna cromatografica Chrompack, Inertsil 5 ODS-2, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 4.6 mm.
- Colonna cromatografica Chrompack, Inertsil 5 ODS-3, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 3 mm (Boerhaaveplein, Olanda).
- Bagno termostatico modello SB24, Falc Instrument s.r.l. (Treviglio, Bergamo, Italia).
- Evaporatore rotante sottovuoto R 114 Buchi (Svizzera).
- Bagno termostatico Stuart Scientific (Redhill, Surrey, Regno Unito).

3.1.3 Sistema dell'acido linoleico: autossidazione dell'acido grasso in presenza di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina

3.1.3.1 Ossidazione

Le prove di ossidazione dell'acido linoleico sono state condotte in strato sottile in assenza di solvente (Banni et al., 1996a; Dessì et al., 2001).

Da una soluzione di acido linoleico (2 mg/ml in MeOH) sono stati campionati 0.5 ml (3566 nmoli), portando il volume totale a 1 ml con MeOH; i campioni sono stati portati a secco sotto vuoto ed incubati in un bagno termostatico a 37°C per 32 ore. Per tutta la durata dell'esperimento, i campioni sono stati esposti a luce artificiale, mentre i controlli sono stati lasciati, per lo stesso tempo, a 0°C al buio. Successivamente i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio e immediatamente disciolti in 1 ml di CH₃CN acidificato con acido acetico (0.14%). Aliquote dei campioni sono state iniettate in HPLC.

Differenti quantità (2÷68 nmoli) delle soluzioni di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina in MeOH (soluzioni 1 mg/ml, 100 µg/ml e 10 µg/ml) sono state preincubate per 10 minuti con l'acido linoleico prima della sua autossidazione. La soluzione di vanillil nonanoato è stata preparata poco prima dell'utilizzo, in considerazione della sua instabilità nei solventi polari (Sutoh et al., 2001). Successivamente i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio e immediatamente disciolti in 1 ml di CH₃CN acidificato con acido acetico (0.14%). Aliquote dei campioni sono state iniettate in HPLC.

3.1.3.2 Analisi in HPLC

Le analisi dell'acido linoleico e dei suoi prodotti di ossidazione, gli isomeri HPODE, sono state eseguite in HPLC con un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi. I composti sono stati eluiti utilizzando una colonna 5 ODS-2 C₁₈ a fase inversa (150 mm × 4.6 mm) e come fase mobile una miscela di CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (70/30/0.12 v/v/v), ad un flusso di 1.5 ml/min. L'acido linoleico è stato rivelato a 200 nm, gli idroperossidi isomeri (c,t-9-HPODE, t,t-9-HPODE, c,t-13-HPODE, t,t-13-HPODE) a 234 nm. L'identificazione dei picchi è stata eseguita comparando il loro tempo di ritenzione con quello dei composti di riferimento commerciali. Inoltre, sono stati effettuati gli spettri in assorbanza e in derivata seconda per confermare l'identificazione dei picchi (Banni et al., 1996a; Dessì et al., 2001), generati utilizzando il software *Agilent Chemstation A.10.02*.

3.1.4 Sistema del colesterolo: ossidazione in presenza di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina

3.1.4.1 Ossidazione

L'ossidazione del colesterolo è stata condotta con il metodo descritto da Kim e Nawar leggermente modificato (Rosa et al., 2005a). Da una soluzione di colesterolo (2 mg/ml in MeOH) sono stati campionati 0.5 ml, portando il volume totale a 1 ml con MeOH.

I campioni sono stati portati a secco sotto vuoto ed incubati successivamente in un bagno termostatico a 140°C per 1.5 ore; per tutta la durata dell'esperimento, i campioni sono stati esposti a luce artificiale, mentre i controlli sono stati lasciati, per lo stesso tempo, a 0°C al buio.

Differenti concentrazioni (2÷68 nmoli) delle soluzioni di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina in MeOH (soluzioni 1 mg/ml, 100 µg/ml e 10 µg/ml) sono state preincubate per 10 minuti con il colesterolo prima della sua autossidazione.

L'ossidazione è stata interrotta mediante raffreddamento in ghiaccio; i campioni sono stati immediatamente disciolti in 1 ml di MeOH e aliquote dei campioni sono state iniettate in HPLC.

3.1.4.2 Analisi in HPLC

L'analisi quali-quantitativa del colesterolo e del suo prodotto di ossidazione 7-cheto è stata eseguita in HPLC con un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi. Il colesterolo è stato eluito utilizzando una colonna 5 ODS-3 C₁₈ a fase inversa (150 mm × 3 mm) e come fase mobile MeOH ad un flusso di 0.4 ml/min.

Il colesterolo è stato rivelato a 203 nm mentre il 7-cheto a 245 nm. L'identificazione dei picchi è stata eseguita comparando il tempo di ritenzione con quello dei composti di riferimento commerciali; sono stati inoltre effettuati gli spettri in assorbanza per confermare l'identificazione dei picchi (Rosa et al., 2005b), generati utilizzando il software *Agilent Chemstation A.10.02*.

3.1.5 Analisi statistiche

È stato usato il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) per calcolare le medie e le deviazioni standard dei dati ottenuti da due esperimenti indipendenti che hanno coinvolto l'analisi in triplo di ciascun campione (n=6). Per evidenziare la significatività tra le medie dei diversi gruppi, è stata effettuata l'analisi One way della varianza (ANOVA).

3.2 Ossidazione delle LDL

3.2.1 Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza analitica, sono stati acquistati dalla Merck (Darmstad, Germania).

Il cloruro di sodio (NaCl), il fosfato monobasico di sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), il fosfato bibasico di sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), l'acido ascorbico e il solfato rameico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sono stati acquistati dalla Carlo Erba (Milano, Italia).

Il 5-colesten-3 β ,7 β -diolo (7 β -OH), gli acidi grassi standard insaturi, la trioleina e la trilinoleina sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Anche le lipoproteine a bassa densità (LDL), ottenute dal plasma umano, sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) come soluzione in 150 mM di NaCl, pH 7.4, con lo 0.01% di EDTA.

Il colesterolo, il 7-cheto e gli idroperossidi (c,t e t,t-13-HPODE e c,t e t,t-9-HPODE) sono stati acquistati come indicato nel modello descritto in precedenza.

La membrana in estere di cellulosa rigenerata (Float-A-Lyzer Spectra/Por), con range di esclusione molecolare da 10.000 dalton, per la dialisi delle LDL, è stata acquistata dalla ditta Prodotti Gianni (Milano, Italia).

Il Desferal (deferrossamina metansulfonato) è stato acquistato dalla CIBA-Geigy, (Basilea, Svizzera).

Tutti gli altri reagenti e prodotti chimici sono stati utilizzati al più elevato grado di purezza.

3.2.2 Apparecchiature

- Sistema HPLC 1100, Agilent Technologies (Deutschland GmbH, Waldbronn, Germania) dotato di rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.
- Colonna cromatografica Chrompack, Inertsil 5 ODS-2, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 4.6 mm.
- Colonna cromatografica Chrompack, Inertsil 5 ODS-3, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 3 mm.
- Colonna C₁₈ ODS Hypersil, particelle di 5 µm, 100 × 2.1 mm.
- Bagno termostatico modello SB24, Falc Instrument s.r.l. (Treviglio, Bergamo, Italia).
- Evaporatore rotante sottovuoto R 114 Buchi (Svizzera).
- Centrifuga ALC 4237R a rotore fisso, ALC INTERNATIONAL (Milano, Italia).

3.2.3 Dialisi

Le LDL sono state dializzate in tampone fosfato 10 mM (NaCl 0.154 M, NaH₂PO₄ 1.13 mM, Na₂HPO₄ 7.997 mM, pH 7.4) (PBS) utilizzando una membrana da dialisi (Spectra/Por Float-A-lyser) in estere di cellulosa rigenerata, con un range di esclusione molecolare da 10.000 dalton, per eliminare l'EDTA presente nella confezione. La membrana è stata preliminarmente lavata e immersa per 30 minuti in acqua distillata per allontanare il sodio azide presente nella soluzione in cui viene conservata. Successivamente le LDL sono state trasferite all'interno della membrana, la quale è stata immersa nel tampone fosfato 10 mM (pH 7.4) per la dialisi.

La dialisi è stata effettuata in camera fredda alla temperatura di 4°C; la soluzione tampone è stata sostituita diverse volte, ogni ora per almeno 5 ore.

Al termine della dialisi, le LDL sono state portate a volume con il tampone fosfato (soluzione 1 mg/ml) e successivamente conservate a 4°C.

La quantità di LDL recuperate dopo la dialisi è stata valutata sulla base del contenuto proteico, misurato secondo il metodo di Bradford (Bradford, 1976).

3.2.4 Ossidazione delle LDL mediata dal Cu^{2+} in presenza di vanillil nonanoato

Per le prove di ossidazione, dalla soluzione di LDL (1 mg di proteine/ml in PBS) sono stati campionati 125 μg di lipoproteine.

Le lipoproteine sono state incubate in un bagno termostatico a 37°C per 2 ore in assenza o in presenza di CuSO_4 5 μM , in un volume finale di 1 ml di PBS.

Differenti quantità (10, 25 e 50 μM) della soluzione di vanillil nonanoato (1 mg/ml in EtOH) sono state preincubate per 10 minuti a temperatura ambiente con le LDL prima dell'ossidazione.

Per tutta la durata dell'esperimento, i campioni sono stati esposti a luce artificiale, mentre i controlli sono stati lasciati, per lo stesso tempo, a 0°C al buio. Successivamente i campioni sono stati raffreddati ed è stata effettuata l'analisi della frazione lipidica.

3.2.5 Estrazione della frazione lipidica

Gli acidi grassi e il colesterolo sono stati estratti dalle lipoproteine secondo il metodo di Folch (Folch et al., 1957) lievemente modificato.

Le lipoproteine sono state disciolte in 12 ml di una soluzione $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 v/v) e tenute al buio per 1 ora.

Dopo aver aggiunto acqua, pari al volume di MeOH, e aver fatto riposare ancora per 1 ora al buio, i campioni sono stati centrifugati a 1200 rpm per 1 ora per facilitare la separazione della fase cloroformica nella quale si ripartiscono i lipidi, dalla fase acqua-MeOH. La fase cloroformica è stata impiegata per l'analisi degli acidi grassi, del colesterolo e dei principali prodotti di ossidazione.

I componenti lipidici sono stati poi recuperati mediante un processo di saponificazione a freddo con doppia estrazione: un'aliquota della fase cloroformica, portata a secco, è stata disciolta in 5 ml di EtOH; sono stati aggiunti 100 μl di Desferal (soluzione 25 mg/ml H_2O), 1 ml di una soluzione acquosa di acido ascorbico 25% e 0.5 ml di KOH 10N. I campioni sono stati lasciati al buio, a temperatura ambiente per 14 ore. Dopo l'aggiunta di 10 ml di esano e 7 ml di H_2O , i campioni sono stati centrifugati per 1 ora a 1200 rpm. Prelevata la fase esanica, contenente il colesterolo, il $7\beta\text{-OH}$ e il 7-cheto, il solvente è stato fatto evaporare ed il residuo è stato risospeso in 300 μl di MeOH.

Dopo l'aggiunta alla fase EtOH- H_2O rimanente di altri 10 ml di esano, i campioni sono stati acidificati con HCl 37% fino a pH 3-4 e successivamente centrifugati per 1 ora a 1200 rpm. Prelevata la fase esanica, contenente gli acidi grassi e i prodotti di ossidazione, il solvente è stato fatto evaporare ed il residuo risospeso in 300 μl di CH_3CN acidificato con CH_3COOH 0.14% (v/v). Aliquote dei campioni sono state iniettate in HPLC.

L'evaporazione di tutti i solventi è stata eseguita sotto vuoto. La resa degli acidi grassi insaturi e del colesterolo è stata calcolata utilizzando una miscela standard (Banni et al., 1994; Deiana et al., 2001; Rosa et al., 2005b).

3.2.6 Analisi in HPLC

L'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi grassi, del colesterolo e dei loro prodotti di ossidazione è stata eseguita in HPLC 1100 *Agilent Technologies* con un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.

Il colesterolo, il 7 β -OH e il 7-cheto sono stati eluiti utilizzando una colonna a fase inversa Chrompack Inertsil 5 ODS-3 e MeOH come fase mobile ad un flusso di 0.4 ml/min. Il colesterolo e il 7- β OH sono stati rivelati a 203 nm, mentre il 7-cheto a 245 nm. L'identificazione del colesterolo e dei prodotti di ossidazione è stata effettuata usando composti standard e la misura degli spettri UV convenzionali, generati usando il software *Agilent Chemstation A.10.02*.

Gli acidi grassi insaturi e gli idroperossidi a dieni coniugati degli acidi grassi (HP) sono stati eluiti utilizzando una colonna a fase inversa Chrompack Inertsil 5 ODS-2 e come fase mobile la miscela CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (70/30/0.12 v/v/v) ad un flusso di 1.5 ml/min. Gli acidi grassi insaturi sono stati rivelati a 200 nm e gli HP a 234 nm. L'identificazione dei picchi è stata effettuata usando composti standard e gli spettri UV convenzionali ed in derivata seconda, generati utilizzando il software *Agilent Chemstation A.10.02*.

3.2.7 Analisi statistiche

È stato usato il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) per calcolare le medie e le deviazioni standard dei dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti che hanno coinvolto l'analisi in triplo di ciascun campione (n=9). Per evidenziare la significatività tra le medie dei diversi gruppi, è stata effettuata l'analisi One way della varianza (ANOVA).

3.3 Colture cellulari

3.3.1 Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza analitica, e il trifluoruro di boro (BF_3) in soluzione metanolica (14%) sono stati acquistati dalla Merck (Darmstad, Germania).

Il terz-butilidroperossido (tBH), l'acido 2-tiobarbiturico (TBA), il (3-4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromide (MTT), il dimetilsolfossido (DMSO), l'acido tricloroacetico (TCA), la vitamina E e gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli standard, il colesterolo, il 7-cheto, gli acidi grassi insaturi, la trioleina e la trilinoleina, gli idroperossidi e i prodotti utilizzati per la saponificazione sono stati acquistati come descritto nei modelli precedenti.

3.3.2 Materiali per le colture cellulari

È stata utilizzata una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia (cellule VERO) acquistata dalla ECACC (Salisbury, Regno Unito).

I materiali per le colture cellulari, il terreno Dulbecco's modified eagles medium (DMEM), il siero fetale bovino (FBS), la soluzione salina fosfato Dulbecco (PBS), con e senza Ca^{2+} e Mg^{2+} , la tripsina-EDTA e la soluzione di antibiotico-antimicotico (penicillina-streptomicina e anfotericina B) sono stati acquistati dalla Invitrogen (Milano, Italia).

3.3.3 Apparecchiature

- Spettrofotometro Agilent Technologies 8453 E (Deutschland GmbH, Waldbronn, Germania).
- Bagno termostatico modello D-91126, Memmert (Schwabach, FRG, Germania).
- Microscopio Leica (Wetzlar, Germania).
- Incubatore ad anidride carbonica con camicia ad acqua, Forma Scientific, Inc. Modello 3121 (Marietta, Ohio, USA).
- Cappa a flusso laminare Bluecam 4, Blueair s.r.l. (Capriolo, Brescia, Italia)
- Centrifuga ALC 4237R a rotore fisso, ALC INTERNATIONAL (Milano, Italia).
- Sistema HPLC-ECD dotato di una pompa Thermo Separation Products P1000, (Milano, Italia), di un detector elettrochimico INTRO (Antec Leyden, Leyden, Olanda) e di un iniettore automatico Triathlon (Spark Holland BV, AJ Emmen, Olanda).
- Gascromatografo (GC) Hewlett Packard HP-6890 (Palo Alto, California) dotato di autocampionatore HP 6890.
- Sistema HPLC 1100, Agilent Technologies (Deutschland GmbH, Waldbronn, Germania) dotato di rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.
- Colonna cromatografia Chrompack, Inertsil 5 ODS-2, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 4.6 mm.
- Colonna cromatografia Chrompack, Inertsil 5 ODS-3, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 3 mm.
- Colonna HP-23 FAME (30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm di cianopropilmetilpolissilano) Hewlett Packard.

- Colonna C₁₈ ODS Hypersil, particelle di 5 μm, 100 × 2.1 mm.
- Evaporatore rotante sottovuoto R 114 Buchi (Svizzera).

3.3.4 Mantenimento della coltura cellulare

Come modello sperimentale è stata utilizzata una linea immortalizzata di fibroblasti di rene di scimmia (VERO). Le cellule sono state mantenute in un terreno di coltura DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino e l'1% di antibiotico-antimicotico penicillina-streptomicina. Le cellule sono state coltivate in fiasche ad una densità di 1×10^6 cellule/10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera al 5% di anidride carbonica.

3.3.5 Valutazione dell'attività citotossica del tBH e del vanillil nonanoato

La citotossicità del tBH e del vanillil nonanoato è stata valutata mediante la metodica dell'MTT (Schiller et al., 1992) che consente la misura della vitalità cellulare. L'MTT è un sale tetrazolico di colore giallo idrosolubile che è facilmente ridotto da donatori di elettroni, come il NADH e il NADPH, attraverso l'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale, a un sale non solubile in ambiente acquoso, il formazano, di colore blu. Tale conversione avviene solo nelle cellule viventi e la quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vitali presenti.

Le cellule sono state coltivate in piastre multipozzetto da 24 ad una densità di 10^5 cellule/ml di terreno di coltura e in seguito incubate con concentrazioni crescenti di tBH (0.75, 1, 2.5, 5 e 10 mM da una soluzione acquosa 100 mM) per 2 ore o di vanillil nonanoato (10, 25, 50, 100, 200, 400 e 500 μ M da soluzione 10:1 in EtOH) per 24 ore; un equivalente volume di EtOH è stato aggiunto alle cellule di controllo. Dopo aver eliminato il terreno e lavato le cellule con il PBS, sono stati addizionati 80 μ l di MTT (5 mg/ml in PBS); le cellule sono state quindi incubate per 4 ore a 37°C. Successivamente il terreno è stato aspirato e nei pozzetti è stato addizionato 1 ml di DMSO.

Il colore sviluppato nel surnatante è stato rivelato spettrofotometricamente a 570 nm (figura 6). Inoltre la morte cellulare è stata valutata mediante osservazione microscopica.

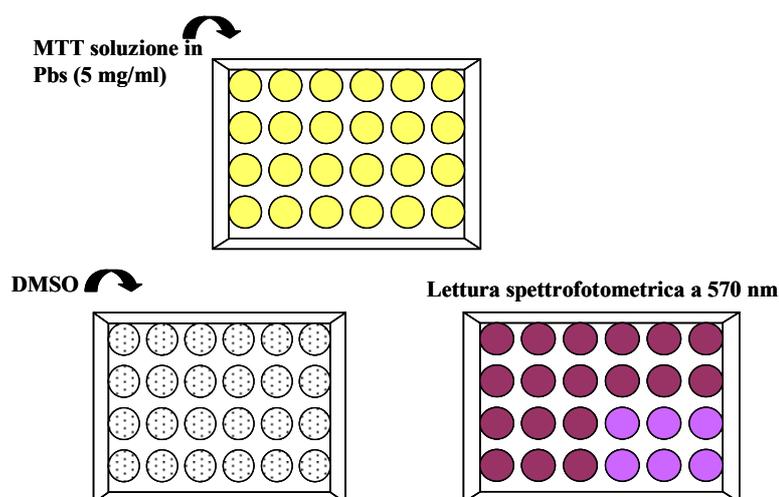


Figura 6: Test MTT.

3.3.6 Ossidazione delle cellule VERO in presenza di tBH

3.3.6.1 Ossidazione

Per la valutazione dello stress ossidativo in colture cellulari sono state utilizzate le cellule VERO. Le cellule sono state seminate nelle capsule Petri alla densità di 10^6 cellule/10 ml di terreno; dopo aver raggiunto la subconfluenza, il terreno è stato eliminato, le cellule sono state lavate ed è stato addizionato il PBS.

Differenti concentrazioni di tBH 1, 2.5 e 5 mM (da una soluzione acquosa 100 mM), sono state addizionate alle cellule in PBS. Dopo due ore di incubazione, il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state staccate con il “*cell scraper*”; dopo centrifugazione è stato eliminato il surnatante e il pellet conservato a -80°C per le successive analisi della frazione lipidica e dei marcatori dell’ossidazione (figura 7).

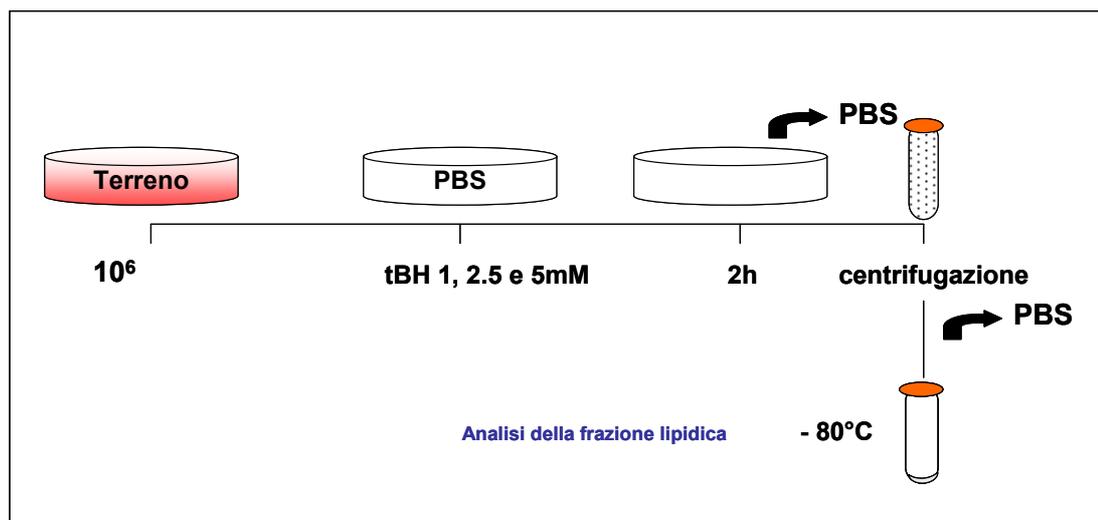


Figura 7: Trattamento delle cellule VERO con tBH.

3.3.6.2 Estrazione dei lipidi

I lipidi sono stati estratti dalle cellule secondo il metodo di Folch (Folch et al., 1957) e saponificati a freddo come descritto in precedenza per il sistema delle LDL, con alcune modifiche.

Un'aliquota del residuo secco ottenuto dalla fase esanica della prima estrazione è stato risospeso in 250 μ l di MeOH e utilizzato per l'analisi quali e quantitativa della vitamina E.

Un'aliquota della fase esanica ottenuta nella seconda estrazione è stata utilizzata per la derivatizzazione degli acidi grassi; 250 μ l di CH₃CN acidificato con CH₃COOH 0.14% (v/v) sono stati utilizzati per disciogliere il residuo secco ottenuto dalla seconda estrazione.

3.3.6.3 Analisi in HPLC

La quantità di vitamina E è stata misurata utilizzando un HPLC con un rivelatore elettrochimico, in grado di rilevare quantità di composto dell'ordine dei picogrammi.

È stata utilizzata una colonna C18 ODS Hypersil, particelle di 5 μ m, 100 \times 2.1 mm, insieme ad una fase mobile costituita da MeOH/CH₃COONa 0.005 M a pH 5.5 (95/5 v/v) ad un flusso di 0.3ml/min. Il rivelatore elettrochimico è stato impostato ad un potenziale di ossidazione di 0.6 V. I dati sono stati raccolti ed analizzati utilizzando il software SC Integrator 1.00.03N Sunicom Oy (Sunicom Oy, Helsinki, Finlandia). L'analisi quali-quantitativa degli acidi grassi, del colesterolo e dei loro prodotti di ossidazione è stata eseguita con le stesse condizioni cromatografiche descritte in precedenza.

3.3.6.4 Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi

L'analisi degli acidi grassi è stata anche eseguita in gascromatografia. Per la loro rilevazione al gascromatografo gli acidi grassi devono essere resi più volatili attraverso un processo di metilazione.

Una porzione del residuo della fase esanica, ottenuta attraverso la metodica della saponificazione a freddo, è stata utilizzata per la preparazione degli esteri metilici secondo la metodica di Christie (Christie, 1989) leggermente modificata. Dopo addizione di 1 ml di BF₃ metanolico al 14% e vigorosa agitazione, i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti. Si è proceduto, quindi, all'estrazione degli esteri metilici con l'aggiunta di 4 ml di esano e 2 ml di acqua. Dopo centrifugazione, la fase esanica è stata portata a secco e i metil esteri risospesi in 300 µl di esano. In seguito 1 µl di ciascun campione è stato iniettato al gascromatografo.

3.3.6.5 Analisi gascromatografica

La separazione degli esteri metilici degli acidi grassi è stata effettuata con un gascromatografo Hewlett-Packard HP-6890 dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). E' stata utilizzata una colonna capillare di cianopropil-metilpolissilano HP-23 FAME (30 m × 0.32 × 0.25 µm). Come gas di trasporto è stato impiegato azoto ad un flusso di 2 ml/min, la temperatura del forno è stata programmata a 175°C, quella dell'iniettore a 250°C, mentre la temperatura del rivelatore è stata mantenuta a 300°C. L'identificazione dei vari picchi è stata effettuata mediante la comparazione con i tempi di ritenzione di standard di riferimento commerciali (Rosa et al., 2002b).

3.3.7 Valutazione dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato in colture cellulari nei confronti dell'ossidazione mediata dal tBH

3.3.7.1 Metodo TBARS

La capacità antiossidante del vanillil nonanoato è stata valutata come protezione dal danno ossidativo indotto sulle cellule VERO dal tBH 750 μ M.

Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 cm² ad una densità di 2×10^6 cellule/4 ml di terreno di coltura completo. Dopo 24 ore, il terreno è stato sostituito con 4 ml di PBS e sono state aggiunte due concentrazioni (5 e 10 μ M) della soluzione di vanillil nonanoato (soluzione 10:1 in EtOH) o un equivalente volume di EtOH per i controlli. Dopo due ore di incubazione, è stata aggiunta una soluzione acquosa di tBH (750 μ M) e le cellule sono state incubate per altre 2 ore. L'estensione del danno ossidativo è stata valutata come formazione di MDA mediante il metodo TBARS (Buege and Aust, 1978).

Dopo addizione di 500 μ l delle soluzioni acquose di TBA (7.4 mg/ml) e di TCA (20 mg/100 ml), le cellule sono state incubate per 15 minuti a 100°C per favorire la formazione dell'addotto MDA-TBA di colore rosa. Il colore sviluppato è stato misurato con un'analisi spettrofotometrica a 540 nm.

3.3.7.2 Valutazione dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato tramite l'analisi della frazione lipidica

3.3.7.2.1 Ossidazione delle cellule VERO in presenza di tBH

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 10^6 cellule/10 ml di terreno e incubate sino a raggiungere la subconfluenza (circa 80%) per effettuare i trattamenti. Il terreno è stato sostituito con PBS e sono state addizionate due concentrazioni di vanillil nonanoato (50 e 100 μ M) da una soluzione 10:1 in EtOH o un equivalente volume di EtOH per i controlli. Dopo 2 ore di incubazione, è stato addizionato il tBH 2.5 mM (da una soluzione acquosa 100 mM).

Dopo altre 2 ore le cellule sono state staccate con il “*cell scraper*”; dopo centrifugazione è stato eliminato il surnatante e il pellet conservato a -80°C per le successive analisi della frazione lipidica.

3.3.7.2.2 Estrazione e quantificazione dei lipidi

I lipidi sono stati estratti dalle cellule secondo il metodo di Folch (Folch et al., 1957) e saponificati a freddo come descritto in precedenza nel sistema dell'ossidazione delle cellule VERO in presenza di tBH.

L'analisi quali-quantitativa degli acidi grassi, del colesterolo e dei loro prodotti di ossidazione è stata eseguita con le stesse condizioni cromatografiche descritte in precedenza.

3.3.8 Analisi statistiche

È stato usato il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) per calcolare le medie e le deviazioni standard dei dati ottenuti da tre o quattro esperimenti indipendenti che hanno coinvolto l'analisi in triplo di ciascun campione (n=9 o n=12). Per evidenziare la significatività tra le medie dei diversi gruppi, è stata effettuata l'analisi One way della varianza (ANOVA).

3.4 Attività antiossidante del vanillil nonanoato in vivo nel modello sperimentale del FeNTA

3.4.1 Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza analitica, sono stati acquistati dalla Merck (Darmstad, Germania).

Il nitrato ferrico-nonidrato ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), il sale disodico dell'acido nitrilotriacetico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_6\text{Na}_2$) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Il colesterolo, il 7-cheto, gli acidi grassi standard insaturi, gli idroperossidi, la trioleina e la trilinoleina e i prodotti utilizzati per la saponificazione sono stati acquistati come indicato nei modelli descritti in precedenza.

3.4.2 Apparecchiature

- Sistema HPLC-ECD dotato di una pompa Thermo Separation Products P1000, (Milano, Italia), di un detector elettrochimico INTRO (Antec Leyden, Leyden, Olanda) e di un iniettore automatico Triathlon (Spark Holland BV, AJ Emmen, Olanda).
- Sistema HPLC 1100, Agilent Technologies (Deutschland GmbH, Waldbronn, Germania) dotato di rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.
- Colonna cromatografia Chrompack, Inertsil 5 ODS-2, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 4.6 mm.
- Colonna cromatografia Chrompack, Inertsil 5 ODS-3, C₁₈ a fase inversa, 150 mm × 3 mm.
- Colonna C₁₈ ODS Hypersil, particelle di 5 µm, 100 × 2.1 mm.
- Bagno termostatico modello SB24, Falc Instrument s.r.l. (Treviglio, Bergamo, Italia).
- Evaporatore rotante sottovuoto R 114 Buchi (Svizzera).
- Centrifuga ALC 4237R a rotore fisso, ALC INTERNATIONAL (Milano, Italia).

3.4.3 Preparazione del FeNTA

La soluzione di FeNTA è stata preparata, immediatamente prima dell'utilizzo, nel modo descritto da Awai (Awai et al., 1979). Sono state preparate due soluzioni acquose di $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_6\text{Na}_2$ 300 mM e 600 mM rispettivamente.

Le due soluzioni sono state poi miscelate in un volume di 1:2 a temperatura ambiente ed il pH è stato portato ad un valore di 7.4, utilizzando bicarbonato di sodio.

3.4.4 Animali e loro trattamento

Sono stati utilizzati ratti maschi adulti Wistar, acquistati dalla Charles River (Calco, Italia). I ratti sono stati sistemati in gabbie con un fondo in policarbonato, in una stanza con una temperatura di circa $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e nutriti con dieta standard e acqua *ad libitum*. Differenti gruppi di animali (peso corporeo finale di $\sim 180\text{-}200$ g) sono stati utilizzati per ciascun esperimento dopo una settimana di stabulazione. Per valutare l'azione protettiva del vanillil nonanoato, alcuni gruppi di animali sono stati pretrattati con il composto, iniettato per via intraperitoneale, 30 minuti prima del trattamento con il FeNTA. Il vanillil nonanoato, soluzione in NaCl (0.9%) contenente il 3% di EtOH e il 10% di Tween 80 (veicolo), è stato preparato poco prima del trattamento.

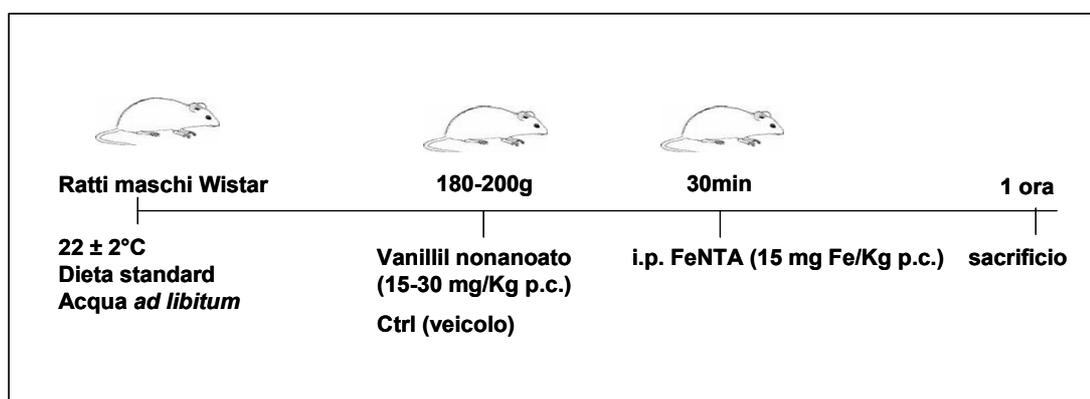


Figura 8: Trattamento degli animali nel modello sperimentale del FeNTA.

Gli animali (5 per gruppo) sono stati pretrattati con una iniezione intraperitoneale di vanillil nonanoato (15 o 30 mg/Kg di peso corporeo) o con il veicolo; dopo 30 minuti gli animali sono stati trattati con una iniezione intraperitoneale di FeNTA (15 mg di Fe/Kg di peso corporeo) o con la soluzione salina e sacrificati dopo 1 ora dal trattamento (figura 8).

Da ciascun animale sono stati prelevati sangue e reni. Il sangue è stato centrifugato a 4°C per dieci minuti a 1500 rpm per ottenere il plasma. I campioni di plasma ed i reni sono stati quindi conservati a -80°C per le successive analisi della frazione lipidica.

3.4.5 Estrazione e quantificazione dei lipidi

I lipidi totali sono stati estratti dal plasma e dal rene mediante la metodica del Folch (Folch et al., 1957). Porzioni di 500 mg di rene e aliquote di 0.7 ml di plasma sono stati omogenati nella miscela $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, utilizzata nelle metodiche sperimentali in precedenza descritte. Durante le fasi della procedura estrattiva i campioni sono stati filtrati per eliminare i residui di tessuto. Dopo aver ottenuto la separazione della fase cloroformica dalla fase acqua-MeOH, aliquote della fase cloroformica sono state impiegate direttamente per le successive analisi sui lipidi. Aliquote di 0.3 ml dai campioni di rene e 0.5 ml dai campioni di plasma sono state portate a secco e i lipidi totali sono stati quantificati attraverso la metodica di Chiang (Chiang et al., 1957).

La saponificazione a freddo utilizzata per determinare gli acidi grassi, il colesterolo e la vitamina E nel rene è stata lievemente modificata: il residuo secco ottenuto dalla seconda estrazione è stato risospeso in 0.5 ml di CH_3CN acidificato con CH_3COOH 0.14% (v/v).

L'analisi quali-quantitativa della vitamina E, degli acidi grassi, del colesterolo e dei loro prodotti di ossidazione è stata eseguita con le stesse condizioni cromatografiche descritte in precedenza.

3.4.6 Analisi statistiche

È stato usato il programma GraphPAD INSTAT (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) per calcolare le medie e le deviazioni standard dei dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti che hanno coinvolto l'analisi di cinque animali per gruppo (n=15). Per evidenziare la significatività tra le medie dei diversi gruppi, è stata effettuata l'analisi One way della varianza (ANOVA).

4 Risultati

4.1 Sistemi chimici in vitro

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata comparata con quella di due analoghi chimici, la vanillina e l'alcol vanillico durante l'autossidazione dell'acido linoleico, a 37°C per 32 ore, e durante l'autossidazione del colesterolo, a 140°C per 1.5 ore.

4.1.1 Sistema dell'acido linoleico

In figura 9 sono mostrati i risultati ottenuti durante l'autossidazione dell'acido linoleico in presenza di differenti quantità (2, 3, 9, 17, 34, 68 nmoli) di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina. L'attività antiossidante è stata espressa come percentuale di protezione dell'acido linoleico, calcolata considerando le differenze nella quantità di acido grasso nei sistemi protetti e non protetti.

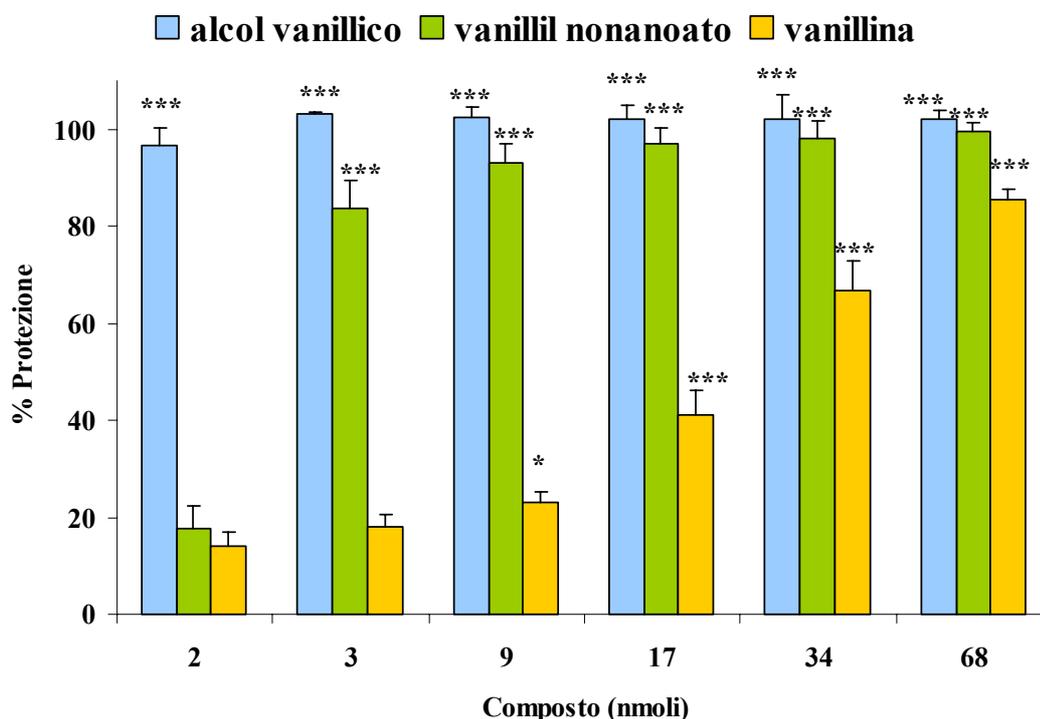


Figura 9: Attività antiossidante, espressa come % di protezione, di differenti quantità di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina, misurata durante l'autossidazione dell'acido linoleico a 37°C per 32 ore.

***= $p < 0.001$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli (n=6).

Il vanillil nonanoato e l'alcol vanillico hanno esercitato una buona attività antiossidante, mentre la vanillina è risultata meno efficace.

La completa inibizione dell'autossidazione dell'acido linoleico è stata osservata a partire dalla quantità di 2 nmoli per l'alcol vanillico, corrispondente ad un rapporto molare del composto rispetto all'acido grasso di 1:1783.

Il vanillil nonanoato ha mostrato una significativa protezione del 90% a 3 nmoli (1:1189) e totale a partire da 9 nmoli, mentre la vanillina ha esercitato una significativa inibizione dell'ossidazione dell'acido grasso a partire da 17 nmoli.

E' stato inoltre misurato il valore degli idroperossidi isomeri, c,t-9-HPODE, t,t-9-HPODE, c,t-13-HPODE e t,t-13-HPODE; sono stati sommati tra loro i due c,t e i due t,t ed è stato calcolato il rapporto c,t/t,t.

In tabella 1 è riportato il valore (μg) degli idroperossidi isomeri c,t, e t,t e del loro rapporto c,t/t,t calcolato durante l'autossidazione dell'acido linoleico in presenza di differenti quantità (2, 3, 9, 17, 34, 68 nmoli) di alcol vanillico, vanillil nonanoato e vanillina. Sono inoltre riportati i valori di riferimento relativi all'acido linoleico iniziale (18:2) e ossidato (18:2 ox).

L'alcol vanillico e il vanillil nonanoato hanno determinato un evidente spostamento del rapporto c,t/t,t degli idroperossidi, correlato alle concentrazioni crescenti dei composti.

Autossidazione dell'acido linoleico

nmoli del composto	HPODE c,t			HPODE t,t			rapporto c,t/t,t		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2	34,44	73,48	66,82	26,47	43,72	49,28	1,30	1,68	1,36
3	9,19	72,83	69,09	6,50	47,11	51,52	1,41	1,55	1,34
9	4,56	34,41	91,12	2,74	23,71	68,05	1,67	1,45	1,34
17	3,94	12,88	126,83	1,89	7,78	93,47	2,09	1,66	1,36
34	2,56	8,15	133,48	1,02	4,21	101,53	2,52	1,94	1,31
68	2,37	7,02	89,01	0,79	2,28	74,73	2,99	3,08	1,19
Valori di riferimento									
	HPODE c,t			HPODE t,t			rapporto c,t/t,t		
18:2	27,94			9,78			2,86		
18:2 ox	78,59			50,26			1,56		

Tabella 1: Valori degli idroperossidi HPODE c,t e t,t (μg) e rapporto tra gli isomeri c,t/t,t formati durante l'autossidazione dell'acido linoleico in presenza di differenti quantità di alcol vanillico (1), vanillil nonanoato (2) e vanillina (3).

4.1.2 Sistema del colesterolo

La figura 10 mostra l'attività antiossidante di differenti quantità (2, 3, 9, 17, 34, 68 nmoli) di alcol vanillico, vanillil nonanoato e vanillina misurata durante l'autossidazione del colesterolo a 140°C per 1.5 ore.

L'attività antiossidante è stata espressa come percentuale di protezione del colesterolo, calcolata considerando le differenze dei livelli di sterolo nei sistemi protetti e non protetti (0% protezione).

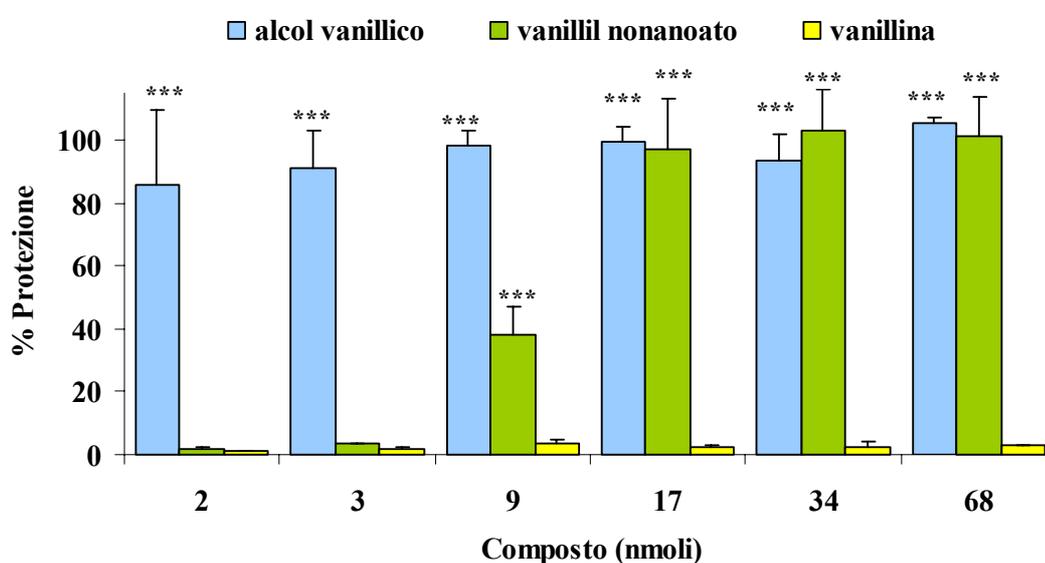


Figura 10: Attività antiossidante, espressa come percentuale di protezione, di differenti quantità di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina durante l'autossidazione del colesterolo a 140°C per 1.5 ore.

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli (n =6).

Dal grafico si può osservare che nel sistema utilizzato l'alcol vanillico ha mostrato un'attività maggiore rispetto ai due analoghi chimici, esercitando una significativa inibizione del processo ossidativo, di circa 80-90%, ai valori di 2 e 3 nmoli e una completa protezione dalla quantità di 9 nmoli; il vanillil nonanoato ha mostrato una totale inibizione del processo ossidativo a partire dalla quantità di 17 nmoli e una significativa protezione del 40% a 9 nmoli, mentre la vanillina non è risultata attiva alle concentrazioni utilizzate a causa della sua caratteristica instabilità alle alte temperature.

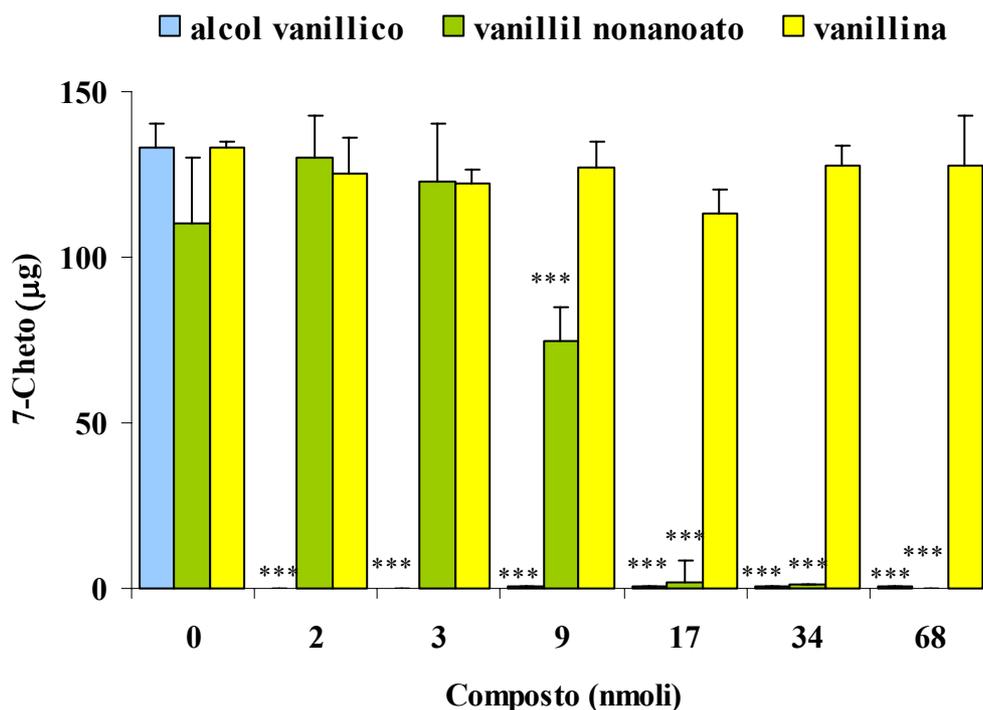


Figura 11: Valori di 7-cheto (μg) formati durante l'autossidazione del colesterolo a 140°C per 1.5 ore, in presenza di differenti quantità ($2 \div 68$ nmoli) di alcol vanillico, vanillil nonanoato e vanillina.

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli ($n = 6$).

Nello stesso sistema sperimentale sono stati inoltre misurati i valori (μg) di 7-cheto, nei campioni ossidati in assenza (0) o in presenza di differenti quantità (2, 3, 9, 17, 34, 68 nmoli) di vanillil nonanoato, alcol vanillico e vanillina (figura 11). L'alcol vanillico ha mostrato una significativa inibizione della formazione di 7-cheto a tutti i valori testati.

Il vanillil nonanoato ha mostrato una significativa protezione della produzione di 7-cheto al valore di 9 nmoli e una completa inibizione a partire dalla quantità di 17 nmoli.

La vanillina alle quantità utilizzate non è risultata efficace, non mostrando alcuna riduzione della produzione di 7-cheto rispetto ai controlli.

4.2 Ossidazione delle LDL mediata dal Cu^{2+} in presenza di vanillil nonanoato

4.2.1 Analisi della frazione lipidica

Nella figura 12 è riportata la somma degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA), eicosapentaenoico (20:5), docosaesaenoico (22:6), arachidonico (20:4), linolenico (18:3-n3 e 18:3-n6), docosatetraenoico (22:4), docosatrienoico (20:3-n3 e 20:3-n6), linoleico coniugato (CD-18:2 o CLA) e linoleico (18:2), dei monoinsaturi (MUFA) (16:1 e 18:1) e il valore degli HP misurati nelle LDL durante l'ossidazione a 37°C in presenza di Cu^{2+} e pretrattamento con diverse concentrazioni di vanillil nonanoato (10, 25 e 50 μM).

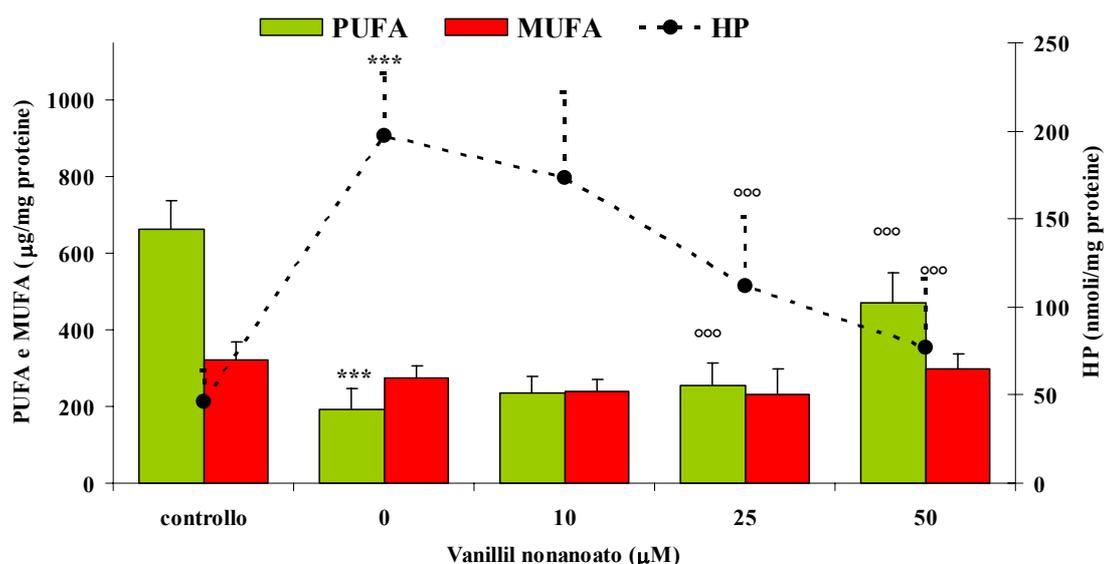


Figura 12: Valori della somma dei PUFA (20:5, 22:6, 20:4, 18:3-n3, 18:3-n6, 22:4, 20:3-n3, 20:3-n6, CLA e 18:2) espressi in $\mu\text{g/mg}$ di proteine e somma dei MUFA (16:1 e 18:1) e degli idroperossidi (HP) espressi in nmoli/mg di proteine, misurati nelle LDL di controllo e ossidate per 2 ore con il Cu^{2+} 5 μM , in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato 10, 25 e 50 μM .

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli;

ooo= $p < 0.001$ rispetto agli ossidati ($n = 9$).

Nelle LDL ossidate è stata osservata una significativa riduzione dei PUFA totali di ~ 70% in corrispondenza ad un significativo aumento degli HP, rispetto al controllo; nei campioni pretrattati con il vanillil nonanoato la concentrazione dei PUFA è

significativamente più alta, rispetto agli ossidati, a partire dalla concentrazione di 25 μM (33%) e si osserva una riduzione significativa dei livelli di HP del 43 e 60%, rispettivamente alle concentrazioni di 25 e 50 μM , indice di una buona attività di protezione del composto nei confronti del danno ossidativo indotto dal Cu^{2+} .

In figura 13 sono inoltre riportati i valori del colesterolo e dei principali ossisteroli misurati nelle LDL durante l'ossidazione indotta a 37°C in presenza di Cu^{2+} e pretrattate con il vanillil nonanoato (10, 25 e 50 μM).

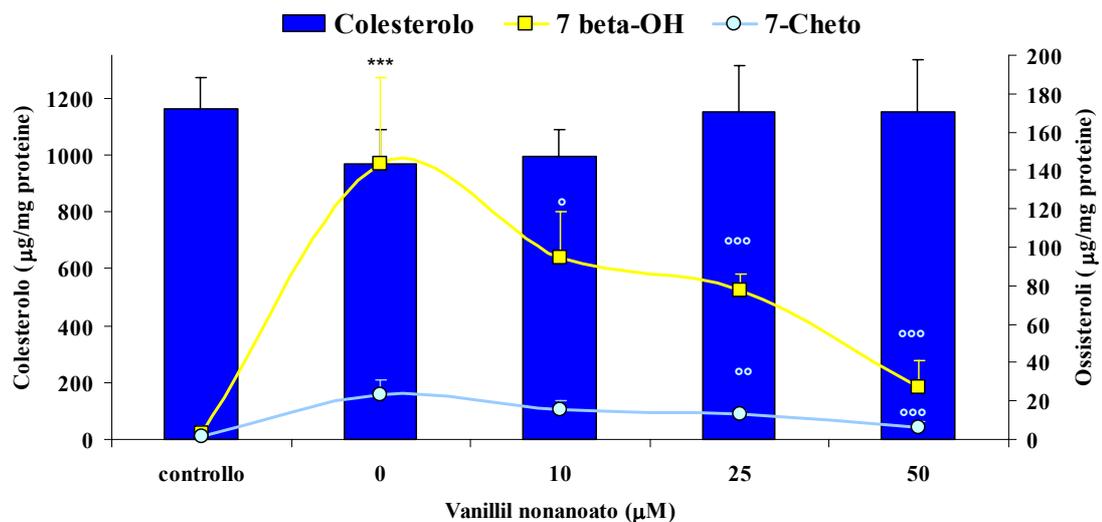


Figura 13: Valori di colesterolo, 7 β -OH e 7-cheto, espressi in $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine, misurati nelle LDL di controllo e nei campioni ossidati per 2 ore con Cu^{2+} 5 μM , in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato 10, 25 e 50 μM .

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli ;

°°°= $p < 0.001$; °°= $p < 0.01$; °= $p < 0.05$ rispetto agli ossidati (n =9).

Nelle LDL ossidate in presenza di Cu^{2+} è stata osservata una significativa riduzione dello sterolo del 16% ed un aumento significativo dei prodotti di ossidazione 7 β -OH e 7-cheto rispetto ai controlli.

Nelle LDL ossidate in presenza di vanillil nonanoato è stata osservata una significativa attività di protezione con una riduzione dei livelli di ossisteroli: un decremento dei valori di 7 β -OH del 34% alla concentrazione di 10 μM e del 46 e 80% rispettivamente alla concentrazione di 25 e 50 μM rispetto ai campioni ossidati, mentre i livelli di 7-cheto sono risultati significativamente più bassi del 43% alla concentrazione di 25 μM e del 72% alla concentrazione più alta testata.

4.3 Colture cellulari

Le colture cellulari di VERO sono state utilizzate in una serie preliminare di prove per valutare l'attività citotossica del tBH, e del vanillil nonanoato al fine di determinare le concentrazioni non tossiche dei due composti.

4.3.1 Valutazione dell'attività citotossica del tBH e del vanillil nonanoato

Nella figura 14 è riportata la percentuale di vitalità cellulare, calcolata rispetto ai controlli, delle cellule VERO dopo 2 ore di incubazione a 37°C in presenza di concentrazioni crescenti di tBH (0.75, 1, 2.5, 5, 10 mM).

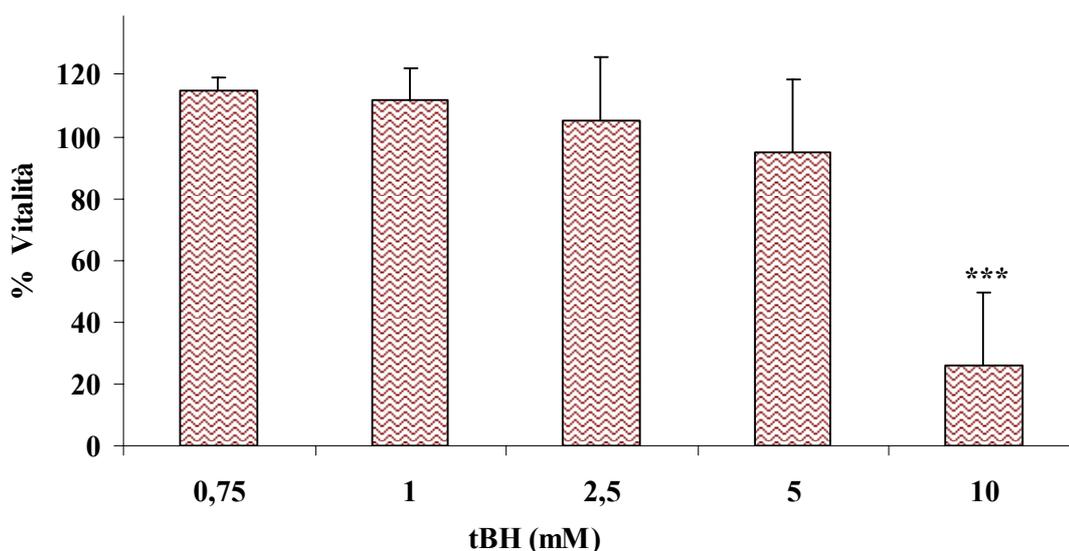


Figura 14: Percentuale di vitalità delle cellule VERO dopo incubazione per 2 ore in presenza di differenti concentrazioni di tBH (0.75 ÷ 10 mM).

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli ($n = 12$).

Il tBH alle concentrazioni di 0.75, 1, 2.5, 5 mM non ha indotto una significativa diminuzione della vitalità cellulare, mentre alla concentrazione di 10 mM ha causato sulle cellule VERO un significativo effetto citotossico, con una riduzione della vitalità del 74%.

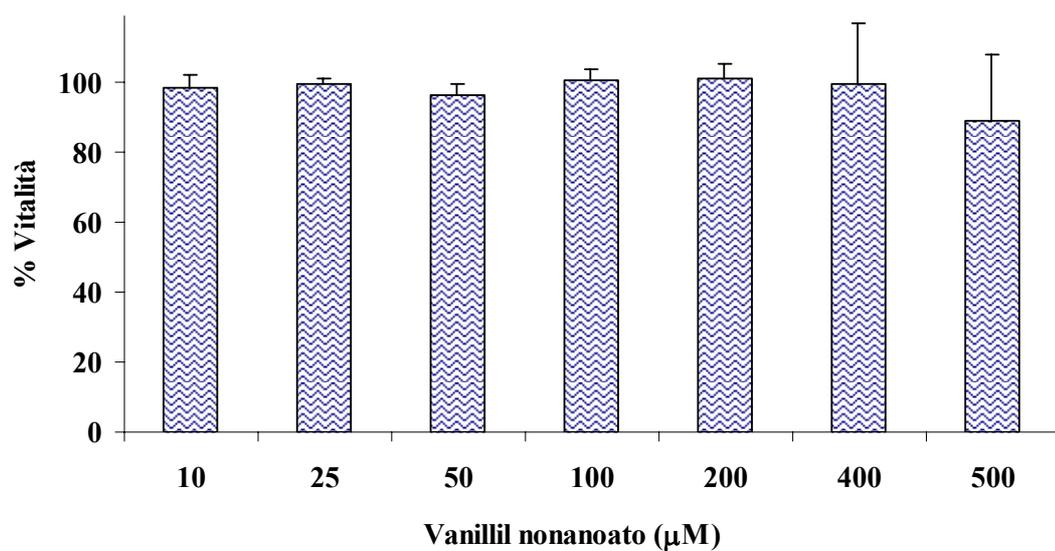


Figura 15: Percentuale di vitalità, calcolata rispetto ai controlli, delle cellule VERO dopo incubazione, per 24 ore, in presenza di differenti concentrazioni (10 ÷ 500 µM) di vanillil nanoato.

La figura 15 mostra la percentuale di vitalità cellulare, calcolata rispetto ai controlli, dopo 24 ore di incubazione, in presenza di differenti concentrazioni di vanillil nanoato (10, 25, 50, 100, 200, 400, 500 µM).

Il vanillil nanoato non è risultato citotossico a nessuna delle concentrazioni testate.

4.3.2 Ossidazione delle cellule VERO in presenza di tBH

4.3.2.1 Analisi della frazione lipidica

Nella figura 16 è riportato il cromatogramma, ottenuto in HPLC, registrato a 200 nm, degli acidi grassi insaturi presenti nelle cellule VERO in un campione di controllo.

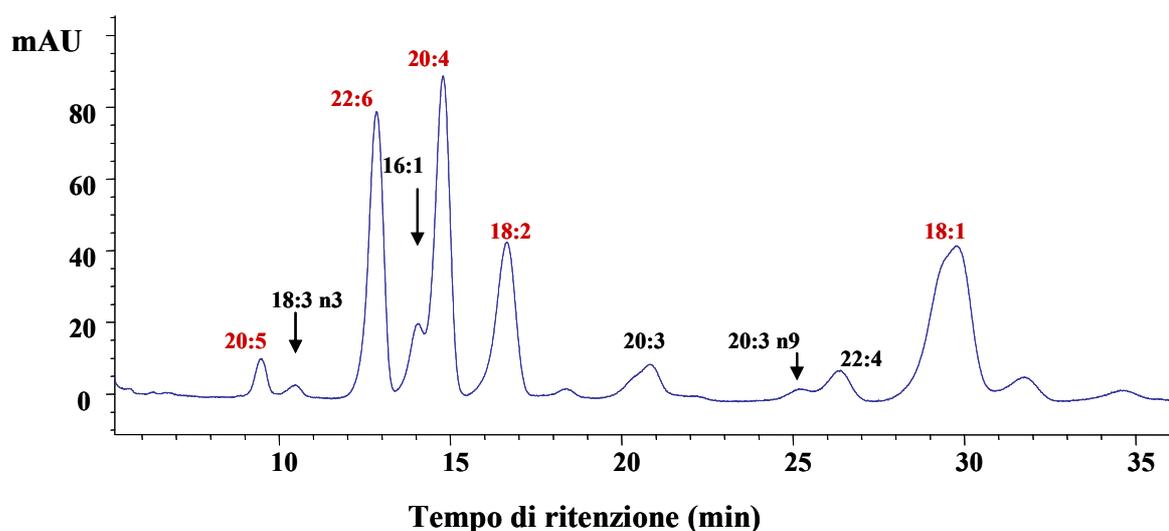


Figura 16: Cromatogramma, registrato a 200 nm, dei principali acidi grassi presenti nelle membrane delle cellule VERO.

I principali acidi grassi insaturi presenti sono risultati l'acido eicosapentaenoico (20:5), l'acido docosaesaenoico (22:6), l'acido arachidonico (20:4), l'acido linoleico (18:2) e l'acido oleico (18:1).

Nella figura 17 è mostrata la somma degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (20:5, 22:6, 20:4, 18:2) e degli idroperossidi (HP), espressi come % rispetto ai controlli non ossidati, misurati durante l'ossidazione delle cellule VERO in presenza di differenti concentrazioni di tBH (1, 2.5 e 5 mM).

È stata osservata una significativa diminuzione della percentuale dei PUFA e un correlato significativo aumento degli HP, a partire dalla concentrazione più bassa di tBH testata, come chiaramente indicato dal coefficiente di correlazione inverso $R = -0.9719$ riportato in figura 17.

Nelle cellule ossidate con tBH è stata osservata una significativa riduzione dei PUFA totali con un range del 21-26%, corrispondente ad un significativo aumento del 55% della formazione di HP alla concentrazione di tBH 1 mM e dell'80% e 90% rispettivamente alla concentrazione di 2.5mM e 5 mM, rispetto alle cellule non ossidate.

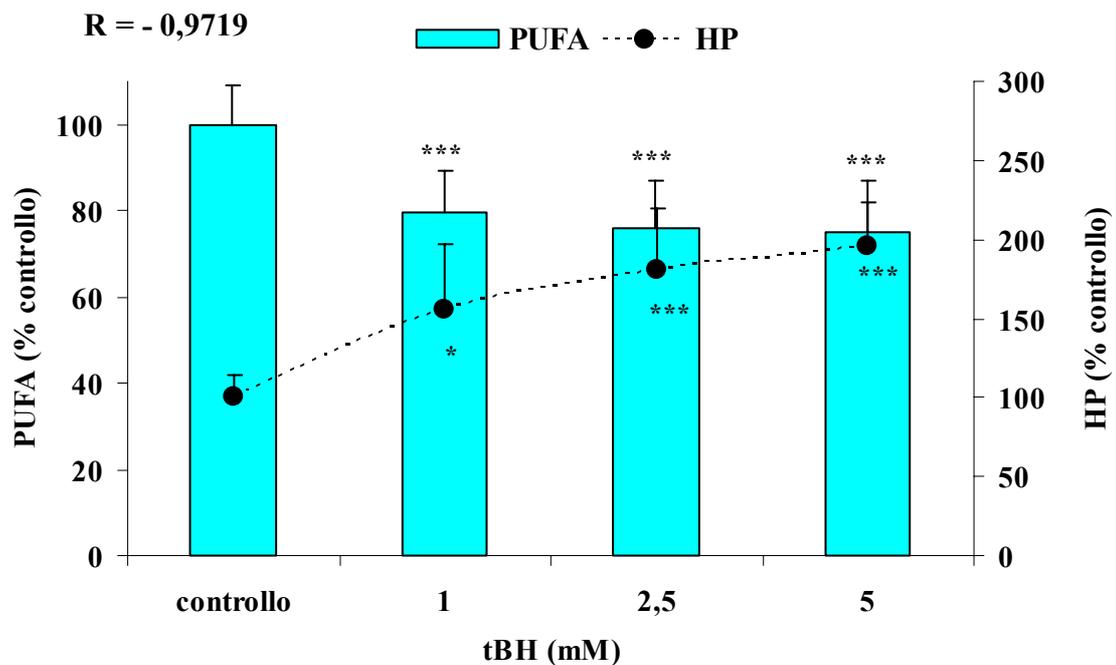


Figura 17: Valori della somma dei principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (20:5, 22:6, 20:4, 18:2) e degli idroperossidi (HP), espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo e ossidate per 2 ore con tBH 1, 2.5 e 5 mM. Coefficiente di correlazione $R = \text{Cov}(x,y)/\sigma_x\sigma_y$.
 ***= $p < 0.001$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli (n =12).

In figura 18 è mostrato l'andamento dell'ossidazione, indotto da tBH, dei singoli acidi grassi presenti nelle cellule VERO. Nei campioni ossidati con il tBH 1 mM è stata osservata una significativa riduzione degli acidi grassi poliinsaturi, in particolare del 20:5, 22:6 e 20:4, i quali diminuiscono rispetto ai controlli rispettivamente del 18%, 33% e 19%. Non è stata osservata invece una significativa riduzione degli acidi grassi 18:2 e 18:1. L'ossidazione è stata più evidente a partire dalla concentrazione di 2.5 mM di tBH, dove è stata osservata una riduzione significativa degli acidi grassi poliinsaturi 20:5 e 22:6, rispettivamente del 31% e 33%, 20:4 e 18:2 del 23%.

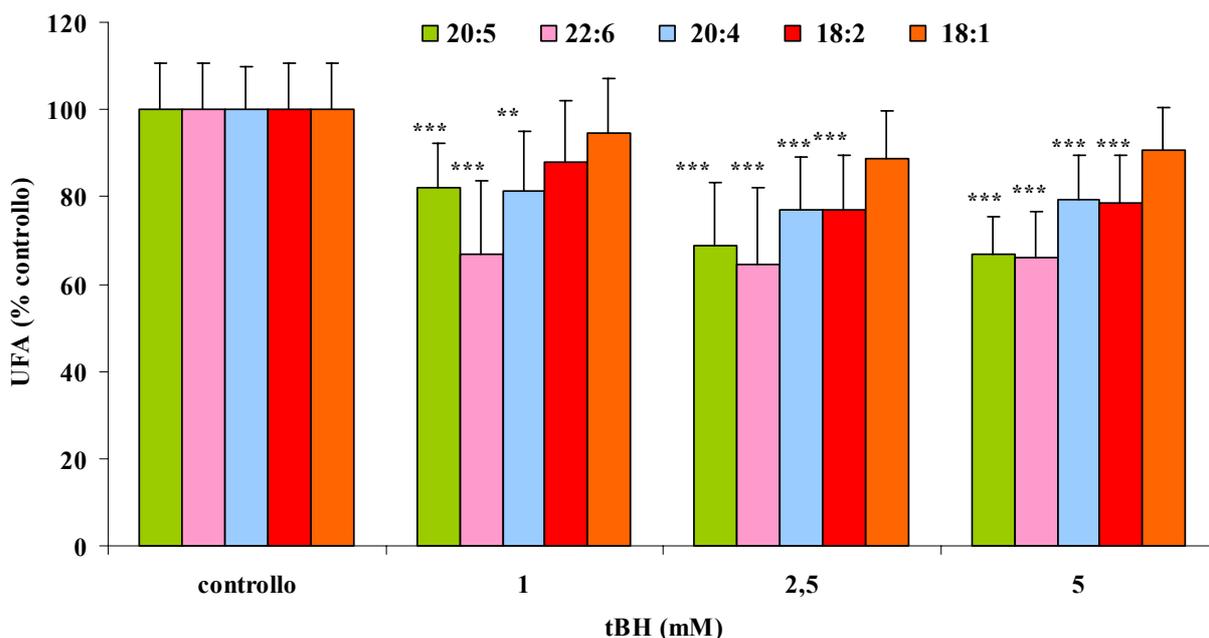


Figura 18: Valori dei principali acidi grassi insaturi UFA (20:5, 22:6, 20:4, 18:2 e 18:1) espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo e ossidate per 2 ore con tBH 1, 2.5 e 5 mM.
 ***= $p < 0.001$; **= $p < 0.01$ (n= 12)

Nella figura 19 sono riportati i valori del colesterolo e del suo principale prodotto di ossidazione 7-cheto, misurati nelle cellule VERO dopo 2 ore di incubazione con il tBH alle concentrazioni di 1, 2.5 e 5 mM. A nessuna delle concentrazioni di tBH testate è stata osservata una riduzione significativa dello sterolo, mentre la % di 7-cheto è risultata aumentare in maniera significativa, rispetto ai controlli, a partire dalla concentrazione di 1 mM. In figura 19 è anche riportato il valore del coefficiente di correlazione (R) che indica una buona correlazione inversa tra la diminuzione dello sterolo e l'aumento del suo prodotto di ossidazione.

È stata inoltre valutata la variazione dell'antiossidante lipofilo di membrana, vitamina E. Come riportato in figura 20, dopo 2 ore di incubazione delle cellule VERO con il tBH è stata osservata una significativa diminuzione del fenolo rispetto ai controlli, a tutte le concentrazioni di ossidante utilizzate.

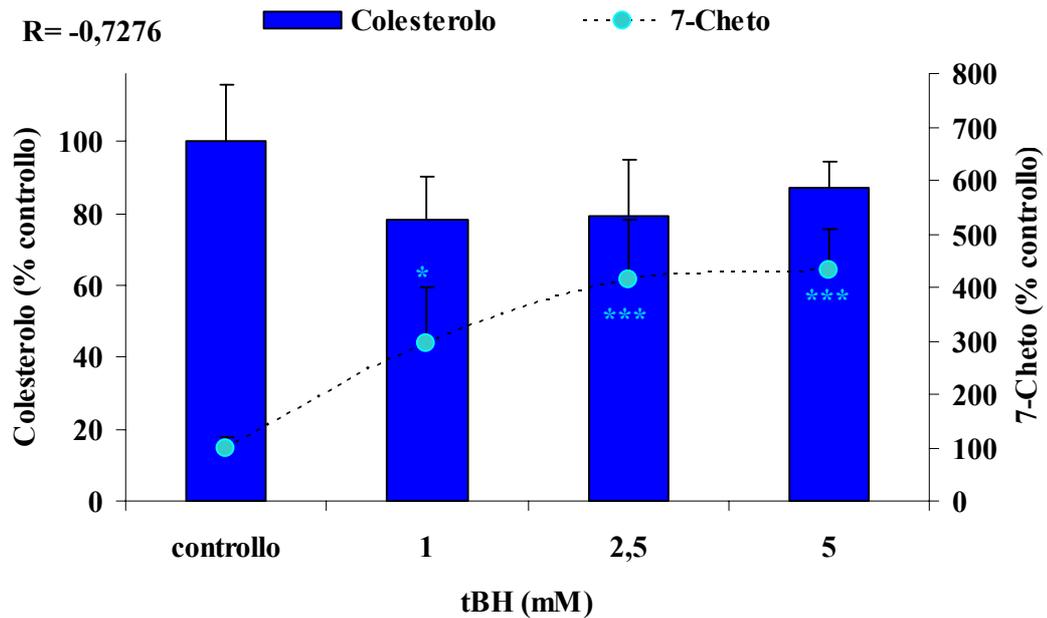


Figura 19: Valori di colesterolo e 7-cheto, espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo e nei campioni ossidati con tBH, per 2 ore alle concentrazioni di 1, 2.5 e 5 mM. Coefficiente di correlazione $R = \text{Cov}(x,y)/\sigma_x\sigma_y$. ***= $p < 0.001$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli ($n = 12$).

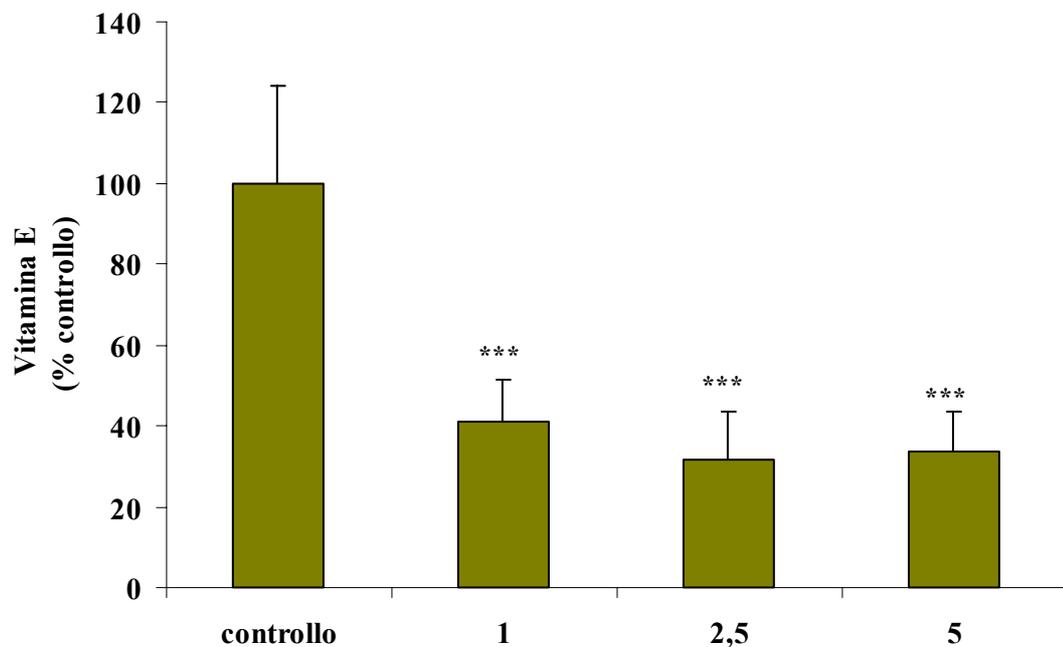


Figura 20: Valori di vitamina E, espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo e nei campioni ossidati con tBH, per 2 ore alle concentrazioni di 1, 2.5 e 5 mM. ***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli ($n = 12$).

Nella figura 21 sono riportati i valori dei principali acidi grassi saturi (SFA): l'acido laurico (12:0), l'acido miristico (14:0), l'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0), misurati al GC nei controlli e nelle cellule ossidate con tBH 2.5 mM.

Nei campioni ossidati con il tBH 2.5 mM non si è osservata una significativa riduzione dei valori degli acidi grassi saturi considerati rispetto ai controlli.

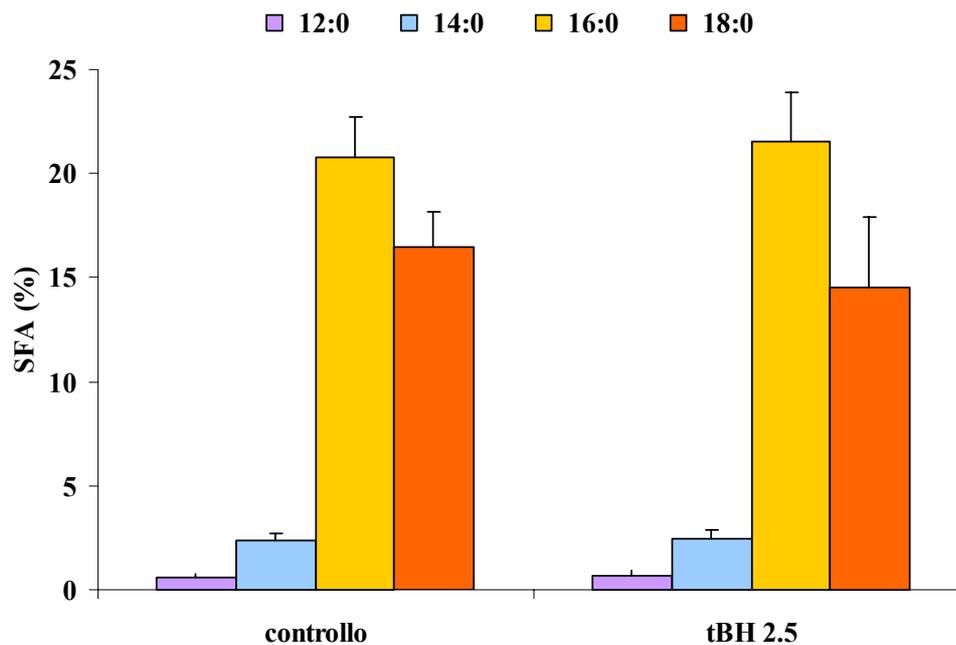


Figura 21: Valori degli acidi grassi saturi (SFA) 12:0, 14:0, 16:0 e 18:0 espressi in percentuale rispetto al totale, misurati nelle cellule VERO di controllo e ossidate per 2 ore con tBH 2.5 mM.

4.3.3 Valutazione dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato in colture cellulari

L'attività protettiva del vanillil nonanoato contro il danno ossidativo indotto dal tBH è stata testata nelle cellule VERO.

4.3.3.1 TBARS

Nel test del TBARS è stata utilizzata la concentrazione 750 μM di tBH, in grado di fornire significativi livelli di ossidazione; l'estensione del danno è stata misurata come produzione di MDA e i dati ottenuti sono riportati nella figura 22.

L'attività antiossidante del composto è stata espressa come percentuale di formazione di MDA in assenza (campioni con tBH, 100% di produzione di MDA) o in presenza dell'antiossidante, confrontata con i controlli non sottoposti all'azione del tBH (la percentuale di MDA prodotta è dello 0%).

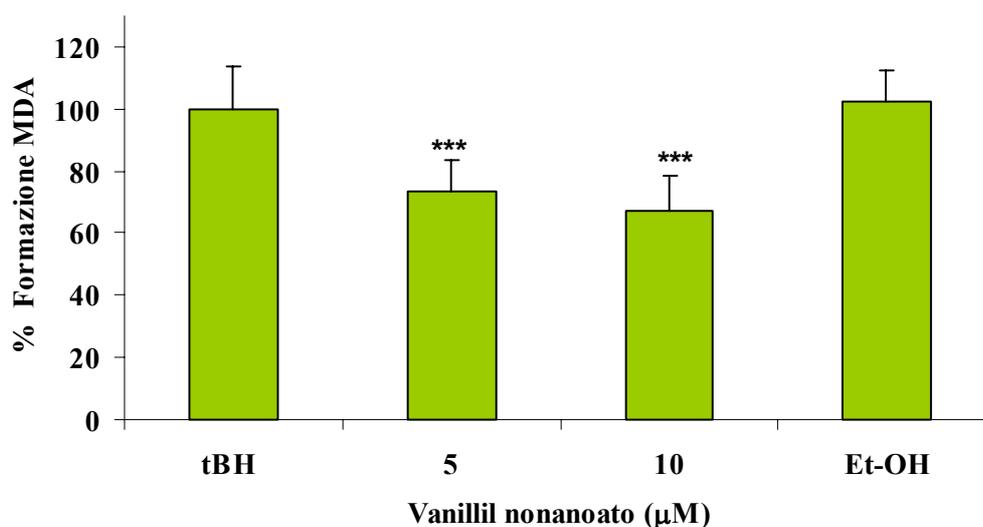


Figura 22: Percentuale di formazione di MDA, indotta da tBH 750 μM , in presenza di vanillil nonanoato (5 e 10 μM), calcolata rispetto ai controlli senza tBH (0% di MDA prodotta). È inoltre mostrato il campione di controllo contenente EtOH.

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli ($n = 12$).

Il vanillil nonanoato ha protetto le cellule dal danno ossidativo indotto dal tBH, mostrando una significativa riduzione del 27% e del 33% della generazione di MDA, rispettivamente alla concentrazione di 5 e 10 μM .

La capacità antiossidante della molecola non è risultata influenzata dalla presenza di EtOH.

4.3.3.2 Analisi della frazione lipidica

Il vanillil nonanoato è stato inoltre testato nelle colture cellulari di VERO per valutare l'effetto protettivo contro l'ossidazione indotta da tBH 2.5 mM nei confronti di specifici "target" lipidici cellulari (acidi grassi e colesterolo).

Nella figura 23 sono riportati i valori della somma dei principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (20:5, 22:6, 20:4, 18:2), espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nei campioni di cellule di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati per 2 ore con tBH 2.5 mM in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato (50 e 100 μ M).

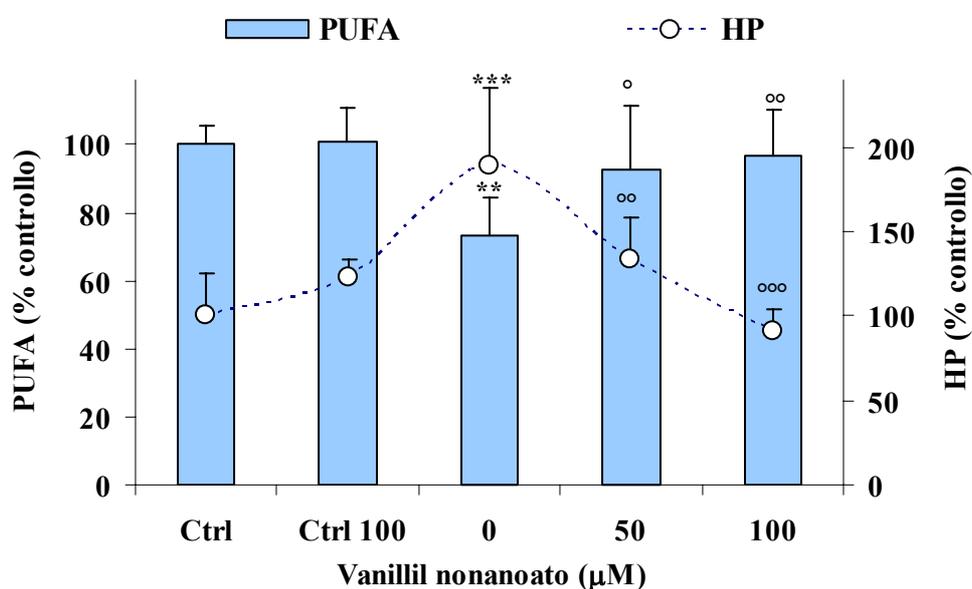


Figura 23: Valori della somma dei principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (20:5, 22:6, 20:4, 18:2) e degli idroperossidi (HP), espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati con tBH, per 2 ore, in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato (50, 100 μ M), ***= $p < 0.001$; **= $p < 0.01$ rispetto ai controlli; °°°= $p < 0.001$; °°= $p < 0.01$; °= $p < 0.05$ rispetto ai campioni ossidati ($n = 12$).

Nella stessa figura sono riportati i valori degli idroperossidi degli acidi grassi (HP), espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati negli stessi campioni di cellule. È inoltre riportato il valore ottenuto nei campioni di cellule trattate con il solo vanillil nonanoato 100 μ M (Ctrl 100): in questi campioni non è stata osservata una significativa riduzione dei PUFA totali né formazione di HP rispetto ai controlli.

Nei campioni ossidati con il tBH è stata osservata una significativa riduzione dei PUFA totali del 27% in corrispondenza ad un significativo aumento (89%) della formazione di HP rispetto ai controlli.

Il vanillil nonanoato, alle concentrazioni 50 e 100 μM , ha mostrato una significativa protezione nei confronti dell'ossidazione indotta dal tBH con valori di PUFA simili ai controlli ed una significativa riduzione di idroperossidi rispetto ai campioni ossidati, con un valore simile al valore di controllo nei campioni con vanillil nonanoato 100 μM .

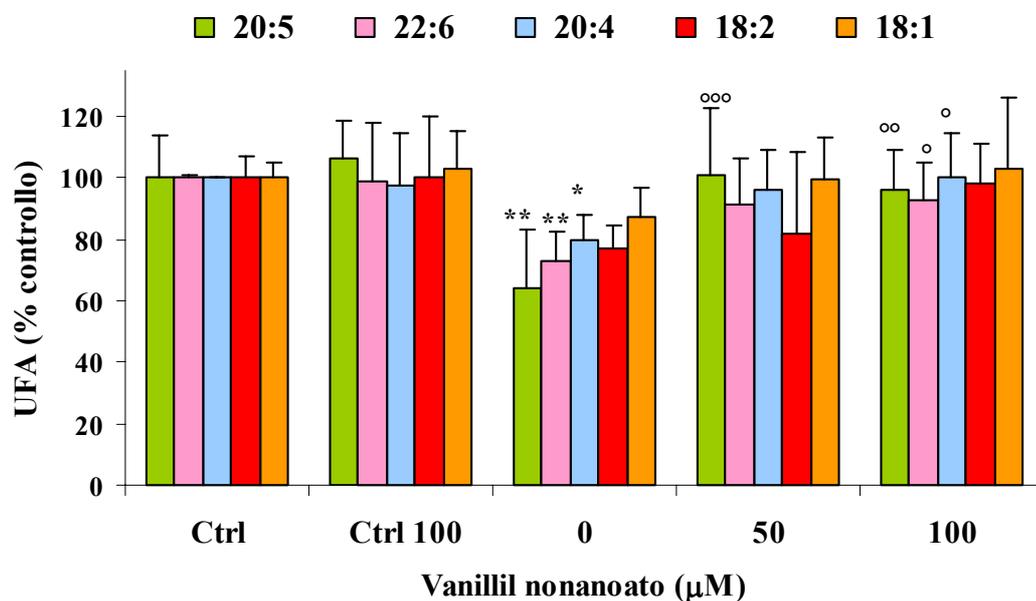


Figura 24: Valori degli acidi grassi insaturi (UFA) (20:5, 16:1, 22:6, 20:4 18:2 e 18:1) misurati nelle cellule VERO di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati con tBH, per 2 ore, in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato (50, 100 μM).

**= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli;

^{oo}= $p < 0.001$; ^o= $p < 0.01$; ^o= $p < 0.05$ rispetto ai campioni ossidati (n =12).

Nella figura 24 sono riportati i valori dei principali acidi grassi insaturi (20:5, 22:6, 20:4 18:2 e 18:1) (UFA), presenti nelle cellule VERO, espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nei campioni di cellule di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati con tBH 2.5 mM in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato (50 e 100 μM).

È anche riportato il valore ottenuto nei campioni di cellule trattate con solo vanillil nonanoato 100 μM (Ctrl 100); in questo gruppo di cellule non sono state osservate

variazioni statisticamente importanti del valore degli acidi grassi poliinsaturi e monoinsaturi rispetto ai controlli.

Nei campioni ossidati con il tBH è stata osservata una significativa riduzione degli acidi grassi poliinsaturi, in particolare del 20:5, 22:6 e 20:4.

Il vanillil nonanoato alla concentrazione di 50 μM ha mostrato una significativa protezione (37%) nei confronti dell'ossidazione del 20:5 indotta dal tBH. Lo stesso composto alla concentrazione di 100 μM ha mostrato una significativa protezione dal danno ossidativo indotto dal tBH nei confronti degli acidi grassi 20:5, 22:6 e 20:4, rispettivamente con una percentuale di incremento del 32%, 20% e 20% rispetto ai campioni ossidati.

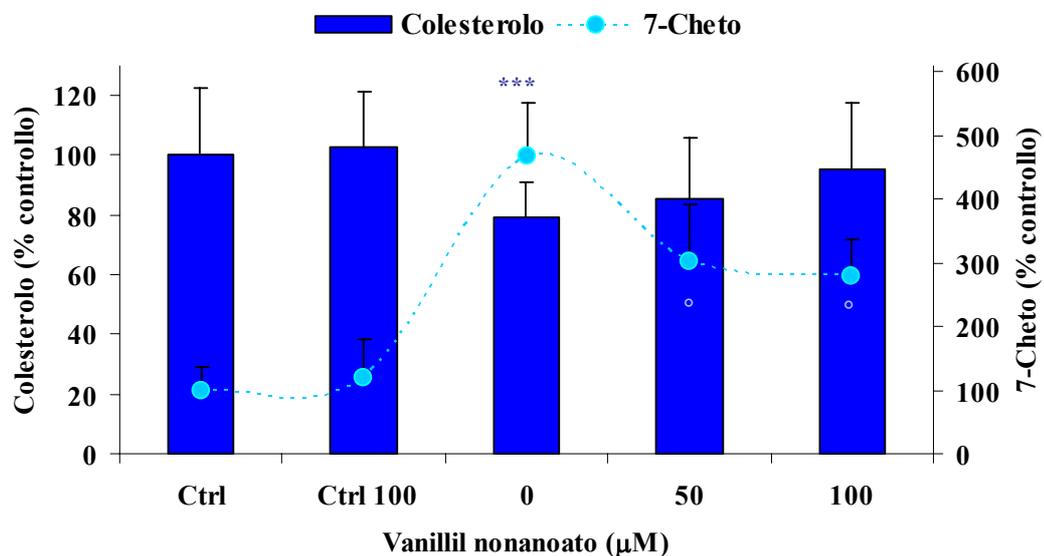


Figura 25: Valori di colesterolo e 7-cheto, espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO di controllo (Ctrl) e nei campioni ossidati con tBH, per 2 ore, in assenza (0) o in presenza di vanillil nonanoato (50, 100 μM).

***= $p < 0.001$ rispetto ai controlli;

°= $p < 0.05$ rispetto ai campioni ossidati ($n = 12$).

Nella figura 25 sono riportati i valori del colesterolo e del suo principale prodotto di ossidazione il 7-cheto, espressi in percentuale rispetto ai controlli, misurati nelle cellule VERO nei controlli e nei campioni ossidati con tBH 2.5 mM in assenza o in presenza di vanillil nonanoato (50 e 100 μM). È riportato inoltre il valore ottenuto nei campioni di cellule trattate con solo vanillil nonanoato 100 μM (Ctrl 100).

Nei campioni di cellule trattate con solo vanillil nonanoato 100 μM non sono state osservate variazioni significative dei valori percentuali di colesterolo e 7-cheto rispetto ai controlli.

Il vanillil nonanoato, alle concentrazioni di 50 e 100 μM , ha mostrato una significativa riduzione della produzione di 7-cheto rispetto ai campioni ossidati.

4.4 Attività antiossidante del vanillil nonanoato in vivo nel modello sperimentale del FeNTA

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata valutata *in vivo* nel modello sperimentale del FeNTA.

A tale scopo alcuni gruppi di animali sono stati pretrattati, per via intraperitoneale, con 2 diverse concentrazioni di vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) 30 minuti prima del trattamento con il FeNTA (15 mg di Fe/Kg di peso corporeo). Gli animali sono stati sacrificati dopo 1 ora dal trattamento e si è proceduto con le analisi biochimiche sulla frazione lipidica del plasma e del rene.

Nella figura 26 sono riportati i valori dei lipidi totali (g/dl di plasma) e della vitamina E (mg/dl di plasma) misurati nel plasma dei ratti trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato.

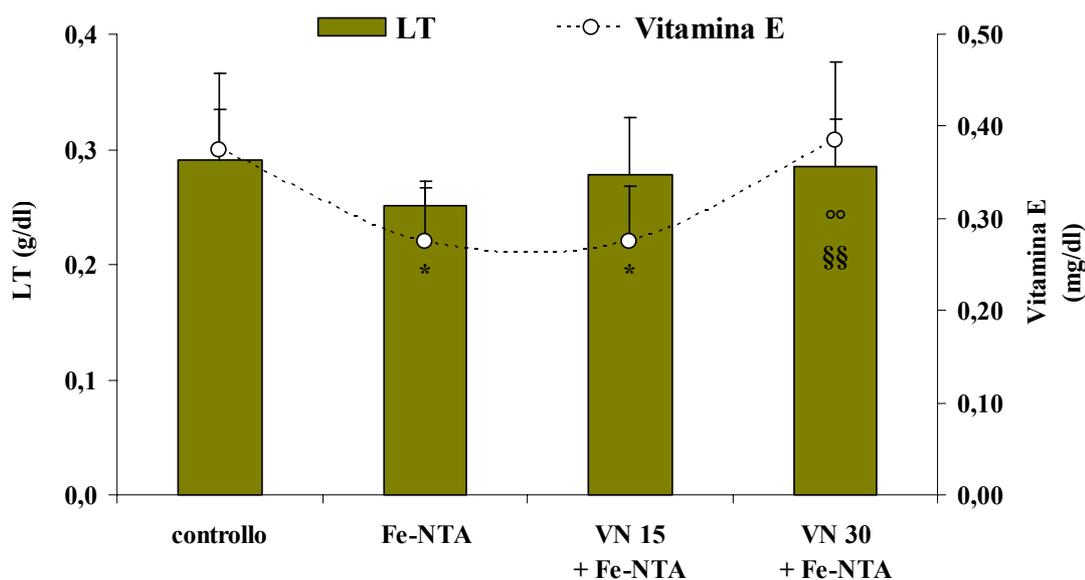


Figura 26: Valori dei lipidi totali (LT) e di vitamina E misurati nel plasma degli animali di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA).

*= $p < 0,05$ rispetto ai controlli;

^{°°}= $p < 0,01$ rispetto ai ratti trattati con il FeNTA;

§§= $p < 0,01$ rispetto a VN 15 + FeNTA (n = 15).

I valori di lipidi totali misurati nel plasma dei ratti trattati con il FeNTA risultano ridotti del 15% rispetto a quelli dei ratti di controllo, mentre per i livelli di vitamina E è stata osservata una riduzione del 23 % rispetto ai ratti di controllo. Si può osservare che negli animali pretrattati con il vanillil nonanoato alla dose di 30 mg/Kg di peso corporeo (VN

30 + FeNTA) è stato osservato un significativo risparmio della vitamina E rispetto ai ratti trattati con il FeNTA.

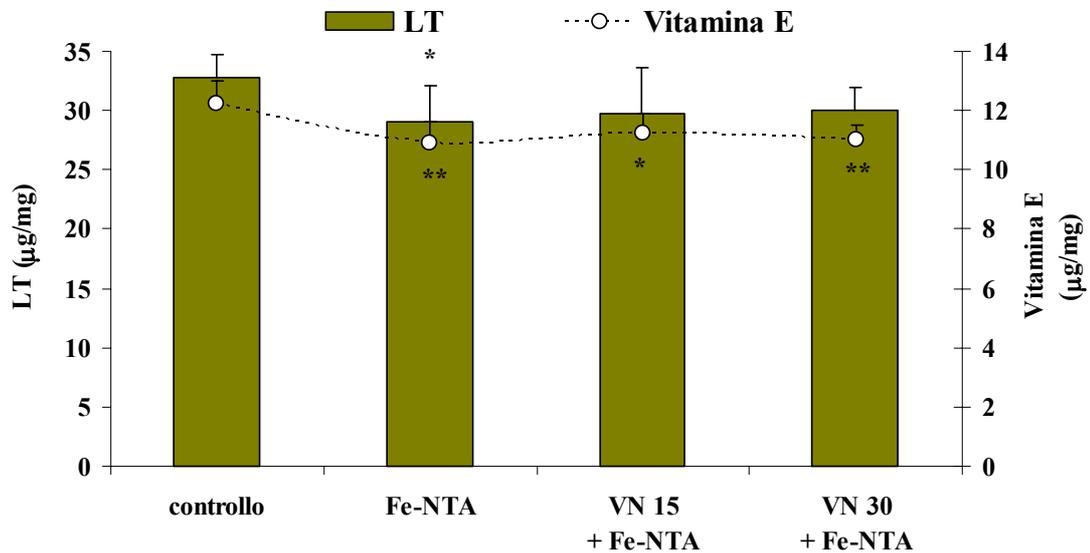
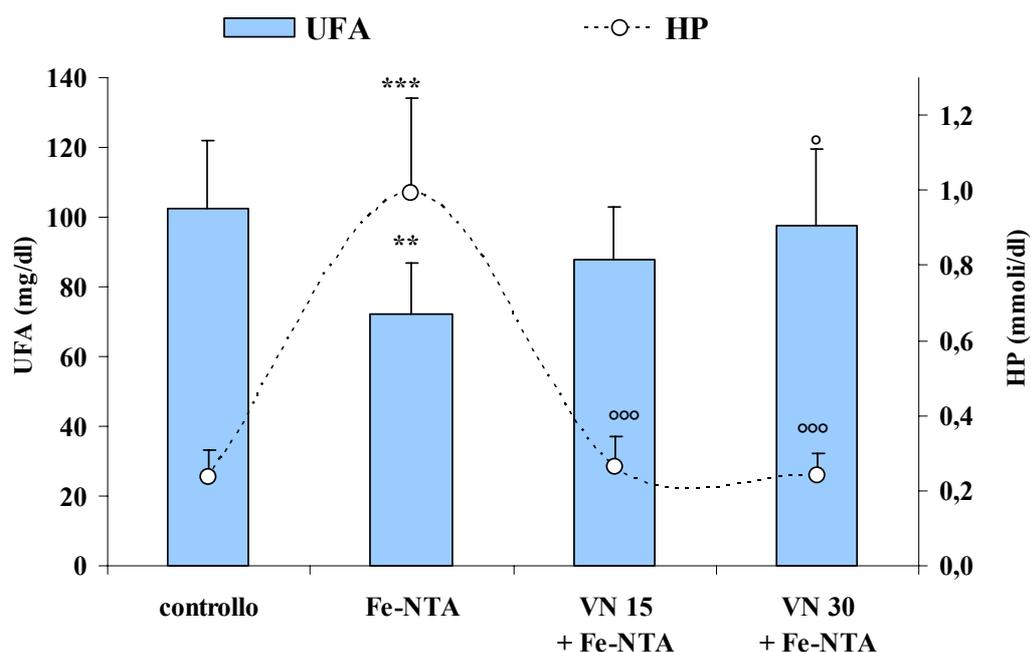


Figura 27: Valori dei lipidi totali (LT) e di vitamina E misurati nel rene degli animali di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA). ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.05$ rispetto ai controlli (n = 15)

Nel rene (figura 27) la diminuzione dei lipidi totali e della vitamina E è risultata meno marcata rispetto a quella osservata nel plasma e l'effetto protettivo osservato negli animali pretrattati con il vanillil nonanoato è risultato meno evidente alle due concentrazioni testate.

La figura 28 mostra l'andamento della somma dei principali acidi grassi insaturi (UFA) (mg/dl di plasma) oleico (18:1), linoleico (18:2), linolenico (18:3), arachidonico (20:4), eicosatrienoico (20:3), eicosapentaenoico (20:5), docosaesaenoico (22:6) e i livelli di HP (mmoli/dl di plasma) misurati nel plasma dei ratti di controllo, trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato.



misurati nel plasma degli animali di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) (VN 15+ FeNTA e VN 30 + FeNTA).

***= $p < 0.001$; **= $p < 0.01$ rispetto ai controlli;

ooo= $p < 0.001$; °= $p < 0.05$ rispetto ai ratti trattato con il FeNTA (n=15).

Nel plasma dei ratti trattati con il FeNTA è stata osservata una significativa riduzione degli UFA e un corrispettivo significativo aumento degli HP rispetto ai controlli; il pretrattamento con il vanillil nonanoato ha indotto una significativa protezione dal danno ossidativo indotto dal FeNTA con valori di idroperossidi comparabili a quelli misurati negli animali di controllo, a partire dalla dose di 15 mg/Kg di peso corporeo.

Nel rene (figura 29) degli animali trattati con una singola iniezione intraperitoneale di FeNTA è stata osservata una significativa riduzione del 24% della somma degli UFA (18:1, 18:2, 18:3: 20:3, 20:4, 20:5 e 22:6) ed un significativo incremento degli HP rispetto ai ratti di controllo. Il pretrattamento con il vanillil nonanoato esplica un effetto protettivo dimostrato dal significativo decremento degli HP rispetto agli animali trattati con il FeNTA, a partire dalla dose più bassa di vanillil nonanoato utilizzata, ma minore rispetto a quello osservato nel plasma.

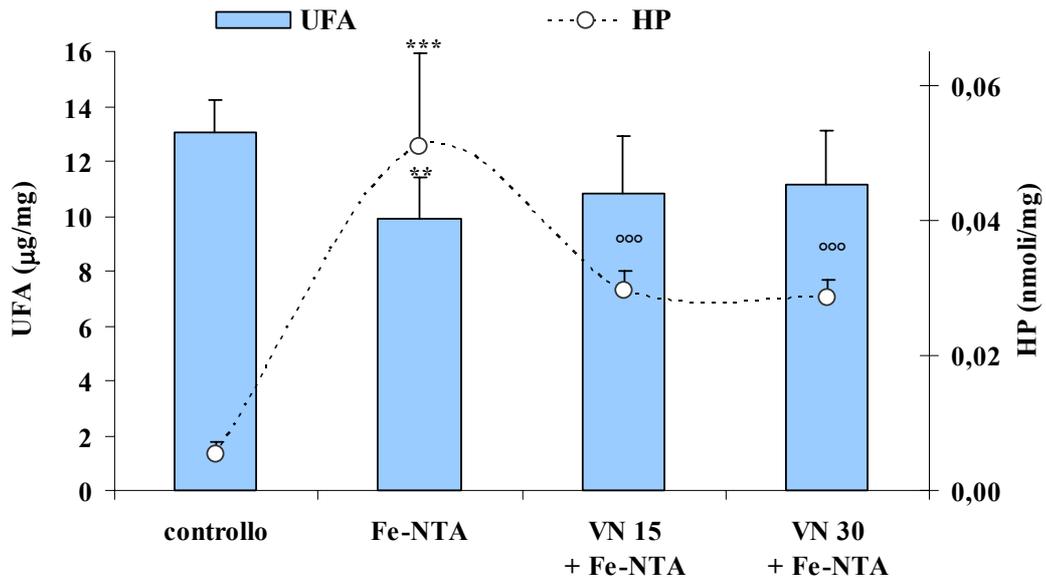


Figura 29: Valori della somma degli acidi grassi insaturi (UFA) e degli idroperossidi (HP) misurati nel rene degli animali di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA).

***= $p < 0.001$; **= $p < 0.01$ rispetto ai controlli;

°°°= $p < 0.001$ rispetto ai ratti trattato con il FeNTA (n=15).

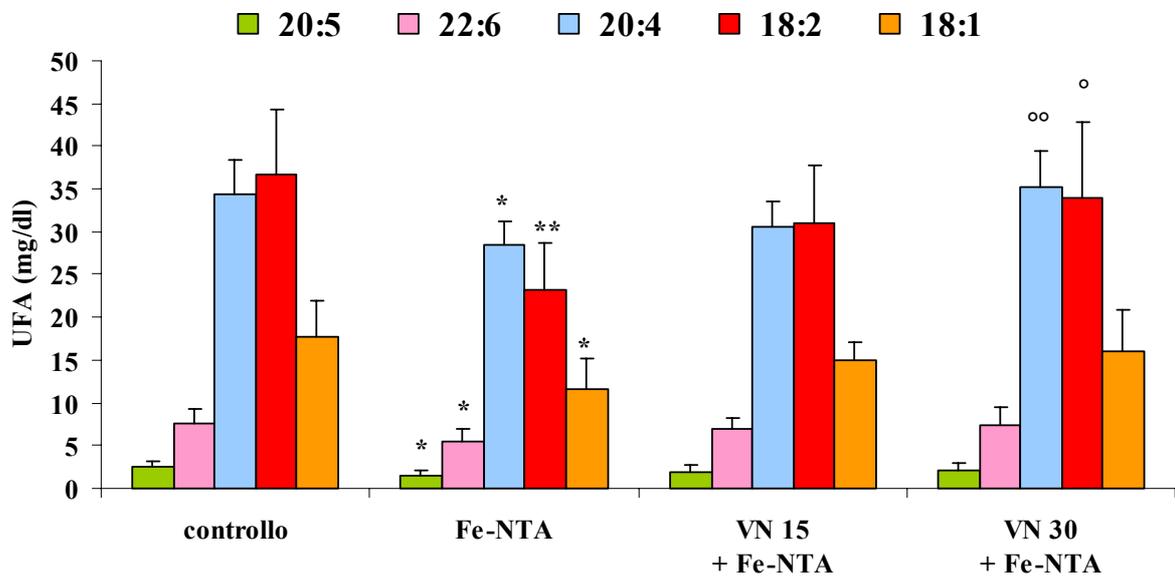


Figura 30: Valori degli acidi grassi insaturi (UFA) oleico (18:1), linoleico (18:2), arachidonico (20:4), eicosapentaenoico (20:5) e docosaesaenoico (22:6) misurati nel plasma dei ratti di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA).

**= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli;

°°= $p < 0.01$; °= $p < 0.05$ rispetto ai ratti trattati con il FeNTA (n=15).

È stato valutato nel plasma e nel rene il profilo degli acidi grassi insaturi (UFA) (mg/dl di plasma) più suscettibili all'ossidazione.

Come si osserva dagli istogrammi in figura 30 e 31, dopo 1 ora dalla somministrazione del FeNTA è stata osservata una significativa riduzione del valore di tutti i principali acidi grassi insaturi presenti nel plasma e nel rene rispetto ai controlli.

Nel plasma degli animali pretrattati con il vanillil nonanoato, alla concentrazione di 30 mg/Kg di peso corporeo, sono stati misurati valori più alti rispetto a quelli dei ratti trattati col solo FeNTA: il pretrattamento con il vanillil nonanoato ha ridotto significativamente il consumo del 20:4 e del 18:2 rispetto agli animali trattati, mentre nel rene il pretrattamento con il vanillil nonanoato (15 mg/Kg di peso corporeo) ha ridotto significativamente il consumo del 22:6 rispetto agli animali trattati con il FeNTA.

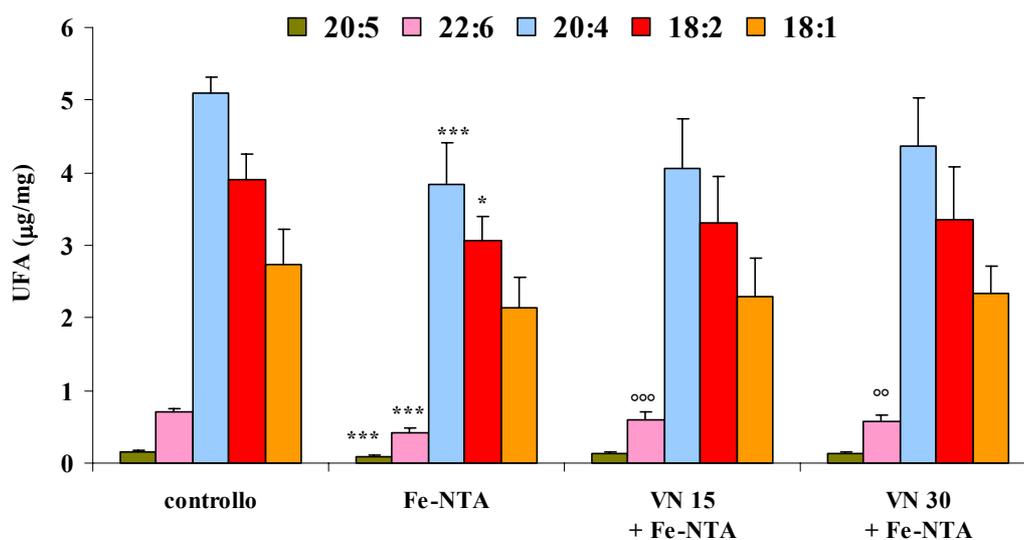


Figura 31: Valori degli acidi grassi insaturi (UFA) oleico (18:1), linoleico (18:2), arachidonico (20:4), eicosapentaenoico (20:5) e docosaesaenoico (22:6) misurati nel rene dei ratti di controllo (veicolo + salina), in quelli trattati con il FeNTA e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA).

***= $p < 0.001$; *= $p < 0.05$ rispetto ai controlli;

ooo= $p < 0.001$; oo= $p < 0.01$ rispetto ai ratti trattati con il FeNTA (n=15).

In figura 32 sono riportati i valori di colesterolo (mg/dl) e del suo principale prodotto di ossidazione 7-cheto misurati nel plasma dei ratti di controllo, trattati con il FeNTA e in quelli pretrattati con il vanillil nonanoato.

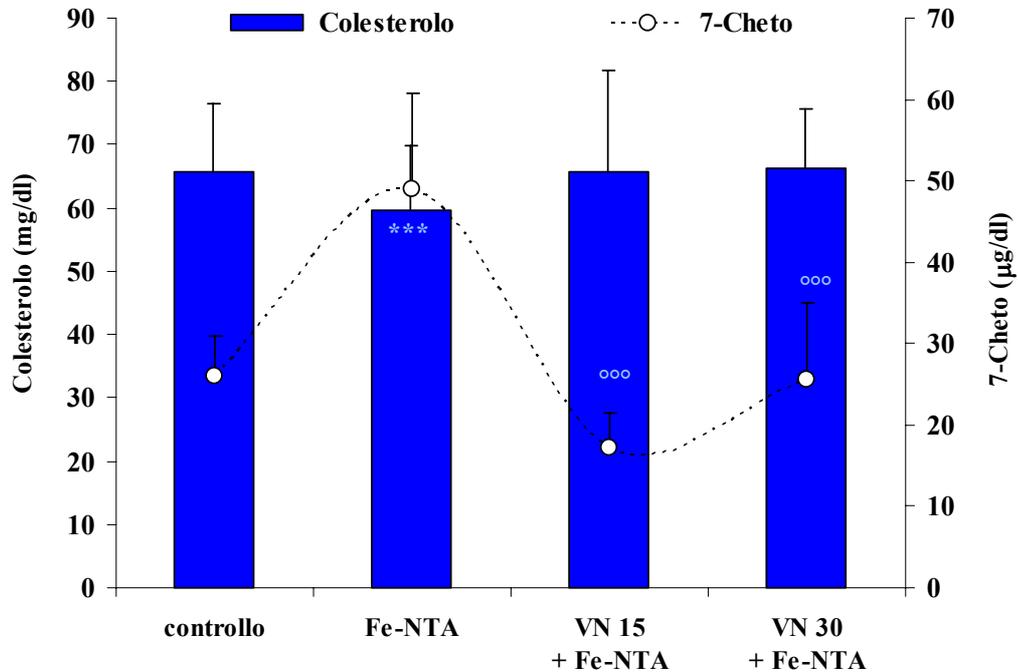


Figura 32: Valori di colesterolo e 7-cheto misurati nel plasma degli animali di controllo, in quelli trattati e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/kg di peso corporeo) (VN 15 + FeNTA e VN 30 + FeNTA).

*** = $p < 0.001$ rispetto ai controlli;

ooo = $p < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con il FeNTA ($n = 15$).

Si può osservare che negli animali trattati con il FeNTA, in seguito alla diminuzione del colesterolo dovuta all'ossidazione indotta dall'agente ossidante, si è avuto un aumento significativo del valore di 7-cheto rispetto agli animali di controllo: questo valore, nei ratti pretrattati con il vanillil nonanoato, è risultato significativamente ridotto rispetto agli animali trattati, ad entrambe le concentrazioni utilizzate.

Anche nel rene (figura 33) degli animali trattati è stata osservata una diminuzione del colesterolo e un significativo aumento del suo principale prodotto di ossidazione 7-cheto, ma meno evidente rispetto a quello osservato nel plasma.

Nello stesso organo i livelli di 7-cheto sono stati ridotti in maniera significativa nei ratti pretrattati con il vanillil nonanoato, ad entrambe le dosi testate rispetto agli animali trattati con il FeNTA.

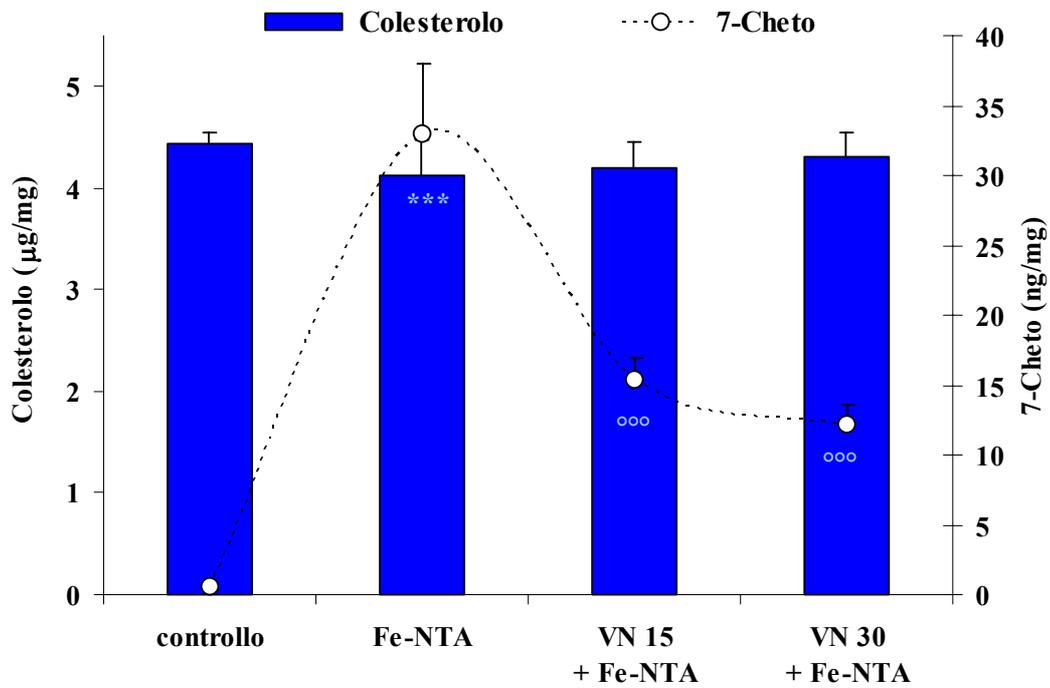


Figura 33: Valori di colesterolo e 7-cheto misurati nel rene degli animali di controllo, in quelli trattati e pretrattati con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo).

*** = $p < 0.001$ rispetto ai controlli;

ooo = $p < 0.001$ rispetto ai ratti trattati con il FeNTA (n=15).

5 Discussione

Un gran numero di molecole presenti nelle piante hanno mostrato la capacità di contrastare l'azione dei radicali liberi in diversi sistemi biologici (Bonnely et al., 2000), ed è per questo motivo che gli antiossidanti naturali presenti nei cibi vengono considerati costituenti importanti per i loro effetti terapeutici (Ames et al., 1993).

Il frutto del *Capsicum annuum* è una buona fonte di antiossidanti naturali e tra questi vi sono dei composti esclusivi di questo genere: i capsaicinoidi presenti principalmente nella varietà piccante (*longum*) e i capsinoidi, presenti in maggiore quantità nei frutti di una *cultivar* non piccante chiamata CH-19 Sweet.

Il capsiato e il diidrocapsiato, i principali capsinoidi presenti nel *Capsicum*, hanno mostrato diverse attività biologiche, in particolare una notevole attività antiossidante *in vitro*. Il vanillil nonanoato viene considerato un composto fenolico in grado di mimare il comportamento dei capsinoidi naturali (Macho et al., 2003a; Macho et al., 2003b; Sancho et al., 2002) e in lavori precedenti, condotti nei nostri laboratori, ha mostrato un'attività antiossidante comparabile a quella dell'analogo naturale (Rosa et al., 2002a). In questo lavoro di tesi è stata approfondita l'attività antiossidante e il meccanismo d'azione dei capsinoidi utilizzando come capsinoide modello il vanillil nonanoato, tenendo conto che questo analogo chimico può essere ottenuto facilmente tramite sintesi enzimatica e chimica (Appendino et al., 2002), mentre l'estrazione e l'isolamento del capsiato naturale è una procedura difficile e dispendiosa.

In questo studio è stato valutato l'effetto antiossidante attraverso l'utilizzo di diversi modelli sperimentali di stress ossidativo.

Nella prima fase del lavoro sono stati utilizzati dei sistemi chimici *in vitro*, ed è stata effettuata la comparazione dell'attività antiossidante del vanillil nonanoato con quella di due analoghi chimici semplificati, i composti vanilloidi alcol vanillico e vanillina, per stabilire una relazione struttura-attività.

Le tre molecole sono state testate nel sistema dell'autossidazione dell'acido linoleico, un semplice sistema che permette di valutare la capacità di una molecola di inibire la perossidazione lipidica indotta dai radicali lipoperossilici ROO[•]. L'andamento dell'ossidazione è stato valutato considerando il consumo dell'acido grasso e la formazione dei suoi principali prodotti di ossidazione, gli droperossidi isomeri HPODE c,t e t,t; inoltre in questo sistema sperimentale la misura del rapporto fra gli idroperossidi isomeri c,t/t,t, formati dalla degradazione ossidativa dell'acido grasso, consente di ipotizzare un'attività di donazione di atomi di idrogeno. La formazione

degli idroperossidi isomeri durante l'autossidazione dell'acido linoleico segue un andamento parabolico, con un iniziale spostamento del rapporto verso gli isomeri c,t che scompare man mano che procede la degradazione dell'acido grasso, ma che viene incrementato in presenza di un antiossidante che agisce come forte donatore di atomi di idrogeno (Banni et al., 1996a).

Dai risultati ottenuti soltanto il vanillil nonanoato e l'alcol vanillico hanno mostrato una notevole efficacia come *scavenger* di radicali lipoperossidici ROO[•] e uno spostamento del rapporto c,t,t degli idroperossidi, correlato alle concentrazioni crescenti di tali composti, indicando un meccanismo di donazione di atomi d'idrogeno; in questo sistema la vanillina è risultata meno efficace.

I dati ottenuti indicano che l'attività antiossidante del vanillil nonanoato, nei confronti dei radicali ROO[•] generati in questo sistema, è probabilmente dovuta alla donazione di atomi di idrogeno dal gruppo idrossilico presente nella porzione vanilloide della molecola, e non alla catena laterale.

È stata inoltre testata la capacità del vanillil nonanoato e degli analoghi chimici semplificati di inibire l'ossidazione del colesterolo a 140°C per 1.5 ore. L'alcol vanillico e il vanillil nonanoato hanno mostrato un significativo effetto protettivo nei confronti del consumo del colesterolo e una significativa inibizione della produzione di 7-cheto, principale prodotto di ossidazione dello sterolo, confermando l'azione di *scavenger* osservata nel sistema precedente, mentre la vanillina non è risultata attiva a causa della sua instabilità alle alte temperature.

L'alcol vanillico, sia nel sistema dell'acido linoleico che in quello del colesterolo, ha esercitato un'attività antiossidante leggermente superiore rispetto a quella del vanillil nonanoato, probabilmente dovuta alla maggiore capacità di delocalizzare il radicale risultante nell'anello aromatico, pur agendo entrambi probabilmente come donatori di atomi d'idrogeno dalla porzione vanilloide.

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato è stata poi valutata in un sistema *in vitro* più complesso, durante l'ossidazione delle LDL in presenza di Cu²⁺.

Lo studio dell'ossidazione delle LDL in presenza di questo metallo è un modello importante per la comprensione dei fenomeni ossidativi che avvengono in alcune patologie. Infatti diversi studi epidemiologici dimostrano come l'ossidazione delle LDL può avere, nell'uomo, un ruolo causale nell'aterosclerosi e in condizioni patologiche ad essa connesse, come patologie cardiovascolari e ischemia (Reaven et al., 1999). Inoltre

la presenza nel plasma di metalli (ferro e rame) in eccesso può portare all'ossidazione di alcune biomolecole ed essere quindi la causa di patologie legate all'ossidazione del compartimento plasmatico (Frei and Gaziano, 1993). È stato ampiamente dimostrato che l'aumento della produzione dei radicali liberi e il danno ossidativo generato dall'alterazione dell'omeostasi del rame sono coinvolti in processi neurodegenerativi caratteristici di alcuni disordini genetici del sistema nervoso centrale (patologia di Menke e di Wilson) (Rossi et al., 2006).

Per valutare l'attività antiossidante del vanillil nonanoato durante l'ossidazione delle LDL per 2 ore in presenza di Cu^{2+} sono stati considerati come indici del danno ossidativo i componenti lipidici delle particelle, quali acidi grassi insaturi e colesterolo e i loro rispettivi prodotti di ossidazione, gli HP e il 7-cheto. In questo sistema il vanillil nonanoato ha esercitato una significativa attività di protezione nei confronti della degradazione ossidativa indotta dal Cu^{2+} dei principali PUFA (20:5, 22:6, 20:4, 18:3, 18:2, CLA, 22:4 e 20:3) e del colesterolo presenti nelle LDL, a partire dalla concentrazione di 25 μM , e una corrispondente diminuzione degli HP e del 7-cheto.

In questo modello sperimentale il vanillil nonanoato ha mostrato un'attività antiossidante inferiore rispetto a quella esercitata nei modelli sperimentali *in vitro* descritti in precedenza; il motivo potrebbe essere il fatto che l'attività antiossidante del composto è stata testata in un ambiente acquoso, in cui il vanillil nonanoato risulta più instabile. Il vanillil nonanoato è un fenolo con caratteristiche lipofile, e possiede una notevole stabilità in solventi poco polari, come acetato di etile, CHCl_3 e n-esano, mentre risulta più labile in solventi polari come acqua, metanolo e etanolo (Sutoh et al., 2001).

È stata inoltre studiata l'attività antiossidante del vanillil nonanoato in un modello di stress ossidativo in colture cellulari, per valutare la capacità della molecola di contrastare la degradazione ossidativa dei lipidi cellulari. Come agente ossidante è stato scelto il tBH, un idroperossido organico in grado di stimolare la perossidazione lipidica in un sistema biologico contenente membrane e ampiamente utilizzato in molti sistemi di colture cellulari (Alia et al., 2006; Masaki et al., 1989).

In particolare il tBH è stato utilizzato come ossidante in colture primarie, in microsomi di fegato di ratto e in cellule di epatocarcinoma umane (HepG2), e lo stress ossidativo indotto è stato valutato attraverso l'analisi di parametri generici, come le specie reattive all'acido tiobarbiturico e enzimi antiossidanti come la catalasi, glutatione perossidasi e

reduttasi, e la superossido dismutasi (Alia et al., 2006; Goya et al., 2007; Rodriguez et al., 2001).

È stato inizialmente valutato l'effetto ossidante di tre concentrazioni, non citotossiche, di tBH sulle cellule VERO (1, 2.5 e 5 mM), per stabilire una concentrazione ottimale per ottenere uno stress ossidativo chiaramente misurabile. Il danno ossidativo è stato valutato attraverso la misura delle modificazioni della frazione lipidica indotte dal tBH. Le modificazioni ossidative a livello della membrana cellulare sono state analizzate monitorando le variazioni dei livelli dei principali acidi grassi insaturi e saturi, del colesterolo e della vitamina E delle cellule VERO.

Dopo due ore dal trattamento con il tBH, è stata osservata una significativa diminuzione dei PUFA totali considerati a partire dalla concentrazione più bassa testata e un correlato significativo aumento degli HP. Alla concentrazione di tBH 1 mM gli acidi grassi insaturi più suscettibili all'ossidazione sono risultati il 20:5, 22:6 e 20:4 e il 18:2 dalla concentrazione di tBH 2.5 mM. Non è stata osservata alcuna diminuzione significativa del 18:1 e dei principali acidi grassi saturi a nessuna delle concentrazioni di tBH testate. L'agente ossidante non ha inoltre indotto una diminuzione significativa del colesterolo, mentre è stato osservato un significativo incremento del 7-cheto a partire dalla concentrazione più bassa. Anche l'antiossidante di membrana vitamina E è risultato fortemente suscettibile all'ossidazione indotta sulle cellule VERO.

È stato quindi valutato l'effetto protettivo del vanillil nonanoato nei confronti del danno ossidativo cellulare indotto dal tBH.

Il fenolo ha mostrato un significativo effetto protettivo in maniera specifica sulla diminuzione dei principali componenti lipidici cellulari e sulla formazione dei rispettivi prodotti di ossidazione, confermando l'azione di *scavenger* dei radicali perossilici mostrata nei modelli precedenti. In particolare ha esercitato, alle concentrazioni di 5 e 10 μ M, una significativa riduzione della formazione di MDA indotta da tBH 750 μ M, e a concentrazioni più elevate, 50 e 100 μ M, ha mostrato un'attività di protezione dalla degradazione ossidativa dei PUFA (in particolare il 20:5, il 22:6 e il 20:4) e del colesterolo indotta da tBH 2.5 mM, riducendo sensibilmente i prodotti di ossidazione (HP e 7-cheto).

L'attività antiossidante del vanillil nonanoato mostrata nei sistemi sperimentali *in vitro* è stata in fine confermata *in vivo* nel modello sperimentale del FeNTA.

L'iniezione intraperitoneale di una dose sub letale di FeNTA (15 mg Fe/Kg di peso corporeo) induce un notevole danno ossidativo in associazione con l'eccesso di ferro, causato da un'elevata produzione di radicali liberi (Qi et al., 1999).

Nel nostro laboratorio è stato osservato che una tale dose è in grado di causare nei ratti l'ossidazione della frazione lipidica, in particolare PUFA, colesterolo e vitamina E nel rene e nel plasma dopo 1 ora dal trattamento con il complesso (Deiana et al., 2001; Deiana et al., 2005). Il compartimento plasmatico sembra essere il primo *target* del processo ossidativo.

Il pretrattamento con il vanillil nonanoato (15 e 30 mg/Kg di peso corporeo) è in grado di indurre una diminuzione della perossidazione lipidica nel plasma e nel rene degli animali trattati con il FeNTA. Infatti nel plasma dei ratti pretrattati con il composto è stato osservato un effetto protettivo sulla riduzione dei lipidi totali, degli acidi grassi insaturi, della vitamina E e del colesterolo, e sull'incremento degli HP e del 7-cheto; l'attività antiossidante è risultata meno evidente nel rene, rispetto a quella osservata nel plasma, probabilmente correlabile alla minore suscettibilità ossidativa di questo organo.

Dai risultati ottenuti il vanillil nonanoato ha mostrato una notevole attività antiossidante in diversi modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*. È un composto lipofilo, altamente instabile nei solventi polari ed estremamente sensibile a processi idrolitici (Ohnuki et al., 2001b; Sutoh et al., 2001). Studi sull'uomo e sui ratti hanno dimostrato che anche gli analoghi della capsaicina vengono metabolizzati tramite idrolisi del legame amidico durante il passaggio attraverso la pelle (Iida et al., 2003). Quindi è probabile che il vanillil nonanoato nei sistemi biologici venga idrolizzato da esterasi o lipasi o subire un'idrolisi chimica in ambiente acquoso (Iida et al., 2003). È dunque ragionevole pensare che l'attività antiossidante del vanillil nonanoato esplicita *in vivo* sia mediata dall'alcol vanillico, metabolita idrolitico idrofilico (Sutoh et al., 2001).

Il vanillil nonanoato mostra le stesse attività biologiche del capsato naturale (Rosa et al., 2002a), può essere quindi considerato un interessante composto antiossidante in grado di mimare il comportamento dei capsinoidi naturali. Inoltre può essere considerato *in vivo* un *pro-drug* dell'alcol vanillico, composto fenolico dotato anch'esso di interessanti proprietà antiossidanti (Hsieh et al., 2000).

Tenendo conto che la somministrazione sistemica dei capsinoidi risulta essere ben tollerata sia negli animali che nell'uomo (Iida et al., 2003), questi composti si qualificano come promettenti antiossidanti naturali, presenti nella dieta.

Ulteriori studi saranno comunque necessari per approfondire i processi correlati all'assorbimento e alla biodisponibilità dei capsinoidi, mediante l'utilizzo del capsinoide mimico vanillil nonanoato.

6 Bibliografia

- Abuja, P. M., and Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* **306**, 1-17.
- Adachi, J., Kudo, R., Ueno, Y., Hunter, R., Rajendram, R., Want, E., and Preedy, V. R. (2001). Heart 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats. *J Nutr* **131**, 2916-20.
- Agarwal, R., and Chase, S. D. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **775**, 121-6.
- Agradi, E., Regondi, S., and Rotti, G. (2005). Aspetti di Botanica Farmaceutica. In "Conoscere le piante medicinali" (MediService, ed.), Vol. IV, pp. 154-156, Cologno Monzese (Mi).
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., and Goya, L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* **212**, 110-8.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7915-22.
- Anderson, J. W., Gowri, M. S., Turner, J., Nichols, L., Diwadkar, V. A., Chow, C. K., and Oeltgen, P. R. (1999). Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **18**, 451-61.
- Ansar, S., Iqbal, M., and Athar, M. (1999). Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitritotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* **20**, 599-606.
- Appendino, G., Minassi, A., Daddario, N., Bianchi, F., and Tron, G. C. (2002). Chemoselective esterification of phenolic acids and alcohols. *Org Lett* **4**, 3839-41.
- Ariyoshi, K., Adachi, J., Asano, M., Ueno, Y., Rajendram, R., and Preedy, V. R. (2002). Effect of chronic ethanol feeding on oxysterols in rat liver. *Free Radic Res* **36**, 661-6.
- Athar, M., and Iqbal, M. (1998). Ferric nitritotriacetate promotes N-diethylnitrosamine-induced renal tumorigenesis in the rat: implications for the involvement of oxidative stress. *Carcinogenesis* **19**, 1133-9.
- Autor, A. P. (1974). Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase. *Life Sci* **14**, 1309-19.
- Aviram, M. (1993). Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **98**, 1-9.
- Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y., and Seno, S. (1979). Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitritotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol* **95**, 663-73.
- Banerjee, D., Madhusoodanan, U. K., Nayak, S., and Jacob, J. (2003). Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta* **334**, 205-9.
- Banni, S., Contini, M. S., Angioni, E., Deiana, M., Dessi, M. A., Melis, M. P., Carta, G., and Corongiu, F. P. (1996a). A novel approach to study linoleic acid autoxidation: importance of simultaneous detection of the substrate and its derivative oxidation products. *Free Radic Res* **25**, 43-53.

- Banni, S., Day, B. W., Ewans, R. W., Corongiu, F. P., and Lombardi, B. (1994). Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of conjugated diene fatty acid in milk, dairy products and lamb tissue. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 150-55.
- Banni, S., Lucchi, L., Baraldi, A., Botti, A., Cappelli, G., and Corongiu, F. (1996b). No direct evidence of increased lipid peroxidation in hemodialysis patients. *Nephron* **72**, 177-83.
- Barabas, K., Szabo, L., Matkovics, B., and Berencsi, G. (1984). Effects of paraquat on peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Gen Pharmacol* **15**, 133-7.
- Bates, G. W., and Schlabach, M. R. (1973). The reaction of ferric salts with transferrin. *J Biol Chem* **248**, 3228-32.
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., and Lusis, A. J. (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**, 2488-96.
- Berliner, L. J., Khramtsov, V., Fujii, H., and Clanton, T. L. (2001). Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radic Biol Med* **30**, 489-99.
- Bianchi, I. (2004). Le Solanacee. *La Medicina Biologica* **3**, 35-42.
- Blake, R. C., 2nd, and Coon, M. J. (1980). On the mechanism of action of cytochrome P-450. Spectral intermediates in the reaction of P-450LM2 with peroxy compounds. *J Biol Chem* **255**, 4100-11.
- Bonnely, S., Peyrat-Maillard, M. N., Rondini, L., Masy, D., and Berset, C. (2000). Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *J Agric Food Chem* **48**, 2785-92.
- Bowry, V. W., Stanley, K. K., and Stocker, R. (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10316-20.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bresnick, E., Birt, D. F., Wolterman, K., Wheeler, M., and Markin, R. S. (1990). Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue. *Carcinogenesis* **11**, 1159-63.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J* **9**, 1551-8.
- Brown, A. J., Leong, S. L., Dean, R. T., and Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* **38**, 1730-45.
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**, 302-10.
- Burcham, P. C. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* **13**, 287-305.
- Burkitt, M. J. (2001). A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* **394**, 117-35.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., and Prior, R. L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* **68**, 1081-7.
- Carratu, B., and Sanzini, E. (2005). Biologically-active phytochemicals in vegetable food. *Ann Ist Super Sanita* **41**, 7-16.

- Chen, H. W., Chiang, T., Wang, C. Y., and Lii, C. K. (2000). Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by alpha-tocopherol and glutathione. *Food Chem Toxicol* **38**, 1089-96.
- Chiang, S. D., Gessert, C. F., and Lowry, O. H. (1957). Colorimetric determination of extracted lipids. An adaptation for microgram amounts of lipid obtained for cerumen. *Curr. List. Med. Lit. Res.* **33**, 56-8.
- Chirico, S. (1994). High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods Enzymol* **233**, 314-8.
- Christie, W. W. (1989). Preparation of methyl esters and other derivatives. In "Gas chromatography and lipids, a practical guide" (W. W. Christie, ed.), pp. 64-84. The Oily Press Ayr.
- Chu, Y. F., Sun, J., Wu, X., and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* **50**, 6910-6.
- Contreras-Padilla, M., and Yahia, E. M. (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J Agric Food Chem* **46**, 2075-79.
- Davies, M. J. (1988). Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron spin resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **964**, 28-35.
- Davies, M. J., and Slater, T. F. (1987). Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. *Biochem J* **245**, 167-73.
- Deiana, M., Aruoma, O. I., Rosa, A., Crobu, V., Casu, V., Piga, R., and Dessi, M. A. (2001). The effect of ferric-nitritotriacetic acid on the profile of polyunsaturated fatty acids in the kidney and liver of rats. *Toxicol Lett* **123**, 125-33.
- Deiana, M., Rosa, A., Corona, G., Collu, S., Ennas, M. G., and Dessi, M. A. (2005). Lipid peroxidation in plasma of rats treated with ferric-nitritotriacetate, in relation to kidney and liver modifications. *Biofactors* **23**, 35-44.
- Del Rio, D., Pellegrini, N., Colombi, B., Bianchi, M., Serafini, M., Torta, F., Tegoni, M., Musci, M., and Brighenti, F. (2003). Rapid fluorimetric method to detect total plasma malondialdehyde with mild derivatization conditions. *Clin Chem* **49**, 690-2.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., and Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 316-28.
- Delaquis, P., Stanich, K., and Toivonen, P. (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *J Food Prot* **68**, 1472-6.
- Dessì, M. A., Deiana, M., Rosa, A., Piredda, M., Cottiglia, F., Bonsignore, L., Deidda, D., Pompei, R., and Corongiu, F. P. (2001). Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Phytother Res* **15**, 511-8.
- Dierckx, N., Horvath, G., van Gils, C., Vertommen, J., van de Vliet, J., De Leeuw, I., and Manuel-y-Keenoy, B. (2003). Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr* **57**, 999-1008.
- Ebina, Y., Okada, S., Hamazaki, S., Ogino, F., Li, J. L., and Midorikawa, O. (1986). Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitritotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* **76**, 107-13.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., and Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* **7**, 197-203.

- Faraut, B., Giannesini, B., Matarazzo, V., Marqueste, T., Dalamasso, C., Rougon, G., Cozzone, P. J., and Bendahan, D. (2007). Downregulation of uncoupling protein-3 is linked to changes in muscle mitochondrial energy metabolism in vivo as a result of capsiate administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, 1474-82.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Ford, E. S., Will, J. C., Bowman, B. A., and Narayan, K. M. (1999). Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* **149**, 168-76.
- Frei, B., and Gaziano, J. M. (1993). Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation. *J Lipid Res* **34**, 2135-45.
- Frei, B., Stocker, R., and Ammmes, B. N. (1988). Antioxidants defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9784-9572.
- Fuhrman, B., Lavy, A., and Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* **61**, 549-54.
- Glade, M. J. (1999). Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. *Nutrition* **15**, 523-6.
- Goya, L., Mateos, R., and Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr* **46**, 70-78.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* **16**, 33-50.
- Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* **486**, 10-3.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In "Free Radicals in Biology and Medicine" (B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, eds.), Vol. 4, pp. 187-276. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., Long, L. H., Yee, T. P., Lim, S., and Kelly, R. (2004). Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. *Curr Med Chem* **11**, 1085-92.
- Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**, 231-55.
- Hara, S., Endo, T., Kuriwa, F., and Kano, S. (1991). Mechanism of paraquat-stimulated lipid peroxidation in mouse brain and pulmonary microsomes. *J Pharm Pharmacol* **43**, 731-3.
- Harada, N., and Okajima, K. (2007). Effect of topical application of capsaicin and its related compounds on dermal insulin-like growth factor-I levels in mice and on facial skin elasticity in humans. *Growth Horm IGF Res* **17**, 171-76.
- Haramizu, S., Mizunoya, W., Masuda, Y., Ohnuki, K., Watanabe, T., Yazawa, S., and Fushiki, T. (2006). Capsiate, a nonpungent capsaicin analog, increases endurance swimming capacity of mice by stimulation of vanilloid receptors. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 774-81.

- Heinecke, J. W., Kawamura, M., Suzuki, L., and Chait, A. (1993). Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* **34**, 2051-61.
- Henderson, D. E., Slickman, A. M., and Henderson, S. K. (1999). Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. *J Agric Food Chem* **47**, 2563-70.
- Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F., and Collen, D. (1998). Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* **98**, 1487-94.
- Hsieh, C. L., Chang, C. H., Chiang, S. Y., Li, T. C., Tang, N. Y., Pon, C. Z., Hsieh, C. T., and Lin, J. G. (2000). Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. *Life Sci* **67**, 1185-95.
- Iida, T., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., Fushiki, T., Yazawa, S., Watanabe, T., and Tominaga, M. (2003). TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology* **44**, 958-67.
- Ikeda, K., Sun, F., Tanaka, K., Tokumaru, S., and Kojo, S. (1998). Increase of lipid hydroperoxides in the rat liver and kidney after administering ferric nitrilotriacetate. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1438-9.
- Imanaga, Y., Sakata, N., Takebayashi, S., Matsunaga, A., Sasaki, J., Arakawa, K., Nagai, R., Horiuchi, S., Itabe, H., and Takano, T. (2000). In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **150**, 343-55.
- Inoue, S., and Kawanishi, S. (1987). Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res* **47**, 6522-7.
- Iorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Zollo, F., Blanco-Molina, M., Macho, A., and Munoz, E. (2001). New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *J Agric Food Chem* **49**, 2022-9.
- Iqbal, M., and Athar, M. (1998). Attenuation of iron-nitrilotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* **36**, 485-95.
- Iqbal, M., Giri, U., and Athar, M. (1995). Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) is a potent hepatic tumor promoter and acts through the generation of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 557-63.
- Iqbal, M., Giri, U., Giri, D. K., and Athar, M. (1997). Evidence that Fe-NTA-induced renal prostaglandin F2 alpha is responsible for hyperplastic response in kidney: implications for the role of cyclooxygenase-dependent arachidonic acid metabolism in renal tumor promotion. *Biochem Mol Biol Int* **42**, 1115-24.
- Iqbal, M., Rezazadeh, H., Ansar, S., and Athar, M. (1998). alpha-Tocopherol (vitamin-E) ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* **17**, 163-71.
- Iqbal, M., Sharma, S. D., Mizote, A., Fujisawa, M., and Okada, S. (2003). Differential role of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides in augmenting ferric

- nitrilotriacetate (Fe-NTA)-mediated DNA damage: implications for carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* **1**, 13-21.
- Ishii, K., Adachi, J., Tomita, M., Kurosaka, M., and Ueno, Y. (2002). Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion. *Free Radic Res* **36**, 163-8.
- Itabe, H., Yamamoto, H., Imanaka, T., Shimamura, K., Uchiyama, H., Kimura, J., Sanaka, T., Hata, Y., and Takano, T. (1996). Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* **37**, 45-53.
- Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Segawa, K., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res* **64**, 1071-8.
- Jialal, I., and Devaraj, S. (1996). The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Nutr* **126**, 1053S-7S.
- Kaur, C., and Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables - the millenium's health. *Int J Food Sci Tech* **36**, 703-25.
- Kawada, T., and Iwai, K. (1985). *In vivo* and *in vitro* metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 441-448.
- Kawada, T., Suzuki, T., Takahashi, M., and Iwai, K. (1984). Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **72**, 449-56.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50.
- Keller, J. N., Hanni, K. B., and Markesbery, W. R. (1999). Oxidized low-density lipoprotein induces neuronal death: implications for calcium, reactive oxygen species, and caspases. *J Neurochem* **72**, 2601-9.
- Kempaiah, R. K., Manjunatha, H., and Srinivasan, K. (2005). Protective effect of dietary capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein in rats. *Mol Cell Biochem* **275**, 7-13.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., Keys, M. H., and et al. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* **124**, 903-15.
- Khan, N., Sharma, S., and Sultana, S. (2004). Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats. *Cancer Lett* **210**, 17-26.
- Kimoto, T., Koya, S., Hino, K., Yamamoto, Y., Nomura, Y., Micallef, M. J., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., and Kurimoto, M. (2000). Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Pathol Int* **50**, 679-89.
- Kobata, K., Sutoh, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., and Watanabe, T. (1999). Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *J Nat Prod* **62**, 335-6.
- Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., and Watanabe, T. (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* **46**, 1695-697.

- Kogure, K., Goto, S., Nishimura, M., Yasumoto, M., Abe, K., Ohiwa, C., Sassa, H., Kusumi, T., and Terada, H. (2002). Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 84-92.
- La Vecchia, C., Altieri, A., and Tavani, A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur J Nutr* **40**, 261-7.
- Lapointe, A., Couillard, C., and Lemieux, S. (2006). Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem* **17**, 645-58.
- Lee, J. S., Chang, J. S., Lee, J. Y., and Kim, J. A. (2004a). Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Arch Pharm Res* **27**, 1147-53.
- Lee, K. J., and Jeong, H. G. (2007). Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. *Toxicol Lett* **173**, 80-7.
- Lee, Y., Howard, L. R., and Villalón, B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J of Food Sci* **60**, 473-76.
- Lee, Y. S., Kang, Y. S., Lee, J. S., Nicolova, S., and Kim, J. A. (2004b). Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res* **38**, 405-12.
- Lercker, G. (2005). L'ossidazione delle sostanze grasse In "Alimenti e salute" (M. Cocchi and A. Mordenti, eds.), pp. 405-418. Coop. Libreria Universitaria Editrice, Bologna.
- Li, J. L., Okada, S., Hamazaki, S., Ebina, Y., and Midorikawa, O. (1987). Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res* **47**, 1867-9.
- Liegeois, C., Lermusieau, G., and Collin, S. (2000). Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J Agric Food Chem* **48**, 1129-34.
- Lin, X., Xue, L. Y., Wang, R., Zhao, Q. Y., and Chen, Q. (2006). Protective effects of endomorphins, endogenous opioid peptides in the brain, on human low density lipoprotein oxidation. *Febs J* **273**, 1275-84.
- Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **15**, 203-10.
- Liu, M., Okada, S., and Kawabata, T. (1991). Radical-promoting "free" iron level in the serum of rats treated with ferric nitrilotriacetate: comparison with other iron chelate complexes. *Acta Med Okayama* **45**, 401-8.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* **134**, 3479S-3485S.
- Loguercio, C., and Federico, A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* **34**, 1-10.
- Long, L. H., and Halliwell, B. (2000). Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic Res* **32**, 463-7.
- Lyons, M. A., and Brown, A. J. (1999). 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 369-75.
- Macho, A., Lucena, C., Sancho, R., Daddario, N., Minassi, A., Munoz, E., and Appendino, G. (2003a). Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper.

- Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *Eur J Nutr* **42**, 2-9.
- Macho, A., Sancho, R., Minassi, A., Appendino, G., Lawen, A., and Munoz, E. (2003b). Involvement of reactive oxygen species in capsaicinoid-induced apoptosis in transformed cells. *Free Radic Res* **37**, 611-9.
- Maeda, H., Katsuki, T., Akaike, T., and Yasutake, R. (1992). High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: suppression of tumor promotion in the Epstein-Barr virus/B-lymphocyte system and scavenging of alkyl peroxide radicals by various vegetable extracts. *Jpn J Cancer Res* **83**, 923-8.
- Marin, A., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., and Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* **52**, 3861-9.
- Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M., and Dominguez, C. (2003). Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* **34**, 1563-74.
- Masaki, N., Kyle, M. E., and Farber, J. L. (1989). Tert-butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch Biochem Biophys* **269**, 390-9.
- Masuda, Y., Haramizu, S., Oki, K., Ohnuki, K., Watanabe, T., Yazawa, S., Kawada, T., Hashizume, S., and Fushiki, T. (2003). Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *J Appl Physiol* **95**, 2408-15.
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., and Takeda, M. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem* **46**, 3468-72.
- Matsui, H., Okumura, K., Mukawa, H., Hibino, M., Toki, Y., and Ito, T. (1997). Increased oxysterol contents in diabetic rat hearts: their involvement in diabetic cardiomyopathy. *Can J Cardiol* **13**, 373-9.
- Matteucci, E., and Giampietro, O. (2000). Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **23**, 1182-6.
- Maugini, E. (1994). Cormofite. In "Manuale di Botanica Farmaceutica" (E. Maugini, ed.), Vol. VII, pp. 429-36. Piccin, Padova.
- May, M. E., Parmley, R. T., Spicer, S. S., Ravenel, D. P., May, E. E., and Buse, M. G. (1980). Iron nitrilotriacetate-induced experimental diabetes in rats. *J Lab Clin Med* **95**, 525-35.
- Mertens, A., and Holvoet, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* **15**, 2073-84.
- Miyajima, H., Adachi, J., Kohno, S., Takahashi, Y., Ueno, Y., and Naito, T. (2001). Increased oxysterols associated with iron accumulation in the brains and visceral organs of aceruloplasminaemia patients. *Qjm* **94**, 417-22.
- Miyajima, H., Fujimoto, M., Kohno, S., Kaneko, E., and Gitlin, J. D. (1998). CSF abnormalities in patients with aceruloplasminemia. *Neurology* **51**, 1188-90.
- Morel, D. W., DiCorleto, P. E., and Chisolm, G. M. (1984). Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**, 357-64.

- Murakami, K., Ito, M., Htay, H., Tsubouchi, R., and Yoshino, M. (2001). Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation. *Mol Cell Biochem* **275**, 7-13.
- Nourooz-Zadeh, J., Gopaul, N. K., Barrow, S., Mallet, A. I., and Anggard, E. E. (1995). Analysis of F2-isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas chromatography-mass spectrometry: development of a solid-phase extraction procedure. *J Chromatogr B Biomed Appl* **667**, 199-208.
- Ohnuki, K., Haramizu, S., Oki, K., Watanabe, T., Yazawa, S., and Fushiki, T. (2001a). Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2735-40.
- Ohnuki, K., Haramizu, S., Watanabe, T., Yazawa, S., and Fushiki, T. (2001b). CH-19 sweet, nonpungent cultivar of red pepper, increased body temperature in mice with vanilloid receptors stimulation by capsiate. *J Nutr Sci Vitaminol* **47**, 295-8.
- Ohnuki, K., Niwa, S., Maeda, S., Inoue, N., Yazawa, S., and Fushiki, T. (2001c). CH-19 sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, increased body temperature and oxygen consumption in humans. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2033-6.
- Okada, S., Minamiyama, Y., Hamazaki, S., Toyokuni, S., and Sotomatsu, A. (1993). Glutathione cycle dependency of ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation in mouse proximal renal tubules. *Arch Biochem Biophys* **301**, 138-42.
- Oldreive, C., and Rice-Evans, C. (2001). The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: impact of diet. *Free Radic Res* **35**, 215-31.
- Osuna-García, J. A., Wall, M. M., and Wadell, C. A. (1998). Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new Mexican-type chile (*Capsicum annum* L.). *J Agric Food Chem* **46**, 5093-96.
- Parmley, R. T., May, M. E., Spicer, S. S., Buse, M. G., and Alvarez, C. J. (1981). Ultrastructural distribution of inorganic iron in normal and iron-loaded hepatic cells. *Lab Invest* **44**, 475-85.
- Pedersen, H., Petersen, M., Major-Pedersen, A., Jensen, T., Nielsen, N. S., Lauridsen, S. T., and Marckmann, P. (2003). Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low-density lipoprotein in type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* **57**, 713-20.
- Preece, N. E., Evans, P. F., Howarth, J. A., King, L. J., and Parke, D. V. (1988). The induction of autoxidative tissue damage by iron nitrilotriacetate in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **93**, 89-100.
- Prior, R. L., and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* **27**, 1173-81.
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Kim, S. J., and Garcia, J. J. (1999). Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. *Toxicology* **139**, 81-91.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* **113**, 189-207.
- Reaven, P. D., Napoli, C., Merat, S., and Witztum, J. L. (1999). Lipoprotein modification and atherosclerosis in aging. *Exp Gerontol* **34**, 527-37.

- Reaven, P. D., and Witztum, J. L. (1996). Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annu Rev Nutr* **16**, 51-71.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., and Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **22**, 375-83.
- Roberts, L. J., and Morrow, J. D. (2000). Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* **28**, 505-513.
- Rodriguez, R. J., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., and Buhler, D. R. (2001). Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* **39**, 437-45.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M., and Dessi, M. A. (2002a). Antioxidant activity of capsinoids. *J Agric Food Chem* **50**, 7396-401.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Piga, R., and Dessi, M. A. (2002b). Determinazione del contenuto lipidico ed acidi grassi di microalghe marine raccolte in Sardegna. *La rivista italiana delle sostanze grasse* **79**, 201-206.
- Rosa, A., Deiana, M., Corona, G., Atzeri, A., Incani, A., Appendino, G., and Dessi, M. A. (2005a). Antioxidant properties of extracts and compounds from *Psoralea morisiana*. *Europ. J. Lipid Sci. Technol* **107**, 521-529.
- Rosa, A., Deiana, M., Corona, G., Atzeri, A., Incani, A., and Dessi, M. A. (2005b). Cholesterol as target of Fe-NTA-induced lipid peroxidation in rat tissues. *Toxicol Lett* **157**, 1-8.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9.
- Rossi, L., Arciello, M., Capo, C., and Rotilio, G. (2006). Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *Ital J Biochem* **55**, 212-21.
- Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P., and Hewitt, W. R. (1985). Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **78**, 473-83.
- Salonen, J. T. (2000). Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation. *Free Radic Res* **33 Suppl**, S41-6.
- Salonen, J. T., Nyyssonen, K., Tuomainen, T. P., Maenpaa, P. H., Korpela, H., Kaplan, G. A., Lynch, J., Helmrich, S. P., and Salonen, R. (1995). Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *Bmj* **311**, 1124-7.
- Sancho, R., Lucena, C., Macho, A., Calzado, M. A., Blanco-Molina, M., Minassi, A., Appendino, G., and Munoz, E. (2002). Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *Eur J Immunol* **32**, 1753-63.
- Schiller, C. D., Kainz, A., Mynett, K., and Gescher, A. (1992). Assessment of viability of hepatocytes in suspension using the MTT assay. *Toxicol In vitro* **6**, 575-578.
- Schroder, H. (2007). Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem* **18**, 149-60.
- Smith, C., Mitchinson, M. J., Aruoma, O. I., and Halliwell, B. (1992). Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* **286**, 901-5.

- Smith, L. L., and Johnson, B. H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med* **7**, 285-332.
- Sparrow, C. P., Parthasarathy, S., and Steinberg, D. (1988). Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res* **29**, 745-53.
- Steinbrecher, U. P. (1987). Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem* **262**, 3603-8.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**, 321-36.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* **50**, 7449-54.
- Surh, Y. J. (2002). Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol* **40**, 1091-7.
- Sutoh, K., Kobata, K., and Watanabe, T. (2001). Stability of capsinoid in various solvents. *J Agric Food Chem* **49**, 4026-30.
- Suzumura, K., Hashimura, Y., Kubota, H., Ohmizu, H., and Suzuki, T. (2000). Antioxidative property of T-0970, a new ureidophenol derivative. *Free Radic Res* **32**, 255-64.
- Tamer, L., Sucu, N., Polat, G., Ercan, B., Aytacoglu, B., Yucebilgic, G., Unlu, A., Dikmengil, M., and Atik, U. (2002). Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. *Arch Med Res* **33**, 257-60.
- Tani, Y., Fujioka, T., Sumioka, M., Furuichi, Y., Hamada, H., and Watanabe, T. (2004). Effects of capsinoid on serum and liver lipids in hyperlipidemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **50**, 351-5.
- Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., and Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**, 373-84.
- Thole, J. M., Kraft, T. F., Sueiro, L. A., Kang, Y. H., Gills, J. J., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Seigler, D. S., and Lila, M. A. (2006). A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *J Med Food* **9**, 498-504.
- Thukkani, A. K., McHowat, J., Hsu, F. F., Brennan, M. L., Hazen, S. L., and Ford, D. A. (2003). Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation* **108**, 3128-33.
- Tognetto, M., Amadesi, S., Harrison, S., Creminon, C., Trevisani, M., Carreras, M., Matera, M., Geppetti, P., and Bianchi, A. (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* **21**, 1104-9.
- Toyokuni, S. (1996). Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* **20**, 553-66.
- Toyokuni, S., Okada, S., Hamazaki, S., Minamiyama, Y., Yamada, Y., Liang, P., Fukunaga, Y., and Midorikawa, O. (1990). Combined histochemical and biochemical analysis of sex hormone dependence of ferric nitrilotriacetate-induced renal lipid peroxidation in ddY mice. *Cancer Res* **50**, 5574-80.

- Toyokuni, S., and Sagripanti, J. L. (1992). Iron-mediated DNA damage: sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron. *J Inorg Biochem* **47**, 241-8.
- Toyokuni, S., and Sagripanti, J. L. (1993). DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**, 223-7.
- Toyokuni, S., Uchida, K., Okamoto, K., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H., and Stadtman, E. R. (1994). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2616-20.
- Tribble, D. L. (1999). Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* **99**, 591-5.
- Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **28**, 1685-96.
- Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y. (1990a). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis* **11**, 345-7.
- Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y. (1990b). Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett* **54**, 95-100.
- Ursini, F. (1990). Radicali liberi: meccanismi fisiologici di difesa. In "Radicali liberi in fisiologia e patologia" (G. D. Bompiani and A. Galluzzo, eds.), Vol. 3, pp. 25-33. Minerva Italica, Torino.
- Utsumi, H., and Yamada, K. (2003). In vivo electron spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Arch Biochem Biophys* **416**, 1-8.
- Vannini, V. (2005). Patologia da radicali liberi. In "Patologia Generale" (G. M. Pontieri, M. A. Russo and L. Frati, eds.), Vol. 7, pp. 225. Piccin, Padova.
- Wautier, J. L., and Schmidt, A. M. (2004). Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* **95**, 233-8.
- Willett, W. C. (1994). Diet and health: what should we eat? *Science* **264**, 532-7.
- Winterbourn, C. C. (1981). Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H₂O₂. *FEBS Lett* **128**, 339-42.
- Yamanoi, Y., Awai, M., and Seno, S. (1984). Degranulation effect of ferric nitrilotriacetate (Fe³⁺-NTA) on the pancreatic islet beta-cells: its acute toxic effect on glucose metabolism. *Acta Med Okayama* **38**, 423-37.
- Ylonen, K., Alfthan, G., Groop, L., Saloranta, C., Aro, A., and Virtanen, S. M. (2003). Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Am J Clin Nutr* **77**, 1434-41.
- Younes, M., and Wess, A. (1990). The role of iron in t-butyl hydroperoxide-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* **10**, 313-7.
- Youngman, R. J., and Elstner, E. F. (1981). Oxygen species in paraquat toxicity: the crypto-OH radical. *FEBS Lett* **129**, 265-8.
- Zamaria, N. (2004). Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reprod Nutr Dev* **44**, 273-82.

- Zhang, D., Okada, S., Kawabata, T., and Yasuda, T. (1995). An improved simple colorimetric method for quantitation of non-transferrin-bound iron in serum. *Biochem Mol Biol Int* **35**, 635-41.
- Zieden, B., Kaminskas, A., Kristenson, M., Kucinskiene, Z., Vessby, B., Olsson, A. G., and Diczfalusy, U. (1999). Increased plasma 7 beta-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 967-71.