

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica



Tesi di Specializzazione:

**“ NUTRIGENOMICA, NUTRIGENETICA, NUTRACEUTICA: EFFETTO
PROTETTIVO DEL LISOSAN G SULLA TOSSICITÀ INDOTTA DAL CIS-PLATINO**

”

**“ NUTRIGENOMICS, NUTRIGENETICS, NUTRACEUTICAL: THE PROTECTIVE EFFECT OF
LISOSAN G ON TOXICITY INDUCED BY CISPLATIN”**

RELATORE

Dott. Vincenzo Longo

Prof. Antonio Lucacchini

CANDIDATA

Dr.ssa Simona Nencioni

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

<u>PREFAZIONE</u>	1
<u>RIASSUNTO</u>	2
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>INTRODUZIONE</u>	6
<u>CAPITOLO 1: NUTRIGENOMICA E NUTRIGENETICA</u>	
1.1 INTRODUZIONE ALLE SCIENZE ‘OMICHE’	7
1.2 NUTRIGENOMICA E NUTRIGENETICA	7
1.3 INTERAZIONI NUTRIENTI-GENI	10
1.3.1 INTERAZIONE DIRETTA	10
1.3.1.1 Recettore per i Sali biliari (FXR)	12
1.3.1.2 Recettore per gli acidi grassi	13
1.3.2 INTERAZIONE EPIGENETICA	14
1.3.3 VARIAZIONE GENETICA	15
1.4 ESEMPI DI PATOLOGIE ASSOCIATE ALLA NUTRIGENOMICA	19
1.4.1 Acidi grassi a lunga catena polinsaturi e carcinogenesi	23
1.5 ESEMPI DI PATOLOGIE ASSOCIATE ALLA NUTRIGENETICA	25
1.5.1 La cardiopatia coronarica	26
1.6 MODELLI DI STUDIO PER COMPRENDERE I BIOMARKERS NUTRIZIONALI	27
<u>CAPITOLO 2: ALIMENTI FUNZIONALI E NUTRACEUTICA</u>	
2.1 ALIMENTI FUNZIONALI	31
2.1.1 I glucosinolati: un esempio di componente funzionale	34
2.2 NUTRACEUTICI	34
2.2.1 Connessione tra nutraceutici e farmaci	36
2.2.2 Potenziati rischi dell’uso di nutraceutici	37
<u>CAPITOLO 3: ENZIMI DEL SISTEMA METABOLIZZANTE I FARMACI</u>	39
3.1 <u>ENZIMI DI FASE I</u>	40
3.1.1 IL CITOCROMO P450: PROPRIETÀ E STRUTTURA	40
3.1.2 IL CITOCROMO P450: LA REAZIONE MONOSSIGENASICA	43
3.1.3 IL CITOCROMO P450: NOMENCLATURA	43
3.2.1 DT-DIAFORASI	44

3.2 ENZIMI DI FASE 2	
3.2.1 GLUTATIONE-S-TRANSFERASI	45
3.2.2 CATALASI (CAT)	46
3.2.3 GLUTATIONE PEROSSIDASI (GSH PEROX)	46
3.2.4 GLUTATIONE REDUTTASI (GSSG RED)	47
<u>CAPITOLO 4: LISOSAN G: NUTRACEUTICO CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE</u>	
4.1 IL LISOSAN G	48
4.1.1 Caratteristiche del Lisosan G	48
4.2 IL SISTEMA ANTIOSSIDANTE	50
4.3 ANTIOXIDANT RESPONSIVE ELEMENT (ARE) E ARE INDUTTORI	53
4.4 LA VIA DI SEGNALEZIONE ARE-MEDIATA E I MECCANISMI DI DIFESA: RUOLO DELLA PROTEINA NRF2	54
<u>CAPITOLO 5: IL CIS-PLATINO</u>	57
5.1 MECCANISMO D'AZIONE DEL CIS-PLATINO	58
5.2 EFFETTI DEL CIS-PLATINO SUL SISTEMA METABOLIZZANTE I FARMACI	62
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	63
<u>MATERIALI E METODI</u>	
Prodotti utilizzati	64
Animali e condizioni di stabulazione	64
Trattamento degli animali	64
Preparazione del plasma	65
Determinazione della concentrazione di testosterone	65
Determinazioni delle concentrazioni di urea e creatinina	65
Determinazione della concentrazione idroperossidi	65
Preparazione microsomiale e citosolica	66
Determinazione del contenuto di proteine microsomiali e citosoliche	67
Determinazione del contenuto di citocromo P-450	67
<u>SAGGI DI ATTIVITÀ MICROSOMIALI</u>	
Attività etossiresorufina O-deetilasi	67
Attività etossicumarina O-deetilasi	67
Attività anilina idrossilasi	67

Attività eritromicina demetilasi e amminopirina-N-demetilasi	68
<u>SAGGI DI ATTIVITÀ CITOSOLICHE</u>	
Attività catalasi	68
Attività Glutazione perossidasi (GSH Perox)	68
Attività Glutazione reduttasi (GSSG Red)	68
Attività Glutazione-S-transferasi (GST)	69
Attività DT-diaforasi	69
<u>RISULTATI</u>	
Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G a livello plasmatico	70
Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci a livello renale	72
Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci a livello epatico	76
<u>DISCUSSIONE</u>	81
EFFETTO DEL CIS-PLATINO	81
EFFETTO DEL TRATTAMENTO SUL RENE	82
EFFETTO DAL TRATTAMENTO SUL FEGATO	83
EFFETTO DEL LISOSAN G	83
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	86

PREFAZIONE

Nonostante il Cis-platino sia ritenuto il farmaco di prima scelta per combattere molteplici tipi di tumori, il suo utilizzo in clinica è limitato a causa della sua elevata tossicità e dei numerosi effetti collaterali che esso provoca, danneggiando fegato, testicoli e soprattutto reni. E' stato dimostrato che il farmaco stimola la produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule degli organi bersaglio, attraverso la riduzione dell'attività degli enzimi antiossidanti e mediante la deplezione del GSH intracellulare.

Alcuni studi hanno documentato che svariati antiossidanti determinano un miglioramento della tossicità indotta dal Cis-platino, ed è per questo motivo che numerosi esperimenti sono incentrati sull'utilizzo di sostanze antiossidanti, somministrate insieme al farmaco, per verificare se sono in grado di ridurre la tossicità.

Recentemente è stato riportato che un nutraceutico derivato dal lisato di grano, chiamato commercialmente Lisosan G, presenta proprietà nutrizionali ed antiossidanti, e che l'alimentazione dei ratti con questa sostanza li protegge dal danno epatico indotto dal tetracloruro di carbonio, un composto molto tossico per l'organismo in quanto capace di innescare reazioni a catena radicaliche che degradano le membrane cellulari.

A tal proposito, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di testare se il Lisosan G è in grado di conferire una protezione nei confronti della tossicità indotta dal Cis-platino ai principali organi bersaglio, quali reni, principalmente e fegato.

Per valutare ciò sono stati utilizzati quattro gruppi di ratti sottoposti a diversi trattamenti.

Per testare un'eventuale protezione da parte del Lisosan G sul danno indotto dal farmaco, prima di eseguire il sacrificio degli animali è stato effettuato loro un prelievo ematico per valutare eventuali variazioni nel contenuto di testosterone, urea, creatinina, e per misurare il valore dello stress ossidativo. Dopo il sacrificio, sono state preparate frazioni microsomiali e citosoliche ottenute da fegati e reni degli animali, utilizzate per saggiare le attività enzimatiche marcatrici di alcune isoforme di citocromo P-450, di altri enzimi di fase 1, di fase 2 ed antiossidanti, sempre allo scopo di confrontare le variazioni di attività tra i vari trattamenti.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni hanno trovato larga applicazione alcune discipline responsabili dello studio delle interazioni reciproche che si hanno tra i nutrienti e il genoma e le proprietà benefiche che possono scaturire sulla salute. Nascono così la nutrigenomica e la nutrigenetica, che trovano il loro ambito applicativo tramite quegli alimenti definiti 'funzionali' ed i nutraceutici.

Sia gli alimenti funzionali che i nutraceutici possiedono varie attività farmacologiche antiipertensive, antiinfiammatorie, antiaritmiche, cardiotoniche ed attività antiossidanti che potrebbero essere utili nella prevenzione contro il danno ossidativo indotto principalmente da xenobiotici, inclusi i farmaci.

Recentemente è stato dimostrato che un nutraceutico derivato da un lisato di grano, denominato commercialmente Lisosan G, ha proprietà antiossidanti. Dati pubblicati dai nostri laboratori hanno mostrato che il Lisosan G protegge dal danno epatico indotto dal tetracloruro di carbonio, un composto molto tossico per l'organismo in quanto capace di innescare reazioni a catena radicaliche che degradano le membrane cellulari.

Il Cis-platino è un agente chemioterapico molto efficiente ed estesamente usato per il trattamento di vari tumori metastatici, il cui utilizzo in clinica è limitato a causa dell'elevata tossicità e dei numerosi effetti collaterali che provoca soprattutto a livello renale. E' un complesso platino coordinato e la sua azione citotossica sembra essere associata alla sua capacità di legare il DNA ed altre componenti cellulari, inoltre è stato suggerito che esso stimoli la produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule degli organi bersaglio, attraverso la riduzione dell'attività degli enzimi antiossidanti.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di testare se il Lisosan G è in grado di prevenire e/o ridurre il danno provocato dal Cis-platino a livello di alcuni organi. Per valutare ciò sono stati utilizzati ratti di controllo, ratti alimentati con Lisosan G, ratti trattati con una singola iniezione i.p. di Cis-platino, e ratti alimentati con Lisosan G e trattati con una singola somministrazione di Cis-platino. Prima di eseguire il sacrificio degli animali è stato effettuato loro un prelievo ematico per valutare il contenuto di testosterone, urea e creatina, e per misurare il valore dello stress ossidativo. Dopo il sacrificio, sono state preparate frazioni microsomiali e citosoliche ottenute da fegati e reni degli animali, utilizzate per saggiare le attività enzimatiche marcatrici di alcune isoforme di citocromo P-450, di enzimi di fase 2 ed antiossidanti.

I risultati hanno mostrato che il trattamento con Cis-platino ha ridotto i livelli plasmatici di testosterone ed ha aumentato significativamente la concentrazione di urea, creatinina, perossido di idrogeno e riducendo il contenuto di citocromo P450 nel rene e fegato.

La sola alimentazione con Lisosan G determina un'induzione di alcune isoforme di P450 e di alcuni enzimi ad azione antiossidante.

Negli animali sottoposti al trattamento con Cis-platino, l'alimentazione con Lisosan G sembra avere un ruolo protettivo, in quanto si evidenzia un parziale ritorno ai livelli di controllo della concentrazione di urea e creatinina rispetto al gruppo di ratti trattati solo con il farmaco.

I dati ottenuti indicano, quindi, che probabilmente il Lisosan G è in grado di proteggere parzialmente gli organi presi in esame dalla tossicità indotta dal Cis-platino.

ABSTRACT

In recent years the nutrigenomics and nutrigenetics sciences have found wide application in the study of the interaction between nutrients and genome and their beneficial properties for the health. The “functional” food and nutraceuticals are the expression of these sciences. Both functional food and nutraceuticals have many pharmacological activities like antihypertensive, anti-inflammatory, anti-arrhythmic, cardiogenic and antioxidants that may be useful in preventing oxidative damage induced mainly by xenobiotics, including drugs.

Recently it was shown that Lisosan G, a nutraceutical derived from a lysate of grain, has antioxidant properties.

In our laboratories have shown that lisosan G has a protective role on carbon tetrachloride hepatotoxicity.

Cisplatin, cis-diaminedichloroplatinum, is one of the most frequently used anti-neoplastic agents for various types of tumors. It has a potent anti-tumor action against a wide range of malignancies and solid tumors. Despite its clinical usefulness, cisplatin treatment was associated with several toxic side effects including nephrotoxicity, and neurotoxicity. Although the mechanism of the side effects induced by cisplatin are not clearly understood, this drug, in addition to the formation of strong electrophilic intermediates that yield adducts with DNA via nucleophilic substitution reactions, causes many alterations of biochemical parameters in plasma, liver, kidney and testis.

The aim of this study was undertaken to evaluate whether the administration of Lisosan G in rats could have a protective effect against toxicity of cisplatin in some organs.

For this scope rats were fed by lisosan G or treated with corn oil or received a single intraperitoneal dose of cisplatin or were fed with Lisosan G and received a single intraperitoneal dose of cisplatin. On the blood of the animals were evaluate the concentration of testosterone, urea and creatine to measure the value of oxidative stress. The animals were killed and microsomal and 100,000g supernatant fractions were prepared from the liver and kidney to test for enzymatic activity marker for the cytochrome P450 isoforms, phase 2 enzymes and antioxidants.

The results showed that cisplatin reduced the plasmatic testosterone level and increased plasma blood urea nitrogen, creatinine, hydrogen peroxide and decreased cytochrome P450 content in renal and hepatic tissues. It was also observed that the ones fed with Lisosan G were able to induce the P450-dependent activities and the activities of antioxidant enzymes as well.

In the group fed with Lisosan G and treated with cisplatin blood urea nitrogen and creatinine returned to the control level indicating a protective effect of Lisosan G. The protective effect of Lisosan G could be associated mainly with the attenuation of the oxidative stress and the preservation in antioxidant enzymes.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

NUTRIGENOMICA E NUTRIGENETICA

1.1 Introduzione alle scienze ‘omiche’

Nel corso degli anni si è assistito ad una evoluzione del concetto di nutrizione e di cibo, partendo dai concetti classici, consistenti nella prevenzione di patologie carenziali e nell’adeguatezza dell’alimentazione di base, alla promozione di uno stato di benessere e salute e di riduzione del rischio di malattia **(1)**.

Dai primi anni 80’, lo sviluppo di strumenti analitici nella chimica e nella biologia, ha indotto una trasformazione nella ricerca sulla nutrizione, facendola divenire nutrizione molecolare. Questa transizione ha permesso una descrizione molecolare dettagliata dei singoli macro e micro nutrienti contenuti negli alimenti, portando all’identificazione di nuovi componenti bioattivi. La ricerca nel campo della nutrizione potrebbe, così, portare ad interventi nutrizionali più mirati, facendo uso di prodotti con funzioni specifiche.

Lo studio del rapporto alimentazione-salute ha portato a numerose contraddittorietà di molti lavori scientifici, in parte dovuta ai diversi comportamenti delle malattie e in parte spiegata dalle biodiversità di ogni individuo. Il progetto di sequenziare il genoma umano (HUGO), concluso nel 2001, ha portato all’apertura di uno spiraglio di comprensione sempre maggiore. Con il completamento del sequenziamento del genoma umano la medicina e la farmacologia hanno assunto un approccio sistematico e globale di fronte alle malattie. Sono nate così le scienze ‘omiche’, in relazione alla genomica, dal termine greco ‘ome’ che significa ‘tutto’, ‘completo’. Queste scienze si propongono di comprendere e analizzare, per ogni individuo, l’espressione genica (trascrittomica), l’alterata sintesi o bioattivazione delle proteine (proteomica) e le conseguenze che possono riscontrarsi a livello dei composti a basso peso molecolare nelle cellule (metabolomica) **(2)**.

1.2 Nutrigenomica e Nutrigenetica

L’applicazione dei concetti relativi alle scienze ‘omiche’ ha portato a coniare il termine di nutrigenomica che in senso lato definisce i rapporti esistenti tra il cibo e il genoma. Una definizione più precisa identifica la nutrigenomica come quella disciplina che studia le conseguenze dell’azione di nutrienti sull’espressione genica.

La nutrigenetica, al contrario, analizza come un determinato assetto genetico possa condizionare la risposta dell’organismo di fronte ad un alimento **(3)**.

Un importante scopo della ricerca nutrigenomica si ha nella comprensione del ruolo dello stress metabolico nella genesi della sindrome metabolica, patologia che unisce una combinazione di fattori quali infiammazione, stress metabolico, insulino-resistenza e diabete (4). Lo stress metabolico comporta cambi nella concentrazione plasmatica e/o cellulare di nutrienti e metaboliti che possono portare alla distruzione delle funzioni cellulari. Un importante gruppo che causa stress metabolico sono i lipidi. Questa ricerca ambiziosa si basa sull'idea che la nutrizione dovrebbe principalmente occuparsi della salute e della prevenzione delle malattie ed essere complementare ad una terapia farmacologica avente come bersaglio gli aspetti patofisiologici della malattia (Fig. 1)

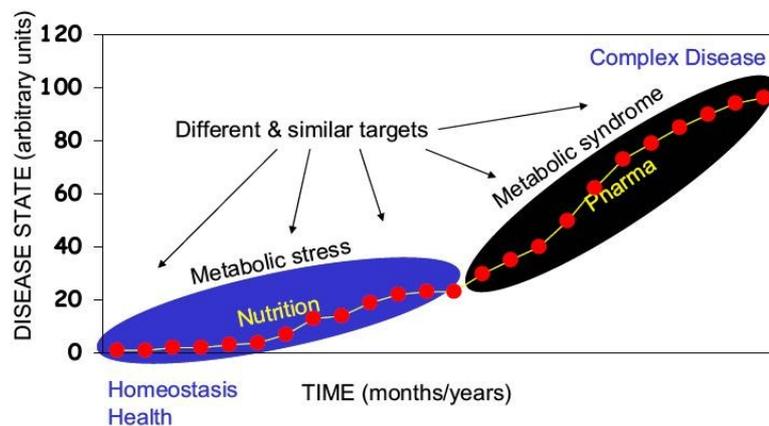


Figura 1

Nella Figura 1 è evidenziato il fatto che la nutrizione può avere un ruolo importante nelle fasi precoci di una malattia, mentre nelle fasi avanzate è necessario l'intervento di prodotti farmaceutici. Alcuni dei target cellulari per la terapia nutrizionale e per quella farmacologica sono sovrapponibili anche se per un maggiore effetto delle potenzialità nutrizionali altri biomarkers precoci dello stato patologico dovranno essere identificati.

Per identificare nuovi target nutrizionali sarà necessario comparare l'assetto genetico che si ha nei pazienti sani (pannello a) rispetto a quello che si osserva nei pazienti affetti dalla patologia (pannello b) (Fig. 2) (5).

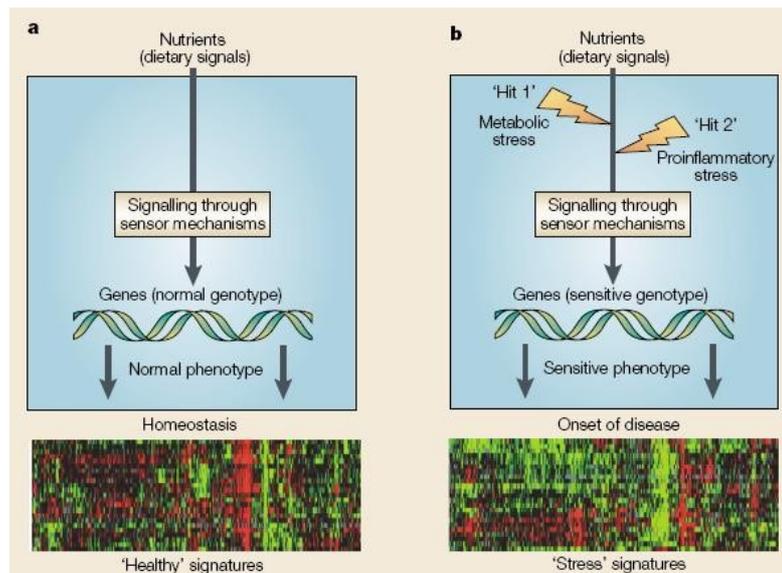


Figura 2

Da un punto di vista molecolare, i nutrienti sono considerati come molecole segnale, che attraverso meccanismi cellulari noti, portano a cambi nell'espressione genica, proteica e metabolica.

La nutrigenetica, come abbiamo detto, rende conto della diversità di risposta di fronte ad un alimento, in virtù delle diversità presenti nel corredo genetico da un soggetto all'altro. Le variazioni genetiche inter-individuali sono spesso un elemento determinante nella diversa richiesta di un nutriente, da parte di un individuo, piuttosto che di un altro.

Uno studio ha indicato che individui con una sostituzione C-T nel gene della metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) può necessitare la richiesta di più folati rispetto all'individuo wild-type (6).

Alla stessa maniera, parecchi studi indicano che la dieta ha una importante influenza sul rischio di sviluppare alcune patologie in cui la predisposizione genetica ha un ruolo rilevante. Un esempio importante di questa interazione si ha dallo studio del carcinoma epatocellulare nelle popolazioni del Sudan. In questo studio è stata osservata una forte relazione tra il rischio di sviluppare il tumore e il consumo di burro di arachidi contaminato con aflatossine (7).

La comprensione di come i diversi nutrienti interagiscono con il genoma a livello molecolare, da parte delle ricerche della nutrigenomica e nutrigenetica, e lo studio della relazione tra le mutazioni genetiche con gli studi metabolici ed epidemiologici, dovrebbe portare allo sviluppo di una dieta personalizzata ottimale. In questo modo, una corretta e mirata nutrizione, unita alla diversità genotipica di ciascun individuo, ha permesso lo sviluppo di nuove terapie sperimentali coadiuvanti la cura e il miglioramento di malattie complesse quali la sindrome metabolica, le malattie neurodegenerative e neoplastiche.

1.3 Interazioni nutrienti-geni

Come detto precedentemente i diversi nutrienti interagiscono con i geni in maniera diversa, determinando un alterato metabolismo e/o una alterata richiesta di nutrienti nella dieta (Fig. 3).

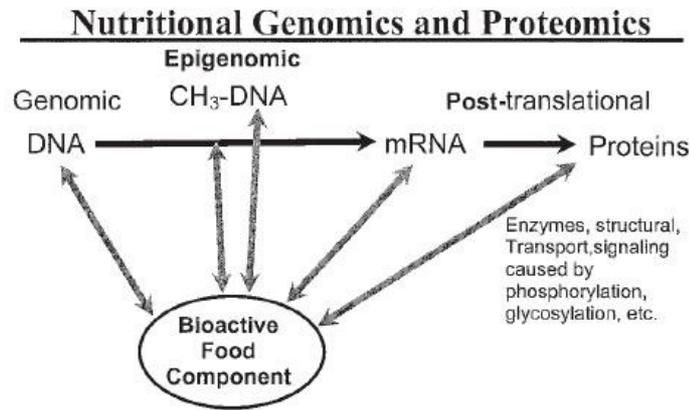


Figura 3

I componenti bioattivi dei nutrienti possono interagire con i geni sia a livello della trascrizione, della traduzione che della attività proteica. Reciprocamente, i geni e le proteine possono influenzare l'assorbimento, il metabolismo o il trasporto dei nutrienti (8). Possiamo suddividere l'interazione tra geni e nutrienti in tre gruppi diversi:

- a. Interazione diretta
- b. Interazione epigenetica
- c. Variazioni genetiche

1.3.1 Interazione diretta

L'azione maggiore dei nutrienti sull'espressione genica si ha attraverso i fattori di trascrizione che legandosi al DNA modulano l'espressione genica (Tab. 1).

TABELLA 1.

FATTORI DI TRASCRIZIONE MODULANTI L'INTERAZIONE NUTRIENTI-GENE

Nutrient	Compound	Transcription factor
Macronutrients		
Fats	Fatty acids Cholesterol	PPARs, SREBPs, LXR, HNF4, ChREBP SREBPs, LXRs, FXR
Carbohydrates	Glucose	USFs, SREBPs, ChREBP
Proteins	Amino acids	C/EBPs
Micronutrients		
Vitamins	Vitamin A Vitamin D Vitamin E	RAR, RXR VDR PXR
Minerals	Calcium Iron Zinc	Calcineurin/NF-ATs IRP1, IRP2 MTF1
Other food components		
	Flavonoids Xenobiotics	ER, NFκB, AP1 CAR, PXR

AP1, activating protein 1; CAR, constitutively active receptor; C/EBP, CAAT/enhancer binding protein; ChREBP, carbohydrate responsive element binding protein; ER, oestrogen receptor; FXR, farnesoid X receptor; HNF, hepatocyte nuclear factor; IRP, iron regulatory protein; LXR, liver X receptor; MTF1, metal-responsive transcription factors; NFκB, nuclear factor κB; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; SREBP, sterol-responsive-element binding protein; USF, upstream stimulatory factor; VDR, vitamin D receptor.

Il gruppo più importante di recettori modulanti l'azione dei nutrienti sono quelli appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari, con 48 membri nel genoma umano (9). Numerosi recettori in questa superfamiglia legano i nutrienti e il loro metaboliti. Tra questi troviamo il recettore per il legame dell'acido retinoico (Retinoic Acid Receptor-RAR) e dei retinoidi X (Retinoid X Receptor- RXR), degli acidi grassi (Peroxisome Proliferator Activate Receptors-PPARs), dei metaboliti del colesterolo (Liver X Receptor-LXR), della vitamina D (Vitamin D receptor-VDR), degli oxisteroli (LXR), dei sali biliari (Farnesoid X Receptor-FXR) e recettori per altri composti idrofobici come il CAR (Constitutively Active Receptor) e PXR (Pregnane X Receptor).

I recettori nucleari eterodimerizzano con RXR legandosi a specifiche sequenze nucleotidiche (response element) nella regione del promotore di una grande quantità di geni. Durante il legame il recettore nucleare va incontro ad un cambio conformazionale che comporta una dissociazione della proteina co-repressore e il reclutamento di quella co-attivatore capace di determinare l'attivazione della trascrizione. Negli organi metabolicamente attivi, come il fegato, l'intestino e il tessuto adiposo, i fattori di trascrizione agiscono come sensori dei nutrienti cambiando il livello di trascrizione di alcuni geni in risposta ai cambi nutrizionali.

I recettori nucleari hanno un ruolo importante nella regolazione di numerosi processi, inclusi il metabolismo dei nutrienti, lo sviluppo embrionale, la proliferazione cellulare e la differenziazione. Per questo motivo è facilmente comprensibile come questi i nutrienti,

tramite l'attivazione dei recettori, siano in grado di influenzare una grande quantità di funzioni cellulari.

Di seguito verranno presentati alcuni esempi di come tramite i recettori, i nutrienti sono in grado di modulare l'espressione genica e con essa le funzioni cellulari e metaboliche.

1.3.1.1 Recettore per i Sali Biliari (FXR)

I sali biliari sono sintetizzati a partire dal colesterolo negli epatociti ed hanno un ruolo chiave nell'assorbimento intestinale dei lipidi e delle vitamine assunte con la dieta. Allo stesso modo, però, un accumulo dei sali biliari ha un effetto citotossico ed elevate concentrazioni sono associate con danno epatico. I livelli epatici di sali biliari sono finemente regolati, la loro sintesi e l'ingresso nel fegato è soppressa, in concomitanza con un aumento dell'escrezione, quando si ha un accumulo di acidi biliari nel fegato. Questi cambi funzionali sono in parte dipendenti dai livelli epatici del Citocromo P450 7A1 (CYP7A1), dal trasportatore taurocolato Na^+ - dipendente dalla pompa di esporto dei sali biliari **(10)**. Il recettore FXR è il sensore che media la risposta agli elevati livelli di acidi biliari agendo direttamente up-regolando l'espressione della pompa di esporto dei sali biliari e down-regolando l'espressione del CYP7A1 e del trasportatore taurocolato Na^+ - dipendente **(11)**.

Il colesterolo assunto con la dieta può essere escreto direttamente dal fegato sotto forma di bile o convertito in acidi biliari. Circa la metà degli acidi biliari e del colesterolo della dieta è riassorbito nell'intestino tenue e trasportato attraverso i chilomicroni al fegato. L'assorbimento intestinale di colesterolo è facilitato grazie alla formazione di micelle con gli acidi biliari. In questo modo la grandezza del pool di acidi biliari influenza l'assorbimento intestinale del colesterolo ed il suo catabolismo epatico. Nei topi il colesterolo introdotto con la dieta incrementa la grandezza del pool di acidi biliari e la loro eliminazione tramite le feci **(12)**. Questo dato supporta la tesi che un aumento del colesterolo assunto con la dieta possa portare ad un incremento degli acidi biliari e dei livelli di colesterolo nel fegato. In topi knock out per il gene del recettore FXR una dieta ricca di acido colico, il più importante degli acidi biliari prodotti dal fegato, incrementa marcatamente i livelli di acidi biliari nel fegato modificandone l'omeostasi **(13)**.

La somministrazione di colesterolo in topi, knock out per il gene del recettore FXR, con danno epatico a causa di una dieta con acido colico, era in grado di migliorare l'epatotossicità pre-esistente, ipotizzando un meccanismo di regolazione dei livelli degli acidi biliari indipendente dal recettore FXR **(14)**.

Tramite questi esempi si può concludere che attraverso il recettore FXR, gli acidi biliari incrementano l'espressione di numerosi prodotti genici coinvolti nel metabolismo lipidico. L'incrementata espressione di questi geni inibisce la sintesi degli acidi biliari e stimola il loro trasporto fuori dalla cellula attraverso il trasportatore ABCB11 nei canalicoli biliari **(15)**.

1.3.1.2 Recettore per gli Acidi Grassi

Nell'alimentazione umana, gli acidi grassi di lipidi vegetali e animali giocano un ruolo importante (assieme ai glucidi e proteine) nella funzione strutturale, ma soprattutto energetica. Studi epidemiologici hanno dimostrato che gli acidi grassi sono associati con un incremento dell'insorgenza di numerose patologie. Studi precoci hanno dimostrato che una dieta ricca di acidi grassi polinsaturi inibisce l'espressione epatica di parecchi geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi **(16)**.

Recentemente sono stati ottenuti dalla nutrigenomica risultati riguardanti l'effetto dei grassi su fattori d'espressione nucleare come i PPARs.

I PPARs sono recettori nucleari che, quando stimolati, si comportano come fattori di trascrizione nucleare controllando l'espressione di specifici geni. I livelli d'espressione maggiore si ritrovano negli adipociti. I ligandi endogeni dei PPARs comprendono gli acidi grassi insaturi. In vari modelli cellulari l'attivazione dei PPARs induce l'espressione di numerosi geni adipogenetici (lipoproteinlipasi, proteine che legano gli acidi grassi, acil CoA sintetasi). I recettori nucleari PPARs agiscono come sensori dei nutrienti per gli acidi grassi ed influenzano l'espressione di geni specifici **(17)**.

Il PPAR α , una delle tre isoforme specifiche, è abbondantemente rappresentato nel fegato ed è attivato a digiuno e dagli acidi grassi rilasciati dal tessuto adiposo. Tuttavia, non è chiaro quali altre condizioni nutrizionali siano in grado di attivarlo.

Gli acidi grassi così prodotti giungono al fegato dove vanno incontro ad una parziale o completa ossidazione. Il legame degli acidi grassi a PPAR α incrementa l'espressione di alcuni geni attraverso il legame a sequenze specifiche nella regione del promotore. I geni attivati da PPAR α sono coinvolti in numerosi processi metabolici nel fegato, inclusi l'ossidazione degli acidi grassi, la chetogenesi, gluconeogenesi, la sintesi della apolipoproteina, il metabolismo degli aminoacidi, la proliferazione cellulare e la risposta nella fase acuta **(18)**.

Alcuni ricercatori hanno sottoposto cavie PPAR α + e PPAR α - ad una dieta ricca (HFD) o povera (LFD) in grassi per 26 settimane **(19)**. I risultati ottenuti hanno mostrato che

L'attivazione dei PPAR α difende il fegato dall'*overload* lipidico dovuto a HFD sottolineando la nozione che questa diventa particolarmente importante quando il flusso epatico di acidi grassi è aumentato. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che l'attivazione di PPAR α protegge il fegato dall'infiammazione cronica indotta dall'obesità. Questo avviene per il controllo della steatosi epatica e per la contro regolazione dell'espressione di geni mediatori dell'infiammazione. Altri studi hanno valutato l'effetto degli acidi grassi polinsaturi sulla carcinogenesi del colon indotta dalla somministrazione del cancerogeno azoximetano (AOM) (20). Gli autori hanno osservato un'azione protettiva degli ω 3 rispetto agli ω 6 e ω 9 sulla carcinogenesi da AOM legata a una fondamentale differenza di espressione di geni. In particolare, è stata osservata una *upregulation* dei geni coinvolti nell'apoptosi e nel differenziamento cellulare.

A questo proposito è interessante notare che l'attuale dieta occidentale ha un rapporto ω 3/ ω 6 di 1:10 mentre i rapporti ottimali sono considerati 1:2-4.

1.3.2 Interazione epigenetica

Solo recentemente le scienze hanno cominciato a studiare i meccanismi epigenetici che spiegherebbero l'effetto dei nutrienti sull'espressione genica. L'epigenetica chiarirà il ruolo dei cambiamenti che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo. In altre parole, saranno studiati i cambiamenti delle proprietà metaboliche di una cellula che sono ereditabili e che possono portare a modificazioni nello stile di vita di una persona, ma non rappresentano un cambiamento nell'informazione genetica.

Gli effetti epigenetici sono mediati dalla metilazione del DNA, dalla acetilazione e/o dalla biotilazione degli istoni (21).

La metilazione del DNA è un importante fattore epigenetico di controllo della trascrizione e gioca un ruolo essenziale nel mantenere la funzione cellulare. La metilazione avviene generalmente a livello delle citosine, specialmente se seguite da una guanosina (le isole 5'-CpG-3') e i siti di metilazione tendono a localizzarsi preferibilmente laddove sono presenti polimorfismi. Quando questa modificazione avviene nella regione del promotore l'espressione genica è alterata. Un incremento nella metilazione è associato, in genere, con il silenziamento o una riduzione dell'espressione genica. Questo avviene dal momento che le isole CpG metilate attraggono alcune proteine che negano l'accesso ai fattori di trascrizione indispensabili per l'induzione dell'espressione genica (Fig. 4).

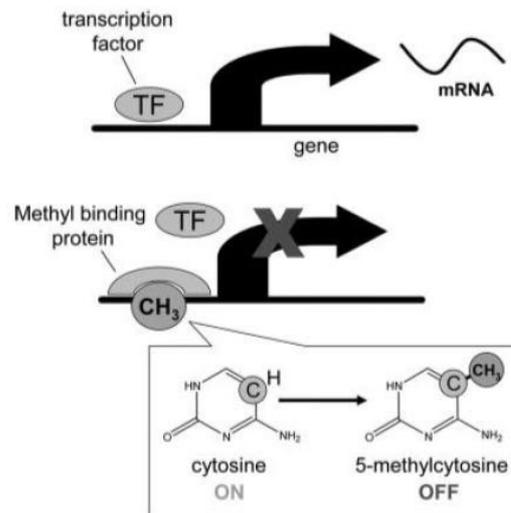


Figura 4

Diverse componenti di alimenti bioattivi possono modulare la metilazione del DNA poiché influenzano la disponibilità di gruppi metilici (-CH₃) e di conseguenza il processo biochimico di metilazione, l'espressione genica e il fenotipo. Queste componenti includono la vitamina B12, B6, la metionina, i folati. Un largo numero di studi epidemiologici e clinici suggerisce che i folati della dieta sono inversamente associati con il rischio di cancro del colon retto e un'aberrante metilazione del DNA, ipometilazione globale accompagnata da specifiche regioni ipermetilate, è di frequente riscontro nei tumori. Questa ipermetilazione è stata associata ad una disattivazione dei geni attivi nella soppressione del processo neoplastico (22).

I polimorfismi possono modulare l'effetto dei folati della dieta sulla metilazione del DNA. Per esempio, il polimorfismo C667T dell'enzima metilentetraidrofolato riduttasi (MTHFR), che catalizza le reazioni che rendono disponibili i gruppi metilici, è associato a un minor rischio di cancro del colon, ma ad un aumentato rischio di cancro della mammella.

1.3.3 Variazione genetica

La nutrigenetica, come abbiamo detto, rende conto della diversità di risposta di fronte ad un alimento, in virtù delle diversità presenti nel corredo genetico da un soggetto a un altro. Le diversità presenti in ogni DNA, e che rendono unico ogni individuo, sono caratterizzate dalle mutazioni. La maggior parte di queste mutazioni sono caratterizzate da piccole differenze, anche di un solo nucleotide. La sostituzione di una sola base nucleotidica (per esempio una timina con una citosina) configura la variante chiamata polimorfismo di singolo nucleotide (SNP). Gli SNPs sono relativamente frequenti, uno ogni 1000

nucleotidi, ammontando quasi a tre milioni per ogni individuo. Il 90% dei geni ne possiede almeno uno. La presenza di uno SNP in zone di DNA non codificanti non ha nessun riflesso sul fenotipo di un individuo se non quello di costituire la sua carta d'identità esclusiva, praticamente unica e non ripetibile. Invece, gli SNPs presenti nei geni possono costituire elemento di diversità fenotipica (dando origine alle diversità somatiche e attitudinali di ogni persona) o di malattia, anche in funzione della dominanza o recessività del gene colpito dalla mutazione **(23)**.

I polimorfismi SNPs possono influenzare la struttura e funzionalità delle proteine e la loro capacità di interagire con altre proteine. In particolare possono condizionare le differenti risposte individuali ai singoli alimenti. Per esempio un polimorfismo TT nel gene dell'angiotensina ha spiegato la differente risposta alla dieta ricca di fibre in pazienti ipertesi, e sempre un polimorfismo spiega il differente rischio di perdita di massa ossea correlata al consumo di caffeina.

A volte gli SNPs sono correlati tra loro e vengono ereditati in blocco da una cellula madre alla cellula figlia costituendo un aplotipo. Siccome gli aplotipi sono gruppi di SNPs ereditati in blocco ma vincolati nel loro insieme ad una determinata malattia, la ricerca genetica sta puntando a disegnare una mappa di aplotipi (molto meno numerosi dei singoli SNPs) per facilitare il riscontro tra mutazioni e predisposizione a patologie **(24)**.

Si conoscono numerosi SNPs associati a patologie ed al consumo di alcuni nutrienti, tra questi abbiamo il polimorfismo a livello del gene che codifica per la metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) responsabile del mantenimento dell'omeostasi di folati. La MTHFR è un enzima coinvolto nella trasformazione del 5-10 metilentetraidrofolato in 5 metiltetraidrofolato che serve come donatore di metili per la rimetilazione della omocisteina a metionina tramite l'intervento della vitamina B12. Rare mutazioni (trasmesse con modalità autosomica recessiva) possono causare la deficienza grave di MTHFR con attività enzimatica inferiore al 20% e comparsa di omocisteinemia ed omocistinuria e bassi livelli plasmatici di acido folico. La sintomatologia clinica è grave con ritardo dello sviluppo psico-motorio e massivi fenomeni trombotici.

Accanto alla deficienza grave di MTHFR è stato identificato il polimorfismo genetico comune, dovuto alla sostituzione di una C (citosina) in T (timina) al nucleotide 677 (C677T), che causa una sostituzione di una alanina in valina nella proteina finale ed una riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR pari al 50%, fino al 30% in condizioni di esposizione al calore (variante termolabile). Tale variante comporta livelli elevati nel sangue di omocisteina specie dopo carico orale di metionina. La frequenza genica in

Europa della mutazione è del 3-3,7% che comporta una condizione di eterozigosi in circa il 42-46% della popolazione e di omozigosi pari al 12-13%. Livelli aumentati di omocisteina nel sangue sono oggi considerati fattore di rischio per malattia vascolare, (trombosi arteriosa) forse attraverso un meccanismo mediato dai gruppi sulfidrilici sulla parete endoteliale dei vasi. Inoltre in condizioni di carenza alimentare di acido folico la variante termolabile della MTHFR porta a livelli molto bassi l'acido folico nel plasma ed è pertanto un fattore di rischio per i difetti del tubo neurale nelle donne in gravidanza **(25)**.

Una seconda mutazione del gene MTHFR (A1298C) è stata associata ad una ridotta attività enzimatica (circa il 60% singolarmente; circa il 40% se presente in associazione alla mutazione C677T). Questa mutazione, in pazienti portatori della mutazione C677T, determina un aumento dei livelli ematici di omocisteina.

Nella ricerca delle patologie cardiovascolari sono stati scoperti alcuni polimorfismi in numerosi geni chiave coinvolti nel metabolismo dei lipidi e nel loro trasporto nel plasma **(26)**. Uno di questi polimorfismi coinvolge il gene APOE, situato sul cromosoma 19 e codificante per l'apolipoproteina E (APOE), una proteina plasmatica, coinvolta nel trasporto del colesterolo, che si lega alla proteina amiloide. Sono presenti tre isoforme di ApoE: Apoε2, Apoε3 e Apoε4, che modulano l'impatto della dieta sulla concentrazione dei lipidi plasmatici. Tali isoforme sono i prodotti di 3 forme alleliche diverse (ε2, ε3, ε4), determinate dal cambiamento dell'amminoacido in due diverse posizioni (varianti Cys112Arg e Arg158Cys).

Le apolipoproteine svolgono un ruolo fondamentale nel catabolismo delle lipoproteine ricche di trigliceridi e colesterolo. L'APOE viene sintetizzata principalmente nel fegato ed ha la funzione di trasportatore lipidico. E' noto da tempo che elevati livelli di colesterolo costituiscono uno dei maggiori fattori di rischio per le malattie cardiovascolari. In particolare non solo il livello di colesterolo totale ma anche i livelli relativi di HDL, LDL e trigliceridi rivestono notevole importanza nella patogenesi delle malattie vascolari. L'APOE è stato uno dei primi marcatori genetici ad essere studiati come fattore di rischio per l'infarto del miocardio. Studi effettuati su una ampia popolazione di pazienti con infarto del miocardio e relativo gruppo di controllo hanno confermato dati già presenti in letteratura dove l'allele ε4 dell'APOE (APOE4) era stato considerato un fattore di rischio genetico per le malattie cardiovascolari. I portatori dell'allele 4 presentano infatti livelli più elevati di colesterolo totale e LDL, in presenza di un'alimentazione ricca in colesterolo, e quindi hanno un rischio maggiore di sviluppare patologie cardiovascolari. Tuttavia questi soggetti sono anche quelli che rispondono meglio quando sottoposti a diete con ridotto

contenuto di grassi, mentre i portatori delle varianti ApoE2 e 3 presentano risposte variabili **(27)**.

Anche l'obesità è una patologia complessa dovuta a fattori genetici, ambientali ed individuali con conseguente alterazione del bilancio energetico ed accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo. Studi su famiglie hanno sempre sostenuto l'ipotesi di un'influenza genetica, responsabile delle cosiddette anomalie metaboliche che faciliterebbero l'insorgenza dell'obesità in presenza di alta disponibilità di alimenti e cronico sedentarismo. L'obesità rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari. Esistono numerosi polimorfismi genici associati a questa patologia.

I recettori adrenergici alfa2 influenzano il metabolismo energetico attraverso l'inibizione della secrezione di insulina e la lipolisi. Il gene codificante per il recettore adrenergico Alfa2B (ADRA2B) presenta un polimorfismo Ins>Del codone 299. La variante Del è molto comune nei caucasici (circa il 31%) ed è stata associata in vivo con una ridotta dilatazione delle arterie brachiali e con un ridotto flusso delle arterie coronariche. Inoltre si pensa che tale variante incida sul metabolismo basale e contribuisca all'obesità **(28)**.

I recettori adrenergici beta 1 sono i principali recettori cardiaci per Norepinefrina ed Epinefrina, che rappresentano il più importante meccanismo mediante il quale il flusso sanguigno è aumentato ad opera del sistema nervoso simpatico. Il gene ADRB1, codificante per il recettore adrenergico B1 presenta un polimorfismo, Gly389Arg, consistente nella variazione aminoacidica Gly-Arg a livello del codone 389. La variante Arg389 è associata ad una migliore funzione recettoriale. Tale variante sembra predisporre ad infarto ed influenzare la risposta terapeutica al trattamento con beta bloccanti. La variante Arg389 è inoltre associata ad ipertensione **(29)**.

L'allele Arg16 del gene Recettore Adrenergico Beta 2 (ADRB2) determina un miglioramento della sensibilizzazione del recettore ed è stato associato ad ipertensione. La contemporanea presenza delle varianti polimorfiche Gly16Arg e Gln27Glu dell'ADRB2 comporta una ridotta vasodilatazione mediata dal recettore adrenergico Beta 2. La variante Glu27 è associata ad un incremento dell'attività del recettore, con conseguente obesità e patologie metaboliche.

Sulla base del suo ruolo biologico nel metabolismo dei lipidi, si pensa che il recettore adrenergico Beta 3 sia uno dei geni che influenza l'accumulo del grasso nel corpo. Una mutazione missense (polimorfismo Trp64Arg) a livello del codone 64 del gene ADRB3 è stata associata con un aumento dell'indice di massa corporea (BMI) **(30)**.

Il Neuropeptide Y (NPY) esercita un ruolo importante nella regolazione del bilanciamento energetico, mediando la stimolazione all'assunzione di cibo e l'accumulo energetico. Tra le molteplici azioni del NPY troviamo la vasocostrizione, la regolazione della pressione sanguigna, il metabolismo del colesterolo e la patogenesi dell'arteriosclerosi.

Un raro polimorfismo del gene codificante per NPY, Leu7Pro, è stato associato ad elevate quantità di colesterolo totale e LDL, specialmente nei pazienti con obesità. Tale polimorfismo, inoltre, è un marker per il rischio di ipertensione ed arteriosclerosi (31).

Infine il Recettore Attivato dai Proliferatori dei Perossisomi-Gamma (PPARG) è un recettore che notoriamente svolge un ruolo importante nella stimolazione del processo naturale del corpo alla base della regolazione del metabolismo lipidico e dei carboidrati, aumentando la sensibilità all'insulina. L'elevata pressione arteriosa, le anomalie lipidiche, la resistenza all'insulina e l'obesità centrale sono le componenti principali della sindrome metabolica, che comunemente prelude alla patologia cardiovascolare ed al diabete di tipo 2. La caratteristica della sindrome metabolica è quella di riunire i maggiori fattori di rischio cardiovascolare compreso l'obesità centrale, la resistenza all'insulina, la pressione arteriosa elevata e le anomalie dei lipidi nel sangue. Quasi un quarto della popolazione mondiale è affetto da sindrome metabolica. Fino ad un massimo dell'80% dei quasi 200 milioni di adulti nel mondo colpiti da diabete decedono a causa di patologie cardiovascolari. Le persone affette da sindrome metabolica sono maggiormente a rischio rispetto alle altre in quanto hanno il doppio delle probabilità di morire per attacco cardiaco ed il triplo delle probabilità di morire per ictus.

Alcuni studi supportano un ruolo benefico del polimorfismo Pro12Ala, che è associato con una ridotta trascrizione del gene PPARgamma2. Tale polimorfismo, inoltre, è associato con una diminuzione dell'indice di massa corporea (BMI), una riduzione dei livelli di insulina, un aumento dei livelli di HDL e una migliorata sensibilità all'insulina. Quindi, il polimorfismo Pro12Ala diminuisce il rischio diabete mellito di tipo II.

Quando una di mutazioni viene riscontrata in famiglia, una preventiva dieta restrittiva può essere l'elemento principale per combattere precocemente l'obesità (32).

1.4 Esempi di patologie associate alla nutrigenomica

Dopo il sequenziamento del genoma di parecchie specie eucariotiche la comprensione di alcune patologie umane è progredita notevolmente. Dei circa 1000 geni scoperti associati a patologie, circa il 97% è correlato a malattie monogeniche, ossia dovute all'alterazione di un singolo gene (33). Modificando il consumo di alcuni composti della dieta alcune

malattie monogeniche, come la galattosemia e la fenilchetonuria, possono essere prevenute.

La galattosemia è una malattia a carattere ereditario dei nati, dovuta ad un malfunzionamento di un enzima capace di metabolizzare il galattosio, portando così ad un accumulo di galattosio nel sangue, che, se non diagnosticato in tempo, può risultare mortale. Erroneamente spesso la si confonde con l'intolleranza al lattosio, ma questa è una forma più grave. Esistono tre forme di deficit enzimatico: una riguarda il galattosio-1-fosfato uridiltransferasi, un'altra la galattochinasi e l'ultima l'uridina difosfato galattosio 4-epimerasi.

La fenilchetonuria è una malattia autosomica recessiva. Il gene mutato non codifica la fenilalanina idrossilasi, enzima che converte l'amminoacido fenilalanina in tirosina. L'assenza di questo enzima rende impossibile tale reazione portando ad un accumulo di fenilalanina nel sangue e ad un elevato rischio di danni neurologici. La fenilalanina è un amminoacido essenziale per l'uomo, e deve essere introdotto nella dieta per consentire la sintesi di molte altre proteine alla base di molteplici processi biochimici, tuttavia fisiologicamente l'organismo converte la fenilalanina (dannosa perché cancerogena e teratogena) in tirosina, rendendola innocua.

Per entrambe queste patologie la dieta assume un ruolo rilevante. Infatti una dieta priva di fonti di galattosio e lattosio e di fenilalanina ma ricca di tirosina, sembrano essere i fattori determinanti per il controllo delle patologie.

Molte patologie che hanno raggiunto proporzioni endemiche nel mondo occidentale, come il cancro, il diabete, l'obesità e le malattie cardiovascolari, invece, sono dovute ad un insieme di disfunzioni biologiche e non alla mutazione di un singolo gene e alcuni componenti bioattivi dei cibi possono alterare uno o più di questi processi biologici (Fig. 5).

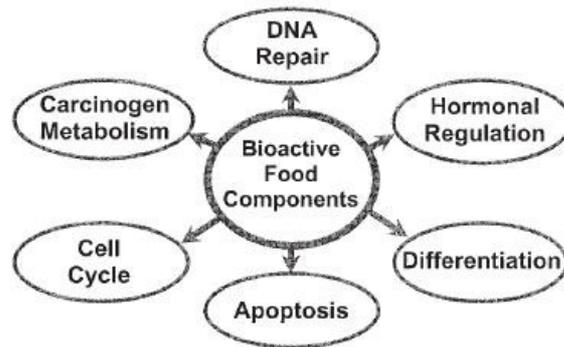


Figura 5

Per questo motivo l'intervento della dieta per prevenire l'avvento di queste patologie è molto più complesso e richiede non solo la conoscenza di come un singolo nutriente possa influenzare il sistema biologico, ma anche la conoscenza di come un insieme di nutrienti, assunti giornalmente, possano interagire tra loro per modulare le funzioni biologiche (34).

Tra i vari tipi di patologia messi in relazione con le mutazioni genetiche quelle maggiormente studiate sono quelle correlate al tumore.

Questo è dovuto al fatto che il tumore, più di altre malattie è una patologia genetica dovuta a mutazioni somatiche che colpiscono cellule mature. Si stima che le mutazioni avvengano spontaneamente ad una frequenza di 10^{-7} per gene per ogni divisione cellulare.

Nei pazienti con tumore del colon i fattori e i segnali che agiscono sul DNA per dare origine alle mutazioni (inattivando geni oncosoppressori o stimolando oncogeni), o per attivare o disattivare fattori di trascrizione sui siti promotori del DNA (in grado di far esprimere o reprimere un determinato gene grazie a meccanismi epigenetici) sono spesso alimenti o componenti alimentari. Ecco perché lo studio della nutrigenomica (e anche della nutrigenetica) è diventato determinante nella comprensione del cancro del colon. La conoscenza di quali siano i cibi in grado di accendere in un determinato individuo i meccanismi che portano alla comparsa del tumore o, al contrario, capaci di proteggerlo, può rappresentare in un futuro prossimo il meccanismo più efficace e naturale di cura e prevenzione di questa patologia.

Numerose evidenze epidemiologiche hanno suggerito negli anni il ruolo protettivo della fibra nella comparsa del tumore del colon. Una pubblicazione di uno studio su più di 500.000 individui europei (35) ha messo chiaramente in evidenza la significativa inversa associazione tra il consumo di fibra e il rischio di tumore del colon retto. L'azione della fibra nel ridurre il rischio del cancro del colon sembra dovuta al legame che esercita su

alcune sostanze nocive alle cellule della mucosa del colon come gli acidi biliari, e alla riduzione del loro tempo di contatto con i colonociti grazie all'aumento della velocità di transito intestinale. In realtà recenti evidenze indicano come principale effetto preventivo la comparsa nel lume intestinale di alcuni acidi grassi a catena corta tra i quali il butirrato, principale nutriente ad agente trofico dei colonociti, frutto della fermentazione operata dalla flora batterica intestinale sulla fibra **(36)**.

Alcuni studi di nutrigenomica hanno dimostrato come l'eme e il calcio svolgano due ruoli opposti nella regolazione del tumore del colon retto. Nei ratti, l'assunzione di carne rossa sembra favorire la comparsa del tumore del colon per azione dell'eme non assorbito. L'eme determina un'azione citotossica sulle cellule del colon che sono stimulate al turn over e alla proliferazione. Questo avviene per effetto della ridotta espressione di molti geni e in particolare di uno chiamato mucosal pentraxin (MPTX) che risulta 10 volte meno espresso rispetto a cellule del colon non cancerose **(37)**. Il calcio, agente noto come protettore nei confronti del cancro del colon, è risultato essere in grado di aumentare l'espressione del gene MPTX e di invertire l'azione down-regolatrice dell'eme nei ratti.

Anche nell'uomo la maggiore incidenza di tumore del colon associata all'assunzione di carne rossa, come risulta da un importante studio europeo che ha reclutato 500.000 individui, sembra essere condizionata dalla presenza dell'eme **(38)**. Infatti a differenza della carni bianche di pollame e pesce che ne contengono meno, l'eme non assorbito, e non le proteine o il ferro inorganico, sembra essere il responsabile della comparsa di composti cancerogeni come le nitrosamine. Inoltre, la cottura alla brace o ad alte temperature della carne rossa favorisce la formazione di idrocarburi aromatici e amine eterocicliche a partire dai grassi, che costituiscono un elemento di rischio aggiuntivo alla comparsa del tumore del colon.

Infine anche il beta carotene (presente in molti vegetali giallo-rossi e in particolare nelle carote e nella zucca) svolge un ruolo protettivo riducendo la proliferazione cellulare attraverso un meccanismo favorente l'apoptosi delle cellule del colon cancerose coltivate in vitro **(39)**.

Molti altri alimenti o sostanze contenute negli alimenti possono regolare l'espressione genica e condizionare pertanto, nel bene e nel male, la comparsa di patologie quali il tumore del colon.

La nutrigenomica tenta di studiare i meccanismi molecolari determinati dagli alimenti che regolano la trascrizione genica e la conseguente azione di proteine e metaboliti. La complessità della composizione degli alimenti stessi rende molto difficile questo compito.

Risulta spesso impossibile svincolare l'effetto di un nutriente da quello di un altro. Altrettanto proibitivo pare riuscire a comprendere le quantità di sostanza in grado di determinare gli effetti studiati tenendo conto della variabilità della biodisponibilità, delle condizioni fisiologiche dei soggetti, e del tempo di esposizione ad un determinato nutriente. Questi ostacoli apparentemente insormontabili non possono però non indurci a sperare di riuscire un giorno a consigliare un determinato tipo di alimentazione specifico per ogni individuo sulla base della conoscenza del proprio genoma. La comprensione del perché un determinato soggetto può beneficiare di una certa sostanza per prevenire una malattia mentre per un altro quella stessa non svolge alcun ruolo permetterà anche di impedire alcune privazioni inutili o addirittura controproducenti.

1.4.1 Acidi grassi a lunga catena polinsaturi e carcinogenesi

Molti studi sia in vitro che in vivo hanno dimostrato che gli acidi grassi a lunga catena polinsaturi (LG-PUFA) assunti con la dieta sono in grado di regolare i meccanismi cellulari in una varietà di tessuti sia sani che cancerogeni. Studi epidemiologici hanno dimostrato che il consumo di LG-PUFA influenza positivamente i processi fisiologici come la crescita, lo sviluppo neurologico, l'accrescimento della massa magra e grassa, la riproduzione, i processi immunologici oltre che alcune patologie croniche e degenerative come il cancro, l'aterosclerosi, l'artrite, il diabete, i processi infiammatori e neurodegenerativi (40).

Il coinvolgimento in una grande quantità di processi fisiologici e patologici è dovuta alla loro capacità di essere molto spesso associati o essere essi stessi dei ligandi per un numero rilevante di fattori di trascrizione importanti, inclusi i recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (PPARs), il fattore nucleare epatico 4, il fattore nucleare $\kappa\beta$ ed altri fattori importanti che permettono ai LG-PUFA di esercitare la loro attività biologica nei vari tessuti (41).

La carcinogenesi è un processo composto da più stadi in cui l'espressione genica, proteica e le funzioni metaboliche iniziano ad operare in modo aberrante. Gli LG-PUFA assunti con la dieta sono stati molto studiati per il loro effetti sul cancro. Studi epidemiologici hanno messo in relazione una maggiore incidenza di tumori del colon in corrispondenza di un'alimentazione ricca in grassi saturi e acidi grassi $\omega 6$ mentre al contrario è stato attribuito un ruolo protettivo agli acidi grassi $\omega 3$ (42) presenti fondamentalmente nell'olio di pesce. Studi di laboratorio inoltre hanno evidenziato un ruolo preventivo degli acidi grassi $\omega 3$

nella carcinogenesi indotta nei ratti a differenza degli $\omega 6$ sottolineando come diverse tipologie di acidi grassi possano determinare effetti opposti nel favorire o ostacolare la comparsa del tumore del colon. Gli acidi grassi $\omega 3$ riducono la concentrazione di acidi biliari secondari che sono fattori stimolanti della proliferazione cellulare e sono considerati promotori della degenerazione neoplastica del colon (43). Studi più recenti hanno chiarito che il meccanismo molecolare attraverso il quale gli acidi grassi $\omega 3$ esercitano la loro azione protettiva è rappresentato dalla modulazione dell'espressione di geni che regolano il ciclo cellulare e l'apoptosi. Nelle cellule tumorali del colon si osserva una resistenza all'apoptosi e una alterata proprietà di adesione cellulare associata ad una sovraespressione della COX2. Gli acidi grassi $\omega 3$ sembrano agire inibendo l'attività della COX2 e favorendo l'apoptosi. L'attività della COX2 è influenzata da altri fattori quali l'ossido nitrico (NO) (44) ed è stata riscontrata un'elevata attività dell'enzima NO sintetasi inducibile nelle cellule del tumore del colon. L'azione del NO si manifesta non solo favorendo l'espressione della COX2 ma anche impedendo al DNA di riparare i propri danni (45). Un recente studio ha evidenziato come gli acidi grassi $\omega 3$ siano in grado di inibire l'azione della NO sintetasi inducibile.

Tecnologie della nutrigenomica moderna, accoppiate con tecniche bioinformatiche, hanno rivelato la complessità di segnali che si attivano in seguito al consumo degli LG-PUFA (Fig. 6).

L'azione degli LG-PUFA è mediata dai fattori di trascrizione come PPAR e SREBP che possono essere attivati simultaneamente o separatamente. In verde sono mostrati i geni che vengono down regolati mentre in rosa quelli up regolati.

La tecnologia del microarray ha portato alla conoscenza delle vie di attivazione dei LG-PUFA, anche se l'utilizzo di specifici inibitori e di tecniche di RNA interference, potrebbe aiutare a comprendere maggiormente il ruolo biologico di questi composti.

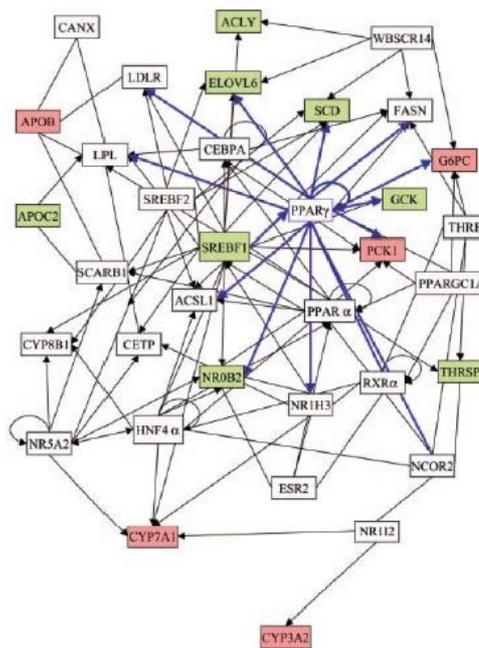


Figura 6

1.5 Esempi di patologie associate alla nutrigenetica

Come detto precedentemente lo scopo della nutrigenetica riguarda l'identificazione delle variazioni genetiche nell'uomo che causano differenze nella risposta fenotipica alle molecole introdotte con la dieta, con l'obiettivo di valutare i rischi e i benefici per l'individuo di determinate componenti della dieta. Ciascuno dei nostri geni possiede circa 10 varianti geniche che costituiscono i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Ci sono numerosi polimorfismi associati al rischio di malattie cardiovascolari e diabete.

Alcuni geni piuttosto che altri tendono ad essere suscettibili a determinati nutrienti questi geni in genere sono **(2)**:

- Geni che sono attivati cronicamente durante uno stato patologico
- Geni che hanno importanti variazioni funzionali
- Geni che hanno una posizione gerarchica importante nella cascata biologica
- Geni con polimorfismi altamente prevalenti nella popolazione
- Geni associati con biomarker

Sulla base di questi criteri alcuni SNP sono stati associati a particolari fenotipi come le malattie coronariche del cuore e il diabete mellito di tipo 2 potendo in tal modo dimostrare come una dieta 'personalizzata' possa modificare l'avvento di queste patologie.

1.5.1 La cardiopatia coronarica

Per cardiopatia ischemica, (CHD, Coronary Heart Disease), si intende una malattia del cuore caratterizzata da insufficiente e/o mancato afflusso di sangue al muscolo cardiaco per ostacolo al passaggio del sangue necessario al funzionamento del muscolo cardiaco stesso attraverso i rami arteriosi dedicati dell'albero coronarico. Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di mortalità e morbilità nel mondo, e la prevenzione di queste patologie - in particolare della CHD - è uno dei principali obiettivi di molti paesi. Una delle principali cause dell'insorgere delle malattie cardiovascolari è l'arterosclerosi: gli strati interni delle pareti delle arterie diventano spessi e irregolari a causa di depositi di lipidi e colesterolo. L'ispessimento porta ad una diminuzione del flusso sanguigno. Su questi vasi, ma anche in assenza di un ispessimento significativo, meccanismi biologici la cui causa prima non è nota possono provocare la formazione di un trombo che, ostacolando completamente il flusso sanguigno provoca un danno permanente all'organo irrorato da quel vaso: cuore o cervello.

Elevati livelli plasmatici di colesterolo rappresentano uno dei principali fattori di rischio per CHD. Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che livelli plasmatici, anche relativamente ridotti, di colesterolo totale e di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (C-LDL) sono correlati linearmente con il rischio di CHD. Nei soggetti con iperlipidemia, la diminuzione dei lipidi plasmatici determina una riduzione lineare del rischio di CHD e non sembra esistere un valore soglia al di sotto del quale non si possa ottenere un ulteriore beneficio. Le evidenze suggeriscono che la riduzione o la presenza di ridotti livelli di colesterolo non sono dannosi per la salute.

Dati clinici hanno dimostrato due linee di terapia fondamentali per determinare un abbassamento di lipidi nella prevenzione di CHD. La prima linea consiste in un cambio generale dello stile di vita del paziente, con conseguente alterazione della dieta e dell'attività fisica associata alla riduzione di peso e di fumo. La seconda linea coinvolge l'uso di composti farmaceutici, come le statine, che sono in grado di inibire efficacemente l'attività della 3 idrossi-metil-glutaril CoA reduttasi epatica (HMG-CoA reductase) e così ridurre i livelli di colesterolo circolanti (46).

È noto però che individui diversi rispondono diversamente all'effetto dei farmaci a causa degli SNP. Diventa importante identificare i geni aventi un ruolo rilevante nella determinazione di CHD e comprendere le loro interazioni con i composti della dieta. Alcuni geni importanti noti sono la Apolipoproteina A1 (APOA1), la lipoproteina lipasi

(LPL), Apolipoproteina E (APOE) e la Proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP).

L'APOA1 costituisce il maggiore componente proteico delle lipoproteine ad alta densità (HDL, il cosiddetto colesterolo buono). Poiché APOA1 esercita un ruolo importante nel trasporto inverso del colesterolo, bassi livelli sierici di APOA1/HDL rappresentano un ben conosciuto fattore di rischio di patologie delle arterie coronariche. Un frequente polimorfismo del gene APOA1 localizzato nella regione promotore, -75G>A, modula l'espressione della proteina. Importanti interazioni tra questo polimorfismo, abitudini dietetiche e livelli di HDL sono ben conosciute. I portatori della variante allelica del polimorfismo -75G>A, possono aumentare il loro livello sierico di HDL in risposta ad una maggiore assunzione con la dieta di acidi grassi insaturi (47).

Il CETP è coinvolto nel metabolismo dei lipidi, mediando lo scambio di lipidi tra lipoproteine mediante il trasferimento di esteri del colesterolo dalle HDL alle lipoproteine ricche di trigliceridi, con conseguente riduzione dei livelli di HDL. Il polimorfismo dell'introne 1 del gene CETP G279A aumenta le concentrazioni del CETP e riduce i livelli di HDL a favore di LDL e VLDL. Un altro polimorfismo, G1533A, localizzato nell'esone 15 del gene CETP, che determina la variazione aminoacidica Arg->Gln a livello del codone 451, è anch'esso associato ad una aumentata attività plasmatica della CETP. Ridotti livelli di HDL sono associati ad un rischio aumentato di patologie cardiovascolari (48).

Ogni anno in Italia muoiono circa 243 mila persone per malattie cardiovascolari. Oggi è possibile identificare i pazienti che hanno maggiore possibilità di essere colpiti da una patologia cardiovascolare. Tra le principali cause e/o fattori di rischio un ruolo di primaria importanza lo giocano l'età, il sesso maschile, la familiarità per cardiopatia ischemica, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia, il fumo e lo stress. Tali fattori di rischio, tuttavia, non sono sufficienti a spiegare tutti i casi di infarto che si manifestano in individui non a rischio: per questo motivo la ricerca e gli studi clinici si sono indirizzati verso l'individuazione di nuovi marcatori, sia legati ai vari cicli metabolici (tra cui i processi emocoagulativi ed infiammatori) che a livello genico, al fine di individuare la predisposizione genetica allo sviluppo di una determinata patologia cardiovascolare.

1.6 Modelli di studio per comprendere i biomarkers nutrizionali

Per estendere le conoscenze su quali siano i biomarkers nutrizionali occorre avere a disposizione dei modelli di studio ottimali e all'avanguardia. L'impossibilità di usare tessuti umani costringe all'utilizzo di modelli animali efficaci tra cui i topi transgenici e

knock out ed all'uso delle innovative tecnologie in vitro. Tecniche come sistemi di espressione inducibili (per esempio con l'uso di tetraciclina, Tet-On), costrutti adenovirali trans dominanti negativi (tdnAd) e RNA interference (RNAi) (Fig. 7) sono usati per modulare e studiare i livelli di espressione e la funzionalità dei biomarkers nutrizionali.

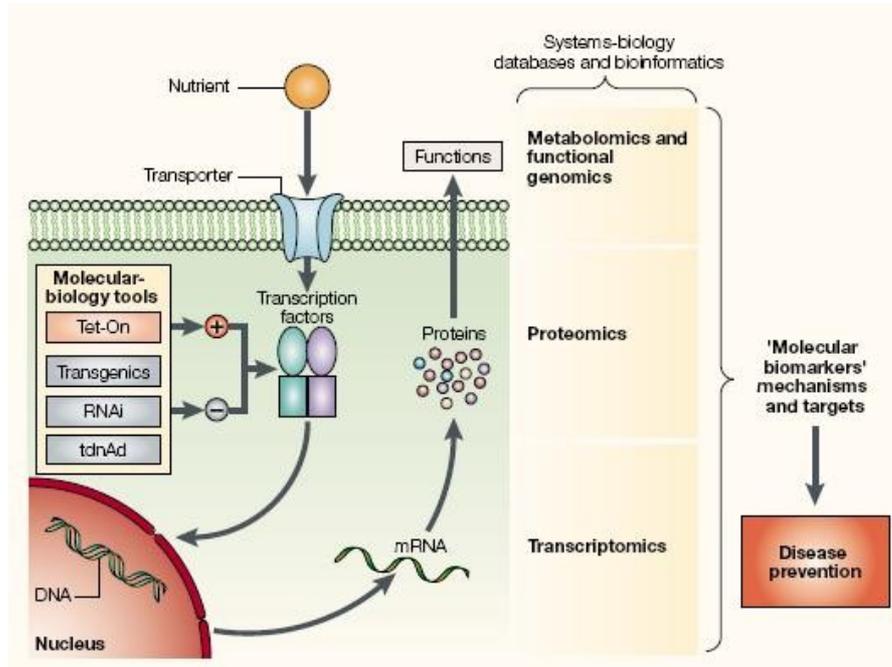


Figura 7

L'utilizzo di queste tecniche sarà di aiuto per la scoperta di nuovi geni target della dieta e la caratterizzazione dei meccanismi che stanno alla base di una determinata patologia. I sistemi biologici nutrizionali traggono vantaggio dalla combinazione di più discipline insieme come la trascrittomica, la proteomica e metabolomica che, insieme, sono in grado di identificare biomarkers biologici fondamentali per la prevenzione di numerose patologie (5).

Oltre a queste tecnologie l'utilizzo di un sistema laser per microdissezione è ideale per isolare zone di tessuto o singole cellule da sezioni istologiche, strisci e coltura cellulare.

L'estrazione di cellule specifiche da un tessuto eterogeneo permette una specifica analisi del DNA, RNA e proteine senza pericolo di contaminazioni dovute a qualsiasi contatto meccanico. Essendo lo spessore di taglio modulabile fino a frazioni di micron, il sistema risulta applicabile ai più disparati campi: patologia, oncologia, ricerca medica, biologia molecolare, genetica e ad un gran numero di preparati. Questo sistema è in grado di ampliare le conoscenze specifiche derivanti da organismi integri sottoposti ad esperimenti nutrizionali.

Anche l'utilizzo di linee cellulari e cellule primarie costituiscono un ottimo modo per comprendere gli effetti della nutrizione sull'espressione genica anche se spesso ci sono delle notevoli differenze in alcuni fattori di trascrizione espressi nelle linee cellulari rispetto alle cellule primarie o ad esperimenti condotti *in vivo*.

Uno dei più importanti metodi per studiare gli effetti dei nutrienti sull'espressione di un grande numero di geni è l'utilizzo dei Microarrays. Tramite questa tecnica è possibile ottenere un profilo di espressione genica durante la restrizione calorica o il digiuno ed esaminare l'effetto di un singolo nutriente.

Conoscere il profilo di espressione genica è importante così da identificare l'effetto avverso o benefico di un determinato componente nutrizionale. Per esempio gli effetti benefici dell'assunzione degli acidi grassi polinsaturi sui livelli delle LDL nel plasma può essere associato a specifici cambi di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo.

Alcuni limiti di questa tecnica sono il fatto che per poter avere un quadro il più possibile completo dell'effetto di un nutriente su determinati geni occorre conoscere il tessuto o l'organo di elezione di quel composto e questa informazione non sempre è disponibile. Inoltre, occorre conoscere la funzione di quei geni che vengono modulati dal nutriente, per poter comprendere il meccanismo di azione di quest'ultimo, ed anche questo aspetto, spesso, non è noto.

Lo studio del profilo di espressione genica può anche aiutare ad identificare i geni, proteine e/o metaboliti importanti che sono alterati in uno stato di pre-malattia e che possono costituire così i 'biomarkers molecolari' (5).

Le analisi nell'uomo vengono condotte principalmente nel sangue, grazie alla facile reperibilità, perciò lo studio tramite microarrays dell'espressione genica nei linfociti umani è uno dei più promettenti argomenti diagnostici.

Con l'utilizzo di tali tecniche il futuro della nutrigenomica probabilmente consisterà nell'identificazione di alcuni biomarkers che tengano conto dell'insieme di alterazioni che un determinato alimento può scatenare in un individuo. Devono essere presi in considerazione biomarkers indicatori di alterazioni genomiche, altri di difetti trascrittomici, altri ancora di modificazioni proteomiche o metabolomiche. In questo modo diventerà possibile disegnare un profilo di soggetto a rischio di una determinata patologia. Il modello dei biomarkers consentirebbe non più di associare un singolo nutriente ad un isolato effetto

molecolare originato in una cellula in vitro, ma fornirebbe informazioni sull'insieme di effetti esercitati a tutti i livelli (genomici, trascrittomici, proteomici e metabolomici) nell'organismo in vivo by-passando i limiti di biodisponibilità, interazioni con altri alimenti e biodiversità genetica individuale. L'analisi complessiva dei vari biomarkers definirebbe il profilo di rischio, di malattia o di stadiazione di malattia di un singolo soggetto.

CAPITOLO 2

ALIMENTI FUNZIONALI E NUTRACEUTICA

2.1 Alimenti funzionali

Per comprendere cosa siano e cosa rappresentino gli alimenti funzionali è necessario innanzitutto esaminare i cambiamenti che hanno segnato l'evoluzione della moderna scienza della nutrizione. Il ruolo della nutrizione è progredito dai concetti classici, consistenti nella prevenzione di patologie carenziali e nell'adeguatezza dell'alimentazione di base, alla promozione di uno stato di benessere e salute e di riduzione del rischio di malattia, passando così al concetto di alimentazione "positiva" od "ottimale". Nel corso del XX secolo la nutrizione ha individuato i nutrienti essenziali ed ha stabilito gli standard e le linee guida nutrizionali. Più di recente sono anche state fatte raccomandazioni rivolte ad evitare un consumo eccessivo di questi nutrienti, dopo aver riconosciuto il loro potenziale ruolo nell'eziologia di diverse malattie in particolare quelle cronic-degenerative. Come risultato di queste acquisizioni, uno dei contributi principali della nutrizione è stato la formulazione del concetto di dieta bilanciata, "una appropriata combinazione di alimenti che fornisca il fabbisogno minimo di nutrienti e altri componenti necessari per sostenere la crescita ed il mantenimento dell'organismo, per prevenire lo sviluppo di deficienze e per ridurre il rischio di malattie associate ad eccessi dannosi" (49). Il XXI secolo, invece, presenta nuove esigenze: da una parte la necessità del contenimento dei costi della spesa sanitaria legati all'aumento della vita media, alle mutazioni ambientali e dello stile di vita e ad un conseguente aumento delle patologie cronic degenerative, dall'altra la richiesta di un miglioramento della qualità della vita e dell'invecchiamento.

Negli ultimi decenni infatti, la richiesta dei consumatori nel campo della produzione alimentare è cambiata considerevolmente. I consumatori sono sempre più interessati ai potenziali benefici degli alimenti e sempre di più credono che il cibo possa contribuire direttamente alla loro salute (50). Una recente indagine condotta nel Regno Unito, in Francia ed in Germania ha portato alla conclusione che i consumatori ritengono che la dieta sia addirittura più importante dell'esercizio fisico o dei fattori ereditari nel mantenere un buono stato di salute (51). Le recenti acquisizioni in campo scientifico inoltre, supportano l'ipotesi che la dieta, oltre ad essere nutriente e gradevole, possa rappresentare una prima linea di difesa e modulare varie funzioni dell'organismo ed essere quindi considerata "funzionale".

In questo contesto, quindi, gli alimenti funzionali rappresentano il punto d'incontro tra ricerca scientifica, innovazione tecnologica e domanda di benessere.

Il concetto di alimenti funzionali, tuttavia, non è totalmente nuovo. Nelle zone asiatiche, influenzate dalla cultura cinese, gli alimenti e i farmaci sono spesso stati considerati derivanti da un'unica fonte.

Il termine “alimento funzionale”, così come il concetto stesso, sono stati proposti per la prima volta in Giappone nei primi anni '80 quando, con il supporto del Ministero dell'Educazione, Scienza e Cultura (MESC), i progetti nazionali “Systematic analysis and development of food functionalities (1984-1987) e “Analysis of bodymodulating functions of food (1988-1991) cominciarono ad essere sviluppati (*Arai, 1996*).

Gli alimenti funzionali sono alimenti freschi o trasformati che hanno proprietà benefiche sulla salute indipendentemente dal loro valore nutrizionale. Un alimento funzionale rimane un alimento e deve dimostrare il suo effetto in quantità che sono normalmente consumate nell'ambito di una dieta normale: non è una pillola o una capsula, ma parte di un normale regime alimentare **(52)**. Un esempio di alimento funzionale è lo yogurt ed altri prodotti fermentati, per il loro contenuto in probiotici, microrganismi vivi con benefico impatto sull'ospite attraverso una azione benefica sul tratto intestinale.

Attualmente nell'Unione Europea manca una legislazione specifica su questa categoria di alimenti e sulla sua etichettatura. Sono state individuate due categorie di alimenti funzionali:

- Tipo A: alimenti che migliorano una specifica funzione fisiologica al di là del loro specifico ruolo nella crescita corporea e nello sviluppo. Questo tipo di alimenti non hanno funzioni in relazione a malattie o stati patologici. Esempio può essere il caffè, per il suo contenuto in caffeina che aumenta le capacità cognitive.
- Tipo B: alimenti che riducono il rischio di una malattia. Ad esempio il pomodoro grazie al suo contenuto in licopene può ridurre il rischio di tumori.

Solo alcune nazioni estere possiedono una precisa legislazione riguardo definizione, etichettatura e commercializzazione degli alimenti funzionali. In Giappone, per esempio, tali alimenti sono riconosciuti e commercializzati con la sigla FOSHU (Food for Specific Health Use), e le proprietà funzionali comprovate da indagini scientifiche su popolazione (in vivo) **(53)**.

Nella definizione di alimento funzionale devono inoltre essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- essere formati da ingredienti o composizioni di ingredienti convenzionali ed essere consumati come vengono convenzionalmente consumati gli alimenti;
- essere consumati come parte della dieta base;
- essere etichettati come aventi funzioni di controllo dell'organismo.

Va enfatizzato come questo ruolo di alimento incorpora funzioni che precedentemente erano attribuite solo ai farmaci, sebbene, come alimenti, debbano essere assunti nel contesto della dieta quotidiana.

In aggiunta dovevano essere soddisfatti i seguenti requisiti:

- l'alimento deve contribuire al miglioramento della dieta di ciascuno ed al mantenimento/rafforzamento della salute;
- i benefici salutistici dell'alimento o dei suoi costituenti devono avere una chiara base medica e nutrizionale;
- sulla base delle conoscenze mediche o nutrizionali, deve essere possibile poter definire un apporto giornaliero dell'alimento o dei suoi costituenti;
- sulla base dell'esperienza, l'alimento o i suoi costituenti devono essere sicuri per l'alimentazione;
- i costituenti dell'alimento devono essere ben definiti in termini di proprietà chimico-fisiche e determinazione analitica quali-quantitativa;
- non devono esserci significative perdite di costituenti nutritivi dell'alimento rispetto a quelli contenuti in alimenti simili;
- l'alimento deve appartenere ad una tipologia quotidianamente consumata nella dieta, piuttosto che assunto occasionalmente;
- il prodotto deve essere in forma di alimento e non in altre forme come pillole o capsule;
- l'alimento e i suoi costituenti non devono essere quelli utilizzati esclusivamente come farmaci.

Non c'è dubbio che l'interesse giapponese per gli alimenti funzionali abbia aumentato la consapevolezza della necessità di questo tipo di prodotti anche in Europa e negli Stati Uniti. La ricerca scientifica applicata a questo specifico campo nutrizionale indicava prospettive molto promettenti rappresentando non solo un beneficio per la salute dei consumatori ma anche un valore aggiunto ai prodotti alimentari che poteva rappresentare un potenziale commerciale per le industrie.

2.1.1 I glucosinolati: un esempio di componente funzionale

Numerosi studi epidemiologici indicano che il consumo di frutta e verdura è associato con un ridotto rischio di malattie cronico degenerative. In particolare, è stata evidenziata una correlazione inversa tra l'assunzione di Crucifereae ed il rischio di molte forme di cancro e questa associazione è risultata essere più stringente rispetto a quella tra il rischio di cancro e l'assunzione di frutta e verdura in generale. Dal momento che le Crucifereae, in particolare i vegetali appartenenti al genere Brassica, sono caratterizzate in modo peculiare dal contenuto in glucosinolati (GLS), di cui rappresentano la principale fonte di assunzione della dieta umana, questi phytochemicals potrebbero essere responsabili degli effetti di promozione della salute (54).

I glucosinolati (GLS) costituiscono un importante gruppo di fitocomponenti presenti in elevate quantità nei vegetali della famiglia delle Brassicaceae o Crucifereae come broccoli, tutti i tipi di cavolo, cavolfiori e cavolini di Bruxelles. Nelle piante, i GLS, ed i loro prodotti di degradazione, hanno proprietà fungicide, battericide, nematocide e la loro composizione varia in funzione della specie, del clima e delle condizioni di coltivazione. Sono inoltre responsabili dell'odore e del gusto pungenti, tipici delle Crucifereae.

Dal punto di vista biologico i GLS sono composti relativamente inattivi. In seguito al danneggiamento della cellula vegetale vengono a contatto con l'enzima mirosinasi, prodotto dalla stessa pianta, ma segregato in un compartimento distinto rispetto al suo substrato con formazione di diversi prodotti di idrolisi. Tra questi, gli isotiocianati (ITC), sono quelli che hanno maggiormente attirato l'attenzione dei ricercatori, a causa delle loro interessanti proprietà biologiche. Alla loro attività sono da ricondurre molti degli effetti fisiologici attribuiti alle Brassicaceae in diversi tipi di studi, inclusi studi in vitro, animali, umani ed epidemiologici. In particolare, il sulforafane (SF) (1- isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano), un ITC prodotto a seguito dell'idrolisi del corrispondente glucosinolato glucorafanina, è stato ampiamente studiato per le sue proprietà chemiopreventive e antinfiammatorie (55).

2.2 Nutraceutici

I Nutraceutici sono sostanze alimentari dalle comprovate caratteristiche benefiche e protettive nei confronti della salute sia fisica, che psicologica dell'individuo.

Il termine Nutraceutico è un neologismo coniato nel 1979 dal professor Stephen L. DeFelice, medico americano di origini italiane, creatore della Foundation Innovation in

Medicine di Cranford, New Jersey. Il termine deriva dall'unione di "nutrizione" e "farmaceutica", esemplificazione dell'interfaccia che coesiste tra gli alimenti e le reazioni metaboliche di tipo farmacologico **(56)**.

Con il termine nutraceutico, si intende qualsiasi alimento, parte di alimento o bevanda, dotato di potenziali effetti positivi sul mantenimento dello stato di salute e sulla prevenzione delle malattie, non riconducibili alla composizione nota in micro e macronutrienti.

Un nutraceutico è un "alimento-farmaco" ovvero un alimento salutare che associa a componenti nutrizionali selezionati per caratteristiche quali l'alta digeribilità e l'ipoallergenicità, le proprietà curative di principi attivi naturali di comprovata e riconosciuta efficacia. Sono sostanze isolate da un alimento ed utilizzate in forma dosata, cibi che potremmo anche introdurre nel menù quotidiano ma senza gli effetti positivi attribuiti al nutraceutico. Il problema, infatti, è il dosaggio, per ottenere la quota efficace dovremmo ingerirne quantità spropositate. Spesso un nutraceutico si presenta sotto forma di pillole, capsule, tavolette o liquido.

Queste proprietà salutari possono anche venir aggiunte a certi alimenti tramite l'aggiunta di sostanze propositive al buon funzionamento psicofisico e alla salute generale della persona, come ad esempio gli Omega 3 al latte o alle uova o le Vitamine ai fiocchi di cereali. In tal modo alle virtù di questi alimenti si sommano quelle degli Acidi grassi Polinsaturi, ottenendo così dei Nutraceutici o Alimenti funzionali ricchi di molecole salutari.

In realtà si dovrebbe fare una distinzione tra l'uso dei termini "nutraceutico" e "alimento funzionale" (o "farmalimento"): mentre il primo si riferisce alla singola sostanza estratta dagli alimenti con proprietà medicamentose, il secondo termine tende piuttosto a identificare l'intero cibo che presenta proprietà benefiche tramite la sua introduzione nella dieta alimentare.

Le due tipologie, Nutraceutico e Alimento funzionale, non sono però poi così diverse, distanti e divisibili, anzi spesso vengono utilizzate in modo scambievole come sinonimi.

Fra gli alimenti più studiati da questa nuova disciplina, ve ne sono alcuni che sembrerebbero essere utili nel contrastare alcune delle patologie più diffuse nella società moderna: ad esempio i lupini, che avrebbero evidenziato effetti positivi sul controllo del colesterolo e della pressione; la soia anch'essa utile nel controllo del colesterolo; il cioccolato amaro che avrebbe dimostrato effetti benefici anche sulla pressione; la berberina, una pianta appartenente alla famiglia delle peonie che sta rivelando un'azione

positiva contro il diabete e la papaya che avrebbe evidenziato un ruolo positivo nei processi di cicatrizzazione della cute.

2.2.1 Connessione tra Nutraceutici e Farmaci

Circa 2000 anni fa Ippocrate sottolineava 'lascia che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo'. I nutraceutici sono alimenti o ingredienti di essi con proprietà mediche e salutiste, ed in quanto tali è difficile stabilire una linea di distinzione netta tra farmaco e nutraceutico. Infatti, non sono riconosciuti facilmente né come farmaci né come alimenti e spesso si trovano in un linea di confine tra i due (Fig. 8).

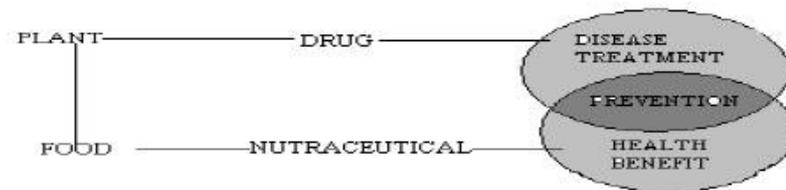


Figura 8

Se la sostanza contribuisce solo al mantenimento della salute degli organi e dei tessuti può essere considerata un alimento, ma se i suoi effetti sono in grado di modulare i processi fisiologici può essere considerato un farmaco.

Un nutraceutico può essere definito un farmaco quando sono soddisfatte due condizioni (57):

- Può essere usato per la prevenzione, il trattamento o la cura di una condizione di malattia
- Può essere somministrato per correggere, conservare o modificare le funzioni biologiche degli esseri umani.

Riguardo le capacità medicamentose di un nutraceutico, questo può essere considerato in due modi:

- Un potenziale nutraceutico
- Un nutraceutico definito

Un nutraceutico potenziale detiene la promessa di un particolare beneficio medico e diventa invece definito quando ci sono evidenze sperimentali sufficienti per dimostrare tali benefici. La maggior parte dei nutraceutici, oggi, appartengono alla categoria di nutraceutici potenziali (58).

Gli alimenti utilizzati come nutraceutici principalmente sono:

- Probiotici
- Prebiotici

- Fibre
- Acidi grassi omega 3
- Antiossidanti

I nutraceutici ricoprono tutte le aree terapeutiche della medicina: problemi di raffreddamento, artrite, disordini del sonno, digestione, prevenzione di tumori, osteoporosi, colesterolo, diabete e depressione (Fig. 9)

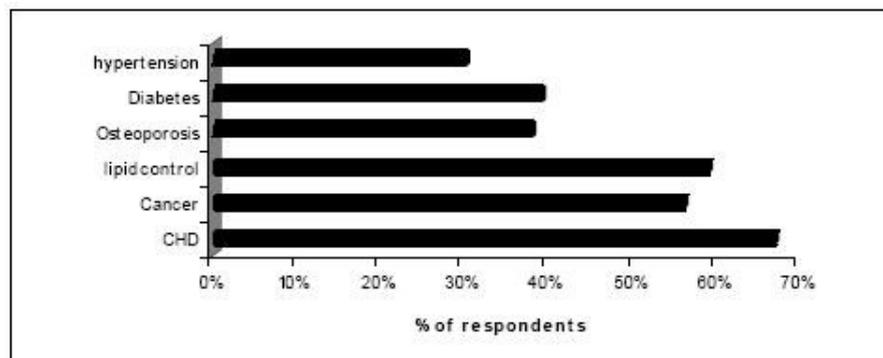


Figura 9

In Figura 9 sono mostrate le percentuali delle aree terapeutiche coperte da prodotti nutraceutici.

2.2.2 Potenziali rischi dell'uso di nutraceutici

Così come accade per tutti i prodotti terapeutici, anche per i nutraceutici occorre condurre studi di valutazione della loro efficacia e sicurezza. Occorre caratterizzare da un punto di vista metabolico i maggiori componenti attivi e capire le possibili interazioni che potrebbero avere con altre sostanze e farmaci, così da non alterarne l'efficacia o avere effetti collaterali.

Comprendere le interazioni dei nutrienti è molto difficile proprio a causa della loro natura complessa formata da più principi nutritivi e in cui un ruolo fondamentale è svolto anche dalle dosi e modalità di somministrazione.

Le interazioni farmacologiche possono avvenire in diverse fasi sia a livello dell'attività degli enzimi metabolici che di proteine di trasporto (Tab. 2).

TABELLA 2

ENZIMI METABOLICI RILEVANTI NELL'INTERAZIONE FARMACO-NUTRACEUTICO

Phase I

- Cytochrome P450 isozymes (1A1/2, 2B6, 2C9/19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4/5/7, 4A, 19)
- Dehydrogenases (alcohol, aldehyde)
- Epoxide hydrolases
- Esterases (serum cholinesterase, paraoxonase)
- Flavin-containing mono-oxygenase
- Monoamine oxidase
- S-oxidases (aldehyde and xanthine)

Phase II

- Glutathione S-transferases
- N-acetyltransferases
- N-acyltransferases (amino acids)
- N-, O-, S-methyltransferases
- Sulfotransferases
- UDP-glucuronosyl transferases

Le interazioni possono essere attribuite a cambi nei profili farmacocinetici e/o farmacodinamici dei metaboliti e dei composti di ciascun individuo. Nel caso di interazioni di tipo farmacodinamico, la risposta al composto è alterata senza avere effetti sulla concentrazione plasmatica, mentre, nel caso di interazioni farmacocinetiche, diversi livelli di esposizione modificano l'assorbimento, la distribuzione, l'escrezione o il trasporto del composto e dei suoi metaboliti. Alcuni cibi possono interagire con i prodotti terapeutici sia a livello farmacinetico che farmacodinamico modulando l'espressione genica a livello molecolare, modulando la trascrizione genica, il processamento dell'mRNA, modificando l'esportazione dal nucleo o l'emivita dell'mRNA e delle proteine (59).

L'epigallocatechina gallato (o EGCG) è un tipo di catechina ed è la più abbondante presente in particolare nel tè verde. L'epigallocatechina-3-gallato è un antiossidante che aiuta a proteggere la cute dai danni prodotti dalle radiazioni UV e si trova in molti integratori alimentari. La EGCG inibisce l'attività proteolitica del proteasoma avendo importanti implicazioni per la proliferazione cellulare e la stabilità dei fattori di trascrizione nel nucleo.

Per evitare che ci siano interazioni tra cibo e prodotti terapeutici dovrebbero essere considerate con più attenzione le concentrazioni delle diverse sostanze o principi nutritivi nei nutraceutici (60).

CAPITOLO 3

ENZIMI DEL SISTEMA METABOLIZZANTE I FARMACI

Gli enzimi coinvolti nel sistema metabolizzante i farmaci hanno un importante ruolo detossificante all'interno degli organismi animali, in quanto sono capaci di rendere più solubili, attraverso una catena di reazioni, le sostanze esogene lipofile che vengono assorbite con facilità, ma risultano difficilmente eliminabili dall'organismo. Questo sistema enzimatico è in grado di metabolizzare i farmaci modificandone le loro proprietà farmacologiche, rendendoli inattivi o eliminandoli precocemente dall'organismo, oppure trasformandoli in prodotti tossici. Tale processo è noto con il nome di biotrasformazione, ed avviene principalmente a livello epatico anche se può essere presente in tessuti extraepatici come il cuore, il polmone, il rene e il tratto gastrointestinale. Alcune componenti di questo sistema, inoltre, possono essere coinvolte nel metabolismo di sostanze endogene.

Questi enzimi sono stati classificati in base al tipo di reazione che catalizzano e si possono così distinguere in enzimi di fase 1, di fase 2 e ad azione antiossidante.

Gli enzimi di fase 1 catalizzano reazioni di funzionalizzazione; fra cui l'idrolisi, la riduzione e l'ossidazione; capaci di introdurre gruppi funzionali quali $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ e $-COOH$ nelle molecole substrato rendendole più idrofile, tra questi enzimi ritroviamo il citocromo P450 (CYP) e la DT-diaforasi.

Gli enzimi di fase 2, come ad esempio la glutatione-S-transferasi (GST), sono invece capaci di coniugare composti; fra cui l'acido glucuronico, il glutatione, gruppi metilici ed aminoacidi; ai gruppi funzionali presenti sulle molecole substrato, rendendole così più polari e quindi facilmente eliminabili. Generalmente, le reazioni di fase 1 intervengono sulle sostanze da eliminare prima delle reazioni di fase 2 ma questo non sempre accade, poiché a volte sulle molecole possono essere già presenti gruppi funzionali, e solo in alcuni casi le reazioni di fase 2 precedono quelle di fase 1.

Sebbene le reazioni di fase 1 e fase 2 generino composti più facilmente eliminabili, certe volte possono dare origine alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), molecole fortemente instabili in grado di innescare un meccanismo ossidativo a catena che può essere dannoso per le molecole biologiche come gli acidi nucleici, i lipidi e le proteine.

Gli enzimi antiossidanti sono in grado di bloccare questo processo attraverso la loro capacità di fornire elettroni alle molecole che ne sono prive; in questo gruppo ritroviamo la catalasi (CAT), la glutatione reduttasi (GSSG Red) e la glutatione perossidasi (GSH Perox).

3.1. ENZIMI DI FASE I

3.1.1 Il citocromo P450: Proprietà e Struttura

Il sistema del citocromo P450 si riferisce ad una famiglia di emoproteine che catalizza l'ossidazione di un'ampia varietà di composti strutturalmente diversi. E' un complesso multienzimatico in grado di svolgere una reazione monoossigenasica, per mezzo della quale le sostanze esogene ed endogene, presenti all'interno dell'organismo, vengono ossidate mediante uno dei due atomi contenuti nell'ossigeno molecolare (O_2). Il sistema monossigenasico citocromo P450 dipendente è noto anche come sistema ossidasico a funzione mista "Mixed Function Oxidase System" ed è il complesso enzimatico più versatile esistente in natura. Gli enzimi appartenenti a questa superfamiglia, come le altre emoproteine, sono in grado di legare O_2 quando l'atomo di ferro eminico si trova nello stato ridotto (Fe^{2+}). Il nome P450 deriva dalle proprietà spettrali che tali enzimi possiedono, in quanto a differenza delle altre emoproteine, la forma ridotta e complessata con monossido di carbonio presenta un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 450 nm, anziché a 420 nm. Questa caratteristica è dovuta alla presenza di una cisteina nella sequenza amminoacidica che forma il sito di legame per l'eme, il gruppo sulfidrilico di questo aminoacido, infatti, costituisce un quinto ligando per l'atomo di ferro eminico.

Questi enzimi sono presenti sia nei procarioti, a livello citosolico, che nelle cellule eucariotiche, dove sono ancorati sul lato esterno della matrice fosfolipidica del reticolo endoplasmatico oppure alla membrana interna mitocondriale. I citocromi P450 contengono un atomo di ferro nel gruppo prostetico, chiamato ferroprotoporfirina IX, che lega l'ossigeno insieme ai siti di legame per il substrato e utilizzano come donatore di elettroni la forma ridotta del nicotinammide-adenilnucleotide fosfato (NADPH) o del nicotinammide-adenilnucleotide (NADH). Durante la catalisi il P450 si lega al substrato e all'ossigeno molecolare, ma nella maggior parte dei casi, il trasferimento di protoni al sito catalitico non avviene direttamente; infatti, c'è bisogno della presenza di altri complessi enzimatici; ed è proprio in base alla natura di questi ultimi che possono essere distinte quattro classi di citocromo P450.

Nella prima classe gli elettroni sono trasferiti dal NADH in un primo momento alla ferredoxina reduttasi, una flavoproteina che contiene flavina adenin dinucleotide (FAD) come gruppo prostetico, poi da essa vengono trasportati ad una proteina ferro-zolfo, la ferredoxina, ed infine al citocromo P450.

Gli enzimi appartenenti alla seconda classe ricevono gli elettroni provenienti dal NADPH attraverso la NADPH-citocromo P450-reduttasi (Fig. 10), una flavoproteina che contiene come gruppi prostetici flavina mononucleotide (FMN) e FAD.

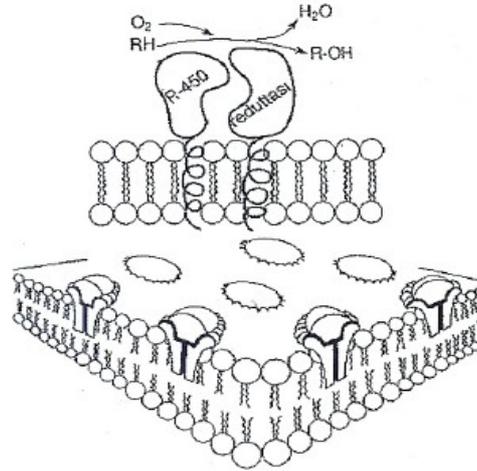


Figura 10

La terza classe comprende citocromi P450 che per agire non richiedono la presenza di ossigeno molecolare e di una fonte esterna di elettroni. I citocromi P450 appartenenti alla quarta classe ricevono gli elettroni direttamente dal NADH, essi sono stati trovati solo nei funghi, dove riducono l'NO, generato attraverso denitrificazione, a N₂O.

Gli enzimi della prima e della seconda classe possono partecipare alla detossificazione oppure, più raramente, all'attivazione di xenobiotici; possono metabolizzare farmaci e pesticidi ed hanno un ruolo importante nei processi di carcinogenesi. I membri delle ultime due classi, invece, vengono considerati reminiscenze di una forma ancestrale, coinvolta nella detossificazione di specie dannose provenienti dall'ossigeno.

Il citocromo P450 è costituito da una singola catena polipeptidica, durante l'evoluzione la funzione ossidativa e la conformazione tridimensionale delle varie isoforme sono state conservate, mentre la sequenza amminoacidica e la specificità catalitica sono andate sempre più diversificandosi. Confronti fra le sequenze amminoacidiche delle varie isoforme infatti, hanno rivelato che ci sono forti differenze nella struttura primaria e in alcuni casi l'omologia risulta inferiore al 20%; tale osservazione ha portato alla conclusione che i vari componenti di questa superfamiglia vengono codificati da geni distinti. Pertanto fra le isoforme ci sono differenze riguardanti il peso molecolare (compreso fra 48 e 57 kDa), la specificità di substrato, le proprietà spettrali, la stereo e la regio selettività. Studi condotti sulla struttura secondaria, attraverso tecniche di dicroismo circolare e computazionali, hanno evidenziato la presenza di tratti amminoacidici ripiegati

a formare sia α -eliche che β -foglietti. Mediante immagini a raggi X e modelli computazionali è stata rivelata la struttura tridimensionale di alcuni citocromi idrosolubili, soprattutto batterici, poichè nelle cellule eucariotiche essi sono immersi in membrane fosfolipidiche e risultano difficili da cristallizzare. Da queste analisi è emerso che il ripiegamento strutturale della proteina è rimasto pressoché inalterato (61), e che la regione maggiormente conservata è quella del “core”, cioè la porzione proteica che circonda l’eme, che è coinvolta nel trasferimento degli elettroni e nell’attivazione dell’ossigeno molecolare.

La ferroprotoporfirina IX (Fig 11) è inserita in una tasca idrofobica localizzata a livello del “core” dove stabilisce interazioni idrofobiche e attrazioni coulombiane con l’apoproteina, inoltre si viene a generare il legame di coordinazione fra il ferro eminico al centro dell’anello tetrapirrolico e un residuo di cisteina dell’apoproteina.

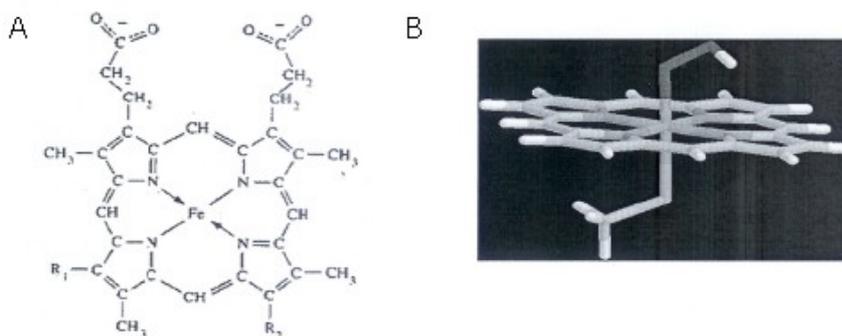


Figura 11 A) Schema del gruppo prostetico del citocromo P450; B) Modello tridimensionale

L’atomo di ferro eminico può essere penta- o esacoordinato, in questa configurazione risulta pentacoordinato e si trova in una condizione chiamata di “high spin” (Fig.12A). Il ferro, nella sua forma ossidata (Fe^{3+}), è in grado di stabilire un sesto legame con un ligando, che può essere rappresentato dall’atomo di ossigeno di una molecola d’acqua oppure, nelle cellule eucariotiche, dall’acido oleico, un lipide che si trova nella membrana del reticolo endoplasmatico; così l’atomo è esacoordinato e si trova in una condizione chiamata di “low spin” (Fig.12B). Lo spettro di assorbimento del citocromo P450 risulta diverso fra le due configurazioni, infatti, nello stato di “high spin” esso presenta un picco massimo alla lunghezza d’onda di 392 nm mentre nello stato di “low spin” a 416 nm. Solo quando l’atomo di ferro viene ridotto (Fe^{2+}), è capace di stabilire il sesto legame con l’ossigeno molecolare, necessario per lo svolgimento della reazione monoossigenasica.

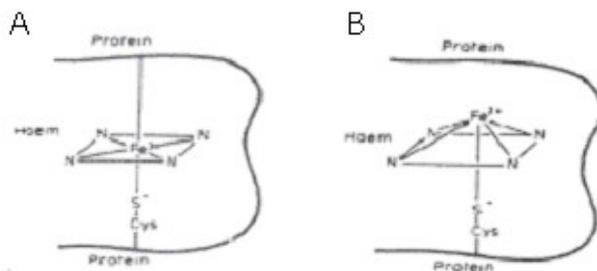
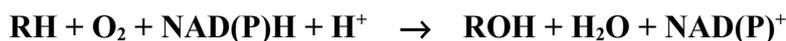


Figura 12

3.1.2 Il citocromo P450: La reazione monoossigenasica

La reazione di base catalizzata da tutti i citocromi P450 conosciuti è una monoossigenazione, che presenta un meccanismo conservato, nonostante possa essere coinvolta in svariati processi (62).

Durante questa reazione un atomo dell'ossigeno molecolare viene incorporato nel substrato mentre l'altro viene ridotto ad acqua. Essa può essere schematizzata come segue:



dove RH sta ad indicare il substrato mentre ROH sta ad indicare il substrato idrossilato.

Il sistema monoossigenasico può essere coinvolto in molte reazioni sia ossidative sia riduttive, fra esse sono comprese:

- l'idrossilazione di un carbonio alifatico o aromatico,
- l'epossidazione di un doppio legame,
- l'ossidazione di eteroatomi (S-, N-, I-) e N-idrossilazione,
- la dealchilazione di eteroatomi (O-, S-, N-),
- la rottura degli esteri,
- la deidrogenazione.

Tali reazioni sono importanti ai fini del processo di biotrasformazione e quindi per la detossificazione, comunque se il ciclo monoossigenasico si interrompe prima del suo compimento, si possono formare specie reattive dell'ossigeno.

1.1.3 Il citocromo P450: nomenclatura

Gli enzimi appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 sono identificati mediante una nomenclatura basata sull'omologia della sequenza aminoacidica, e non quella enzimatica classica, dal momento che una stessa isoforma può generalmente catalizzare più di una reazione. Sulla base dell'omologia della struttura primaria si possono distinguere famiglie, i cui membri mostrano un'omologia di sequenza superiore al 40%, sottofamiglie,

nelle quali l'omologia è superiore al 55%, e singole isoforme. Per indicare ognuna di esse è utilizzata la sigla CYP, dove CY sta per citocromo mentre P per P450, ad essa viene affiancato un numero arabo, che indica la famiglia di appartenenza, seguito da una lettera alfabetica maiuscola, che designa la sottofamiglia, ed infine da un altro numero arabo che rappresenta la singola isoforma **(63)**.

Questa classificazione, come già detto, non tiene conto delle proprietà metaboliche delle varie isoforme, pertanto enzimi appartenenti alla stessa famiglia possono presentare capacità catalitiche diverse e possedere una differente specificità di substrato. Dal punto di vista genico, citocromi P450 appartenenti alla stessa sottofamiglia spesso costituiscono un unico "cluster" di geni. Le singole isoforme, inoltre, possono presentare più varianti alleliche; esse sono definite quando sequenze nucleotidiche diverse danno origine a proteine con sequenze aminoacidiche divergenti per meno del 3% **(64)**.

Fino ad oggi sono state descritte circa 200 famiglie di citocromo P450, di cui 18 presenti in tutte le specie di mammifero; quest'ultime possiedono un alto numero di geni codificanti per diverse isoforme, in particolare nel genoma di ratto sono stati identificati e sequenziali 84 geni, 103 nel topo e 57 nell'uomo **(65)**.

3.2.1 DT-diaforasi

Gli enzimi appartenenti alla famiglia della DT-diaforasi vengono chiamati anche NAD(P)H-chinone-ossidoreduttasi (NQO) data la loro capacità di ridurre i chinoni ad idrossichinoni usando il NAD(P)H come cofattore **(66)**. Tali enzimi si trovano nel citosol, in forma di omodimeri del peso di 27 kDa, e sono flavoproteine, dal momento che contengono FAD e FMN come gruppi prostetici. Essi sono espressi in tutti i mammiferi, ma la loro distribuzione tissutale nelle varie specie non è la stessa. Nell'uomo sono presenti due forme dell'enzima, la NQO1, maggiormente presente, e la NQO2 che presenta un'espressione polimorfica **(66)**.

Il meccanismo di reazione delle DT-diaforasi implica il trasferimento di due elettroni al substrato impedendo così la formazione di semichinoni, ciò risulta utile all'organismo per la detossificazione dei chinoni esogeni, come gli epossidi e i derivati delle arilamine. La NQO1 ha anche un ruolo nel metabolismo endogeno, infatti, può ridurre il menadione, la vitamina K₃, che, una volta convertito in idrochinone assume la capacità di partecipare ad importanti vie fisiologiche quali la cascata coagulativa ed il metabolismo osseo. Questa isoforma di DT-diaforasi, inoltre, può prevenire la perossidazione lipidica attraverso la riduzione dell'ubichinolo e della vitamina E, che rappresentano due importanti

antiossidanti biologici. Questi enzimi però possono anche attivare alcuni xenobiotici, quali la streptonigrina, la mitomicina C e il diazichinone, causando stress ossidativo e favorendo l'alchilazione del DNA. In più le isoforme di DT-diaforasi risultano over-esprese in molti tumori come quelli polmonari, epatici, del colon e della mammella.

L'attività di questi enzimi è inibita dal dicumarolo, e la loro espressione genica è indotta da composti come il 3-metilcolantrene (3-MC), alcuni antiossidanti come il 3-tert-butil-4-idrossinisolo (BHA) ed altri composti attraverso l'attivazione del recettore nucleare AhR. Tale processo risulta tessuto-specifico, sesso-specifico e specie-specifico.

3.2. ENZIMI DI FASE 2

3.2.1 Glutathione-S-transferasi

La famiglia della glutathione-S-transferasi (GST) comprende vari isoenzimi capaci di catalizzare la coniugazione di sostanze chimiche elettrofile, in particolare epossidi, con il gruppo sulfidrilico del glutathione ridotto, un tripeptide composto da glicina, cisteina ed acido glutammico, quest'ultimo legato mediante un legame γ -glutamilico. Questi enzimi sono omodimeri o più raramente eterodimeri, con un peso di 25 kDa circa e sono distinti in due superfamiglie:

- superfamiglia microsomiale, i cui enzimi sono circa il 5% delle GST totale ed hanno un ruolo importante nel metabolismo endogeno di leucotrieni e prostaglandine
- superfamiglia citosolica e mitocondriale, comprende circa il 95% delle GST totali, le quali sono coinvolte nella detossificazione di xenobiotici.

Per quanto riguarda le GST citosoliche, sino ad oggi, nei mammiferi sono state identificate 18 diverse subunità (GSTA1-5, GSTM1-6, GSTP1-2, GSTT1-3, GSTO1 e GSTZ1) che si combinano a formare l'enzima attivo e vengono classificate in sette classi (α , μ , ω , π , σ , τ , ζ) la κ è propria delle GST mitocondriali e, sia nell'uomo sia nei roditori, comprende un singolo rappresentante (68). I dimeri si formano fra subunità appartenenti alla stessa classe e che presentano un'omologia nella struttura primaria superiore al 70%, essi inoltre mostrano distintive capacità catalitiche e di legame ai vari substrati. Generalmente le GST appartenenti a classi diverse mostrano un'omologia di sequenza minore al 25% mentre quelle di una stessa classe presentano un'identità maggiore al 40%.

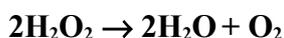
La reazione catalizzata da questa famiglia di enzimi gioca un ruolo importante nella detossificazione, infatti, vengono metabolizzati composti elettrofili che, per le loro caratteristiche, sono capaci di legarsi alle proteine ed al DNA, determinando danni cellulari

e mutazioni genetiche. Le varie isoforme di GST partecipano anche alla protezione contro lo stress ossidativo dei lipidi, catalizzando la decomposizione dei perossidi che si formano da tali molecole (69). Oltre ad avere effetti positivi, questi enzimi possono anche essere coinvolti nell'attivazione di xenobiotici a composti tossici per l'organismo, inoltre è stata riscontrata un'over-espressione delle isoforme della classe π in alcuni tumori di ratto e umani.

L'espressione delle GST citosoliche può essere regolata da xenobiotici e da ormoni che sono tessuto, sesso e specie specifica. La diversità degli induttori, fra i quali sono compresi idrocarburi policiclici aromatici, specie tossiche dell'ossigeno, barbiturici ed antiossidanti fenolici, fa supporre che il processo modulatore di questi enzimi sia a carico di più meccanismi di regolazione in cui sono coinvolti i recettori nucleari AhR, CAR e PXR.

3.2.2 Catalasi (CAT)

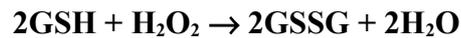
La catalasi è un enzima capace di proteggere la cellula dagli effetti tossici del perossido di idrogeno catalizzando la sua decomposizione in ossigeno molecolare ed acqua senza la produzione di radicali liberi. Nella reazione vengono utilizzate due molecole H_2O_2 , delle quali una agisce da substrato riducente mentre l'altra da accettrice di elettroni:



La catalasi, nonostante abbia una velocità di turnover molto alta, infatti, al secondo ogni mole di enzima può decomporre 44 milioni di moli di H_2O_2 , presenta una K_m molto elevata per cui risulta inefficace quando la concentrazione del substrato è bassa. Dal punto di vista strutturale, la catalasi è un tetramero di 250 kDa le cui subunità contengono un gruppo eminico con ferro trivalente, a livello del quale avviene l'interazione con il perossido di idrogeno. Questo enzima è localizzato soprattutto a livello dei perossisomi ed è presente in tutti i tessuti animali, in maggior modo nel fegato.

3.2.3 Glutazione perossidasi (GSH Perox)

La famiglia delle glutazione perossidasi è costituita da glicoproteine tetrameriche contenenti quattro residui di selenocisteine che svolgono un'importante funzione antiossidante. Infatti, esse sono in grado di ridurre i perossidi ad acqua ed alcool e il perossido di idrogeno a due molecole d'acqua, come donatrici di elettroni utilizzano due molecole di glutazione ridotto, il più potente antiossidante prodotto dall'organismo:



I vari isoenzimi appartenenti a questa famiglia differiscono per localizzazione cellulare e specificità di substrato; nei mammiferi sono presenti almeno quattro isoforme, la più studiata è la glutatione perossidasi 1, una forma citosolica che presenta una distribuzione ubiquitaria all'interno dell'organismo.

3.2.4 **Glutatione reduttasi (GSSG Red)**

La glutatione reduttasi è un enzima capace ridurre la forma ossidata del glutatione utilizzando due molecole di NADPH:



Il NADPH utilizzato viene prodotto dalla reazione catalizzata dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi, coinvolta nello shunt dell'esoso monofosfato. La glutatione reduttasi ha un ruolo importante all'interno dell'organismo, infatti, ripristinando i livelli di glutatione ridotto all'interno della cellula, consente a quest'ultima di mantenere la sua capacità di rispondere allo stress ossidativo. Dal punto di vista proteico l'enzima è un dimerico del peso di 105 kDa costituito da due catene polipeptidiche identiche e contiene, come gruppi prostetici, due molecole di FAD. In ogni catena è possibile distinguere quattro domini diversi: il sito di legame del substrato, quello per il NADPH, quello per il FAD e un dominio interfaccia.

CAPITOLO 4

LISOSAN G: NUTRACEUTICO CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

4.1. Il Lisosan G

Da una particolare lavorazione di cruschetto e germe di grano biologico nasce il Lisato di Grano, nutraceutico, denominato commercialmente Lisosan G. E' un prodotto probiotico, completamente naturale e biologico, certificato dal Ministero come integratore alimentare. La sua metodica di preparazione, senza aggiunta di sostanze chimiche, è volta ad esaltare la peculiare componentistica nutritiva del cereale, e parallelamente, a mettere in rilievo altre proprietà benefiche, altrimenti latenti. I chicchi di grano, in primo luogo, vengono fatti fermentare alla temperatura controllata di 35°C per non far degradare gli enzimi, dopodiché, vengono fatti essiccare; durante questa fase il grano perde la componente acquosa, che viene poi prelevata.

La sua preparazione consiste nel lisare tutta la componentistica macromolecolare, per rendere accessibili agli enzimi delle pareti intestinali i principi attivi che altrimenti resterebbero integri e quindi non utilizzabili dal nostro organismo.

4.1.1. Caratteristiche del Lisosan G

Il Lisosan G si presenta come una polvere bruna, dal sapore acidulo e ricca in vitamine, minerali, acidi grassi, amminoacidi, e altre sostanze importanti per la nostra nutrizione (Tab. 3).

TABELLA 3**ALCUNE COMPONENTI DEL LISOSAN G**

(i dati riportati possono subire variazione, trattandosi di un prodotto naturale)

Proteine	174 g/kg
Lipidi	147 g/kg
Glucidi	372 g/kg
Cellulosa	26 g/kg
Fosforo	13 g/Kg
Zolfo	1,9 g/Kg
Sodio	5,4 g/Kg
Magnesio	4,1 g/Kg
Calcio	10 g/Kg
Ferro	0,1 g/Kg
Zinco	0,13 g/Kg
Rame	0,01 g/Kg
Selenio	57 µg/kg
Acido Linolenico (Omega-3)	3 g/kg
Acido Linoleico (Omega-6)	33 g/kg
Acido Oleico	7,4 g/kg
Tocoferoli	0,02 g/kg
Vitamina B1	3,8 µg/Kg
Vitamina B2	0,9 µg/Kg
Vitamina B6	2,2 µg/Kg
Nicotinamide	1,3 µg/Kg
Octacosanolo	12,3 g/kg

I tocoferoli rappresentano la forma attiva della vitamina E, un antiossidante in grado di proteggere dalla perossidazione i lipidi ed altre componenti delle membrane cellulari; la sua carenza infatti si ripercuote sull'integrità delle membrane ricche in acidi grassi insaturi. Inoltre, la vitamina E è coinvolta in vari processi fisiologici; partecipa alla respirazione cellulare di tutti i muscoli, specialmente quelli cardiaci e scheletrici, mettendoli in grado di funzionare con meno ossigeno, e aumentando la resistenza agli sforzi prolungati; promuove la dilatazione dei vasi sanguigni, e quindi un maggior afflusso di sangue al cuore, rinforza le pareti dei capillari ed ha azione antitrombigena.

Probabilmente la vitamina E è anche coinvolta nel metabolismo del calcio, correggendo l'eccessivo o lo scarso deposito nell'organismo. La sua azione antiossidante è potenziata dal selenio, cofattore della glutatione perossidasi che con un meccanismo non ancora chiarito, incrementa la ritenzione della vitamina E nelle lipoproteine del sangue dalle quali viene trasportata. Inoltre il selenio è un oligominerale importante anche per la risposta del nostro sistema immunitario contro gli attacchi batterici.

Le vitamine del gruppo B (B1, B2, B6), partecipano come coenzimi alle più importanti reazioni enzimatiche da cui le cellule, e quindi l'uomo, traggono energia. La vitamina B1, inoltre, favorisce la salute della pelle, supporta il sistema nervoso e normalizza l'appetito, mentre la vitamina B6 è coinvolta nel metabolismo degli amminoacidi ed aiuta la formazione dei globuli rossi.

L'acido linolenico, appartenente alla classe degli omega-3, e l'acido linoleico, appartenente agli omega-6, sono acidi grassi essenziali in quanto non possono essere sintetizzati direttamente dal nostro organismo, ma vengono assunti mediante la dieta. Sono indispensabili per il corretto funzionamento dell'organismo e molto importanti per il mantenimento delle membrane cellulari.

L'octacosanolo è una molecola a 28 atomi di carbonio appartenente al gruppo degli alcoli, in grado di migliorare la prestazione atletica e la funzionalità dell'ipofisi, ottimizzando l'efficienza fisica e mentale.

Esperimenti condotti nei nostri laboratori hanno confermato che il Lisosan G ha attività antiossidante, e che l'alimentazione con questa sostanza per quattro giorni protegge i ratti dal danno epatico indotto dal tetracloruro di carbonio, un composto molto tossico per l'organismo in quanto capace di innescare reazioni a catena radicaliche che degradano le membrane cellulari (70). Inoltre l'alimentazione con Lisosan G non sembra interferire con gli enzimi del metabolismo dei farmaci, e quindi potrebbe essere assunto anche da individui sotto trattamento terapeutico.

4.2. Il sistema antiossidante

Le cellule dei diversi tessuti dell'organismo sono costantemente esposte all'azione tossica e potenzialmente mutagena di una serie di agenti ossidanti costituiti da specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), metaboliti elettrofilici e prodotti della lipoperossidazione, generati endogenamente o da composti esogeni che costituiscono diversi fattori di stress ambientale (aria, acqua, cibo). Elevati livelli di specie "reattive" alterano la normale funzionalità cellulare interagendo direttamente con le macromolecole (proteine, lipidi, DNA nucleare e mitocondriale) che costituiscono le strutture cellulari, o indirettamente innescando una ulteriore produzione e propagazione di un sempre maggior numero di molecole reattive ed il risultato finale di questa cascata di reazioni è una disfunzione e/o la morte cellulare. Per contenere o attenuare l'insulto ossidativo, si è sviluppato negli organismi superiori un sistema di difesa antiossidante, la cui induzione

rappresenta non solo una risposta adattativa alla condizione di stress ossidativo, ma anche una nuova possibilità terapeutica (71).

Questo sistema di difesa è rappresentato non solo da enzimi antiossidanti, ma anche da enzimi che regolano lo stato redox dell'ambiente cellulare come la glucosio 6-fosfato deidrogenasi, la glutatione reduttasi (GR) e la tioredoxina reduttasi (TR) che rigenerano rispettivamente NADPH, il glutatione (GSH) e la tioredoxina (Trx), la gamma-glutamylcisteina sintasi (γ -GCS) che catalizza la tappa limitante della biosintesi del glutatione, da enzimi di riparazione del DNA, da proteine del sistema di degradazione del proteasoma, chaperones e stress proteins, nonché da enzimi di fase 2 del metabolismo degli xenobiotici che includono la NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi (NQO1) e la glutatione-S-transferasi (GST), la UDPglucuronosil transferasi (UGT), l'aldeide reduttasi (AR), epossido idrolasi (EH) che conducono alla detossificazione e all'eliminazione dei carcinogeni e l'eme ossigenasi (HO).

Benchè gli enzimi di fase 2 siano tradizionalmente identificati come aventi una azione detossificante di substrati endo e xenobiotici, questa classificazione si sta espandendo fino ad includere proteine che catalizzano un ampio spettro di reazioni che conferiscono citoprotezione contro la tossicità di elettrofilo e specie reattive dell'ossigeno.

Questi enzimi proteggono la cellula contro la tossicità delle specie reattive (e dei potenziali cancerogeni) attraverso una varietà di reazioni tra cui le principali sono rappresentate dalla conversione a specie meno reattive e meno tossiche mediante coniugazione con substrati endogeni tra cui glutatione, acido glucuronico o il solfato che aumentano la solubilità della molecola e ne facilitano così l'escrezione e dall'aumento della capacità antiossidante cellulare attraverso la generazione di antiossidanti endogeni quali, ad esempio, GSH e bilirubina (Fig. 13) (72).

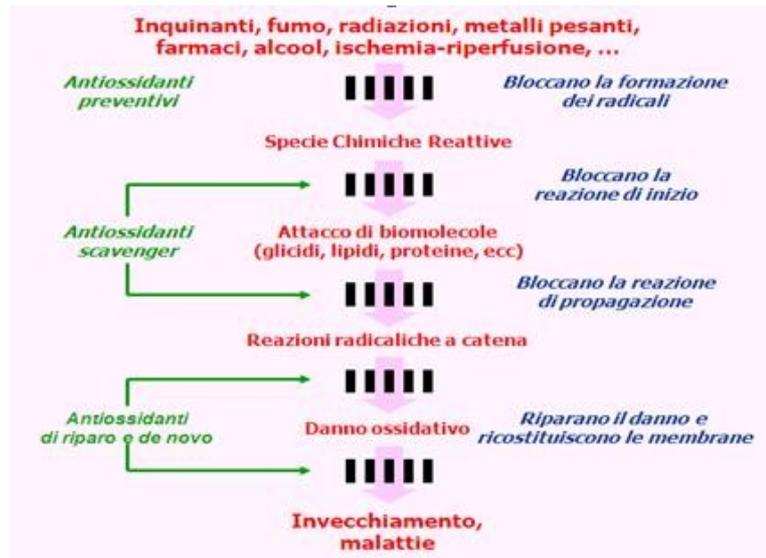


Figura 13

L'induzione di tali enzimi risulta in una detossificazione ed eliminazione sia di potenziali cancerogeni che di specie reattive dell'ossigeno prodotte da fonti endogene, composti elettrofilici e ossidati con conseguente protezione delle strutture cellulari bersaglio della loro tossicità. La conseguenza principale di tale induzione sarebbe quindi un rafforzamento della capacità antiossidante cellulare. La up-regolazione del sistema antiossidante endogeno rappresenta quindi potenzialmente una strategia per la riduzione del rischio di patologie, in particolare quelle cronico degenerative, in cui lo stress ossidativo rappresenta un fattore causale (73).

Anche se le reazioni di ossidazione sono fondamentali per la vita, possono essere altrettanto dannose, perciò piante ed animali mantengono complessi sistemi di molteplici tipi di antiossidanti; livelli troppo bassi di antiossidanti o di inibizione degli enzimi antiossidanti causano stress ossidativo e possono danneggiare o uccidere le cellule.

Il sistema di difesa antiossidante è, quindi, molto importante per difendere e mantenere l'integrità delle cellule, per tale motivo, negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse nei confronti di sostanze antiossidanti di origine naturale, ritenute importanti per il mantenimento di un buono stato di salute. Così come lo stress ossidativo potrebbe essere la causa di molte malattie umane, così l'uso degli antiossidanti in farmacologia è stato intensamente studiato, in particolare nei trattamenti dell'ictus e delle malattie neurodegenerative. Gli antiossidanti sono largamente usati come ingredienti negli integratori alimentari, con la speranza di mantenere il benessere fisico e prevenire malattie come cancro e cardiopatie coronariche.

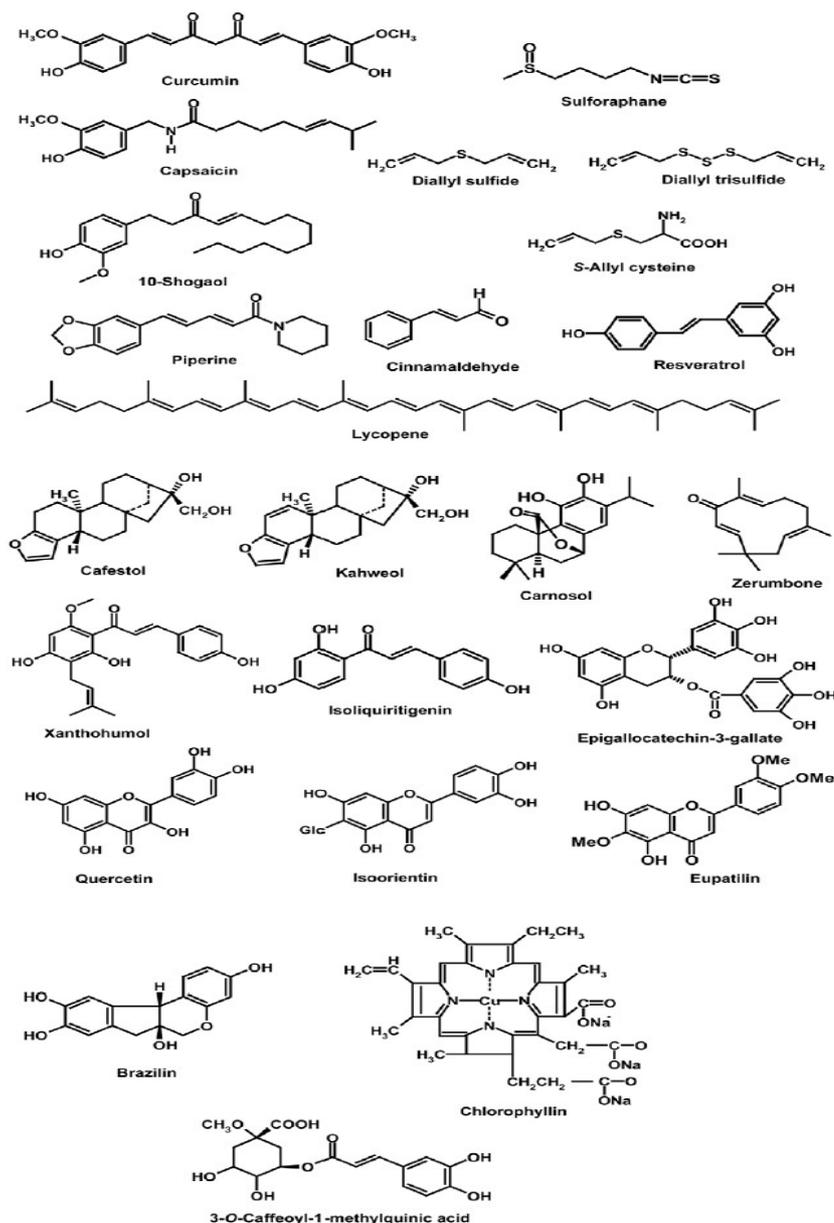
Numerosi studi mostrano che molte piante, inclusi gli estratti di grano, esibiscono attività antiossidanti e potrebbero, quindi, essere utili nella prevenzione contro il danno ossidativo. Inoltre, le piante producono metaboliti secondari, chiamati così in quanto sono prodotti del metabolismo non essenziali per la semplice crescita, sviluppo o riproduzione della pianta, ma hanno un ruolo di natura ecologica (repellenza, difesa dai parassiti, difesa dagli erbivori, attrazione degli impollinatori), e dal loro studio è emerso che essi hanno diverse attività farmacologiche: antiipertensive, antiinfiammatorie, antiaritmiche e cardiotoniche.

4.3. Antioxidant Responsive Element (ARE) e ARE induttori

L'induzione di molti enzimi citoprotettivi in risposta ad uno "stress chimico" è regolato principalmente a livello trascrizionale. Questa risposta coordinata è regolata attraverso l'Antioxidant Response Element o ARE, una sequenza enhancer presente nella regione del promotore di numerosi geni che codificano per enzimi citoprotettivi. La sequenza ARE possiede caratteristiche strutturali e biologiche che caratterizzano la sua responsività allo stress ossidativo; è infatti attivata non solo in risposta ad H_2O_2 , ma in modo specifico da composti chimici suscettibili di cicli ossidoriduttivi o di essere trasformati in un intermedio elettrofilo reattivo. Alterazioni dello stato redox cellulare dovute ad elevati livelli di specie reattive ROS e specie elettrofile e/o una ridotta capacità antiossidante (es. glutazione) rappresentano importanti segnali per l'innescò della risposta trascrizionale mediata da questo enhancer. ARE viene attivato da numerose molecole strutturalmente diverse, tra cui composti planari come i flavonoidi e gli antiossidanti fenolici, composti contenenti gruppi tiolici come gli isotiocianati e gli 1,2-ditiol-3-tioni, metalli pesanti e complessi contenenti il gruppo eme.

I composti che inducono l'espressione di enzimi citoprotettivi in modo ARE dipendente sono complessivamente chiamati ARE induttori; essi costituiscono un ampio gruppo di sostanze in grado di aumentare la capacità antiossidante cellulare con un meccanismo che può essere considerato di tipo antiossidante indiretto. Tali proprietà sono condivise da alimenti di origine vegetale di regolare consumo e da altri prodotti naturali (74) che sono attualmente ampiamente investigati in virtù della loro relativamente bassa tossicità, ampia disponibilità, nonché per loro implicazioni come alimenti salutistici o funzionali (Tab. 4). Il successo nell'uso di prodotti naturali per up-regolare gli enzimi citoprotettivi nell'uomo è strettamente dipendente dalla conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano questa up-regolazione

TABELLA 4
ARE INDUTTORI



4.4. La via di segnalazione ARE-mediata e i meccanismi di difesa:

ruolo della proteina Nrf2

Un ruolo centrale nella modulazione della risposta trascrizionale ARE mediata è rivestito dal fattore di trascrizione nucleare, “Nuclear factor erythroid-2-related factor 2” (Nrf2) che è un fattore di trascrizione di tipo leucina zipper, isolato inizialmente attraverso esperimenti di clonazione (75). La proteina NF-E2 attiva la trascrizione in seguito al legame con la sequenza 5'-TGCTGAGTCAC-3' sul DNA, formando un etero dimero con subunità di 45 e 18 kDa.

Il ruolo critico di Nrf2 nell'espressione dei geni di fase 2 ed antiossidanti è stata ulteriormente confermata da studi di espressione genica in topi che non esprimono Nrf2; confrontati a topi wild-type mostravano ridotti livelli di enzimi antiossidanti ed una maggiore sensibilità ai carcinogeni (76).

Il coinvolgimento di Nrf2 nell'espressione sia costitutiva, sia inducibile dei geni "ARE-dipendenti", è ben stabilita e documentata in numerosi studi sia in vitro che in vivo (77) tanto che attualmente il sistema Nrf2/ARE è riconosciuto come uno dei principali meccanismi di difesa cellulare contro stress ossidativo e xenobiotico.

Aumentati livelli di Nrf2 sono stati riportati up-regolare l'espressione genica indotta da vari antiossidanti naturali ed agenti chemio preventivi quali isotiocianati, solfuri diallilici, indoli, terpeni, e composti fenolici come le catechine del tè verde, la quercetina, il resveratrolo e i curcuminoidi (78).

In aggiunta ai classici enzimi di fase 2, due geni che codificano per trasportatori cellulari sono stati scoperti essere sotto il controllo regolatorio di Nrf2: uno è il gene che codifica per il trasportatore cisteina-glutammato che media l'influsso di cisteina accoppiato con l'efflusso di glutammato intracellulare, essenziale per il mantenimento delle concentrazioni intracellulari di cisteina e conseguentemente dei livelli di glutatione; l'altro è il gene Mrp1, un membro della famiglia Multidrug-resistance-associated proteins, un trasportatore che ha un ruolo importante nell'esclusione cellulare dei metaboliti coniugati degli enzimi di fase 2.

Due proteine partecipano all'attivazione trascrizionale dei geni AREdipendenti: il fattore di trascrizione Nrf2 e la proteina Keap1 (kelchlike erythroid-cell-derived protein with CNC homology (ECH)- associated protein 1), una proteina citoplasmatica omologa alla proteina legante l'actina Kelch identificata nella *Drosophila* (79). Queste costituiscono, a livello citoplasmatico, un sistema sensore dello stress ossidativo, che costituisce il target molecolare primario degli induttori chimici e dei composti ad azione chemio preventiva. Quando le cellule sono esposte ad ARE induttori, quali ad esempio, ditiolioni, flavonoidi, isotiocianati, o a stress ossidativo, un segnale che coinvolge una modificazione redox e/o una fosforilazione è trasmesso al complesso Nrf2/Keap1, causandone la dissociazione e la conseguente traslocazione nucleare di Nrf2 (Fig. 14). In seguito alla formazione di un eterodimero, Nrf2 è in grado di legarsi alla sequenza ARE presente nella regione del promotore dei geni che codificano per gli enzimi di fase 2 aumentando anche la sua stessa trascrizione (80).

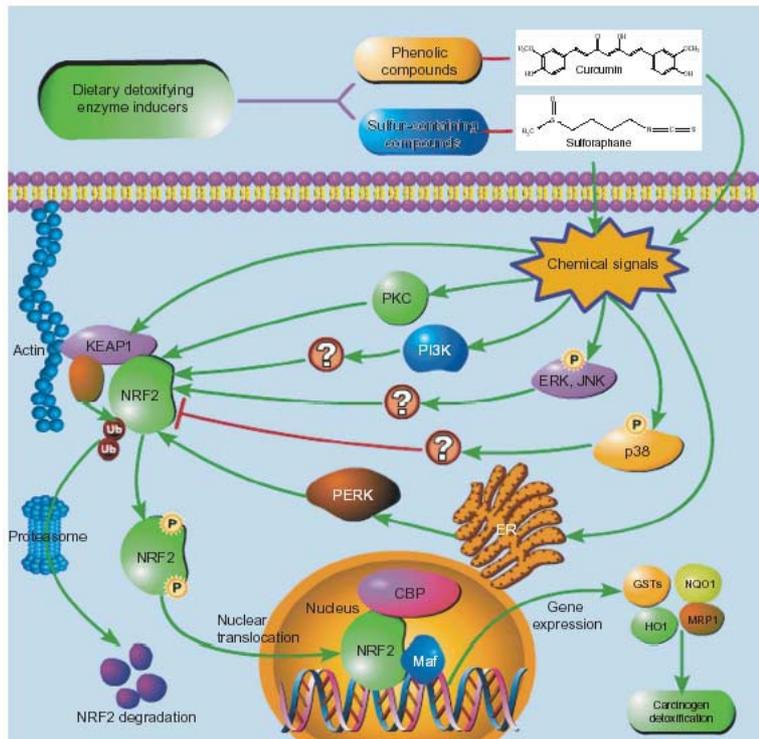


Figura 14

CAPITOLO 5

IL CIS-PLATINO

Il Cis-platino (cis-diammoniodicloroplatino) è un agente chemioterapico appartenente alla categoria dei farmaci generici, utilizzato come farmaco di prima scelta per il trattamento di carcinomi ai testicoli, ovaie, vescica, seno, testa, collo, polmone e stomaco **(81)**. Tuttavia, il suo uso in clinica è limitato a causa dell'elevata tossicità e dei numerosi effetti collaterali che provoca, quali, tra i più importanti, nefrotossicità, epatotossicità, neurotossicità e sterilità. La tossicità del Cis-platino è associata ad un incremento della perossidazione lipidica, ad una riduzione dell'attività degli enzimi ad azione antiossidante e ad un calo della concentrazione di glutatione (GSH) intracellulare. Infatti, anche se il meccanismo di nefrotossicità non è completamente chiaro, l'effetto protettivo degli *scavenger* di radicali liberi e degli antiossidanti, suggeriscono che lo stress ossidativo possa essere responsabile del danno indotto dal farmaco.

Il Cis-platino è un complesso planare platino coordinato a pianta quadrata, costituito da un atomo di platino a cui sono legati due atomi di cloro e due molecole di ammoniaca in posizione *cis* (Fig. 15). La molecola è idrosolubile, per questo motivo, una volta somministrato, il farmaco si lega per il 90% alle proteine sieriche e si distribuisce in molti tessuti, accumulandosi maggiormente nei reni, da dove viene escreto e dove provoca i principali danni.

La nefrotossicità si sviluppa in primo luogo a livello dei tubuli contorti prossimali ed è caratterizzata dalla distruzione degli organelli intracellulari, dalla perdita dei microvilli, dall'alterazione del numero e della struttura dei mitocondri, seguita da alterazioni funzionali quali inibizione della sintesi proteica, deplezione del glutatione, perossidazione lipidica e danni mitocondriali **(82)**.

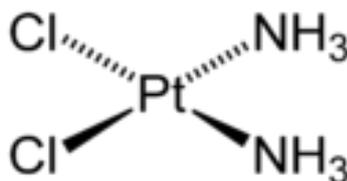


Figura 15

5.1. Meccanismo d'azione del Cis-platino

Una volta somministrato, per via intravenosa o intraperitoneale, il farmaco entra all'interno delle cellule mediante Ctr1, principale trasportatore del rame nella cellula (83). Una volta dentro la cellula, la molecola perde i due atomi di cloro, rimossi lentamente uno dopo l'altro dall'acqua, a causa della bassa concentrazione di ioni cloro nell'ambiente intracellulare, lasciando così un complesso reattivo che interagisce prima con l'acqua stessa e dopo con diverse strutture cellulari quali il DNA, formando con esso ponti inter e intrafilamento. Gli addotti Cis-platino-DNA possono causare l'inibizione della trascrizione, arresto del ciclo cellulare in fase G2 e apoptosi, e sono così responsabili della citotossicità delle cellule cancerogene.

E' stato dimostrato che i ponti intrafilamento (*intrastrand cross-link*) danno i maggiori contributi citotossici, e che il Cis-platino è molto più citotossico del Trans-platino, in quanto forma preferenzialmente legami a ponte intrafilamento (in particolare gli 1,2), mentre il suo isomero forma legami a ponte interfilamento (Fig. 16).

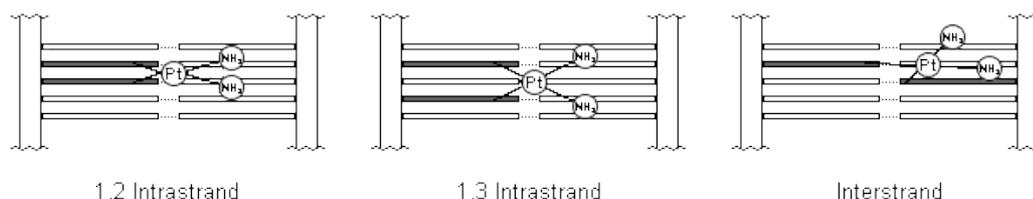


Figura 16

E' stato dimostrato che tra i quattro residui di acidi nucleici il Cis-platino tende preferenzialmente ad associarsi con la guanina (Fig.17).

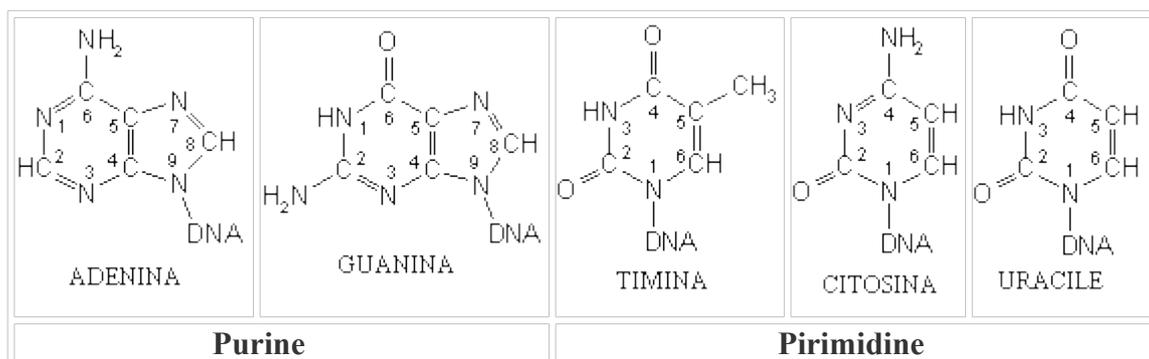


Figura 17

Inizialmente si credeva che il legame di interazione del farmaco con il DNA riguardasse l'O⁶, tuttavia in seguito è stato osservato che il sito fondamentale di interazione era l'N⁷ della guanina; essendo bifunzionale, il Cis-platino si legherà con due siti N⁷.

L'interazione tra Cis-platino e DNA provoca modificazioni della struttura del DNA, in quanto la formazione degli addotti causa rotture significative nella disposizioni delle basi per ospitare la struttura planare quadrata della molecola e uno snodamento della doppia elica.

I tioli come lo zolfo ed il GSH si legano facilmente alla molecola di platino, sostituendo uno degli atomi di cloro, prevenendone il legame con DNA, RNA e proteine. In cellule mononucleari isolate dal sangue periferico, un incremento della concentrazione del GSH intracellulare è correlato con un calo di addotti Cis-platino-DNA **(84)**, mentre studi sulle cellule tumorali hanno mostrato una correlazione tra elevati livelli di GSH e resistenza all'azione anticancerogena del farmaco.

Una serie di studi volti a determinare il ruolo dell'enzima gamma-glutamyltransferasi (GGT) sulla tossicità indotta dal Cis-platino hanno rivelato che nelle cellule tumorali l'espressione di questo enzima incrementa la resistenza al Cis-platino, mentre nel rene l'espressione di GGT rende le cellule sensibili alla tossicità prodotta dal farmaco **(85)**.

La GGT è un enzima di superficie presente nella membrana delle cellule e la sua più alta attività è presente nel rene, sulla superficie luminale delle cellule del tubulo contorto prossimale. La GGT agisce a livello del legame γ -glutamminico presente tra il carbonio in posizione γ del glutammato e un gruppo amminico terminale, infatti sono substrati della GGT tutti i gamma-glutammin-composti, quali il GSH del quale idrolizza il legame γ -glutamminico tra l'acido glutammico e la cisteina, determinando così il rilascio del dipeptide cisteinil-glicina, ulteriormente degradato ad opera di dipeptidasi della membrana plasmatica; i residui di cisteina e glicina entrano nella cellula attraverso trasportatori specifici. Il residuo di acido glutammico invece è trasferito su un amminoacido accettore, per poi essere trasportato dentro la cellula dove può essere riutilizzato per la sintesi del GSH intracellulare.

L'inibizione della GGT ostacola la nefrotossicità provocata dal Cis-platino sia su ratti, che in topi trattati con il farmaco **(86)**.

I differenti ruoli della GGT nell'attività antitumorale del Cis-platino indicano che il meccanismo con cui il farmaco agisce sulle cellule tumorali è diverso rispetto a quello con cui agisce sulle cellule del tubulo contorto prossimale del rene.

Studi in vivo su colture cellulari hanno mostrato che la nefrotossicità provocata dal Cis-platino si manifesta in seguito al metabolismo della molecola, effettuato per mezzo di intermedi GSH-coniugati come gli alcheni alogenati, durante il quale essa viene attivata.

Inibendo la coniugazione del Cis-platino con il GSH, quindi, si ha una riduzione della tossicità a livello renale.

Il meccanismo molecolare con il quale il Cis-platino uccide le cellule renali è dipendente dalla concentrazione del farmaco e dallo stato antiossidante delle cellule **(87)**, infatti, è stato dimostrato che elevate concentrazioni di GSH hanno un ruolo protettivo sulla tossicità indotta dal farmaco **(88)**. La quantità di GSH necessaria per realizzare questo effetto protettivo è 30/40 volte più elevato della dose di Cis-platino somministrata, in quanto il GSH, essendo il substrato fisiologico della GGT, agisce come inibitore competitivo dell'enzima, quando è presente ad alti livelli nel fluido extracellulare **(89)**.

Le cellule tubulari danneggiate spesso vanno incontro a morte cellulare, che può essere accidentale, definita anche necrosi, oppure programmata, chiamata apoptosi.

L'induzione dell'apoptosi o morte programmata delle cellule è un meccanismo comune con il quale molti farmaci citotossici, incluso il Cis-platino, agiscono uccidendo le cellule tumorali **(90)**. Il processo dipende sia dalla dose somministrata che dalla durata del trattamento, infatti, a dosi elevate (200-800 μM) il farmaco provoca necrosi, mentre a concentrazioni minori (10-100 μM) determina il processo apoptotico **(91)**.

E' stato visto che l'apoptosi delle cellule renali indotta dal Cis-platino implica l'attivazione della via mitocondriale. I primi studi mostrarono che un'elevata espressione di Bcl-2, fattore antiapoptogeno, nelle cellule del tubulo prossimale rese le cellule renali in parte resistenti all'apoptosi indotta dal farmaco **(92)**. Questa osservazione è stata confermata da esperimenti sui ratti, nei quali il pretrattamento con acetato di sodio provocò un aumento significativo di Bcl-2 nel rene, riducendo l'induzione di apoptosi nelle cellule tubulari e la conseguente disfunzione renale **(93)**.

Successivamente, la nefrotossicità provocata dal Cis-platino è stata associata all'aumento dell'espressione di Bax in vivo **(94)**, la cui induzione è mediata da p53; Bax forma eterodimeri con Bid permeabilizzando la membrana mitocondriale esterna al citocromo c, una proteina apoptogena che una volta rilasciata nel citosol si lega alla proteina Apaf-1 formando l'apoptosoma, che a sua volta recluta e attiva la procaspasi 9. L'apoptosi indotta dal Cis-platino è, quindi, associata con l'incremento dell'attività della caspasi 9 e la denaturazione del DNA viene inibita da specifici pretrattamenti con inibitori della suddetta caspasi.

La caspasi 9, una volta attivata, attiva a sua volta la procaspasi 3 a caspasi 3, che rappresenta l'esecutore del processo apoptotico, infatti, colture di cellule tubulari del rene risposero alla somministrazione del farmaco aumentando l'attività della caspasi 3.

I meccanismi con i quali il Cis-platino attiva le diverse vie apoptotiche suggerite rimangono poco chiari, comunque, è stato ipotizzato un ruolo dello stress di ossidativo nello sviluppo del danno. Molti studi hanno documentato l'importanza della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) durante l'apoptosi indotta dal Cis-platino (91). E' noto che i mitocondri producono in continuazione ROS, eliminati grazie all'azione degli enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi, la glutatione perossidasi, la catalasi, e la glutatione-S-transferasi. Il Cis-platino si accumula nei mitocondri delle cellule epiteliali renali, molti studi hanno dimostrato che il farmaco induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno in queste cellule, attraverso la riduzione dell'attività degli enzimi antiossidanti e mediante la deplezione del GSH intracellulare (94). Altri studi hanno documentato che svariati antiossidanti determinano un miglioramento della nefrotossicità indotta dal Cis-platino, infatti, agenti come come il GSH, la superossido dismutasi, la catalasi, ecc., offrono una parziale protezione contro l'apoptosi indotta dal farmaco nelle cellule epiteliali renali (95).

Le specie reattive dell'ossigeno sono in grado di avviare gli stessi meccanismi apoptotici attivati dal Cis-platino. Per esempio, possono attivare Fas (96) e p53 (97), possono anche alterare la permeabilità mitocondriale (98) provocare il rilascio del citocromo c nel citosol (99), ed attivare direttamente le caspasi (100).

Un recente studio ha suggerito che la causa primaria di morte della cellula esposta all'azione del farmaco non è tanto la formazione di ROS in se, quanto l'induzione della via mitocondriale che determina danno e conseguente attivazione dell'apoptosi. Molti studi hanno dimostrato che in seguito alla somministrazione del Cis-platino i mitocondri delle cellule epiteliali renali cessano di funzionare (98). I bersagli del Cis-platino sembrano essere i complessi enzimatici che comprendono la catena di trasporto degli elettroni, con una conseguente riduzione dei livelli di ATP intracellulare (98). Se la dose di Cis-platino è alta, il calo di ATP è drastico, in quanto determina un rapido crollo metabolico seguito da morte cellulare necrotica. Una riduzione minore dei livelli di ATP associati con una minore dose del farmaco può determinare l'attivazione della via apoptotica con rilascio del citocromo c. Attualmente non è conosciuto precisamente come il Cis-platino sia in grado di inibire i complessi enzimatici della catena respiratoria, ed i meccanismi con i quali determina il rilascio del citocromo c rimangono controversi.

La diminuzione dei livelli di ATP nelle cellule innesca, quindi, il processo apoptotico indotto dal Cis-platino, mentre la formazione dei ROS non sembra svolgere un ruolo cruciale nell'avvio del processo, anche se l'inibizione della loro formazione riduce i danni

prodotti dalla somministrazione del farmaco. Una possibile spiegazione potrebbe essere che questi due processi coesistano anziché escludersi l'un l'altro, e così la riduzione di ATP intracellulare determina danno e successivamente apoptosi, che a sua volta può accelerare la formazione di ROS nelle cellule danneggiate, amplificando il danno che si estende anche alle cellule vicine.

L'inibizione di ROS può limitare questo coppia di amplificazione, e può alleviare anche nefrotossicità riducendo la risposta infiammatoria.

5.2 Effetti del Cis-platino sul sistema metabolizzante i farmaci

Come già detto precedentemente, dopo la somministrazione, il farmaco causa i primi effetti tossici a livello renale. Il trattamento di ratti con Cis-platino ha mostrato un incremento del contenuto di ferro catalitico accompagnato ad un calo del contenuto di citocromo P450 nel rene, ciò implica che, probabilmente, lo stress ossidativo indotto dal farmaco potrebbe coinvolgere direttamente il gruppo eme presente nel P450, contribuendo al processo di nefrotossicità **(101)**.

Esperimenti eseguiti su ratti maschi hanno mostrato che una singola somministrazione di Cis-platino alla dose di 5 mg/kg causa, dopo quattro giorni, un significativo calo dei livelli di urea e creatinina, indicando l'effettivo danno renale, ed un decremento delle attività delle isoforme 2C11 e 3A2 nel fegato, ma non delle concentrazioni di AST e ALT, indici di danno epatico. Questo indica che nel fegato, il farmaco non provoca un danno diretto e immediato come nel rene, ma che comunque determina una riduzione del contenuto di isoforme di P450 sesso-specifiche quali 2C11 e 3A2 **(102)**.

Nel rene il Cis-platino determina, inoltre, la deplezione degli enzimi appartenenti al sistema di difesa antiossidante, in particolare diminuiscono le attività della catalasi, della glutazione perossidasi, della glutatione-S-transferasi e della glutatione reduttasi.

Un altro studio ha mostrato che il trattamento di ratti con Cis-platino per sette giorni, causa un profondo decremento dei livelli di citocromo P450 nei testicoli e causa la deplezione dei livelli di testosterone nel plasma, accompagnata dalla riduzione dell'idrossilazione in posizione 17 α dei nuclei steroidei, mediata dal CYP17 ed essenziale per la completa formazione del testosterone. L'effetto del farmaco sembra essere correlato ad un deficit dei processi metabolici dell'eme, causando problemi durante il suo assemblaggio per la formazione della porzione apoproteica del CYP17.

Per quanto riguarda l'effetto tossico del farmaco a livello epatico pare che il danno si manifesti in seguito all'iniezione di dosi elevate oppure in risposta ad un trattamento

prolungato nel tempo. La somministrazione continuata di Cis-platino provoca nel fegato un incremento significativo della perossidazione lipidica ed un calo dei livelli di GSH, suggerendo un aumento dello stress ossidativo nel tessuto epatico.

Studi svolti sui ratti hanno mostrato che l'attività dell'enzima glutatione-S-transferasi non varia in maniera significativa dopo il trattamento, mentre l'attività dell'enzima glutatione reduttasi cala, indicando una correlazione con la riduzione dei livelli di GSH. Le attività degli enzimi glutatione perossidasi e catalasi invece aumentano, indicando il loro ruolo protettivo in quanto procedono nella rimozione del perossido di idrogeno che si forma durante lo stress ossidativo. Anche l'enzima GGT aumenta dopo il trattamento, probabilmente per ripristinare i livelli di GSH all'interno della cellula **(106)**.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Prodotti utilizzati

Tutte le sostanze utilizzate sono di provenienza commerciale.

Animali e condizioni di stabulazione

Per le analisi sperimentali sono stati utilizzati ratti maschi albini adulti del ceppo Wistar del peso di 250 g di 3 mesi di età.

Gli animali, sono stati stabulati fino al momento del sacrificio con umidità al 70% ed alla temperatura di 22 ± 3 °C, e sincronizzati con un ciclo di luce-buio di 12 ore.

Trattamento degli animali

I ratti sono stati suddivisi in quattro gruppi di quattro animali ciascuno:

- **Controllo;**

alimentati con mangime completo tradizionale *ad libitum*.

- **Alimentati con Lisosan G;**

il Lisosan G è stato sostituito al mangime tradizionale per quindici giorni, prima del sacrificio. E' stato somministrato *ad libitum* e sottoforma di trucioli, come il mangime tradizionale.

- **Trattati con Cis-platino;**

il farmaco è stato somministrato intraperitonealmente, alla dose di 20 mg/kg, in animali nutriti con mangime tradizionale, che sono stati sacrificati quattro giorni dopo il trattamento.

- **Alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino;**

Gli animali sono stati nutriti con Lisosan G per quindici giorni, ed il farmaco è stato somministrato intraperitonealmente, alla dose di 20 mg/kg, l'undicesimo giorno, per poi essere sacrificati quattro giorni dopo il trattamento.

Prima di eseguire il sacrificio degli animali è stato effettuato loro un prelievo ematico per determinare le concentrazioni di testosterone, urea, creatinina e idroperossidi. Dopo il sacrificio, sono stati prelevati fegato e reni, dai quali sono state preparate frazioni microsomiali e citosoliche.

Preparazione del plasma

Il sangue appena prelevato dal cuore degli animali, è stato posto in provette contenenti eparina, un anticoagulante che agisce attivando l'antitrombina III, che a sua volta va ad inibire l'azione della trombina e quindi la conversione del fibrinogeno in fibrina, impedendo la formazione del coagulo. Il sangue è stato poi centrifugato producendo un pellet, costituito dagli elementi figurati, ed un sovranatante liquido, il plasma, prelevato e utilizzato per le determinazioni.

Determinazione della concentrazione di testosterone

Il livello di testosterone è stato determinato attraverso un saggio immunoenzimatico, basato sul legame competitivo di anticorpi anti-testosterone, rilevato mediante il sistema SYNCHRON CX4CE, un analizzatore di chimica clinica ad accesso random controllato da un microprocessore.

Determinazioni delle concentrazioni di urea e creatinina

I livelli di urea e creatinina sono stati determinati mediante i sistemi SYNCHRON CX^R.

Per la determinazione dell'urea è stato utilizzato il reattivo BUN, mentre per la creatinina è stato usato il reattivo CRE3.

Determinazione della concentrazione idroperossidi

La determinazione dei livelli di idroperossidi nel plasma, indici di stress ossidativo, è stata effettuata mediante kit d-ROMs test, un saggio spettrofotometrico che consente di determinare in un campione biologico la concentrazione degli idroperossidi generati nelle cellule in seguito all'attacco ossidativo dei ROS su svariati substrati biologici. Per il saggio sono stati allestiti un bianco, uno standard e tre prove per ciascun campione, sono stati utilizzati un reagente cromogeno ed il tampone acetato a pH 4.8, la miscela è stata fatta incubare a 37°C per 75 minuti ed è stata letta l'assorbanza a 505 nm dello

standard e dei campioni azzerando contro il bianco. La comparsa della colorazione rossa che si sviluppa è attribuita alla formazione, perossidazione, del radicale cationico della N,N-dietil-para-fenilendiammina, che viene generato dalla concomitante riduzione dei radicali alcossilici e perossilici, derivanti dalla scissione degli idroperossidi presenti nel campione, per azione degli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} rilasciati dalle siero proteine nell'ambiente acido creato *in vitro*. Il livello di idroperossidi è stato calcolato in unità Carratelli (U CARR) considerando che 1 U CARR = 0.008 mg di H_2O_2 /dl.

Preparazione microsomiale e citosolica

I tessuti prelevati dopo il sacrificio sono stati pesati e lavati ripetutamente con KCl 1,15% (P/V) per eliminare i residui di sangue, dopodichè è stata effettuata l'omogenizzazione mediante un potter Elvehjem, utilizzando 4 volumi di tampone KP 100 mM + KCl 1,15% (P/V) + EDTA 1 mM pH 7,4 + PMSF 0,1 mM (inibitore delle proteasi).

Questa e tutte le operazioni successive sono state condotte ad una temperatura di 4° C. L'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 25' a 10000 x g in una centrifuga refrigerata in maniera da far precipitare nuclei e mitocondri.

Il sovrantante ottenuto, contenente la frazione microsomiale ed il citosol, è stato prelevato ed ulteriormente centrifugato a 33000 rpm (100000 x g) per 1h e 10' in una ultracentrifuga Beckman Spico L2-65B con rotore 60Ti.

Il nuovo sovrantante è stato suddiviso in aliquote, congelato ed in seguito utilizzato per saggi di enzimi citosolici, invece il pellet contenente sia proteine microsomiali che non, è stato nuovamente omogeneizzato con tampone KP 0,1 M + EDTA 0,1 M pH 7,4 e centrifugato per 1h a 33000 rpm nelle suddette condizioni, in modo da far precipitare solo le proteine microsomiali.

Il pellet ottenuto è stato risospeso in due volumi di tampone KP 0,1 M + EDTA 0,1 M pH 7,4 in maniera da ottenere una concentrazione finale di 0,5 g di fegato/ml, mentre per reni e testicoli il precipitato è stato risospeso in un volume di tampone ottenendo una concentrazione finale di 1 g/ml.

La sospensione microsomiale così ottenuta è stata aliquotata, rapidamente congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C fino al suo utilizzo.

Determinazione del contenuto di proteine microsomiali e citosoliche

Le proteine microsomiali e citosoliche sono state determinate come descritto da Lowry (104), utilizzando come standard l'albumina sierica di bovino.

Determinazione del contenuto di citocromo P-450

Il contenuto di citocromo P-450 presente nei microsomi è stato determinato seguendo il metodo di Omura e Sato (Omura T. e Sato R., 1964), misurando spettrofotometricamente la variazione di assorbanza del citocromo ridotto e complessato con il monossido di carbonio tra 450 nm e 500 nm, tenendo presente che il coefficiente di estinzione molare (ϵ) per il complesso "citocromo P-450 ridotto- CO" è pari a $91.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Saggi di attività microsomiali

Tali reazioni sono catalizzate da enzimi presenti nella frazione microsomiale, preparata come descritto precedentemente.

Attività etossiresorufina O-deetilasi

In questa attività i substrati vengono metabolizzati dai CYP della famiglia 1; principalmente dal CYP1A1 e in modo minore dai CYP1A2 e 1B1, con produzione di resorufina determinata fluorimetricamente (EX: 530 nm, EM: 585 nm) (105).

Attività etossicumarina O-deetilasi

Tale attività permette la determinazione fluorimetrica della 7-idrossi cumarina prodotta in seguito alla deetilazione dell'etossicumarina da parte degli enzimi P450 appartenenti principalmente alla famiglia 2A (EX: 390 nm, EM: 440 nm) (Aitio, 1978).

Attività anilina idrossilasi

La reazione di idrossilazione dell'anilina, catalizzata dall'isoforma CYP2E1, produce il 4-ammino-fenolo che, trattato con fenolo in soluzione basica, forma il fenato corrispondente. La quantità di fenato presente in soluzione è misurabile spettrofotometricamente, poiché questa molecola presenta un massimo di assorbimento a 630 nm (106).

Attività eritromicina demetilasi e amminopirina-N-demetilasi

Il metodo utilizzato è basato sulla determinazione spettrofotometrica della formaldeide, liberata come prodotto della reazione di demetilazione dell'eritromicina, catalizzata dall'isoforma CYP3A, e dell'amminopirina da parte delle isoforme CYP1A, CYP2B e CYP3A. Tale determinazione viene effettuata come descritto da Yang (Tu Y.Y. e Yang C.S., 1983) utilizzando il reattivo di Nash, il quale forma un complesso colorato con la formaldeide avente un massimo di assorbimento a 412 nm.

Saggi di attività citosoliche

Tali attività sono state misurate sulle frazioni citosoliche ottenute durante la preparazione dei microsomi, come descritto precedentemente.

Attività catalasi

L'attività enzimatica della catalasi è stata valutata monitorando spettrofotometricamente a 240 nm la decomposizione dell'acqua ossigenata. La quantificazione è stata eseguita seguendo la legge di Lambert e Beer con un coefficiente di estinzione molare di $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Attività Glutazione perossidasi (GSH Perox)

L'attività della Glutazione perossidasi è stata monitorata spettrofotometricamente a 340 nm, valutando il consumo del NADPH da parte della GSSG Red, che è stata aggiunta alla miscela di reazione. Il cofattore, infatti, è utilizzato per riformare il GSH consumato in precedenza dalla GSH Perox per ridurre il substrato scelto, il terzial-butildidroperossido (Flohe et al., 1984). L'attività è stata quantificata attraverso la legge di Lambert e Beer con un coefficiente di estinzione molare di $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Attività Glutazione reduttasi (GSSG Red)

L'attività della Glutazione reduttasi è stata valutata attraverso il consumo del NADPH, la molecola che dona l'elettrone necessario per la riduzione del glutatione. Il processo è stato monitorato spettrofotometricamente a 340 nm;

l'attività è stata quantificata secondo la legge di Lambert e Beer utilizzando un coefficiente di estinzione molare di $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wheeler et al., 1990).

Attività Glutathione-S-transferasi (GST)

Questo saggio enzimatico è stato effettuato utilizzando come substrato l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene che viene coniugato dall'enzima con il GSH; la reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm poiché si ha una variazione di assorbanza che si accompagna alla coniugazione. L'attività è stata calcolata usando il coefficiente di estinzione molare uguale a $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habib W.H. et al., 1974).

Attività DT-diaforasi

Per misurare l'attività della DT-diaforasi è stata valutata spettrofotometricamente, a 600 nm, la diminuzione di assorbanza del 2,6-Diclorofenolo-indrofenolo, un colorante che viene ridotto dall'enzima per mezzo di elettroni provenienti dal NADPH. L'attività è stata quantificata secondo la legge di Lambert e Beer utilizzando un coefficiente di estinzione molare di $22,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

RISULTATI

Al fine di verificare se il Cis-platino, somministrato per via i.p. alla dose di 20 mg/kg in ratti maschi, provoca danni a livello di fegato e reni e se un'alimentazione con Lisosan G è in grado di prevenirli o ridurli, sono stati analizzati alcuni parametri plasmatici, indici di tali danni, e sono stati eseguiti vari saggi di attività enzimatiche. Per valutare ciò è stata esaminata la differenza dei valori ottenuti rispetto ai controlli, e la differenza tra i ratti alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino rispetto ai soli trattati con il farmaco.

Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G a livello plasmatico

Dall'analisi del plasma dei quattro differenti gruppi di ratti è stato evidenziato un calo significativo del contenuto di testosterone rispetto al controllo, sia nei trattati con la singola somministrazione di Cis-platino che negli animali alimentati con Lisosan G e poi trattati con il farmaco, rispettivamente dell'84% e del 67% (Fig. 18). Nei ratti alimentati con il lisato e trattati con Cis-platino, quindi, si ha un lieve recupero dell'attività rispetto al terzo gruppo, pari al 17%.

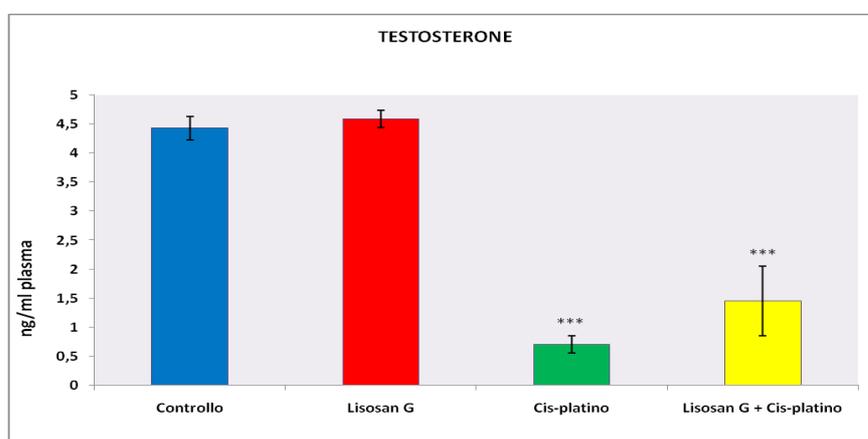


Fig. 18 Determinazione del contenuto di testosterone nel plasma di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($P < 0,001$).

La singola somministrazione di Cis-platino provoca un incremento dei livelli di urea e creatinina nel plasma, indici di un effettivo danno a livello renale. Come si può notare dalle Fig. 19 e 20, le concentrazioni dei metaboliti aumentano in maniera significativa nei trattati con il farmaco rispetto ai controlli, mentre nei

ratti alimentati con Lisosan G e trattati con il Cis-platino si vede una diminuzione significativa di entrambi rispetto ai soli trattati, indicando un recupero parziale del danno.

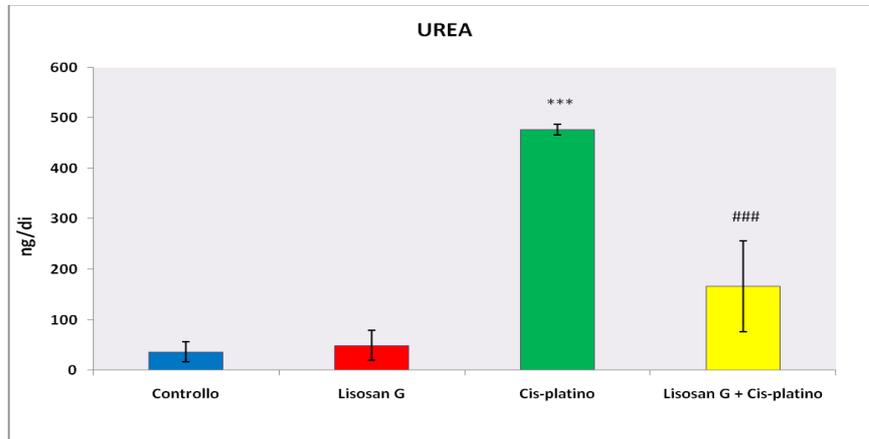


Fig. 19 Determinazione della concentrazione di urea nel plasma di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($P < 0,001$). ### il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($P < 0,001$).

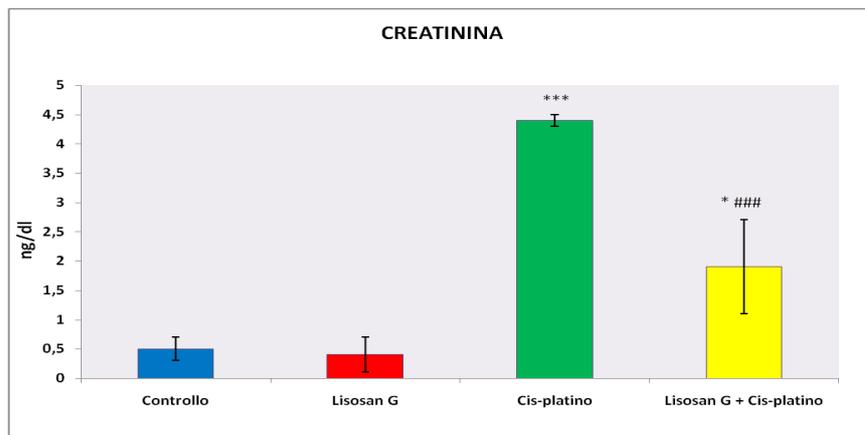


Fig. 20 Determinazione della concentrazione di creatinina nel plasma di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. * ($P < 0,05$) *** ($P < 0,001$) il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA. ### il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($P < 0,001$).

La concentrazione plasmatica di idroperossidi, indice di stress ossidativo, aumenta significativamente negli animali trattati intraperitonealmente con Cis-platino rispetto ai controlli. Considerando che nei ratti alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco l'aumento di idroperossidi è minore e non statisticamente significativo, si può ipotizzare che il lisato utilizzato conferisca una protezione parziale verso il danno ossidativo che il chemioterapico provoca (Fig. 21).

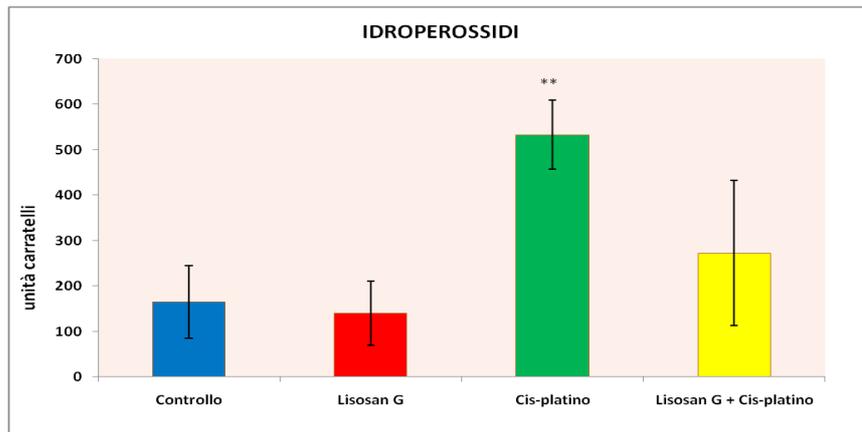


Figura 21 Determinazione della concentrazione di Idroperossidi nel plasma di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($P < 0,01$).

Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci a livello renale

La somministrazione di Cis-platino causa una riduzione significativa del contenuto totale di citocromo P450 rispetto ai controlli, equivalente al 60%, mentre i ratti alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco mostrano un recupero totale del contenuto di P450 rispetto ai soli trattati con il chemioterapico, mostrando una protezione da parte del lisato (Fig. 22).

L'attività etossicumarina O-deetilasi (ECOD), associata principalmente alla sottofamiglia 2A del CYP450, si riduce significativamente nei ratti trattati con Cis-platino, mostrando una riduzione di attività del 67% rispetto ai controlli. Mentre, sia gli animali alimentati solamente con Lisosan G che quelli nutriti con il lisato e trattati con il farmaco mostrano un aumento significativo dell'attività rispetto ai controlli, indicando una lieve induzione promossa dal Lisosan G su determinate isoforme di P450. Inoltre il gruppo di animali alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino differiscono significativamente anche dai soli trattati con il farmaco, evidenziando un recupero totale dell'attività (Fig. 23).

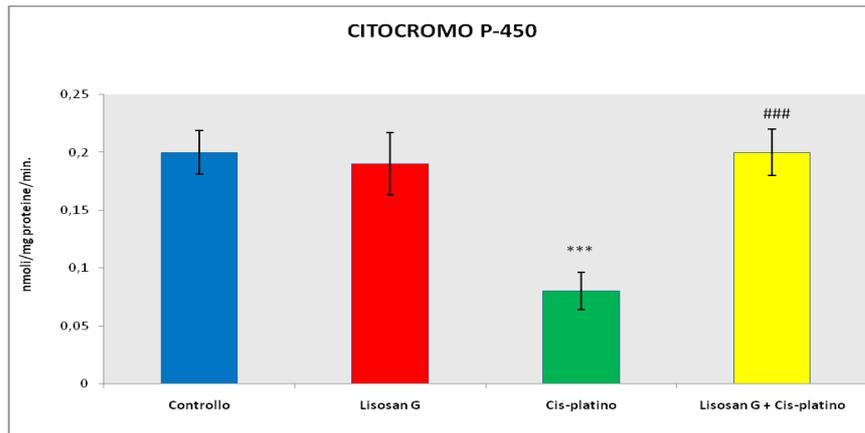


Figura 22 Determinazione del contenuto di citocromo P-450 in microsomi renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$). ### il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$).

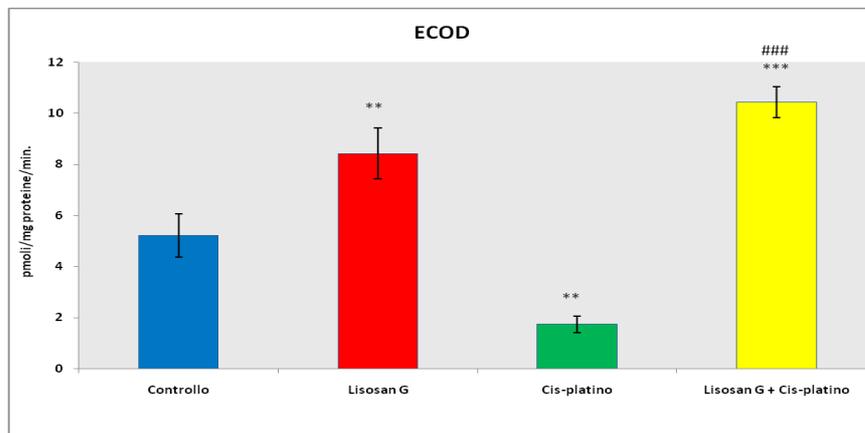


Figura 23 Attività etossicumarina O-deetilasi (ECOD) in microsomi renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** ($P < 0,01$) *** ($P < 0,001$) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA. ### ($P < 0,001$) il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA.

La figura 24 mostra l'attività etossiresorufina O-deetilasi (EROD), marcatrice prevalentemente della sottofamiglia 1A. I ratti trattati con il chemioterapico diminuiscono significativamente la loro attività del 92% rispetto ai controlli, mentre i ratti alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino riducono la loro attività del 16% rispetto ai controlli, evidenziando un recupero significativo rispetto ai soli trattati con il farmaco pari al 76%. Anche qui i risultati mostrano che la sola alimentazione con Lisosan G determina un aumento significativo dell'attività EROD, facendo presumere un'induzione delle isoforme 1A1/2.

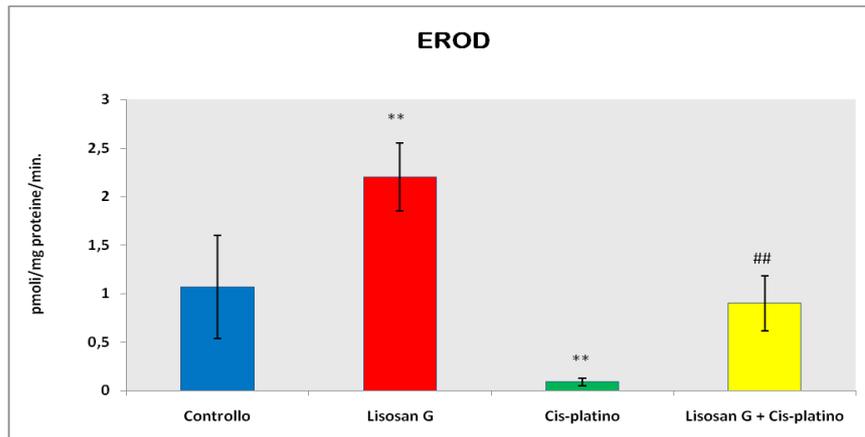


Figura 24 Attività etossiresorufina O-deetilasi (EROD) in microsomi renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** ($P < 0,01$) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA. ## ($P < 0,01$) il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA.

Per quanto riguarda l'attività dell'enzima glutatione-S-transferasi riportata in figura 25, la somministrazione del Cis-platino ne determina una riduzione significativa pari al 51%, mentre nei ratti alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco la riduzione è del 20%, evidenziando un recupero significativo dell'attività rispetto ai soli trattati con Cis-platino, equivalente al 31%.

Sempre in figura 26 e sono riportate le attività degli enzimi ad azione antiossidante glutatione perossidasi e glutatione reduttasi. La somministrazione del farmaco non sembra influire sull'attività della glutatione perossidasi, in quanto ne determina una riduzione del 10% che non è statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo, mentre, invece, il Lisosan G provoca un incremento significativo dell'attività rispetto ai controlli, sia nei soli alimentati con il lisato che negli animali alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. Questi ultimi, inoltre, differiscono in maniera significativa anche rispetto agli animali trattati solo con il farmaco, mostrando un incremento dell'attività enzimatica.

L'attività dell'enzima glutatione reduttasi si riduce significativamente del 47% nel gruppo di ratti trattati con Cis-platino e del 22% negli animali alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco, rispetto al gruppo di controllo. Tale attività viene recuperata parzialmente nel gruppo di animali alimentati con il lisato di grano e trattati con Cis-platino rispetto ai ratti sottoposti solo al trattamento con il chemioterapico, mostrando un incremento pari al 25%.

L'enzima antiossidante catalasi mostra una riduzione significativa della sua attività rispetto al controllo sia nel gruppo di ratti sottoposti al trattamento con Cis-platino, equivalente al 69%, che negli animali alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco, pari al 47%, inoltre quest'ultimi evidenziano un incremento significativo dell'attività enzimatica rispetto ai soli trattati con Cis-platino del 25%. La sola alimentazione con Lisosan G determina un aumento significativo dell'attività rispetto al controllo, evidenziando un'induzione dell'attività enzimatica (Fig.26).

L'attività dell'enzima DT-diaforasi, riportata in figura 27, non mostra differenze significative tra i vari gruppi di animali, ipotizzando che né l'alimentazione con Lisosan G, né la somministrazione di Cis-platino influenzino, in queste condizioni sperimentali, l'enzima a livello renale.

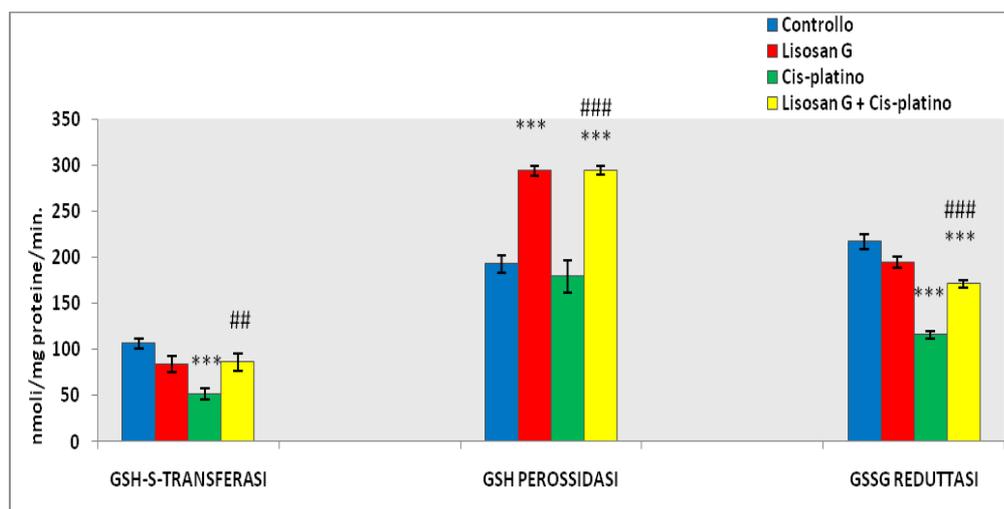


Figura 25 Attività Glutazione-S-Transferasi, Glutazione Perossidasi e Glutazione Reduttasi in frazioni citosoliche renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** (P<0,001) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA. ## (P<0,01) ### (P<0,001) il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA.

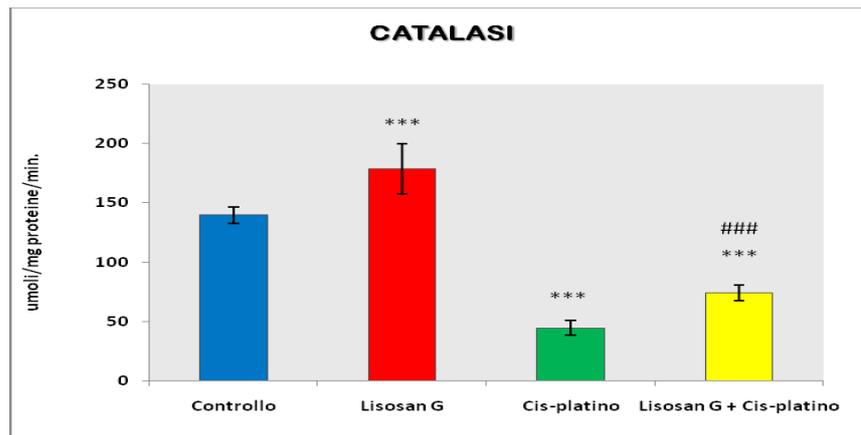


Figura 26 Attività Catalasi in frazioni citosoliche renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$). ### il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$).

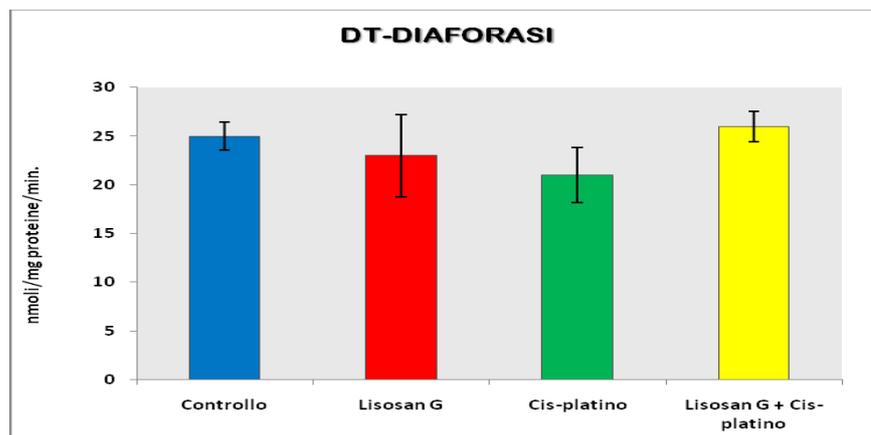


Figura 27 Attività DT-Diaforasi in frazioni citosoliche renali di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino.

Effetto della somministrazione di Cis-platino e della dieta con Lisosan G sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci a livello epatico

La somministrazione di Cis-platino provoca una riduzione significativa del contenuto totale di citocromo P450 rispetto ai controlli, evidente sia negli animali trattati con Cis-platino, che presentano un calo del 40%, che in quelli alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco, che presentano una diminuzione del 26%. In questi ultimi, quindi, si nota un recupero del contenuto di P450 pari al 14% rispetto ai soli trattati, evidenziando una parziale protezione da parte del lisato (Fig. 28).

Le attività ECOD, associata principalmente alla famiglia 2A del CYP450, ed EROD, marcatrice della famiglia 1A, risultano diminuite nel gruppo trattato con il farmaco rispettivamente del 76% e del 46% rispetto al controllo. Per quanto riguarda l'attività ECOD il recupero dovuto all'alimentazione con il Lisosan G nel quarto gruppo è parziale, equivalente al 31%, mentre per quanto concerne l'attività EROD il recupero è quasi totale (Fig. 29). Inoltre possiamo notare un incremento di attività nei ratti sottoposti alla sola alimentazione con Lisosan G, che nell'attività EROD differisce in maniera significativa rispetto ai controlli.

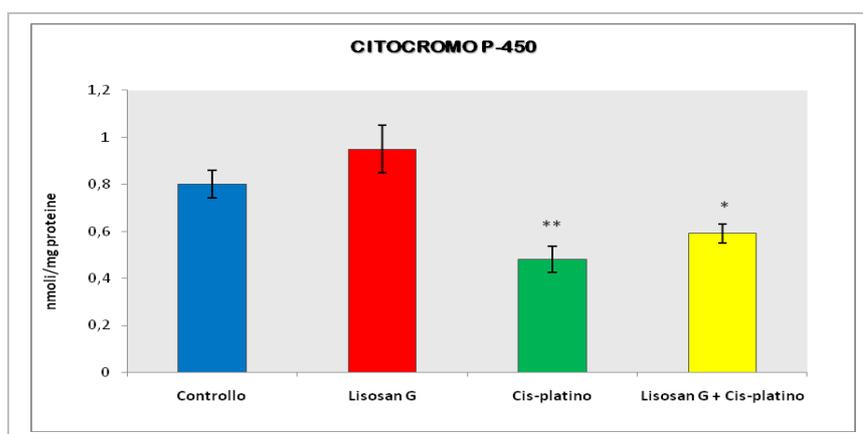


Figura 28 Determinazione del contenuto di citocromo P-450 in microsomi epatici di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. * ($P < 0,05$) ** ($P < 0,01$) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA .

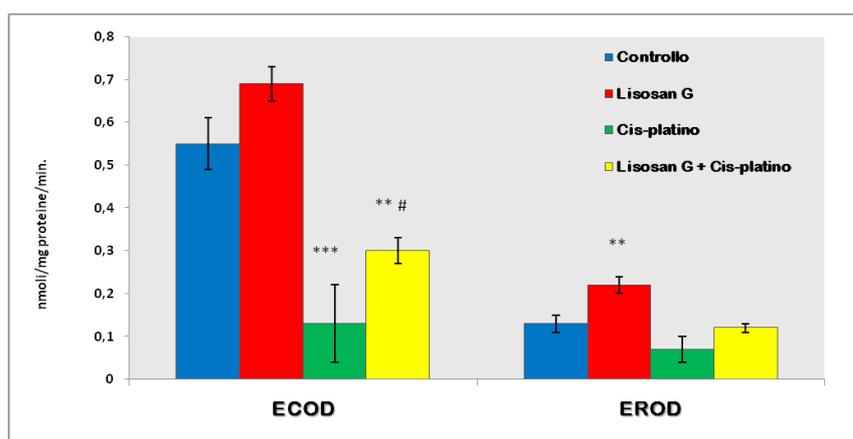


Figura 29 Attività etossicumarina O-deetilasi (ECOD) ed etossiresorufina O-deetilasi (EROD) in microsomi epatici di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** ($P < 0,01$) *** ($P < 0,001$) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA . # il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,05$).

Nella figura 30 sono riportati i risultati delle attività amminopirina demetilasi, marcatrice delle sottofamiglie 1A, 2B, 3A, ed eritromicina-N-demetilasi, catalizzata principalmente dalle isoforme 3A1/2. In entrambe notiamo un calo statisticamente significativo di attività rispetto al controllo, sia nel gruppo di ratti trattati con Cis-platino, che in quelli alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco, e non è evidente nessun recupero di attività da parte del lisato.

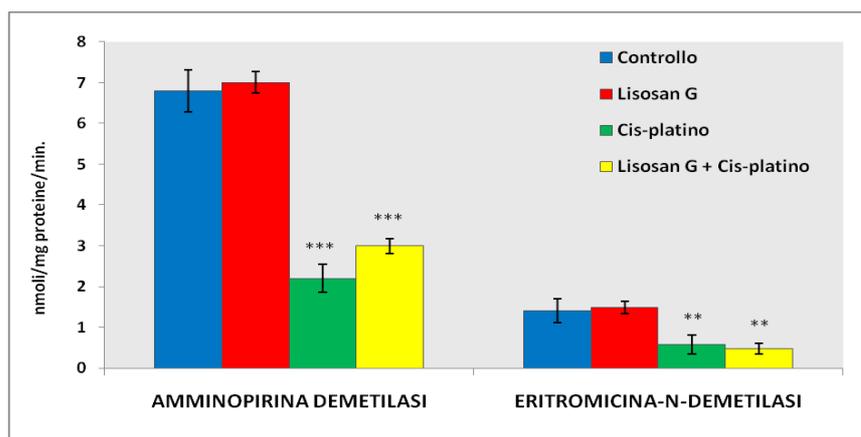


Figura 30 Attività Amminopirina-N-demetilasi ed Eritromicina demetilasi in microsomi epatici di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** ($P < 0,01$) *** ($P < 0,001$) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA .

Per quanto riguarda l'attività anilina idrossilasi invece, marcatrice dell'isoforma 2E1, non notiamo differenze significative tra i quattro gruppi (Fig 31), deducendo che probabilmente questo isoenzima non sia coinvolto direttamente nel metabolismo del Cis-platino a livello epatico.

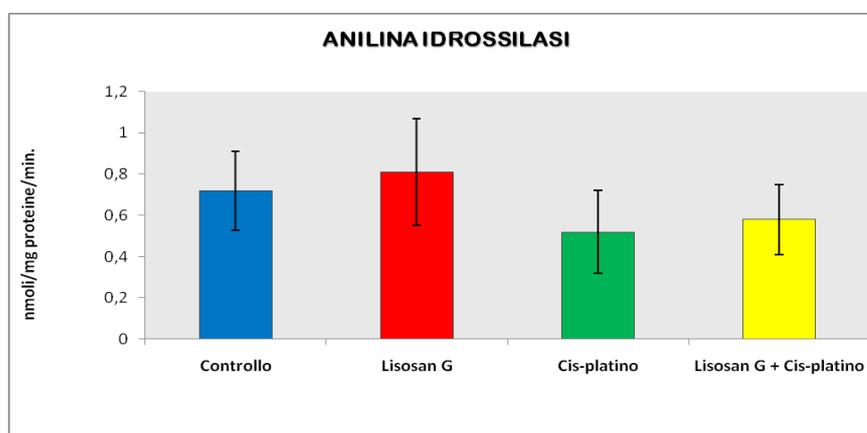


Figura 31 Attività Anilina Idrossilasi in microsomi epatici di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino.

Per quanto riguarda l'enzima di fase 2 glutatione-S-transferasi, il trattamento con Cis-platino non sembra ridurre l'attività, in quanto non vi sono differenze significative tra i controlli ed i trattati con il farmaco, mentre l'alimentazione con il Lisosan G, invece, pare indurre leggermente l'attività. Infatti, il gruppo di animali nutriti con il lisato e sottoposti al trattamento con il farmaco differisce significativamente dai ratti trattati con Cis-platino, mostrando un recupero di attività del 37% (Fig. 32).

Sempre in figura 6.3.7 sono riportate le attività degli enzimi ad azione antiossidante glutatione perossidasi e glutatione reduttasi, in entrambe è evidente un calo significativo dell'attività nei ratti a cui è stato somministrato il farmaco rispetto a quelli di controllo, mentre essa viene recuperata totalmente negli animali alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino.

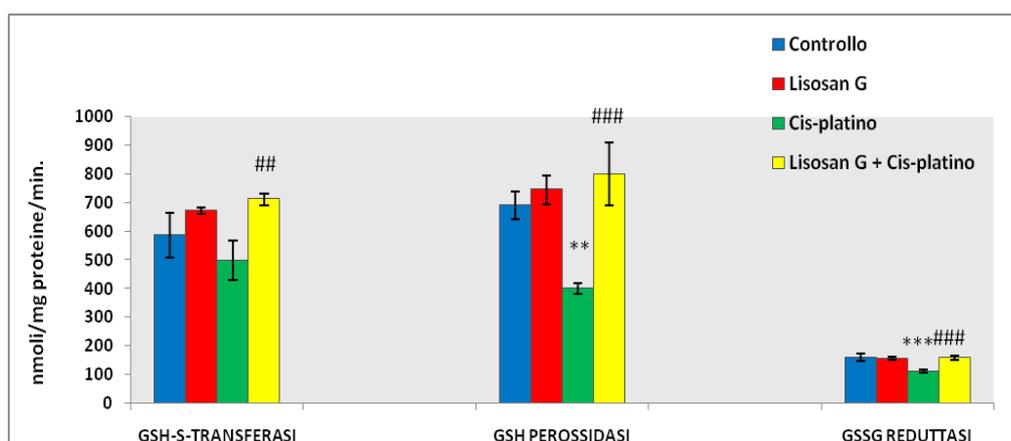


Figura 32 Attività Glutazione-S-Transferasi, Glutazione Perossidasi e Glutazione Reduttasi in frazioni citosoliche epatiche di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. ** (P<0,01) *** (P<0,001) Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA. ## (P<0,01) ### (P<0,001) il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA.

Nella figura 33 sono riportate le variazioni dell'attività dell'enzima catalasi, evidenziando come tutti e tre i gruppi sottoposti ai diversi trattamenti differiscano in maniera significativa rispetto al gruppo di controllo: i ratti alimentati con Lisosan G mostrano un'incremento di attività pari al 33%, i ratti trattati con Cis-platino invece riducono la loro attività di un valore pari al 36%, mentre i ratti sottoposti sia all'alimentazione con il lisato che al trattamento con il farmaco aumentano la loro attività del 52%. Questi ultimi, inoltre, differiscono

significativamente anche dai soli trattati con il farmaco, mostrando un recupero totale dell'attività

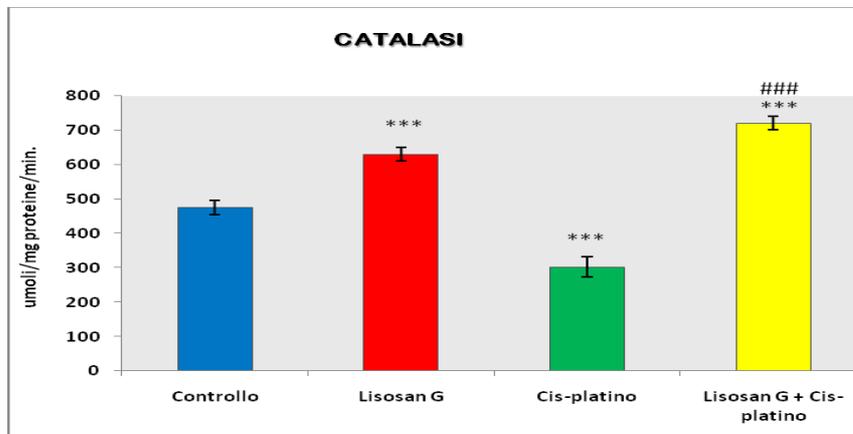


Figura 33 Attività Catalasi in frazioni citosoliche epatiche di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. *** Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$). ### il valore differisce significativamente rispetto al gruppo trattato con Cis-platino in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,001$).

L'attività dell'enzima DT-diaforasi mostra una lieve tendenza all'aumento negli animali trattati con Cis-platino, che però non è statisticamente significativa rispetto al controllo, mentre sale significativamente nei ratti alimentati con Lisosan G e trattati con il farmaco rispetto al controllo (Fig.34).

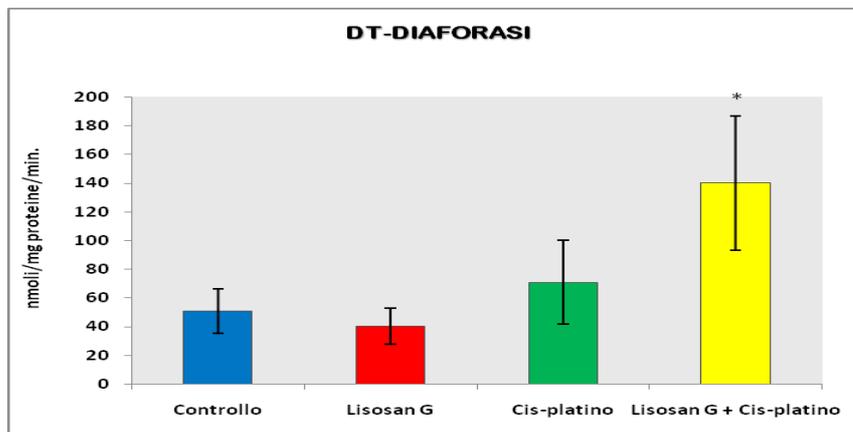


Figura 34 Attività DT-Diaforasi in frazioni citosoliche epatiche di ratti di controllo, alimentati con Lisosan G, trattati con Cis-platino, alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino. * Il valore differisce significativamente rispetto al controllo in base all'analisi della varianza ANOVA ($p < 0,05$).

DISCUSSIONE

Alcuni studi hanno mostrato che numerosi antiossidanti sono in grado di contrastare in parte la tossicità indotta dal Cis-platino. Per questo motivo, negli ultimi anni, sono stati condotti esperimenti incentrati sulla co-somministrazione di sostanze antiossidanti e Cis-platino in modo da verificarne la prevenzione del danno. In questo ambito si colloca questo lavoro di tesi, mirato all'utilizzo del composto Lisosan G che, come dimostrato da studi condotti nel nostro laboratorio protegge i ratti dal danno epatico indotto da tetracloruro di carbonio, un composto molto tossico capace di innescare reazioni a catena radicaliche che degradano le membrane cellulari (70).

Oltre ad avere proprietà antiossidanti, il Lisosan G mostra anche delle caratteristiche nutritive che lo rendono più completo, da un punto di vista nutrizionale, rispetto ai comuni integratori alimentari, infatti, esso è ricco in vitamine, minerali, acidi grassi, amminoacidi ed altre sostanze importanti per la nostra alimentazione. Esaminando le varie componenti che costituiscono questo nutraceutico e i mangimi commerciali utilizzati nel trattamento dei ratti, non sono state riscontrate grandi differenze, se non nel contenuto di lipidi che si presenta nettamente superiore nel Lisosan G. Per questo motivo, il lisato non è stato introdotto assieme al mangime tradizionale, ma sostituito ad esso come alimentazione dei ratti sottoposti al trattamento, con lo scopo testarne l'azione effettiva.

Prima di eseguire il sacrificio, gli animali sono stati pesati e non si sono osservate differenze significative tra i gruppi sottoposti ai diversi trattamenti.

Effetto del Cis-platino

Dall'analisi del plasma è emerso che la singola somministrazione di Cis-platino alla dose di 20 mg/kg causa un evidente stress ossidativo, mostrato dall'aumentata concentrazione di idroperossidi negli animali trattati con il farmaco rispetto al gruppo di controllo. Come riportato in letteratura, l'eccessiva produzione di sostanze ossidanti ha il ruolo di amplificare la nefrotossicità indotta dal farmaco, infatti il danno a livello renale è confermato dagli elevati livelli di urea e creatinina riscontrati nel plasma degli animali trattati con Cis-platino, oltre che

dalla diminuzione dell'attività di alcune isoforme di citocromo P450 coinvolte nel metabolismo dei farmaci, di enzimi di fase 2 e ad azione antiossidante.

Effetto del trattamento sul rene

Dalla determinazione del contenuto totale di citocromo P450 a livello renale è stato visto che esso è ridotto notevolmente nel gruppo di animali trattati con il Cis-platino. Come confermato dai dati di attività catalitica (etossiresorufina O-deetilasi e etossicumarina O-deetilasi), sulla frazione microsomiale renale, le principali isoforme di P450 che hanno mostrato un decremento significativo della loro attività sono le 1A1/2 e 2A. In letteratura è stato descritto che il trattamento di ratti con Cis-platino determina un incremento del contenuto di ferro catalitico accompagnato da un calo del contenuto di citocromo P450 nel rene, ciò suggerisce che lo stress ossidativo indotto dal farmaco potrebbe coinvolgere direttamente il gruppo eme presente nel P450, contribuendo al processo di nefrotossicità **(101)**: il citocromo P450 potrebbe legarsi alla molecola di platino producendo perossido d'idrogeno, che a sua volta distruggerebbe l'enzima stesso rilasciando l'eme e successivamente il ferro catalitico. Quest'ultimo contribuirebbe alla formazione di ROS determinando perossidazione lipidica ed un conseguente danno alla membrana cellulare.

Inoltre, dai nostri dati, risultano diminuite in maniera significativa anche le attività dell'enzima glutatione-S-transferasi, capace di catalizzare la coniugazione di sostanze chimiche elettrofile con il gruppo sulfidrilico del GSH, e degli enzimi ad azione antiossidante quali catalasi, che svolge la funzione di catalizzare la decomposizione del perossido di idrogeno in ossigeno molecolare ed acqua senza la produzione di radicali liberi, e glutatione reduttasi, capace di ridurre la forma ossidata del glutatione. Molti studi, a tal proposito, hanno dimostrato che il Cis-platino induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule degli organi bersaglio attraverso la riduzione delle attività degli enzimi antiossidanti e mediante la deplezione del GSH intracellulare **(94)**. La riduzione della concentrazione di GSH all'interno della cellula sembra dovuto alla sua capacità di legarsi con la molecola di platino del farmaco divenuta reattiva a seguito della scissione di uno dei due atomi di cloro.

Effetto dal trattamento sul fegato

Nel fegato, il farmaco provoca una diminuzione della concentrazione di citocromo P450 totale. I risultati ottenuti dai saggi enzimatici in vitro hanno mostrato un decremento delle attività di alcuni isoenzimi appartenenti alle sottofamiglie 1A, 2A, 3A, 2B e 2C, in particolare si evidenzia una riduzione delle attività e dell'espressione di isoforme sesso-specifiche quali 2C11 e 3A2, confermando i dati già riportati in letteratura (102).

In accordo con quanto riportato in letteratura (103), l'attività dell'enzima glutatione-S-transferasi non varia in maniera significativa dopo il trattamento con Cis-platino rispetto ai controlli. Mentre per quanto riguarda le attività degli enzimi ad azione antiossidante catalasi e glutatione perossidasi i dati sono discordanti, in quanto i nostri risultati mostrano un calo significativo della loro attività in seguito al trattamento, anziché un incremento come indicato da uno studio effettuato precedentemente (103). Molto probabilmente questa differenza è dovuta alla diversa durata del trattamento con il farmaco, in quanto è stato suggerito che l'effetto tossico a livello epatico si manifesti con un trattamento prolungato nel tempo oppure in seguito a somministrazioni elevate di Cis-platino. La somministrazione continuata di Cis-platino, infatti, provoca nel fegato un incremento significativo della perossidazione lipidica ed un calo dei livelli di GSH, suggerendo un aumento dello stress ossidativo nel tessuto epatico. Questo potrebbe significare che una singola iniezione del farmaco, eseguita quattro giorni prima del sacrificio degli animali, non sia stata sufficiente a determinare uno stress ossidativo diffuso ed un accumulo di perossido d'idrogeno tale da indurre le attività degli enzimi atti a rimuoverlo, quali appunto la catalasi e la glutatione perossidasi.

Effetto del Lisosan G

L'alimentazione dei ratti per quindici giorni con Lisosan G provoca, rispetto al controllo, un aumento delle attività di isoforme di P450 appartenenti alle sottofamiglie 1A e 2A, sia a livello epatico che renale, come mostrato dai risultati dei saggi enzimatici etossiresorufina O-deetilasi e etossicumarina O-deetilasi, rispettivamente associati alle suddette isoforme.

Questa induzione probabilmente è dovuta alla componente lipidica, presente in quantità maggiore nel Lisosan G rispetto al mangime tradizionale. Infatti, in

letteratura è riportato che il contenuto totale di citocromo P450 aumenta in ratti sottoposti ad una dieta ricca di lipidi.

Negli animali alimentati con Lisosan G e trattati con Cis-platino si nota un parziale recupero del contenuto di citocromo P450 totale e delle attività marcatrici di varie isoforme di P450 che potrebbero indicare un ruolo protettivo del composto utilizzato nei confronti della tossicità indotta dal farmaco. Questa ipotesi viene avvalorata dai risultati ottenuti dalle analisi eseguite sul plasma degli animali trattati, che mostrano una riduzione parziale delle concentrazioni di idroperossidi, urea e creatinina plasmatiche, rispetto al gruppo di ratti sottoposti al solo trattamento con Cis-platino, ed un lieve aumento dei livelli di testosterone, che si erano ridotti notevolmente in seguito alla somministrazione del farmaco.

Anche gli enzimi ad azione antiossidante catalasi, glutatione perossidasi e glutatione reduttasi, e l'enzima di fase 2 glutatione-S-transferasi, mostrano un recupero della loro attività dovuto all'alimentazione con Lisosan G, indicando, come riportato in letteratura, che l'azione di antiossidanti determina una riduzione della tossicità indotta dal Cis-platino, in quanto, agenti come la glutatione perossidasi e la catalasi, offrono una parziale protezione contro l'apoptosi indotta dal farmaco (95). Inoltre è stato dimostrato che elevate concentrazioni di GSH, mantenute anche grazie all'azione dell'enzima glutatione reduttasi, hanno un ruolo protettivo sulla tossicità indotta dal Cis-platino.

La somministrazione del farmaco negli animali alimentati con Lisosan G provoca un aumento significativo dell'enzima DT-diaforasi, ma il meccanismo con cui avviene quest'induzione non è ancora stato chiarito e sarà oggetto dei prossimi studi, così come dovrà essere dimostrata un'eventuale regolazione delle isoforme appartenenti alle sottofamiglie 1A e 2A in seguito ad una dieta a base di Lisosan G per un periodo di tempo prolungato. Infatti, in uno studio eseguito precedentemente nei nostri laboratori non si era verificata alcuna interferenza del lisato di grano con gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci. Probabilmente questo è dipeso dalla differente durata del trattamento, che era stato di soli quattro giorni.

Possiamo concludere questo lavoro di tesi confermando i dati già presenti in letteratura sulla tossicità indotta dal Cis-platino a livello degli organi bersaglio tra cui reni e fegato e sulla riduzione dei suddetti effetti tossici promossa dall'azione degli antiossidanti, che riducono lo stress ossidativo. Inoltre possiamo supporre

che il Lisosan G sia in grado di conferire una parziale protezione nei confronti della tossicità indotta dal farmaco.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Thompson LU, Ward WE (2006) Food-Drug Synergy and Safety, CRC Press, Taylor and Francis, University of Toronto, ON, Canada.
2. Mutch DM, Wahli W, Williamson G (2005) Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition, *The FASEB J.*, 19, 1602-1616
3. Debusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS (2005) Nutritional genomics in practice: where do we begin?, *J. Am. Diet. Assoc.*, 105, 589-598
4. Afman L, Muller M (2006) Nutrigenomics: From molecular nutrition to prevention of disease, *J. Am. Diet. Assoc.*, 106, 569-576
5. Muller M, Kersten S (2003) Nutrigenomics: goals and strategies, *Nat. Rev.*, 4, 315-322
6. Bailey LB, Gregory JF (1999) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement, *J. Nutr.*, 129, 919-922
7. Omer RE et al. (2001) Peanut butter intake, GSTM1 genotype and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Sudan, *Cancer Causes Control*, 12, 23-32
8. Milner JA (2004) Molecular target for bioactive food components, *J. Nutr.*, 134, 2492S-2498S
9. Francis GA, Fayard E, Picard F and Auwerx J (2002) Nuclear receptor and the control of metabolism, *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 261-311
10. Norlin M and Wikvall K (2007) Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids, *Curr. Mol. Med.*, 7, 199-218
11. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, and Karpen SJ (2001) The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp, *Gastroenterology*, 121, 140-147
12. Tiemann M, Han Z, Soccio R, Bollineni J, Shefer S, Sehayek E, and Breslow JL (2004) Cholesterol feeding of mice expressing cholesterol 7-hydroxylase increases bile acid pool size despite decreased enzyme activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101, 1846-1851
13. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, and Gonzalez FJ (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis, *Cell*, 102, 731-744
14. Miyata M, Matsuda Y, Nomoto M, Takamatsu Y, Sato N, Hamatsu M, Dawson PA, Gonzalez FJ and Yamazoe Y (2009) Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acids in cholic acid-fed farnesoid X receptor (FXR)-null mice: FXR-Independent suppression of intestinal bile acid absorption, *Drug Metab. Disp.*, 37, 338-344
15. Jansen PL, Muller M and Sturm E (2001) Genes and cholestasis, *Hepatology*, 34, 1067-1074
16. Jump DB (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription, *Curr. Opin. Lipidol.*, 13, 155-164
17. Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A and de Lange P (2010) PPARs: Nuclear receptors controlled by and controlling, nutrient handling through nuclear and cytosolic signaling, *PPAR Res.*, PubMed in Process

18. Xu J et al., **(2002)** Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) influences substrate utilization for hepatic glucose production, *J. Biol. Chem.*, 277, 50237-50244
19. Patsouris D, Reddy JK, Muller M, Kersten S. **(2006)** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression, *Endocrinology*, 147, 1508-1516
20. Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND et al. **(2004)** Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat, *Cancer Res.*, 64, 6797-6804
21. Fuks F **(2005)** DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15, 490-495
22. Davis CD, Uthus EO **(2004)** DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions, *Exp. Biol. Med.*, 229, 988-995
23. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, et al. **(2005)** Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations, *Science*, 307, 1072–1079
24. Crawford DC, Nickerson DA **(2005)** Definition and clinical importance of haplotypes, *Annu Rev. Med.*, 56, 303–320
25. Hanson HQ, Aras O, Yang F, Tsai MY **(2001)** C677T and A1298C polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease, *Clin. Chem.*, 47, 661–6
26. Loktionov A. **(2003)** Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases, *J. Nutr. Biochem.*, 14, 426–51
27. Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K **(2010)** Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases, *Indian J. Med. Res.*, 132, 363-378
28. Van Rossum EF, Lamberts SW **(2004)** Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition, *Recent Prog. Horm. Res.*, 59, 333-57
29. Iwai C, Akita H, Kanazawa K, Shiga N, Terashima M, Matsuda Y, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kajiya T, Hayashi T, Yokoyama M. **(2003)** Arg389Gly polymorphism of the human beta1-adrenergic receptor in patients with nonfatal acute myocardial infarction, *Am. Heart J.*, 146(1), 106-9
30. Masuo K, Katsuya T, Kawaguchi H, Fu Y, Rakugi H, Ogihara T, Tuck ML **(2006)** Beta2-adrenoceptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic activation, *Am. J. Hypertens.*, 19 (10), 1084-91
31. Pesonen U **(2008)** NPY L7P polymorphism and metabolic diseases, *Regul. Pept.*, 149 (1-3), 51-5
32. Subbiah MTR **(2006)** Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine, *Transl. Res.*, 149, 55-61
33. Jimenez-Sanchez G, Childs B and Valle D **(2001)** Human disease genes, *Nature (London)*, 409, 853–855
34. Arab L **(2004)** Individualized nutritional recommendations: do we have the measurements needed to assess risk and make dietary recommendations?, *Proc. Nutr. Soc.*, 63, 167–172

35. Bingham S **(2006)** The fibre-folate debate in colo-rectal cancer, *Proc. Nutr. Soc.*, 65(1), 19-23
36. Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G, Pool-Zobel BL **(2006)** Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells, *Br. J. Nutr.*, 96(5), 803-810
37. Van der Meer-van Kraaij C, Kramer E, Jonker-Termont D, Katan MB, Van der Meer R and Keijer J **(2005)** Differential gene expression in rat colon by dietary heme and calcium, *Carcinogenesis*, 26(1), 73-79
38. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, et al. **(2005)** Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition, *J. Natl. Cancer Inst.*, 97(12), 906-916
39. Briviba K, Schnabele K, Schwertle E, Blockhaus M, Rechkemmer G. **(2001)** Beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis, *Biol. Chem.*, 382(12), 1663-1668
40. Bourre JM **(2004)** Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing, *J. Nutr. Health Aging*, 8, 163–174
41. Lapillonne A, Clarke SD and Heird WC **(2004)** Polyunsaturated fatty acids and gene expression, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 7, 151–156
42. Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, Dougherty ER, Wang N, Lupton JR, Carroll RJ et al. **(2004)** Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat, *Cancer Res.*, 64, 6797–6804
43. Reddy BS **(2000)** The Fourth DeWitt S. Goodman lecture. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 239-247
44. Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, Rao CV **(2000)** Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: Implications for human colon cancer prevention, *Cancer Res.*, 60, 4792-4797
45. Jaiswal M, LaRusso N, Burgart L, Gores G **(2000)** Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in colonic carcinoma cells by a nitric oxide dependent mechanism, *Cancer Res.*, 60, 184-189
46. Chilton RJ **(2004)** Pathophysiology of coronary heart disease: a brief review, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 104, 5S–8S
47. Haas MJ, Mooradian AD **(2010)** Therapeutic interventions to enhance apolipoprotein A-I-mediated cardioprotection, *Drugs.*, 70(7), 805-821
48. Kolovou G, Stamatelatos M, Anagnostopoulou K, Kostakou P, Kolovou V, Mihos C, Vasiliadis I, Diakoumakou O, Mikhailidis DP, Cokkinos DV **(2010)** Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and longevity syndrome, *Open Cardiovasc. Med. J.*, 4, 14-19
49. James WP **(1988)** Healthy nutrition. Preventing nutrition-related diseases in Europe, *WHO Reg. Publ. Eur. Ser.*, 24, 1-150
50. Mollet B, Rowland I **(2002)** Functional foods: at the frontier between food and pharma, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 483-485
51. Hardy G **(2000)** Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning, *Nutrition*, 16, 688-689

52. Walter PI **(2008)** 10 years of Functional Foods in Europe, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 78(6), 253-260
53. Patel D, Dufour Y, Domigan N **(2008)** Functional food and nutraceutical registration processes in Japan and China: a diffusion of innovation perspective, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 11(4), 1-11
54. Zhang Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P, et al. **(2006)** Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9370-9376
55. Bones AM, Rossiter JT **(2006)** The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates, *Phytochemistry*, 67, 1053-1067
56. De Felice L Stephen **(1995)** The nutraceutical revolution, its impact on food industry, *Trends in Food Sci. and Tech*, 6, 59-61
57. Dietary Supplement Health Education Act (DSHEA) of 1994. Public Law 103-417, available from FDA website: <http://www.fda.gov>
58. Pandey M, Verma RK, Saraf SA **(2010)** Nutraceuticals: new era of medicine and health, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), 11-15
59. Shay NF, Ban WJ **(2005)** Regulation of gene transcription by botanicals: novel regulatory mechanisms, *Annu. Rev. Nutr.*, 25, 297-315
60. MacDonald L, Foster BC, Akhtar H **(2009)** Food and Therapeutic Product Interactions – A Therapeutic Perspective, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 12, 367-377
61. Graham SE and Peterson JA **(1999)** How similar are P450s and what can their differences teach us, *Arch. Biophys. Biochem.*, 369, 24-29
62. Porter TD and Coon MJ **(1991)** Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms, *J. Biol. Chem.*, 266, 13469-13472
63. Nebert DW, Nelson DR, Coon HJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Stato R, Weterman MR, Waxman DJ **(1991)** The P450 superfamily: update on new sequences gene mapping and recommended nomenclature, *DNA and Cell Biol.*, 10, 1-14
64. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW **(1996)** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics.*, 6, 1-42
65. Nelson DR (2003) <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
66. Klaassen CD **(1996)** Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Companies Inc., New York
67. Jaiswal AK, Burnett P, Adesnik M and McBride OW **(1990)** Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6, *Biochemistry*, 29, 1899-1906
68. Knight TR, Choundhuri S, Klaassen CD **(2007)** Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice, *Toxicol. Sci.*, 100, 513-524

69. Cao Z and Li Y **(2004)** The chemical inducibility of mouse cardiac antioxidants and phase 2 enzymes in vivo, *Biochem. and Biophys. Research Comm.*, 371, 1080-1088
70. Longo V, Chirulli V, Gervasi PG, Nencioni S, Pellegrini M **(2007)** Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *Biotechnol. Lett.*, 29, 1155-1159
71. Giudice A, Montella M **(2006)** Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention, *Bioessays*, 28, 169-181
72. Talalay P **(2000)** Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes, *Biofactors*, 12, 5-11
73. Sheweta SA, Tilmisany AK **(2003)** Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes, *Curr. Drug Metab.*, 4, 45-58
74. Surh YJ, Kundu JK, Na HK **(2008)** Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals, *Planta Med.*, 74, 1526-1539
75. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW **(1994)** Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9926-9930
76. Lee JS, Surh YJ **(2005)** Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention, *Cancer Lett.*, 224, 171-84
77. Nguyen T, Yang CS, Pickett CB **(2004)** The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress, *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 433-441
78. Surh YJ, Kundu JK, Na HK **(2008)** Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals, *Planta Med.*, 74, 1526-1539
79. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. **(1999b)** Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.*, 13, 76-86
80. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW **(2003)** Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival, *J. Biol. Chem.*, 278, 8135-8145
81. Hanigan MH, Devarajan P **(2003)** Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanism, *Cancer Ther.*, 1, 47-61
82. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H **(1998)** Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by bioflavonoid quercetin, *Arch. Toxicol.*, 72, 536-540
83. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB **(2002)** The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Pharmacol.*, 62, 1154-1159
84. Sadowitz PD, Hubbard BA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Tacka KA, Aktas MK, Cunningham MJ, Dubowy RL, Souid AK **(2002)** Kinetics of

- cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol- blocking agents and thiol drugs, *Drug. Metab. Dispos.*, 30, 183–190
85. Hanigan MH, Lykissa ED, Townsend DM, Ou C, Barrios R, Lieberman MW **(2001)** Gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice are resistant to the nephrotoxicity of cisplatin, *Am. J. Pathol.*, 159, 1889–1894
 86. Townsend DM, Hanigan MH **(2002)** Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300, 142–148
 87. Park MS, De Leon M, Devarajan P **(2002)** Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13, 858–865
 88. Smyth JF, Bowman A, Perren T, Wilkinson P, Prescott RJ, Quinn KJ, Tedeschi M **(1997)** Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: results of a double-blind, randomised trial, *Ann. Oncol.*, 8, 569–573
 89. Hanigan MH and Frierson HF **(1996)** Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue, *J. Histochem. Cytochem.*, 44, 1101–1108
 90. Friesen C, Fulda S, Debatin KM **(1999)** Cytotoxic drugs and the CD95 pathway, *Leukemia*, 13, 1854–1858
 91. Ueda N, Kaushal GP, Shah SV **(2000)** Apoptotic mechanisms in acute renal failure, *Am. J. Med.*, 108, 403–415
 92. Zhan Y, Van de Water B, Wang Y, Stevens JL **(1999)** The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells, *Oncogene*, 18, 6505–6512
 93. Zhou H, Miyaji T, Kato A, Fujigaki Y, Sano K, Hishida A **(1999)** Attenuation of cisplatin-induced acute renal failure is associated with less apoptotic cell death, *J. Lab. Clin. Med.*, 134, 649–658
 94. Huang Q, Dunn RT, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, Blanchard KT **(2001)** Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology, *Toxicol. Sci.*, 63, 196–207
 95. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A **(2000)** Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis, *Am. J. Physiol. (Renal Physiol)*, 278, F726–F736
 96. Bauer MK, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K **(1998)** Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression, *J. Biol. Chem.*, 273, 8048–8055
 97. Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumaker PT **(2000)** Redox regulation of p53 during hypoxia, *Oncogene*, 19, 3840–3848
 98. Nowak G **(2002)** Protein kinase C- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells, *J. Biol. Chem.*, 277, 43377–43388
 99. Reed JC **(1997)** Cytochrome c: can't live with it - can't livewithout it, *Cell.*, 91, 559–562
 100. Higuchi M, Honda T, Proske RJ, Yeh ETH **(1998)** Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases, *Oncogene.*, 17, 2752–2760

101. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV **(1997)** Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure, *Am. J. Kid. Dis.*, 29, 467–477
102. Masubuchi Y, Kawasaki M, Horie T **(2006)** Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes associated with cisplatin-induced acute failure in male rats, *Arch. Toxicol.*, 80, 347-353
103. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY **(2006)** Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats, *Europ. J. Pharmacol.*, 532, 290-293
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ **(1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
105. Lubert RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolf T and Guengerich FP **(1985)** Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 43-48
106. Ko IY, Park SS, Song BJ, Pattern C, Tan Y, Hah YC, Yang CS and Gelboin HV **(1987)** Monoclonal antibodies to ethanol-induced rat liver cytochrome P450 that metabolise aniline and nitrosamines, *Cancer Res.*, 47, 3101-3109