

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISILOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXVII°

Tesi di Dottorato di Ricerca

EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL FUMO DI SIGARETTA
SULL'OMEOSTASI DEL GLUTATIONE IN CELLULE
DELL'EPITELIO RESPIRATORIO

Dottorando: Dott.ssa Valeria Rossetti

Matricola: R09718

Tutor: Prof. Giuliano Meyer
Dipartimento di Bioscienze

Coordinatore: Prof. Michele Mazzanti

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

1. Riassunto	4
2. Introduzione	7
2.1 Il fumo di sigaretta	7
2.2 Principali ossidanti nel fumo di sigaretta	10
2.3 Stress Ossidativo	12
2.4 Sistemi di difesa antiossidanti	15
2.4.1 Antiossidanti endogeni enzimatici	16
2.4.2 Antiossidanti endogeni non enzimatici	20
2.4.3 Antiossidanti esogeni vitaminici	27
2.4.1 Antiossidanti esogeni non vitaminici	29
2.5 Principali mucolitici e antiossidanti farmacologici	30
2.5.1 N-acetil-L-cisteina	30
2.5.2 Erdosteina	30
2.5.3 Fudosteine	31
2.5.4 Carbocisteina sale monoidrato di lisina	32
3. Scopo del lavoro	36
4. Materiali e Metodi	38
4.1 Colture cellulari	38
4.2 CSE (Cigarette Smoke Extract)	40
4.3 Saggi di citotossicità	41
4.3.1 Test con Sali di MTT per la vitalità cellulare	41
4.3.2 Analisi della vitalità cellulare con Trypan blue	43

4.3.3	Analisi della risposta apoptotica	44
4.4	Valutazione dei livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH)	46
4.5	Valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	47
4.6	Estrazione proteica	49
4.6.1	Estrazione proteine totali	49
4.7	Dosaggio proteico	50
4.8	Western blot	51
4.8.1	Elettroforesi SDS PAGE	51
4.8.2	Trasferimento	52
4.8.3	Blocco e incubazione con gli anticorpi	54
4.8.4	Sviluppo	56
4.8.5	Stripping della membrana	56
4.8.6	Colorazione con Rosso Ponceau	57
4.9	Real Time PCR quantitativa (qPCR)	57
4.9.1	Estrazione RNA	57
4.9.2	Retrotrascrizione	61
4.9.3	Real Time	62
4.10	Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx)	66
4.11	Analisi statistiche	68
5.	Risultati	69
5.1	Effetti del CSE sulla vitalità cellulare	69
5.1.1	Analisi della vitalità cellulare mediante Trypan blue	69
5.1.2	Analisi della vitalità cellulare mediante MTT Assay	71
5.1.3	Analisi della risposta apoptotica	72
5.2	Effetti del CSE sul contenuto intracellulare di GSH	73
5.3	Effetti del CSE sui livelli intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	77
5.4	Effetti del CSE sugli enzimi coinvolti nella sintesi del Glutatione	79

5.4.1	Esperimenti di Real Time PCR	79
5.4.2	Esperimenti di Western Blot	85
5.5	Effetti del CSE sull'attività dell'enzima Glutazione Perossidasi	90
6.	Discussione	92
6.1	Effetti del CSE sulla vitalità cellulare	93
6.2	Effetti del CSE sui livelli intracellulari di Glutazione ridotto (GSH) e sui livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	94
6.3	Effetti del CSE sugli enzimi coinvolti nella sintesi del Glutazione	96
	Bibliografia	101

1. Riassunto

Il fumo di sigaretta, essendo costituito da una miscela complessa di oltre 4700 composti, è considerato una fonte inesauribile di molecole ossidanti in grado di determinare stress ossidativo ed infiammazione a livello dei tessuti polmonari.

Tali composti sono considerati tra i principali fattori eziologici di varie malattie respiratorie, come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (*BPCO*), l'enfisema polmonare ed il tumore al polmone.

Il CSE (cigarette smoke extract), rappresenta un modello stabilito per lo studio in vitro degli effetti dell'esposizione del fumo di sigaretta e simula il fumo inalato dal fumatore. Esso induce stress ossidativo cellulare e colpisce il sistema del glutatione, uno dei più importanti agenti antiossidanti presenti nel citoplasma delle cellule e nel fluido che ricopre le vie aeree superiori.

La carbocisteina sale monoidrato di Lisina (*S-CMC-Lys*) ha trovato largo impiego terapeutico nelle affezioni delle vie aeree superiori. Questo farmaco oltre ad essere un fluidificante, può fungere da mucoregolatore ed è in grado di stimolare la secrezione di GSH.

L'obiettivo di questa tesi sperimentale è stato valutare il ruolo della *S-CMC-Lys* nello studio dello stress ossidativo in cellule polmonari umane indotto dall'esposizione al fumo di sigaretta, al fine di valutare i meccanismi difensivi antiossidanti.

A tale scopo abbiamo utilizzato come modello cellulare le 16-HBE, una linea cellulare di epitelio respiratorio umano.

Per testare l'effetto del fumo di sigaretta sul nostro modello sperimentale ne è stato valutato inizialmente l'effetto sulla vitalità cellulare.

I risultati ottenuti hanno permesso di osservare che il CSE determina un aumento significativo della mortalità cellulare in modo tempo e dose dipendente, attraverso un percorso apoptosi-indipendente.

Al fine di valutare il possibile effetto protettivo della S-CMC-Lys sui livelli intracellulari di GSH e ROS in seguito a stress ossidativo, sono stati effettuati esperimenti di fluorescenza utilizzando due differenti fluorofori: il monoclorobimane (MCB) per rilevare la presenza del tiolo e un derivato della fluorescina (CMH(2)DCFDA) per valutare i livelli di ROS intracellulari, aventi intensità di fluorescenza direttamente proporzionali alle concentrazioni intracellulari di GSH e ROS.

Mentre il CSE determina un aumento dei livelli di GSH e ROS, la S-CMC-Lys diminuisce i livelli di ROS in trattamenti brevi e diminuisce il drop indotto dal CSE nel caso di trattamenti brevi a basse concentrazioni o trattamenti lunghi ad alte concentrazioni. In parallelo sono state valutate l'espressione e l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH mediante esperimenti di RT-PCR, Western blot e saggi colorimetrici.

Gli enzimi chiave nel metabolismo del glutatione sono: la γ glutammil cistein sintetasi (GCS) che catalizza il primo step della sintesi *ex novo* di glutatione, la glutatione perossidasi (GPX) che catalizza la riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno a spese del glutatione ridotto e la glutatione reduttasi (GR) che permette il riciclo del glutatione ossidato in glutatione ridotto.

Finora sono state identificate otto isoforme della famiglia della glutatione perossidasi (GPx-1 – GPx-8), quattro di queste (GPx-1 - 4) sembrano essere espresse e funzionali nelle cellule delle vie aeree dove sembrano avere una funzione antiossidante in diversi compartimenti cellulari. Per il nostro studio abbiamo scelto di escludere la GPx-4 perché coinvolta per lo più nella protezione delle membrane.

I risultati mostrano un aumento dell'espressione di questi enzimi in seguito ad un trattamento sia breve che prolungato con CSE.

La S-CMC-Lys è efficace nel contrastare questi effetti solo in seguito ad una breve esposizione.

Il presente studio dimostra che, nelle cellule epiteliali bronchiali 16 - HBE, il CSE influisce negativamente sulla vitalità cellulare e porta ad una variazione dei livelli intracellulari di GSH e ROS, causando stress ossidativo. L'esposizione al CSE induce una risposta bifasica nelle cellule respiratorie; un'esposizione prolungata dà luogo ad

un recupero del calo iniziale di GSH (risposta adattativa), caratterizzato da una upregolazione dell'espressione degli enzimi coinvolti nella sintesi di GSH e nell'eliminazione dei ROS.

Il recupero della concentrazione intracellulare di GSH, osservata durante la risposta adattativa al CSE, sembra essere attribuibile principalmente ad un aumento dell'espressione della subunità modulatore della GCS, che porta ad un incremento dell'attività enzimatica e, di conseguenza, ad un aumento della sintesi di GSH.

Delle diverse isoforme della GPx espresse nelle cellule epiteliali respiratorie, la GPx-2 e 3 sembrano essere quelle maggiormente coinvolte nella difesa cellulare contro il CSE.

Oltre alla sua azione nota come farmaco mucolitico, S-CMC-Lys può quindi in qualche misura contrastare l'onere ossidativo indotto dal CSE, e potrebbe quindi essere utile per il trattamento di patologie associate al fumo di sigaretta.

Ulteriori studi in vivo sono necessari per studiare i meccanismi molecolari e gli effetti della carbocisteina nei fumatori.

2. INTRODUZIONE

2.1 IL FUMO DI SIGARETTA

L'apparato respiratorio, con la sua ampia superficie a contatto con l'ambiente esterno e per le sue particolari caratteristiche anatomiche e funzionali, è un organo ad alto rischio di danno ossidativo, essendo direttamente esposto a sostanze tossiche date dall'inquinamento atmosferico, dal fumo di sigaretta e da agenti infettivi. (Kariya et al., 2008).

Il fumo di sigaretta rappresenta uno dei principali fattori eziologici di diverse malattie respiratorie, tra le quali la broncopneumopatia cronica ostruttiva (*BPCO*), l'enfisema polmonare e il tumore al polmone.

Le malattie respiratorie croniche costituiscono un problema di salute pubblica globale che ha raggiunto proporzioni pandemiche. Recenti stime indicano che circa 300 milioni di pazienti soffrono di asma e 210 milioni di BPCO in tutto il mondo (Mohammad et al., 2013).

La broncopneumopatia cronica ostruttiva è una condizione caratterizzata da una progressiva, e in gran parte irreversibile, ostruzione delle vie aeree e da un afflusso di cellule infiammatorie nei polmoni (Rahman et al., 1999).

L'esposizione al fumo di sigaretta determina infatti il reclutamento di cellule infiammatorie, in particolar modo macrofagi e neutrofili, e le induce a secernere sostanze in grado di attivare i linfociti T perpetuando l'infiammazione. L'infiammazione cronica comporta il rimodellamento e il restringimento delle piccole vie aeree (bronchiolite) e causa la distruzione del parenchima e la perdita degli attacchi alveolari che sono responsabili della riduzione del ritorno elastico polmonare (enfisema).

La BPCO è associata a diverse altre malattie, come le malattie cardiovascolari, l'osteoporosi, il diabete e la sindrome metabolica, più frequentemente di quanto previsto dal caso (Barnes PJ, 2010).

Il fumo di sigaretta può essere diviso in due fasi: una componente gassosa e una corpuscolare.

La fase gassosa passa liberamente attraverso il filtro mentre quella corpuscolare viene intrappolata e trattenuta (Pryor et al., 1993).

La composizione del fumo di tabacco è complessa e variabile e dipende dalla qualità del tabacco, dalle lavorazioni cui è sottoposto e dal modo in cui viene fumato. Esso contiene più di 4700 specie chimiche differenti (Kariya et al., 2008), molte delle quali sono tossiche e cancerogene (Hausman, 2012) e contengono un'alta concentrazione di radicali liberi e antiossidanti (Pryor, 1997).

Le principali sono: l'ossido di carbonio, l'acido cianidrico, l'ossido di etilene, le N-nitrosammine, le ammine aromatiche, l'1-3 butadiene, gli ossidi d'azoto, le aldeidi, i fenoli, gli alcaloidi (come la nicotina), l'arsenico, gli elementi radioattivi e gli idrocarburi policiclici aromatici.

Sostanza	MS	SS
Componente gassosa		
Monossido di carbonio (mg)	10-23	2.5-4.7
Anidride carbonica (mg)	20-60	8.41
Formaldeide (µg)	70-100	0.1-0.50
Acroleina (µg)	60-100	8.15
Acetone (µg)	100-250	2-5
Piridina (µg)	20-40	10-20
3-vinil piridina (µg)	15-30	20-40
Acido cianidrico (µg)	400-500	0.1-0.25
Ossidi di azoto (µg)	100-600	4-10
Ammoniaca (µg)	50-130	4-130
N-nitrosodimetilamina (ng)	10-40	20-100
N-nitrosopirrolidina (ng)	6-30	6-30
Componente corpuscolata		
Materiale corpuscolato (mg)	15-40	1.3-1.9
Nicotina (mg)	1-2.3	2.6-3.3
Fenolo (µg)	60-120	2.0-3.0
Catecolo (µg)	100-280	0.6-0.9
Anilina (ng)	360	30
2-toluidina (ng)	160	19
2-naftilamina (ng)	1.7	30
Benzoantracene (ng)	2.0-7.0	2-4
Benzoalpirene (ng)	20-40	2.5-3.5
Chinolina (ng)	500-2000	8-11
N-nitrosonomicotina (µg)	200-3000	0.5-3
N-nitrosodietanolamina (ng)	20-70	1.2
Nickel (ng)	20-80	13-30
Polonio-210 (pCi)	0.03-0.5	?

Tabella 2.1 - Distribuzione di alcune sostanze tossiche selezionate nel flusso principale di fumo di sigaretta (main stream - MS) e nel flusso collaterale di fumo (side stream – SS) di sigarette senza filtro.

Tali componenti chimiche non sono però tutte preesistenti nelle foglie di tabacco: la maggior parte si formano durante la combustione, alle temperature che variano dai 600 agli 850 gradi, da altri composti presenti nelle foglie, detti precursori.

Fra le diverse sostanze presenti nel fumo di sigaretta tre sono particolarmente dannose per l'organismo:

- nicotina: responsabile della dipendenza fisica al fumo con azione stimolante, aumenta la frequenza cardiaca, la pressione arteriosa e restringe i vasi sanguigni;
- monossido di carbonio: gas rilasciato dal tabacco mentre brucia. Nel sangue si lega ai globuli rossi al posto dell'ossigeno con conseguente grave sofferenza del cuore, degli altri muscoli dell'organismo e dei vasi sanguigni;

- catrame: si forma quando il fumo si raffredda e condensa. Si raccoglie nei polmoni e può causare il cancro.

Il fumo di sigaretta induce uno stress ossidativo a livello dei polmoni e di tutto l'organismo (Rueff-Barroso et al., 2010), contribuendo ad un danno strutturale irreversibile del parenchima e delle pareti delle vie aeree (Balasubramanian et al., 2006).

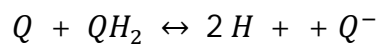
I macrofagi alveolari sono stimolati dagli ossidanti presenti nel fumo di sigaretta a produrre ulteriori specie reattive dell'ossigeno (ROS) e a rilasciare mediatori, alcuni dei quali attraggono neutrofili e altre cellule infiammatorie nei polmoni (Lee et al., 2012). Come conseguenza, aumentano i prodotti della perossidazione lipidica e le citochine pro infiammatorie e la capacità antiossidante delle cellule del polmone è ridotta.

I ROS indotti dal fumo di sigaretta (Cigarette Smoke Extract, CSE) inducono l'espressione genica di mediatori infiammatori, come IL-1 e TNF- α sui macrofagi alveolari e cellule epiteliali bronchiali, che a loro volta possono portare le cellule epiteliali delle vie respiratorie ad attivare geni pro-infiammatori, come TNF- α , IL-8, IL-1, iNOS, COX-2, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, MMP-9, MIP-1 α , GM-CSF, geni di risposta allo stress e geni degli enzimi antiossidanti (Biswas et al., 2009). Inoltre, l'esposizione al fumo di sigaretta, può causare anche una diminuzione della concentrazione del glutatione ridotto (GSH) (Avti et al., 2006) e l'espressione o l'attività di diversi enzimi antiossidanti come la glutatione perossidasi (GPx), la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi.

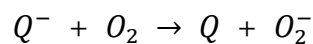
2.2 PRINCIPALI OSSIDANTI NEL FUMO DI SIGARETTA

Il fumo di sigaretta contiene numerose molecole ossidanti tra cui radicali liberi dell'ossigeno, perossidi e perossinitrili, sia in forma gassosa che particolata. Si stima che la quantità di radicali introdotta sia nell'ordine di 10^{14} radicali per puff (Kariya et al., 2008).

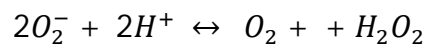
Le specie radicali con le proprietà chimiche più interessanti presenti nel fumo di sigaretta sono un semichinone in equilibrio con chinoni ed idrochinoni. Questo equilibrio chinone/semichinone/idrochinone è mostrato nell'equazione seguente, dove Q è un chinone, QH₂ un idrochinone, e Q⁻ un semichinone.



Molti dei componenti della fase corpuscolata del fumo di sigaretta sono solubili in acqua, incluso anche una parte del complesso sistema chinone polimerico appena descritto. Pertanto, l'estratto acquoso della fase corpuscolata contiene il sistema radicale chinone, che, come è tipico dei radicali chinoni, riduce l'ossigeno per formare superossido:



Il superossido, a sua volta, può reagire per formare perossido di idrogeno:



Queste soluzioni acquose della fase corpuscolata consumano così ossigeno e producono una serie di specie reattive dell'ossigeno che possono causare danni biologici (Pryor et al.,1993).

Anche la fase gassosa del fumo di sigaretta contiene alte concentrazioni di ossidanti/radicali liberi (>10¹⁵ molecole per puff), come O₂⁻, ossido nitrico e piccoli radicali alchilici e alcossilici, dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata. L'ossido nitrico e l'O₂⁻ reagiscono immediatamente a formare la molecola altamente reattiva del perossinitrito.

Questi radicali possono danneggiare direttamente o indirettamente le proteine del polmone, i lipidi, e il DNA, contribuendo allo stress ossidativo a livello polmonare.

2.3 STRESS OSSIDATIVO

Il termine stress ossidativo indica l'insieme delle alterazioni che si manifestano a livello di tessuti, cellule e macromolecole biologiche quando queste vengono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti (Corti et al., 2009).

Si può incorrere in stress ossidativo sia in condizioni normali di salute (praticando sport o facendo sforzi muscolari) sia negli stati patologici (obesità, diabete, ipertensione, patologie allergiche e flogistiche, artrite reumatoide, Alzheimer e Parkinson).

Elevati valori di stress ossidativo si riscontrano anche in condizioni di stress psico-fisico, esposizione ad inquinamento ambientale, fumo, radiazioni solari, abuso di alcol.

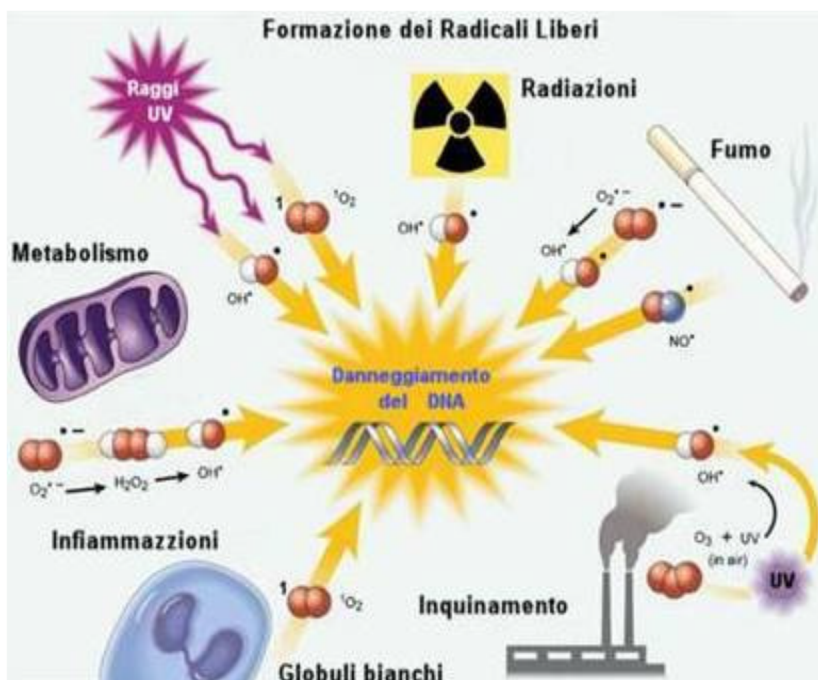


Figura 2.1 - Formazione dei radicali liberi.

Il fenomeno ossidativo viene osservato ogni qualvolta avviene un accumulo di sostanze radicaliche libere nei tessuti come ad esempio le specie reattive

dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species: ROS). Altri radicali liberi sono rappresentati dalle specie reattive dell'azoto e da agenti xenobiotici.

La pericolosità degli agenti radicali consiste nel fatto di essere in grado di reagire potenzialmente con qualsiasi componente cellulare (lipidi, proteine, DNA). Tali alterazioni possono danneggiare e mutare la funzionalità cellulare fino a provocarne l'apoptosi o la carcinogenesi.

In particolare, lo stress ossidativo indotto da radicali ossidrilici può avere come conseguenze: la perossidazione dei lipidi insaturi di membrana, l'ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine e danni al DNA (ricco di siti nucleofili).

Il risultato di queste alterazioni si può constatare a livello citoscheletrico, mitocondriale, del metabolismo cellulare e dell'attività di numerosi enzimi, dei lipidi e delle proteine di membrana, in quest'ultimo caso con conseguente aumento della permeabilità del plasmalemma e squilibrio dell'omeostasi ionica cellulare.

Dal punto di vista chimico i radicali liberi sono atomi o molecole molto reattive e con emivita breve.

La loro instabilità è molto spesso dovuta ad un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno dell'atomo che tende a diventare stabile solo accoppiandosi con un altro elettrone libero di spin opposto.

Generalmente queste specie reattive vengono prodotte in molte reazioni omolitiche biologiche ($A:B \rightarrow A\bullet + B\bullet$), nella scissione di un legame interatomico a carico e per intervento di diversi composti.

I maggiori responsabili del danno ai tessuti biologici sono le specie radicaliche dell'ossigeno, le quali si formano per riduzione monovalente dell' O_2 per acquisizione di un elettrone, formando: perossido di idrogeno (H_2O_2), anione superossido (O_2^-) e radicale ossidrilico ($\bullet OH$).

Solo O_2^- e $\bullet OH$ vengono definiti radicali liberi propriamente detti (contengono elettroni spaiati), mentre l'ossigeno singoletto rappresenta uno stato eccitato dell'ossigeno inoltre, il perossido d'idrogeno nonostante non sia un radicale e non reagisca spontaneamente con le molecole biologiche, si è dimostrato un forte ossidante.

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto.

Tutte le forme di vita conservano, all'interno delle loro cellule, un ambiente riducente che viene preservato da enzimi che mantengono lo stato ridotto attraverso un costante apporto di energia metabolica.

Determinate quantità di sostanze ossidanti sono indispensabili per mantenere il corretto funzionamento cellulare, regolando i meccanismi propri dell'omeostasi.

Durante le reazioni di riduzione dell'ossigeno, però, le specie reattive generate possono superare il valore soglia fisiologico.

Se si genera uno sbilanciamento tra la produzione di ROS e l'efficacia del sistema di difesa antiossidante, si stabilisce una condizione di stress ossidativo, come mostrato in figura 2.2 (Sompol et al., 2008).

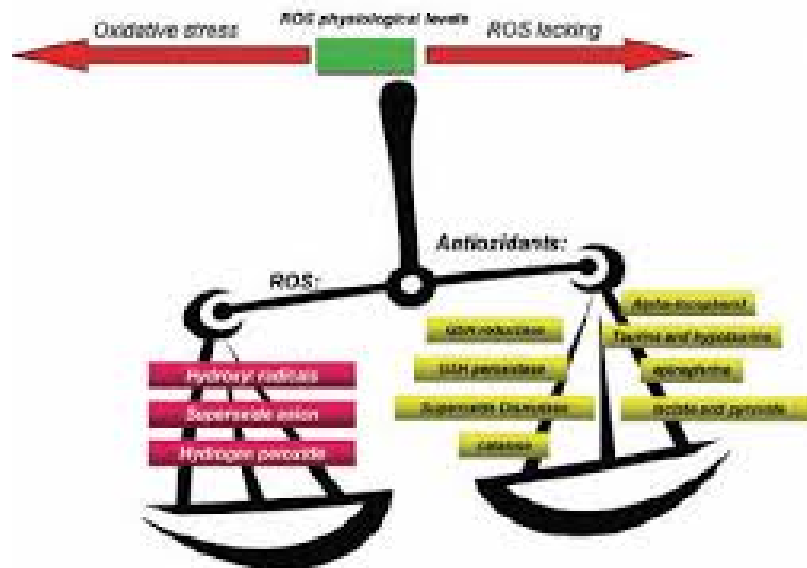


Figura 2.2 - Modificazione del normale equilibrio tra ROS e sostanze antiossidanti.

2.4 SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE

Gli effetti dei radicali liberi possono essere estremamente gravi: potenzialmente possono essere in grado di attaccare qualsiasi molecola del nostro organismo determinando la produzione di numerosi danni che si ripercuotono a livello di cellule, organi e apparati. Tuttavia l'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci che permettono di neutralizzare i ROS e di bloccare la loro attività ossidante.

Molti sistemi antiossidanti sono già presenti all'interno dell'organismo (antiossidanti endogeni); altri devono essere introdotti attraverso la dieta (antiossidanti esogeni).

Una prima classificazione degli antiossidanti si può effettuare in base alla loro provenienza e alle caratteristiche strutturali: tra gli antiossidanti endogeni sono presenti sistemi enzimatici, come il sistema superossido dismutasi-catalasi-glutazione perossidasi e non enzimatici, come selenio-proteine e glutazione. Tra gli antiossidanti esogeni si trovano vitamine e composti non vitaminici, come carotenoidi e polifenoli.

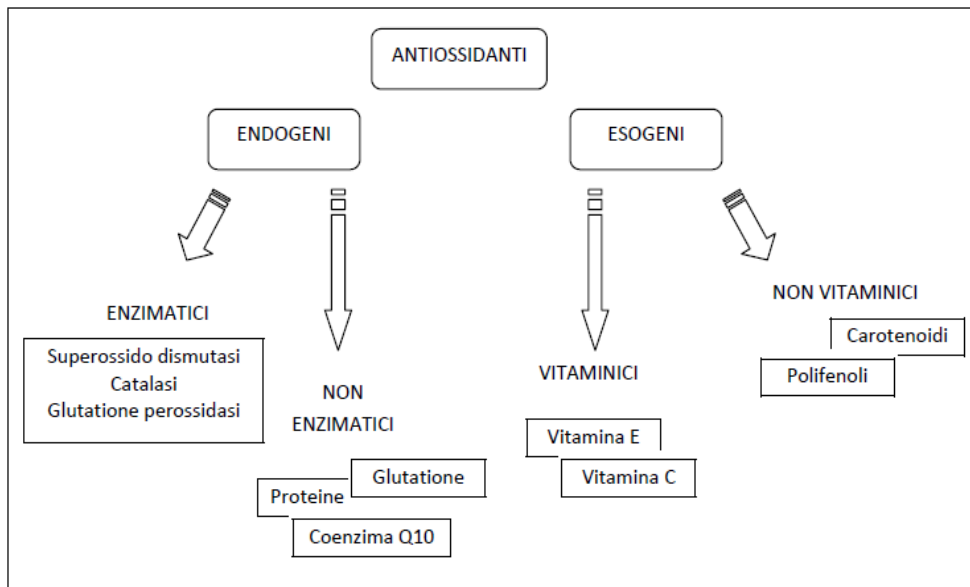


Figura 2.3 - Classificazione degli antiossidanti a seconda di provenienza e struttura.

Un secondo tipo di classificazione si può effettuare considerando le modalità di azione degli antiossidanti: gli antiossidanti primari o preventivi limitano l'azione

ossidante delle specie reattive dell'ossigeno favorendo la trasformazione dei ROS in specie non reattive (es. sistema enzimatico superossido dismutasi-catalasi-glutatione perossidasi), chelando metalli di transizione o rigenerando altri antiossidanti (es. glutazione, vitamina C), riportandoli nelle loro forme attive. Gli antiossidanti secondari o di tipo *chain-breaking* (es. polifenoli) hanno strutture che permettono loro di bloccare i radicali liberi, trasformandosi in radicali meno reattivi di quelli di partenza.

In questo modo gli antiossidanti riescono ad intervenire nella fase di iniziazione e di propagazione di reazioni radicaliche come ad esempio nel caso della perossidazione lipidica, rallentandone la velocità.

2.4.1 Antiossidanti endogeni enzimatici

Alla classe degli antiossidanti endogeni appartengono una vasta gamma di enzimi in grado di detossificare la cellula dai ROS attraverso delle reazioni enzimatiche in cui le specie radicaliche dell'ossigeno perdono la loro reattività e vengono trasformate in sostanze innocue per la cellula [Figura 4].

Il più efficiente sistema antiossidante enzimatico è quello costituito dagli enzimi superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi. Attraverso l'azione combinata dei tre enzimi, il sistema contribuisce a limitare la concentrazione di ROS all'interno della cellula, riducendo l'anione superossido ad acqua e ossigeno.

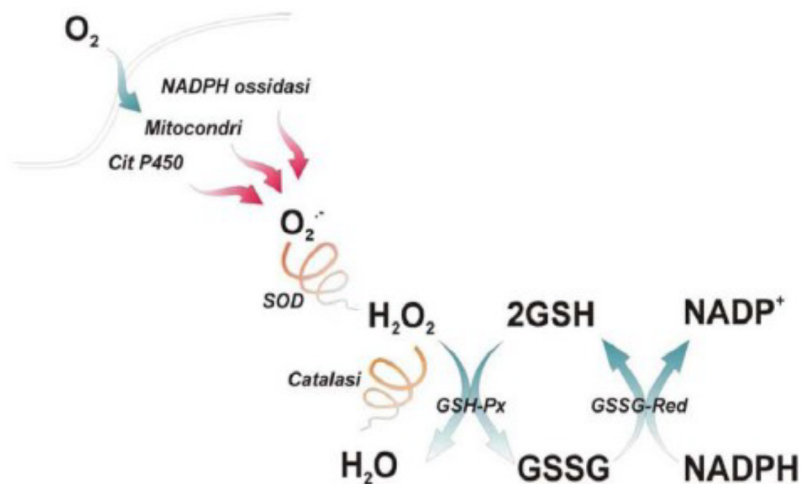
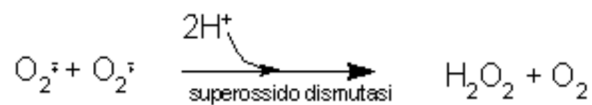


Figura 2.4 - Principali difese antiossidanti endogene. SOD (superossido dismutasi); GPx (glutatione perossidasi); GSSG-Red (Glutatione Redattasi); Catalasi.

2.4.1.1 Superossido Dismutasi

L'enzima superossido dismutasi (SOD) è stato scoperto nel 1969 da McCord e Fridovich e rappresenta la prima difesa nei confronti dei ROS e, in particolare, del radicale superossido. La SOD infatti catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare.

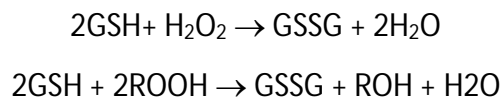


Nei mammiferi sono presenti tre isoforme dell'enzima SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3) e tutte hanno la caratteristica di avere un metallo di transizione redox attivo nel loro sito catalitico necessario per catalizzare la reazione di dismutazione (Culotta *et al.*, 2006). Le diverse isoforme dell'enzima SOD, codificate da geni diversi, si caratterizzano, oltre che per il diverso catione metallico che funge da cofattore, anche per la diversa compartimentazione; si distinguono una Cu, Zn-SOD (SOD-1) localizzata principalmente a livello della zona citoplasmatica e nello spazio intermembrana, una Mn-SOD (SOD-2) principalmente presente nella matrice mitocondriale e una Fe-SOD (SOD-3) localizzata nello spazio extracellulare. I geni che

codificano per le tre famiglie di SOD, ad oggi note, derivano da due geni ancestrali tra loro non correlati. Da uno dei due geni ancestrali deriva il gruppo delle Mn-SOD e delle Fe-SOD, estremamente diffuso a livello degli organismi aerobi, dai batteri, alle piante fino all'uomo. Dall'altro discende la famiglia delle Cu, Zn-SOD, distribuito esclusivamente tra gli organismi eucariotici.

2.4.1.2 Glutazione Perossidasi & Glutazione Reduttasi

Un altro enzima fondamentale nella detossificazione del perossido di idrogeno è la Glutazione Perossidasi (GPx). Si tratta di enzimi selenio-dipendente che convertono H₂O₂ o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) rispettivamente attraverso l'ossidazione di glutazione ridotto (GSH). Di seguito viene riportata la reazione di dismutazione del H₂O₂ e degli idroperossidi organici:

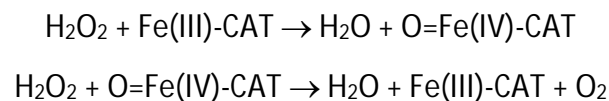


Sebbene tutte le GPx catalizzano apparentemente la stessa reazione, ogni enzima differisce sia per la localizzazione cellulare (citosol, mitocondrio, ecc) che per la specificità del substrato (Brigelius-Flohe, 1999). Un altro enzima coinvolto nella detossificazione di substrati ossidati è Glutazione-S-Transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai substrati ossidati che vengono poi eliminati dall'organismo. Nell'uomo e nei mammiferi sono state identificate e caratterizzate 7 diverse classi di GST-transferasi appartenenti ad un'unica famiglia di enzimi solubili citosolici e, solo recentemente, sono state identificate altre due famiglie di enzimi a localizzazione rispettivamente mitocondriale e microsomiale (MAPEG). L'attività sia delle GPx che delle GST comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG; al fine di mantenere costante il rapporto GSH/GSSG, il GSSG viene rilasciato dalla cellula e degradato nell'ambiente extracellulare. Il GSH può essere rigenerato attraverso la sintesi *ex novo* o attraverso riduzione della forma ossidata GSSG ad opera della glutazione reduttasi (GR), una

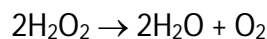
flavoproteina che permette di convertire GSSG in GSH utilizzando come agente riducente il NADPH. Il GSH può essere sintetizzato *ex novo* attraverso due reazioni sequenziali, ATP-dipendenti, catalizzate rispettivamente dalla γ -glutamilcisteina sintetasi (γ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutatione sintetasi.

2.4.1.3 Catalasi

Dato che la reazione di dismutazione dell'anione superossido porta alla formazione del perossido di idrogeno, la funzione antiossidante della Cu, ZnSOD è legata all'attività di altri enzimi detossificanti, quali la catalasi e GSH-Px. La catalasi è un enzima tetramerico ad alto peso molecolare contenente porfirina nel sito attivo. La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H_2O_2) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



La reazione netta risultante è quindi:



2.4.1.4 Tioredoxina

La tioredoxina (indicata con l'acronimo Trx) è una piccola proteina ubiquitaria, la sua espressione può essere indotta ad esempio, nei linfociti o in altre cellule, a seguito di stress ossidativo causato da perossido di idrogeno o irradiazioni con raggi UV.

Con il sistema del Glutatione (GSH), la Trx gioca un ruolo importante nel mantenimento dello stato ridotto intracellulare negli organismi superiori. La sequenza a monte del gene per la Trx sembra contenere siti di legame per alcuni fattori trascrizionali redox-sensibili quali AP-1 e NF-kB (Hayashi et al., 1993; Nakamura et al., 1997).

Risultati precedenti dimostrano il ruolo della Trx nella difesa contro lo stress ossidativo e nel controllo dell'apoptosi (Saitoh et al., 1998). Molte di queste funzioni dipendono dall'attività disolfuro reduttasica della proteina, con l'ausilio del NADPH e della Trx reduttasi.

L'attività ossido-reduttasica della proteina ha due funzioni molto importanti:

- Trasportatore di elettroni necessari per il ciclo catalitico di biosintesi enzimatica (ribonucleotide reduttasi, solfato reduttasi);
- Protezione delle proteine citosoliche dall'aggregazione o dall'inattivazione attraverso la formazione di ponti disolfuro inter- o intramolecolari.

La secrezione della Trx in condizioni di stress ossidativo e infiammazione è stata osservata in molti citotipi sani e neoplastici.

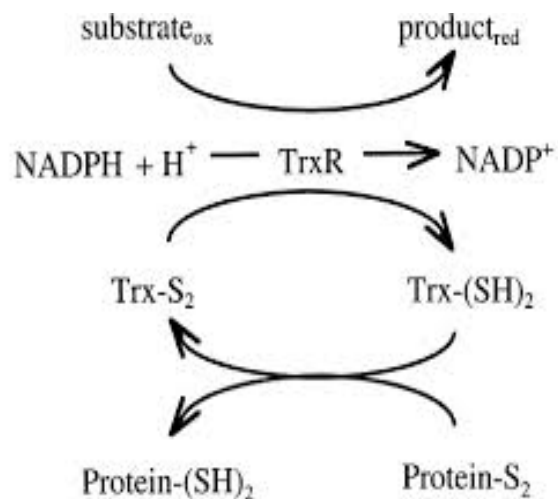


Figura 2.5 - Schema dell'attività reduttasica del sistema NADPH/tioredoxina.

2.4.2 Antiossidanti endogeni non enzimatici

Tra i sistemi non enzimatici è opportuno citare il glutatione.

2.4.2.1 Glutazione

Il glutazione è il principale tiolo non proteico implicato nella difesa cellulare antiossidante.

È un tripeptide [Figura 2.6] idrosolubile formato da cisteina, acido glutammico e glicina (Smith et al., 1996). Rappresenta il più abbondante composto tiolico a basso peso molecolare (PM = 307,33) presente nelle cellule animali.

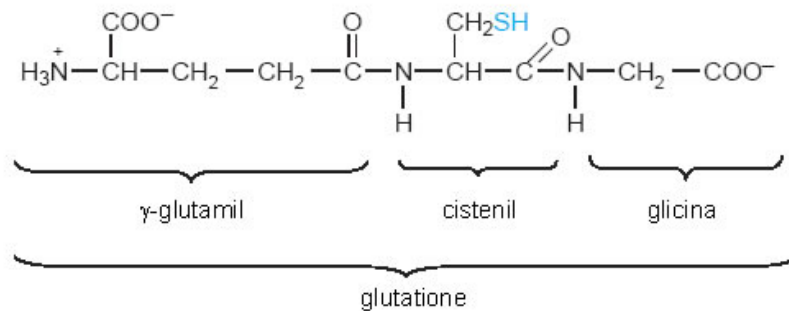


Figura 2.6 - Struttura del glutazione.

Il glutazione è una molecola ubiquitaria che viene prodotta in tutti gli organi, soprattutto nel fegato, tuttavia all'interno dei singoli organelli cellulari la distribuzione non è omogenea; infatti, circa l'80-85% del glutazione totale è presente nel citosol, dove viene sintetizzato, mentre il restante 10-15% è concentrato all'interno dei mitocondri, dove, tuttavia, la concentrazione raggiunta è paragonabile a quella del citosol (Griffith and Meister, 1985).

Poiché all'interno dei mitocondri non sono presenti gli enzimi per la sintesi del glutazione, la sua concentrazione viene mantenuta costante con un uptake continuo dal citosol, ad opera di trasportatori specifici.

In molte cellule, la concentrazione citosolica di glutazione è compresa tra 1-10 mM. Concentrazioni micromolari sono invece presenti nel plasma (2-20 μM) (Wu et al., 2004; Gao et al., 1999). A livello dell'ELF (epithelial lining fluid) la concentrazione di GSH è 10-100 volte più alta rispetto al plasma (Cantin et al., 1987).

A livello dei fluidi che ricoprono l'epitelio respiratorio rappresenta però il più importante agente antiossidante non enzimatico.

Il glutathione può essere presente in cellula in due forme: il glutathione ridotto (GSH), circa il 90-95% del glutathione totale, costituito da un solo tripeptide, ha azione antiossidante e il glutathione ossidato (GSSG), presente in minore quantità in cui due molecole di glutathione formano un ponte disolfuro tramite l'ossidazione dei due gruppi sulfidrilici di ciascuna cisteina (Franklin et al., 2009).

Le concentrazioni intracellulari di GSH sono ampiamente ridotte in condizioni di malnutrizione, stress ossidativo e molte condizioni patologiche.

La sintesi del GSH è un processo in due tappe [Figura 2.7], catalizzato da due diversi enzimi. Nella prima reazione la γ -glutammina-cisteina ligasi (GCL) sintetizza, consumando una molecola di ATP, la γ -glutammina-cisteina a partire da glutammina e cisteina; nel secondo passaggio la glutathione sintetasi (GS), consumando un'altra molecola di ATP, catalizza l'aggiunta di una molecola di glicina alla γ -glutammina-cisteina, sintetizzando glutathione. Il glutathione stesso esercita un'inibizione a feedback sulla γ -glutammina-cisteina sintetasi (Dringen, 2000).

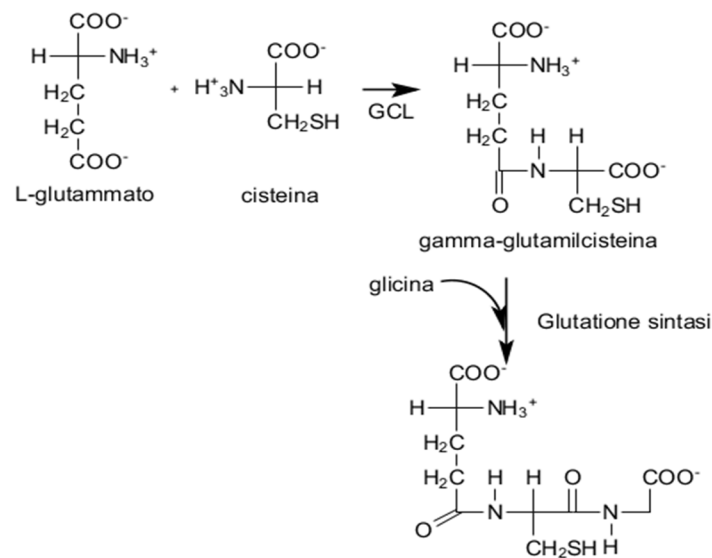


Figura 2.7 - Reazione di sintesi del glutathione.

Tali enzimi (GCL e GS), presenti in tutti i tipi cellulari, sono particolarmente attivi nel fegato, dato che a carico di quest'organo avviene la maggior parte della produzione di GSH dell'intero organismo.

Nel corso della prima reazione il gruppo carbossilico γ del glutammato reagisce con il gruppo amminico della cisteina a formare un legame peptidico di tipo γ che protegge il GSH dall'idrolisi causata da peptidasi intracellulari.

La GCL è un eterodimero costituito da una subunità catalitica pesante e una modulatore leggera. La subunità catalitica (GCLC) è la più grande delle due subunità (637 amminiacidi, 73 KDa) e contiene il sito attivo responsabile del legame ATP-dipendente tra cisteina e glutammato.

La subunità modulatore è la più piccola (274 amminiacidi, 31 KDa) e attraverso la diretta interazione con GCLC è in grado di aumentare l'efficienza catalitica di GCLC.

GCLM riduce la K_m per il glutammato e l'ATP e aumenta la K_i per l'inibizione a feedback del GSH (Franklin et al., 2009).

La GCL è l'enzima limitante la velocità della sintesi di GSH.

Tra i fattori che intervengono nella regolazione della sintesi di GSH vi sono la disponibilità di cisteina e la concentrazione stessa di GSH che funge, con un meccanismo di feedback negativo, da inibitore della GCL.

Il principale fattore limitante per la sintesi di GSH è l'amminoacido cisteina; il pool intracellulare di tale amminoacido è generalmente più basso rispetto a quello di GSH (Chung et al., 1990) risulta quindi necessario reintrodurlo in cellula.

Dati presenti in letteratura avrebbero infatti dimostrato che sostanze che stimolano l'uptake di cisteina, come i fattori di crescita e l'insulina, generalmente provocano l'aumento della concentrazione di GSH in cellula (Lu et al. 2000).

Sembra inoltre che questi fattori, oltre a favorire l'ingresso di cisteina in cellula, stimolino anche l'attività della GCL così come lo stress ossidativo, le citochine infiammatorie, il cancro, la chemioterapia, le radiazioni ionizzanti, lo shock termico, la prostaglandina A_2 , i metalli pesanti e gli antiossidanti (Lu et al., 2000; Townsend et al., 2003).

Per contro, l'attività della GCL può essere inibita da una dieta ipoproteica, dal dexametasone, dall'eritropoietina, dal fattore di crescita tumorale β (TGF β), dall'iperglicemia e dalla fosforilazione della stessa GCS (Chung et al., 1990).

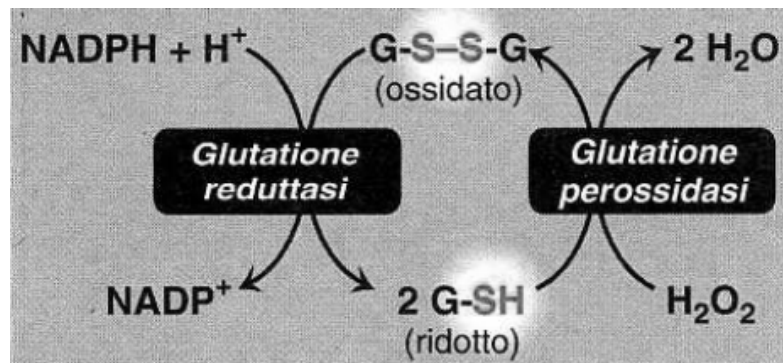


Figura 2.8 - Meccanismo d'azione della Glutazione Reduttasi e della Glutazione Perossidasi.

Il GSH prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi. La reazione di riduzione del glutatiene ossidato (GSSG) viene catalizzata dalla Glutazione Reduttasi (GR) in presenza di NADPH quale donatore di elettroni [Figura 2.8].

La glutatiene-disolfuro reduttasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:

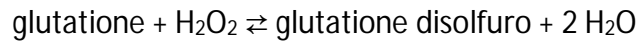


La GR è un flavoenzima e l'esposizione ad agenti che inducono stress ossidativo, ne comporta un aumento della trascrizione.

Evidenze sperimentali hanno rilevato l'importanza dell'attività della GR sia nel metabolismo del GSH che nelle reazioni di difesa GSH-dipendenti.

Durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno e dei composti elettrofili, il GSH agisce da substrato per la Glutazione Perossidasi e per la Glutazione S-Transferasi.

La glutatione perossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:



Le Glutazione perossidasi sono una famiglia di enzimi antiossidanti selenio-dipendenti e indipendenti che catalizzano la riduzione dei danni causati da perossido di idrogeno (H_2O_2) e da una grande varietà di idroperossidi (come i perossidi del DNA e i perossidi a livello lipidico) in acqua e alcoli, rispettivamente, proteggendo così le biomembrane e i componenti cellulari dallo stress ossidativo. (Duong et al., 2010).

In presenza di GSH si forma un legame tra selenio e zolfo, poi rotto da una seconda molecola di GSH con la produzione di Glutazione Perossidasi Ridotta.

Durante questo processo catalitico, lo stato di ossidazione dell'enzima dipende dalla concentrazione relativa del substrato ridotto (GSH) e di quello ossidato (GSSG).

Vi sono diversi isoenzimi codificati da diversi geni, che variano nella localizzazione cellulare e nella specificità di substrato: la glutatione perossidasi citosolica (cGpx, GPX-1), la idroperossidasi dei fosfolipidi (PHGPx, gpx-4), la glutatione perossidasi plasmatica (PGPX, gpx-3), la glutatione perossidasi gastrointestinale (GI-GPX GPX -2), la glutatione perossidasi 5 (espresso specificamente in epididimo topo), e, nell'uomo, la glutatione perossidasi 6, limitata al sistema olfattivo. Anche se la loro espressione è ubiquitaria, i livelli di ogni isoforma variano a seconda del tipo di tessuto. (Duong et al., 2010).

La GPx-1 è l'isoforma predominante ed è ubiquitariamente espressa in tutto l'organismo. Nei polmoni si trova a livello dell'epitelio, del liquido di rivestimento epiteliale alveolare, e nei macrofagi alveolari. Ci sono dati che suggeriscono che GPx-1 può avere un ruolo nella regolazione della risposta infiammatoria in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta. Elevati livelli di H_2O_2 sono stati misurati nel respiro di pazienti affetti da BPCO, in particolare durante le riacutizzazioni.

La GPx-2, conosciuta anche come Glutazione perossidasi gastrointestinale è espressa in modo particolare nell'epitelio del tratto gastrointestinale.

Tra le varie isoforme di GPx, la GPx-2 ha mostrato la massima induzione nei polmoni di topi in risposta al fumo di sigaretta. Analogamente, nell'uomo la GPx-2 ha la più alta induzione trascrizionale nell'epitelio delle vie aeree dei fumatori rispetto ai non fumatori (Singh et al., 2006).

La fonte principale della GPx-3 è il rene. Nel rene è prodotta dalle cellule dell'epitelio tubulare prossimale e dalle cellule parietali della capsula di Bowman e rilasciata poi nel sangue. Minori quantità di GPx-3 si trovano nel fegato, nel muscolo scheletrico, nel pancreas, nel cervello, nei polmoni, nel cuore, nell'epitelio ciliare dell'occhio, nelle cellule epiteliali di assorbimento dell'intestino crasso, nell'epididimo, nella placenta (Brigelius-Flohé, 1999).

L'esposizione cronica al fumo di sigaretta induce l'espressione di GPx-3 nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie umane e nei macrofagi alveolari (Singh et al., 2006).

Il glutatione è responsabile del mantenimento dello stato ridotto delle proteine cellulari contenenti un gruppo tiolico.

Una diminuzione dei livelli di GSH provoca un'accelerazione della formazione dei ponti disolfuro all'interno delle proteine, che ripiegandosi in maniera errata presenterebbero un'alterazione della loro funzionalità (Chakravarthi and Bulleid, 2004).

Gli eventi di "glutathionilazione" sono importanti per la funzionalità di numerose proteine alle quali il GSH è legato covalentemente regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti.

Mascherando il gruppo tiolico, la proteina non sarebbe più in grado di formare ponti disolfuro e potrebbe passare da una conformazione inattiva a una attiva o viceversa (Townsend et al., 2003).

Sebbene la glutathionilazione proteica venga considerata come uno dei principali meccanismi protettivi per prevenire l'ossidazione irreversibile dei tioli proteici, evidenze recenti suggeriscono che le reazioni controllate di glutathionilazione possono anche essere usate per modificare la struttura e la funzione delle proteine.

In molti protidi infatti, sono state trovate cisteine che potrebbero rappresentare siti specifici di attacco del Glutatione; inoltre l'abbondanza di proteine glutationate sembra aumentare durante lo stress ossidativo.

Il GSH presente in cellula possiede anche altre funzioni:

- Reagisce con vari elettrofili, metaboliti fisiologici (estrogeni, melanina, prostaglandine e leukotrieni) e xenobiotici (bromobenzene e acetoaminofene). Queste reazioni sono catalizzate dalla GSH-S-Transferasi;
- Reagisce con l'NO a formare l'S-formylGlutatione che grazie al sistema della tioredoxina è convertito in NO e GSH;
- È necessario come substrato della formaldeide deidrogenasi, che converte la formaldeide in S-formylGlutatione. La rimozione della formaldeide (composto cancerogeno) è di importanza fisiologica perché si produce nelle reazioni metaboliche della metionina, della colina, del metanolo, della sarcosina e degli xenobiotici (attraverso il sistema della monossigenasi P450 dipendente dal reticolo endoplasmatico);
- È richiesto per la conversione della prostaglandina H₂ (un metabolita dell'acido arachidonico) a prostaglandina D₂ e E₂;
- Il GSH viene considerato importante per numerose altre funzioni vitali nelle cellule animali quali: la proliferazione cellulare, la spermatogenesi, l'attivazione dei linfociti T e dei leucociti polimorfo nucleati e la produzione di citochine durante il processo infiammatorio.

2.4.3 Antiossidanti esogeni vitaminici

Tra gli antiossidanti vitaminici i più efficienti sono la vitamina C o acido ascorbico e la vitamina E, che svolgono fundamentalmente la stessa funzione: la prima in ambiente acquoso, la seconda in ambiente lipofilo.

2.4.3.1 Vitamina C o Acido ascorbico

La vitamina C (ascorbato - Asc): è un antiossidante non enzimatico idrosolubile e spiccatamente acido. Presenta due gruppi idrossilici ionizzabili (AscH₂): tuttavia, a pH

fisiologico, il 99.9% della vitamina C è presente sottoforma di semideidroascorbato (AscH^-).

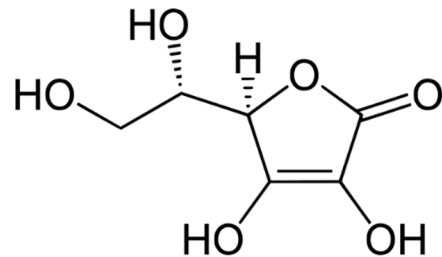


Figura 2.9 - Struttura chimica dell'ascorbato.

Nell'interazione con i radicali, AscH^- dona un elettrone, generando così il radicale semideidroascorbico ($\text{Asc}\cdot^-$). Quest'ultimo è scarsamente reattivo ed è infatti considerato come un antiossidante terminale. Sembra, comunque, che la vitamina C abbia un ruolo importante soprattutto in reazioni di ossidoriduzione catalizzate da ossigenasi. La sua attività antiossidante si esplica principalmente in associazione ad enzimi antiossidanti, carotenoidi e vitamina E.

2.4.3.2 Vitamina E o α -tocoferolo

Esistono 8 tipi di vitamina E. Fra queste, l' α -tocoferolo [Figura 2.10] è la forma biologicamente più potente ed attiva. E' infatti il più importante antiossidante liposolubile utilizzato dalle cellule.

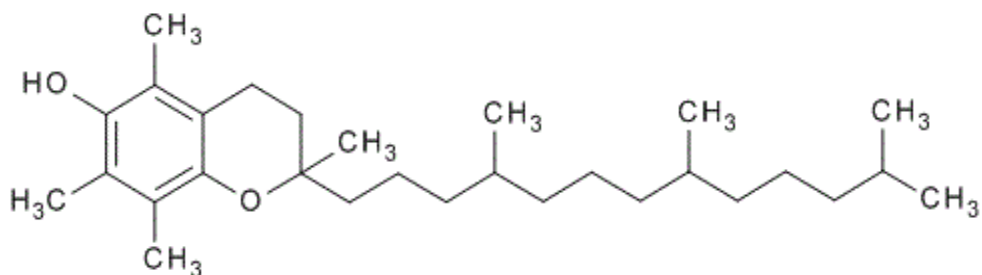


Figura 2.10 - Struttura chimica dell' α -tocoferolo.

La sua attività antiossidante è volta alla prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo della perossidazione lipidica. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando l'elettrone del suo gruppo idrossilico ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la loro perossidazione. Tale reazione *redox* trasforma l' α -tocoferolo in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C, il glutatione o la vitamina Q (Q10) per riformare l' α -tocoferolo.

2.4.4 Antiossidanti esogeni non vitaminici

Tra gli antiossidanti non vitaminici sono importanti da citare i polifenoli e i carotenoidi.

2.4.4.1 Polifenoli

I polifenoli sono antiossidanti naturali presenti nelle piante (molecole polifenoliche tipo bioflavonoidi noti come procianidine, proantocianidine, leucoantocianidine, piconogenoli, tannini, ecc.) e possono risultare utili nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine e nel reagire con i radicali liberi, eliminandoli; sono accertati inoltre effetti biomedici positivi a livello cardiovascolare, di malattie legate alla senescenza e di arresto della crescita tumorale.

2.4.4.2 Carotenoidi

Negli organismi fotosintetici, i carotenoidi, invece, giocano un ruolo centrale nel processo di fotosintesi: infatti da una parte prendono parte alla catena di trasporto dell'energia, e dall'altra proteggono il centro di reazione dall'ossidazione. Negli organismi non fotosintetici, invece, queste molecole sembrano avere un ruolo importante nei meccanismi anti-ossidativi.

I carotenoidi possiedono molte proprietà fisiologiche, e hanno importanti effetti sia nelle piante che in altri organismi. A causa della loro particolare struttura molecolare,

sono capaci di legare ed eliminare i radicali liberi, e giocano in questo senso un ruolo importante nel sistema immunitario dei vertebrati.

2.5 PRINCIPALI MUCOLITICI E ANTIOSSIDANTI FARMACOLOGICI

Gli agenti antiossidanti, come i composti donatori di tioli e i loro analoghi (farmaci mucolitici, come l'N-acetil-L-cisteina (NAC), la carbocisteina, l'erdosteina, e il fudosteina) disintossicano dai radicali liberi e dagli ossidanti, aumentano i livelli di tioli intracellulari, controllano l'attivazione di NF- κ B e inibiscono espressione genica infiammatoria.

2.5.1 N-ACETIL-L-CISTEINA (NAC)

La NAC è un derivato N-acetilato dell'amminoacido cisteina, ed è un forte agente riducente.

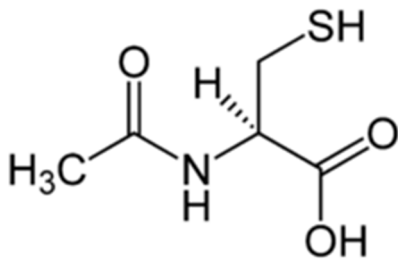


Figura 2.11 - Struttura chimica dell'N-acetil-L-cisteina.

È un agente mucolitico che riduce la viscosità del muco, migliorando così la clearance mucociliare. La NAC è deacetilata nel tratto gastrointestinale e la cisteina serve come precursore del glutathione. Riducendo i legami disolfuro, la NAC è in grado di neutralizzare le specie ossidanti. Poiché la NAC può ridurre la cistina intracellulare a cisteina, può aumentare i livelli intracellulari di GSH in vivo nei polmoni (Rahman and MacNee, 2012).

2.5.2 ERDOSTEINA

L'erdosteina è un tiolo antiossidante mucolitico.

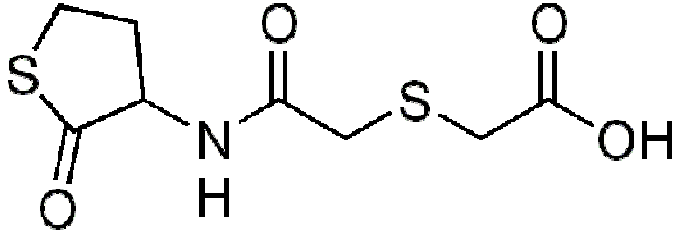


Figura 2.12- Struttura chimica dell'erdosteina.

Il farmaco è stato originariamente utilizzato come agente mucolitico ed agisce rompendo i legami disolfuro delle glicoproteine del muco, agendo sulle proprietà fisiche del muco porta ad un aumento della clearance del muco. Inoltre ha attività antiossidante, anti-infiammatoria e antibatterica (Rahman and MacNee, 2012).

2.5.3 FUDOSTEINE

Il Fudosteine è stato usato come mucolitico e antiossidante.

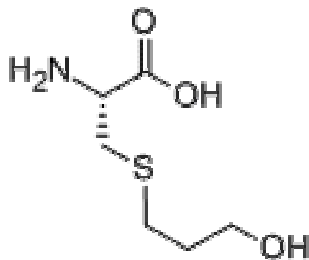


Figura 2.13 - Struttura chimica del fudosteine.

Questo farmaco ha una maggiore biodisponibilità rispetto alla NAC e agisce come antiossidante aumentando i livelli intracellulari di cisteina (Rahman and MacNee, 2012).

2.5.4 CARBOCISTEINA SALE MONOIDRATO DI LISINA

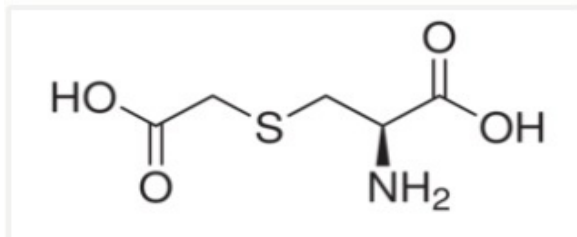


Figura 2.14 - Struttura chimica della Carbocisteina sale monoidrato di lisina (S-CMC-Lys).

La carbocisteina (S-CMC-Lys) è un muco regolatore derivato dalla cisteina, normalmente impiegato nella cura delle costrizioni bronchiali, soprattutto se croniche, ed in altre patologie che riguardano un'eccessiva produzione di muco.

La Carbocisteina è disponibile sia come preparazione orale sia come S-CMC e il suo sale di lisina (S-CMC-Lys).

Il gruppo della lisina viene scisso durante assorbimento gastrico per formare il principio attivo (Hooper and Calvert 2008).

Questo farmaco fu sintetizzato per la prima volta nel 1930 e fu reso disponibile come mucoregolatore nelle malattie respiratorie negli anni Sessanta (Hooper and Calvert, 2008).

L'azione mucolitica della carbocisteina differisce dagli altri mucolitici tiolici, come la NAC e l'erdosteina poiché essa aumenta il contenuto di sialomucine, influenzando le proprietà reologiche del muco attraverso l'inibizione di chinine. La Carbocisteina facilita inoltre la velocità di clearance mucociliare, in particolare nei pazienti con bronchite cronica che hanno una clearance lenta prima del trattamento (Braga et al., 1990).

Questo farmaco ha diverse proprietà:

Proprietà mucolitiche

La CMC ha un effetto "normalizzante" sulla clearance e sulla fluidità delle secrezioni bronchiali.

In condizioni basali il muco è composto da tre classi principali di glicoproteine: le sialo e sulfomucine tipicamente acide, le fucomucine neutre.

Questi elementi assumono un significato protettivo e strutturale nei confronti dell'epitelio sottostante; infatti alcune patologie dipendono da un cambiamento del rapporto sialo e fuco mucine.

Le sostanze regolatrici più importanti per la fluidità del muco sono i derivati della cisteina, tra cui la S-Carbossimetilcisteina (S-CMC). Diversamente da altri derivati della cisteina, come la N-acetil-L-cisteina (NAC) o la S-Carbamil-L-cisteina (CAC), la S-CMC-Lys funge da mucoregolatore anziché da semplice fluidificante.

Nella S-Carbossimetilcisteina il gruppo sulfidrilico è bloccato da un residuo di acido carbossilico quindi non si limita a ridurre il ponte disolfuro delle mucine bensì interferisce con la sintesi di queste ultime.

La sua efficacia mucolitica è legata alla sua capacità di sostituire fucomucine con sialomucine, riducendo così la viscosità del muco (Macciò et al., 2009).

In questo modo la S-CMC-Lys consente un miglioramento di alcune proprietà reologiche del muco (quali viscosità e velocità di trasporto muco ciliare) mentre altre, come l'elasticità, non vengono modificate significativamente.

La S-CMC-Lys modula inoltre la secrezione di Cloro e acqua migliorando l'eliminazione del muco (Guizzardi et al., 2006).

Proprietà anti-infiammatorie

La carbossimetilcisteina diminuisce la produzione e la secrezione basale di citochine infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α (Macciò et al., 2009; Yasuda et al., 2006).

Studi su animali hanno dimostrato l'azione anti-infiammatoria della carbocisteina in modelli con infiammazione polmonare indotta.

Il pre-trattamento orale con S-CMC-Lys sembra attenuare il reclutamento in acuto dei neutrofili indotto da IL-1 β (considerato uno dei principali mediatori della risposta infiammatoria del sistema respiratorio), l'infiammazione delle vie aeree e la migrazione di neutrofili, macrofagi e di eosinofili nello spazio pleurico (Asti et al., 1995).

Diversi studi in vitro hanno dimostrato che l'attività antiossidante della S-CMC-Lys è parallela con l'inibizione di IL-8. E' stato dimostrato che la produzione di IL-8 potrebbe essere mediata, almeno in parte, dagli OH intracellulare. Quindi la capacità della S-CMC-lys di inibire la produzione di IL-8 sembra essere correlata alla sua capacità scavenger sugli OH (Macciò et al., 2009).

Proprietà antiossidanti

Durante lo stress ossidativo, la S-CMC-Lys, stimola l'efflusso sia di GSH che di Cloro, aumenta la concentrazione di GSH e tampona l'aumento di ROS nelle cellule.

La S-CMC-Lys è uno scavenger selettivo di HOCl e OH•. La capacità di S-CMC-Lys di contrastare OH e HOCl è legata alla reattività del suo gruppo tioetere che può reagire con i ROS, ossidare sé stesso per generare solfossido e derivati e successivamente generare S-CMC = O. La capacità scavenger di S-CMC-Lys contro HOCl e OH• è paragonabile a quella del GSH, che è il principale antiossidante endogeno (Macciò et al., 2009).

La concentrazione di GSH è alta nel liquido di rivestimento dell'epitelio polmonare (ELF) nel quale rappresenta un importante meccanismo antiossidante di difesa contro i radicali liberi e gli altri ossidanti, ed è implicato nella modulazione della risposta immunitaria e infiammatoria.

Una riduzione della concentrazione nell'ELF è presente in diverse condizioni infiammatorie come la fibrosi polmonare idiopatica, la sindrome da stress respiratorio acuto, il trapianto del polmone, l'infezione da HIV. Durante tutte queste condizioni patologiche, l'efflusso di GSH stimolato da S-CMC-Lys potrebbe quindi giocare un ruolo positivo.

La S-CMC-Lys determina inoltre una riduzione significativa dei livelli di ROS intracellulare. Tale diminuzione è correlata all'effetto diretto di scavenger del gruppo tioetere del farmaco (Guizzard et al., 2006; Garavaglia et al., 2008).

Diversi studi hanno dimostrato che la carbocisteina è in grado di migliorare lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica associata a gravi malattie croniche, in particolare

il cancro avanzato e l'anoressia/cachessia legate al cancro, sia da sola che in combinazione con altri farmaci antiossidanti (Macciò et al., 2009).

3. SCOPO DEL LAVORO

Il fumo di sigaretta causa numerosi danni alle cellule dell'apparato respiratorio. Esso contiene più di 4000 specie chimiche differenti molte delle quali tossiche e cancerogene.

Esso rappresenta uno dei principali fattori eziologici di diverse malattie respiratorie, tra le quali la broncopneumopatia cronica ostruttiva (*BPCO*), l'enfisema polmonare e il tumore al polmone.

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che il fumo di sigaretta è in grado di indurre stress ossidativo.

Lo stress ossidativo è una condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti.

Uno dei più importanti sistemi di difesa prodotti dall'organismo è il glutatione.

Il glutatione (GSH) è un tripeptide formato da cisteina, glicina e glutammato. Gli enzimi chiave del metabolismo del glutatione sono la γ glutammil-cistein sintetasi che catalizza il primo step della reazione di sintesi del glutatione; la glutatione perossidasi che catalizza la riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno a spese del glutatione ridotto e la glutatione reduttasi che permette il riciclo di glutatione ossidato in glutatione ridotto.

Dati sperimentali, ottenuti su cellule epiteliali respiratorie umane, suggeriscono un ruolo centrale della carbocisteina sale monoidrato di lisina (S-CMC-Lys) nella secrezione di GSH e, di conseguenza, nella protezione contro i danni causati dallo stress ossidativo.

La S-CMC-Lys è un mucolitico e fluidificante utilizzato nelle patologie acute e croniche che coinvolgono l'apparato respiratorio, ed in particolare nella broncopneumopatia cronica ostruttiva.

Lo studio presentato in questa tesi è stato volto a confermare l'induzione di stress ossidativo da parte del fumo di sigaretta e a valutare il possibile ruolo protettivo della carbossimetilcisteina nella condizione di stress tipica di numerose malattie polmonari.

Gli studi sono stati condotti su cellule 16-HBE 14o- (16 HBE: Human Bronchial Epithelial), una linea cellulare di epitelio respiratorio umano.

Per simulare l'effetto del fumo di sigaretta abbiamo utilizzato il CSE (Cigarette Smoke Extract) che rappresenta un modello stabilito per lo studio in vitro degli effetti dell'esposizione del fumo di sigaretta.

Per verificare l'effetto tossico del CSE sul nostro modello cellulare sono stati condotti saggi di citotossicità. La vitalità cellulare è stata quindi valutata attraverso il saggio dell'MTT e attraverso conte cellulari mediante colorazione con Trypan Blue.

E' stato poi indagato il meccanismo apoptotico quale possibile causa del fenomeno di morte cellulare osservato in seguito a trattamento con CSE attraverso il kit fluorimetrico Apopercantage (Biocolor).

Al fine di valutare il possibile effetto protettivo della S-CMC-Lys sui livelli intracellulari di GSH e ROS in seguito a stress ossidativo, sono stati effettuati esperimenti di fluorescenza utilizzando due differenti fluorofori: il monoclorobimane (MCB), per rilevare la presenza del tiolo, e un derivato della fluorescina (CMH(2)DCFDA), per valutare i livelli di ROS intracellulari.

Poiché concentrazione e funzionalità del glutatione, in seguito a stress ossidativo, sembrano essere influenzate dalla presenza della S-CMC-Lys, in parallelo, sono state valutate l'espressione e l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH mediante esperimenti di RT-PCR, Western blot e saggi colorimetrici.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule 16-HBE 14o- (16 HBE: Human Bronchial Epithelial), una linea cellulare di epitelio respiratorio umano fatte crescere su coating di collagene e fibronectina [Tabella 4.1]. Le cellule sono fatte crescere a 37°C, in presenza di 5% CO₂ (95% aria) in un terreno di coltura adeguato [Tabella 4.2].

Composizione soluzione di coating

MEM Minimum Essential Medium Eagle (M5650, Sigma)
BSA 1 mg/ml
COLLAGENE (BD Italia) 0,1%
FIBRONECTINA (BD Italia) 0,1%

Tabella 4.1 - Composizione soluzione di coating per cellule 16HBE.

Composizione terreno di coltura

MEM Minimum Essential Medium Eagle (M5650, Sigma)
FBS Fetal Bovin Serum (14-801F, Lonza) 10%
L-glutammina (G7513, Sigma) 200 mM
Penicillina 100 U/ml; Streptomicina 0,1 mg/ml (P4333, Sigma)
Amminoacidi non essenziali 0.1 mM (M7145, Sigma)

Tabella 4.2 – Composizione del terreno di crescita per cellule 16 HBE.

Le cellule sono state fatte crescere in piastre Petri dal diametro di 3,5 cm, 6 cm oppure 10 cm; una volta raggiunto l'80% circa della confluenza, lavorando sotto cappa a flusso laminare, in condizioni di sterilità, il terreno di coltura è stato prelevato

e le cellule sono state lavate con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) [Tabella 4.3], al fine di rimuovere il terreno residuo in modo da evitare l'inibizione dell'azione della tripsina da parte delle proteine contenute nel siero. Una volta rimosso il PBS 1X, è stata aggiunta una soluzione di tripsina [Tabella 4.4] e la si è lasciata agire per qualche minuto affinché l'enzima possa agire staccando le cellule dal fondo della piastra. Per bloccare l'azione della tripsina è stato aggiunto un volume opportuno (variabile a seconda delle dimensioni della piastra Petri in cui le cellule sono coltivate) di terreno completo [Tabella 4.2]. Le cellule sono state quindi seminate in altre piastre di diametro variabile a seconda dell'esperimento da condurre, aggiungendo un opportuno volume di terreno completo fresco.

Composizione PBS 1X

NaCl	136,89 mM
KCl	2,69 mM
Na ₂ HPO ₄	3,21 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
NaOH	1 mM

Tabella 4.3 - Composizione del PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, pH 7,4; soluzione tampone, salina, isotonica, comunemente usata come soluzione di lavaggio per le cellule.

Composizione della tripsina 1X

TRIPSINA 10X (T4549, Sigma)	10%
EDTA	0,53 mM
EGTA	0,005 mM
POLIVINILPIRROLIDONE	250 mM
HEPES	20 mM
PBS 1X	

Tabella 4.4 - Composizione del PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, pH 7,4; soluzione tampone, salina, isotonica, comunemente usata come soluzione di lavaggio per le cellule.

Per testare l'effetto della Carbocisteina sale monoidrato di lisina (S-CMC-Lys), le cellule sono state incubate per tre o ventiquattro ore in presenza o in assenza del farmaco. La S-CMC-Lys è stata usata alla concentrazione di 100 μ M (Garavaglia et al., 2008) ed è stata aggiunta al terreno cellulare 1 ora prima dell'inizio degli esperimenti. Lo stress ossidativo è stato ottenuto esponendo le cellule a diverse concentrazioni di CSE (Cigarette Smoke Extract).

4.2 CSE (Smoke Cigarette Extract)

Il CSE (Cigarette Smoke Extract) è stato preparato in laboratorio, esso rappresenta un modello stabilito per lo studio in vitro degli effetti dell'esposizione del fumo di sigaretta e simula il fumo inalato dal fumatore.

Per ogni preparazione tre sigarette (Marlboro, Philip Morris, catrame 10 mg nicotina 0,8 mg.), private del filtro, sono state "fumate" in continuo tramite una siringa, come mostrato nella figura 4.1.

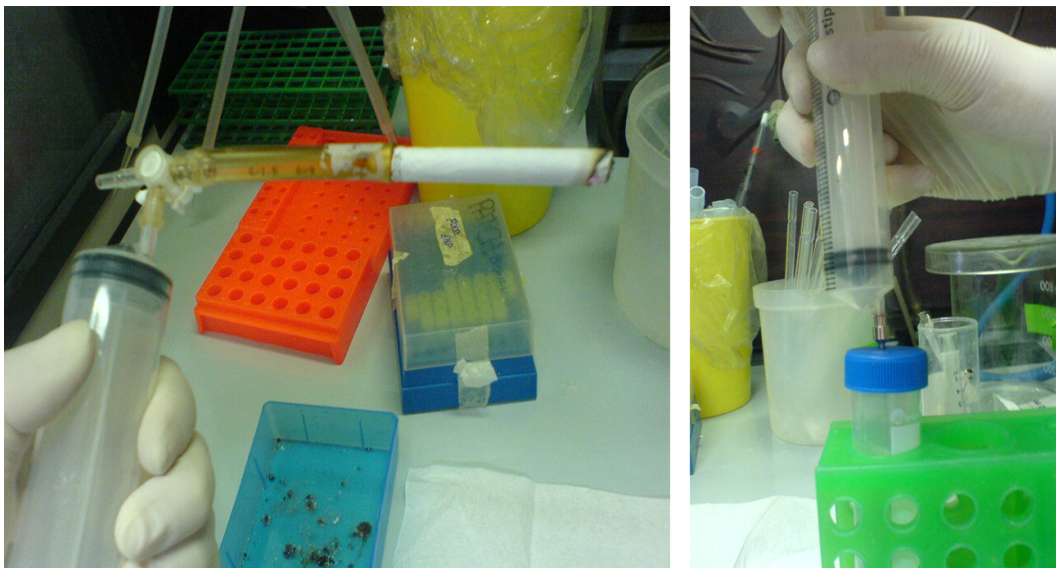


Figura 4.1 - Preparazione dell'estratto di fumo di sigaretta (CSE) in laboratorio.

Il fumo accumulato all'interno della siringa è stato poi espulso e fatto gorgogliare in 30 ml di Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) [Tabella 4.5]. La soluzione CSE-PBS è stata quindi filtrata con un filtro a porosità 0.45 μM per eliminare impurità e batteri e questa soluzione è stata considerata come soluzione madre al 100% di CSE. Per ogni trattamento è stata preparata una madre 100% fresca che viene utilizzata nell'arco di 1-3 ore e tenuta a 4°C fino al momento dell'utilizzo. Per uniformare le diverse preparazioni, ogni soluzione CSE-PBS al 100% è stata dosata allo spettrofotometro (A 320 nm) e portata al valor medio di 0.7 OD, in modo che le diluizioni utilizzate per i trattamenti (2.5%, 5% e 10% CSE, diluito direttamente nel medium di coltura) abbiano sempre la stessa concentrazione. Secondo quanto riportato in letteratura soluzioni di CSE dal 2.5 al 10% preparato in questo modo corrispondono a esposizioni associate al consumo di 10 (2.5% CSE) - 40 (10% CSE) sigarette al giorno (Su et al., 1998).

Composizione del D-PBS 1X

CaCl ₂	0,9 mM
MgCl ₂	2,67 mM
KCl	2,67 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
NaCl	138 mM

Tabella 4.5 - Composizione del D-PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, pH 7,4.

4.3 Saggi di citotossicità

4.3.1 Test con Sali di MTT per la vitalità cellulare

Per valutare l'attività mitocondriale in seguito al trattamento con CSE è stato impiegato il test dei sali di tetrazolio, un test colorimetrico in grado di stimare il numero delle cellule aventi ancora attività

Il saggio dell'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide) si basa sulla capacità dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, presente nelle cellule vitali, di trasformare i sali di tetrazolio, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare.

Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto ai controlli.

Le cellule sono state contate mediante emocitometro (Camera di Burkner), seminate in piastre Multiwell da 96 pozzetti, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a 10^4 cellule per pozzetto e trattate con diverse concentrazioni di CSE (2.5%, 5% e 10%).

Dopo 3 o 24 ore di trattamento è stato eseguito il seguente protocollo:

- Il terreno di ogni pozzetto è stato sostituito con 100 μ l di terreno + MTT (90 μ l di terreno preriscaldato + 10 μ l MTT 50 μ g/ml diluito in PBS 1X [Tabella 4.3]). La soluzione è preparata fresca, stagnolata e tenuta a 4°C fino al momento dell'utilizzo;
- Le cellule sono state incubate nella soluzione con MTT per 2 ore a 37°C;
- Il terreno + MTT è stato sostituito con 125 μ l di buffer di lisi (DMSO + buffer glicina) [Tabella 4.6], stando attenti a non prelevare anche i precipitati formati;
- Si proseguiva spipettando fino al completo scioglimento dei precipitati;
- È stata dunque misurata l'assorbanza a 570 nm (entro 30 minuti dal prelievo) tramite Infinite™ 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, CH). Ai valori ottenuti è sottratta l'assorbanza dei valori letta a 630 nm (background).

Composizione del Buffer di Lisi:

DMSO	90 %	
Sorensen's glycine buffer	10 %	
	Glicina	0,1 M
	NaCl	0,1 M

Tabella 4.6 – Composizione del Buffer di Lisi per i test di proliferazione con MTT assay; DMSO 100% è unito a Sorensen's glycine buffer (pH 10.5 con NaOH 0,1 N) in rapporto 9:1.

4.3.2 Analisi della vitalità cellulare con Trypan blue

La stima della vitalità cellulare è stata effettuata anche mediante colorazione con Trypan Blue. Questo marker, aggiunto ad una sospensione cellulare, è in grado di attraversare esclusivamente membrane la cui integrità è stata modificata in maniera significativa. Il Trypan Blue infatti penetra soltanto in cellule danneggiate, la cui vitalità è compromessa, dando loro un colore blu al microscopio a luce visibile.

Le cellule vitali, che non sono permeabili al marker, rimangono trasparenti.

Le cellule sono state contate mediante emocitometro (Camera di Burker), seminate in piastre Multiwell da 96 pozzetti, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a $5 \cdot 10^3$ cellule per pozzetto e trattate con diverse concentrazioni di CSE (2.5%, 5% e 10%).

Dopo 3 o 24 ore è stato eseguito il seguente protocollo:

- Per ogni condizione il contenuto di 4 pozzetti è stato prelevato e raccolto in una eppendorf in ghiaccio;
- I pozzetti sono stati lavati con 50 μ l di PBS 1X [Tabella 4.3];
- In ogni pozzetto sono stati messi 20 μ l di tripsina [Tabella 4.4] per permettere il distacco delle cellule dal fondo dei pozzetti;
- La tripsina è stata poi stoppata con 180 μ l di terreno fresco [Tabella 4.1] per ogni pozzetto e il tutto è stato raccolto nella eppendorf in ghiaccio;
- Si pellettava a 1800 rpm per 10 minuti a 4°C;
- Il sovrinatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 100 μ l di PBS 1X [Tabella 4.3] (eventualmente diluire ulteriormente con PBS 1X);

- Sono stati prelevati 20 μ l a cui sono stati aggiunti 20 μ l di Trypan Blue (0.4% in PBS);
- Dopo 5 minuti in ghiaccio è stata effettuata la conta al microscopio utilizzando la cameretta di Burker.

Le cellule che sono visivamente blu non sono vitali, le altre sì. Questo succede perché il Trypan Blue contiene un fluorocromo carico negativamente: nelle cellule con membrana integra non può entrare, ma può entrare laddove la membrana cellulare è frammentata, ovvero nelle cellule danneggiate.

4.3.3 Analisi della risposta apoptotica

L'apoptosi cellulare è stata valutata dopo trattamento con le CSE attraverso il kit fluorimetrico Apopercantage (Bicolor). La metodica usa un colorante che è selettivamente introdotto all'interno delle cellule che vanno incontro ad apoptosi. Esso rileva l'apoptosi nello stato dell'alterazione di membrana quando la fosfatidilserina è esternalizzata. L'ingresso del colorante non avviene finché non si verifica il meccanismo del "flip flop" il quale ne consente il passaggio [Figura 4.2]. Il colorante APOPercentage entra così nelle cellule in seguito a questo evento e l'assorbimento continua fino alla formazione dei "blebs" che impediscono l'ingresso di ulteriore colorante nella cellula. Mentre le cellule necrotiche non possono trattenere il colorante, questo si accumula dentro le cellule in apoptosi, in cui non è rilasciato e quindi può essere rilevato (Pasciu et al., 2010).

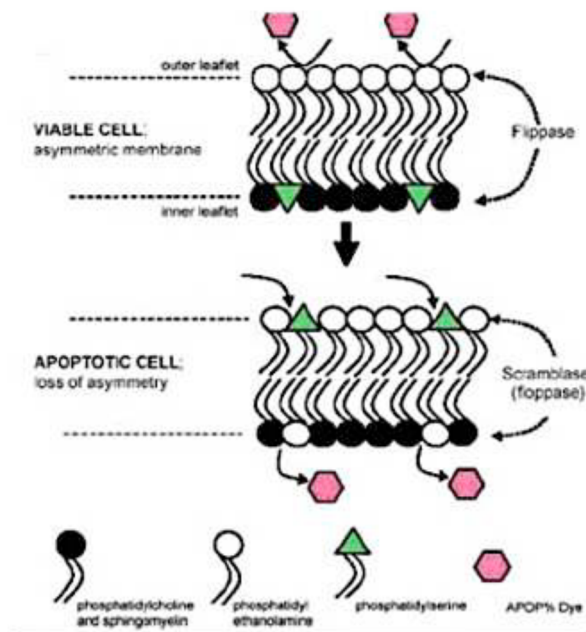


Figura 4.2: Internalizzazione del colorante APOPercentage nelle cellule apoptotiche.

Le cellule sono state contate mediante emocitometro (Camera di Burkler), seminate in piastre Multiwell da 96 pozzetti, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a $5 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto e trattate con diverse concentrazioni di CSE (2.5%, 5% e 10%).

Dopo 24 ore è stato eseguito il seguente protocollo:

- Il terreno di coltura è stato eliminato da pozzetti da 96 mm di diametro;
- Le cellule sono state trattate con 5% di ApoPercentage dye;
- Le cellule sono state incubate a 37°C per 30 minuti;
- Le cellule sono state poi lavate 2 volte con 1 ml di PBS 1X per rimuovere l'eccesso di colorante;
- Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di Release Reagent;
- Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente in agitazione per 10 minuti;
- I pozzetti sono stati uniti a due a due ed è stata misurata l'assorbanza a 550 nm tramite Infinite™ 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, CH).

L'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando un saggio colorimetrico seguito del rilascio di colorante dalle cellule apoptotiche.

4.4 Valutazione dei livelli intracellulari di glutatione ridotto (GSH)

Il glutatione (GSH) è una molecola, presente in gran quantità nella maggior parte delle cellule, che possiede un gruppo tiolico libero; tale caratteristica le conferisce un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo, essendo tra i più potenti degli antiossidanti endogeni presenti nell'organismo.

Per determinare il contenuto intracellulare dei tioli liberi in particolare di Glutathione (GSH) è stata utilizzata la fluorescenza.

Come indicatore fluorescente è stato utilizzato il MonoChloroBimane (MCB Invitrogen). Questo xenobiotico penetra in cellule e non è fluorescente fino alla sua coniugazione con il Glutathione (GSH) per attività della glutathione-S-transferasi (GST) con formazione di Glutathione-S-Bimane. La necessità dell'intervento di questo sistema enzimatico per la formazione del prodotto coniugato tra GSH e MCB fa sì che questo indicatore fluorescente sia altamente specifico per il GSH e non per altri tioli intracellulari.

Le cellule sono state contaminate mediante emocitometro (Camera di Burker) e seminate in piastre da 3 cm di diametro, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a $1,1 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto.

A 3 o 24 ore dal trattamento delle cellule 16 HBE con PBS (controllo), CSE, S-CMC-Lys o CSE+S-CMC-Lys:

- Il terreno di coltura è stato eliminato dalle piastre da 3 cm di diametro;
- Le cellule sono state lavate con D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio;
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio in cui era sciolto il MCB con una concentrazione finale di 60 μ M;
- Le cellule sono state incubate a 37°C per 20 minuti;

- Le cellule sono state poi lavate 2 volte con 1 ml della soluzione di D-PBS+glucosio e messe in 2 ml di D-PBS+glucosio;
- Si procedeva dunque immediatamente all'acquisizione.

La fluorescenza è stata misurata a temperatura ambiente utilizzando un microscopio invertito a fluorescenza (Axiovert 2000, Zeiss) adattato con un obiettivo 20X.

Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ (NIH, USA).

I valori rappresentano la media dell'intensità della fluorescenza media misurata in campi distribuiti in modo casuale (ogni campo ha rappresentato una regione di interesse, ROI) all'interno di Petri indipendenti (cinque ROI per ogni Petri). Tutte le ROI erano delle stesse dimensioni e i dati sono stati raccolti in due o più giornate sperimentali. In ogni giornata sperimentale sono stati analizzate tutte le condizioni (controllo, CSE, CSE e S-CMC-Lys). Solo le cellule aderenti di ciascuna ROI sono state considerate nell'analisi.

4.5 Valutazione della formazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Per valutare la produzione dei ROS è stata utilizzata una metodica, che sfrutta l'ossidazione da parte dei ROS di una sonda fluorogena la diidro-2',7'-diclorofluorescina diacetato (H_2DCF -DA) (Molecular Probe, Eugene) alla concentrazione 3,5 μM ; tale sonda penetra nelle cellule dove viene diesterificata in una forma non fluorescente la H_2DCF dalle esterasi endogene. In presenza di ROS intracellulari, la H_2DCF viene ossidata in un composto fluorescente, la 2,7-Diclorofluoresceina (DCF). H_2DCF è in grado di reagire con diverse specie radicaliche, come gli idroperossidi organici e in particolar modo con gli idroperossidi lipidici (Sohn N, 2006).

L'intensità della fluorescenza dunque sarà proporzionale alla quantità di ROS presenti nel campione preso in esame.

Il protocollo sperimentale di incubazione del fluoroforo è simile a quello utilizzato per la fluorescenza con il MCB.

Le cellule sono state contate mediante emocitometro (Camera di Burker) e seminate in piastre da 3 cm di diametro, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a $1,1 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto.

A 3 o 24 ore dal trattamento delle cellule 16 HBE con PBS (controllo), CSE o CSE+S-CMC-Lys:

- Il terreno di coltura è stato eliminato dalle piastre da 3 cm di diametro;
- Le cellule sono state lavate due volte con D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio;
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio in cui era sciolta la fluoresceina (CM-H₂DCF-DA) con una concentrazione finale di 3,5 μ M;
- Le cellule sono state incubate a 37°C per 20 minuti;
- Le cellule sono state poi lavate 2 volte con 1 ml della soluzione di D-PBS+glucosio e messe in 2 ml di D-PBS+glucosio;
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio ed sono state incubate a 37°C per 15 minuti;
- Sono stati quindi aggiunti 2 ml di D-PBS [Tabella 4.1] + 4,5% di glucosio e si procedeva all'acquisizione.

La fluorescenza è stata misurata a temperatura ambiente utilizzando un microscopio invertito a fluorescenza (Axiovert 2000, Zeiss) adattato con un obiettivo 20X.

Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ (NIH, USA).

I valori rappresentano la media dell'intensità della fluorescenza media misurata in campi distribuiti in modo casuale (ogni campo rappresenta una regione di interesse, ROI) all'interno di Petri indipendenti (due ROI per ogni Petri). Tutte le ROI erano delle stesse dimensioni e i dati sono stati raccolti in due o più giornate sperimentali. In ogni giornata sperimentale sono stati analizzate tutte le condizioni (controllo, CSE, CSE e

S-CMC-Lys). Nell'analisi sono state considerate solo le cellule aderenti di ciascuna ROI.

4.6 Estrazione proteica

4.6.1 Estrazione proteine totali

A 3 o 24 ore dal trattamento delle cellule 16 HBE con PBS (controllo), CSE, S-CMC-Lys o CSE+S-CMC-Lys:

- Il terreno di coltura è stato eliminato dalle piastre da 6 cm di diametro;
- Le cellule sono state lavate con PBS 1X;
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di PBS 1X;
- Le cellule sono state staccate dal fondo della piastra utilizzando uno scraper e sono state raccolte in eppendorf;
- Le eppendorf sono state centrifugate a 230 g, 4 °C per 10 minuti;
- Il sovrnatante è stato eliminato;
- Il pellet di cellule è stato lisato in 80 µl di Buffer di Lisi [Tabella 4.7] addizionato di inibitori delle proteasi;
- Si procedeva con due cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare;
- Il pellet è stato quindi centrifugato a 4 °C, 4500 g per 5 minuti per eliminare i debris cellulari;
- Del sovrnatante così ottenuto è stata una parte (circa 5 µl) per i dosaggi proteici, la restante parte è stata conservata a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Composizione del Buffer di Lisi

Tris HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	1%

Tabella 4.7 – Composizione del Buffer di Lisi per l'estrazione di proteine totali, pH 7.

4.7 Dosaggio proteico

Per misurare la concentrazione delle proteine è stato utilizzato il metodo Bradford (1979). Tale sistema consiste nell'utilizzo di un colorante costituito da una soluzione acida di Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) contenuto in un reattivo formato da acido fosforico ed etanolo (Biorad Protein Assay kit). Il colorante anionico si lega alle proteine causando una variazione di colore che è possibile rilevare attraverso una variazione di assorbanza quantificabile ad una lunghezza d'onda di 595 nm. Per il dosaggio è stato utilizzato 1 ml di reattivo diluito 1:5 in acqua, a cui è stato aggiunto il campione. Il dosaggio delle proteine è stato misurato allo spettrofotometro; per risalire dal valore di assorbanza alla concentrazione del campione è necessario allestire una retta di taratura, servendosi di diluizioni seriali di albumina da siero bovino a concentrazione nota. La quantificazione dei campioni avviene leggendo l'assorbanza a $\lambda=595$ nm. Dopo averne determinato la concentrazione proteica è possibile preparare i campioni per effettuare la corsa elettroforetica.

4.8 Western blot

4.8.1 Elettroforesi SDS PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PPA) è stata condotta in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), utilizzando un metodo di tipo discontinuo, così detto per le differenze di concentrazione e di pH esistenti fra Running gel e Stacking gel [Tabella 4.8]. La funzione dello Stacking gel è quella di impaccare le proteine sul fronte di corsa, mentre la funzione del Running gel è quella di permetterne la separazione. La corsa elettroforetica viene effettuata in presenza di sodiododecilsolfato (SDS), un detergente anionico in grado di legarsi alle proteine, provocandone la denaturazione. In tali condizioni le proteine assumono una carica negativa che consente loro di migrare verso il polo positivo, pertanto la separazione avviene solo in funzione del peso molecolare.

Preparazione dei campioni

Prima di caricare i campioni:

- Aggiungere ai preparati Sample Buffer 4X [Tabella 4.9] in modo che risulti 1X in concentrazione finale;
- Scaldare i campioni a 99°C per 5 minuti;
- Spinnare.

I campioni sono stati quindi caricati nei pozzetti del gel per elettroforesi SDS-PAGE (10% acrilammide) e sono stati fatti correre con il marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) a voltaggio costante di 120 V, in Buffer di corsa 1X [Tabella 4.10].

Composizione dei gel

	Stacking gel 4%	Running gel 10%
Miscela di acrilammide/bisacrilammide (30% e 0,8%)	870 μ l	5 ml
H ₂ O bi distillata	4,07 ml	6,03 ml
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,67 ml	-
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	3,75 ml
SDS 10%	66,7 μ l	150 μ l
Temed	6,7 μ l	7,5 μ l
APS 10%	33,3 μ l	75 μ l

Tabella 4.8 – Composizione dei gel di poliacrilammide per la separazione elettroforetica delle proteine negli esperimenti di Western blot.

Composizione del Sample Buffer 4X

Tris HCl (pH 6,8)	250 mM
Glicerolo	8% (w/v)
SDS	40% (w/v)
Blu di bromophenolo	0,008% (w/v)
β -mercaptoetanolo	2,5% (w/v)

Tabella 4.9 – Composizione del Sample Buffer 4X contenente gli agenti in grado di legarsi alle proteine provocandone la denaturazione.

Composizione del Buffer di corsa 1X

Tris base	25 mM
Glicina	200 mM
SDS	0,1%

Tabella 4.10 – Composizione del Buffer di corsa 1X per la corsa elettroforetica della proteine negli esperimenti di Western blot.

4.8.2 Trasferimento

Al termine della corsa elettroforetica lo Stacking gel è stato eliminato e le proteine

sono state trasferite dal Running gel ad una membrana di nitrocellulosa (Biorad) per mezzo di un elettroblotter:

- La membrana nitro pretrattata (2 minuti in acqua e 2 minuti in Buffer di trasferimento [Tabella 4.11]), il Running gel, due fogli di carta da filtro 3M e due spugnette sono stati pre-equilibrati solo nel Buffer di trasferimento;
- La membrana è stata posta a contatto con il gel, a loro volta, membrana e gel sono stati posizionati tra i due fogli di carta da filtro e il tutto tra due apposite spugnette (verificando l'assenza di bolle d'aria che potrebbero compromettere il trasferimento);
- Il tutto è stato immerso nel Buffer di trasferimento [Tabella 4.11];
- Il trasferimento è stato condotto tra due elettrodi di platino (con la membrana rivolta verso l'anodo), con voltaggio costante di 80 V, a 4 °C per 120 minuti;
- Al termine del trasferimento, il gel è stato colorato con Blue di Coomassie R-205 (Sigma) 0,4% per 60 minuti e poi decolorato con acido acetico al 10% overnight;
- La membrana è stata sciacquata in TBS-T (Tween-20 0,1%) per eliminare i residui di Buffer di trasferimento.

Composizione del Buffer di trasferimento

Metanolo	15%
Tris base	48 mM
Glicina	39 mM

Tabella 4.11 – Composizione del Buffer di trasferimento per il trasferimento delle proteine su membrana durante gli esperimenti di Western blot.

Composizione del TBS 10X

Tris HCl 1,5 M pH 8.8	10%
NaCl	150 mM
Tween-20	0,1%

Tabella 4.12 – Composizione del TBS 10X, buffer utilizzato per il lavaggio delle membrane nel Western Blot pH 7.5.

4.8.3 Blocco e incubazione con gli anticorpi

La membrana è stata messa a contatto con una soluzione di bloccaggio, TBS-T, addizionata a polvere di latte per 1 ora, in agitazione, in modo da andare a saturare i siti aspecifici della membrana cui potrebbe legarsi l'anticorpo.

Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario diluito in TBS-T addizionato a polvere di latte o BSA.

Sono seguono lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso, al termine dei lavaggi, la membrana è stata incubata in agitazione per un'ora con l'anticorpo secondario, diluito in TBS-T addizionato a polvere di latte. L'anticorpo secondario è coniugato a perossidasi di rafano (HRP).

Sono seguono ulteriori lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso.

Combinazioni proteina-blocco-anticorpo primario-lavaggi-anticorpo secondario-lavaggi:

GCLC	Blocco	5% milk TBS-T 0,1% 1 ora RT
	Anticorpo I	anti-GCLC 24.1 (clone 3HI, D.B.A. Italia) 1:500 O/N 4 °C
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
	Anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
GCLM	Blocco	5% milk TBS-T 0,1% 1 ora RT
	Anticorpo I	anti-GCLM (purified MaxPab mouse polyclonal antibody (B01P), D.B.A., Italy) 1:500 O/N 4 °C
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
	Anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
TUBULINA	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% 1 ora RT
	Anticorpo I	Anti-TUBULINA (clone DM1A 05-829, Millipore, Italy) 1:500 O/N 4 °C
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
	Anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
GAPDH	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% O/N 4 °C
	Anticorpo I	Anti-GAPDH (clone GAPDH-71.1, Sigma-Aldrich) 1:40000 1 ora RT
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%
	Anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	3 da 10 minuti in 5% milk TBS-T 0,1%

Tabella 4.13 – Combinazioni delle differenti proteine con le relative modalità di blocco, anticorpo primario, secondario e modalità di lavaggio.

4.8.4 Sviluppo

Il kit utilizzato per lo sviluppo è il kit per chemiluminescenza Immobilon (Millipore). La membrana è stata ricoperta per circa 3 minuti con ECL: una soluzione contenete Luminol, un substrato della perossidasi che, quando viene ossidato, in presenza di H_2O_2 e in condizioni alcaline, passa ad uno stato eccitato. Il decadimento dallo stato eccitato allo stato fondamentale avviene con emissione di luce che, in seguito a brevi esposizioni (fino a circa 1 ora), può impressionare un film per autoradiografia sensibile alla luce blu.

4.8.5 Stripping della membrana

Dopo lo sviluppo, le membrane incubate con un anticorpo, prima di essere reincubate con un altro anticorpo, devono essere strippate per eliminare i residui di anticorpo legati alla membrana:

- Si lava la membrana in acqua di soluzione per 5 minuti;
- Si procede con un lavaggio di 1 minuto in Soluzione di stripping [Tabella 4.14];
- Si lava con Soluzione di stripping per 40 minuti;
- Si eseguono due lavaggi da 5 minuti in acqua di soluzione;
- Si equilibra la membrana in PBS-T;
- Si effettua uno sviluppo di controllo, per verificare che non ci sia più segnale, cioè che l'anticorpo non sia più legato alla membrana;
- Si prosegue con il blocco della membrana e quindi con le incubazioni con gli anticorpi necessari.

Composizione Soluzione di stripping

Tris HCl	50 mM
SDS	2%

Tabella 4.14 – Composizione della soluzione di stripping, pH 2.2-2.3.

4.8.6 Colorazione con Rosso Ponceau

Al termine del Western blot, per verificare il trasferimento delle proteine, la membrana nitro è stata colorata con una soluzione contenente Ponceau S (Sigma) e acido acetico [Tabella 4.15] in agitazione per un paio di minuti, successivamente è stata risciacquata velocemente con acqua di soluzione poi fatta asciugare all'aria.

Composizione Ponceau solution

Ponceau	0,1% (w/v)
Acido acetico	5%

Tabella 4.15 – Composizione della soluzione Ponceau solution per la colorazione delle membrane degli esperimenti di Western blot.

4.9 Real Time PCR quantitativa (qPCR)

La real-time PCR, o PCR quantitativa, è una tecnologia utilizzata per quantificare gli acidi nucleici attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da un fluoroforo.

Il processo analitico è costituito da tre fasi distinte:

- Estrazione dell'RNA
- Retrotrascrizione in cDNA
- Amplificazione RealTime

4.9.1 ESTRAZIONE RNA

Estrazione dell'RNA

La prima fase sperimentale prevede l'estrazione dell'RNA dalle cellule in seguito a trattamento per 3 o 24 ore con PBS (controllo), CSE, S-CMC-Lys o CSE+S-CMC-Lys:

L'RNA totale è stato isolato da piastre da 10 cm di diametro usando un apposito kit (RNeasy Protect Mini Kit, Quiagen);

- Il terreno di coltura è stato eliminato dalle piastre da 10 cm di diametro;

- Le cellule sono state lavate con PBS 1X [Tabella 4.3];
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di PBS 1X [Tabella 4.3];
- Le cellule sono state staccate dal fondo della piastra utilizzando uno scraper e venivano raccolte in eppendorf;
- Le eppendorf sono state centrifugate a 230 g, 4 °C per 10 minuti;
- Il sovrantante è stato eliminato;
- Il pellet di cellule è stato lisato con il buffer RLT a cui era stato aggiunto il β -mercapto etanolo;
- Si procedeva con due cicli di congelamento e scongelamento in azoto liquido;
- Al fine di favorire la lisi cellulare il pellet è stato siringato circa 10 volte con una siringa con l'ago del diametro di 0,9 mm;
- Al campione è stato aggiunto etanolo al 70%;
- Il lisato è stato quindi trasferito in un'apposita colonna e centrifugato a 10000 rpm per 30 secondi;
- Si procedeva aggiungendo buffer RPE alla colonna e centrifugando a 10000 rpm per 30 secondi.
- Il flow through è stato eliminato ed è stato aggiunto Buffer RPE con etanolo;
- Si procedeva centrifugando a 10000 rpm per 30 secondi;
- Si ripeteva dunque lo stesso passaggio centrifugando 2 minuti a 10000 rpm e successivamente 1 minuto a massima velocità;
- Al lisato è stata infine aggiunta H₂O RNAsi free ed è stato centrifugato 1 minuto a 10000 rpm per far eluire il campione;
- Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione, è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Dosaggi

Per il dosaggio è stata usata una cuvetta di quarzo trasparente agli UV ed è stato eseguito il seguente protocollo:

- La cuvetta è stata riempita con 350 μ l di H₂O RNAsi free;

- Si effettuava una lettura allo spettrofotometro dell'H₂O RNAsi free, tale lettura costituisce il "bianco", il valore letto verrà sottratto automaticamente dallo strumento alla lettura fatta in presenza del DNA;
- Ai 350 µl di TE sono stati aggiunti 4 µl di campione, direttamente in cuvetta, è stato rimescolato ed è stato misurato il valore di assorbanza;
- La lettura è stata fatta a due diverse lunghezze d'onda: 260 nm (per la concentrazione del RNA) e 280 nm (per la concentrazione delle proteine). Il rapporto tra le due letture fornisce un indice della qualità della preparazione del RNA. Una preparazione di RNA deve avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2;
- Il calcolo della concentrazione è stato effettuato sapendo che, per un cammino ottico pari ad 1 cm, una soluzione acquosa di RNA a pH 7-7,5, ad una concentrazione di 50 ng/µl ha un'assorbanza pari a 1. E' stata utilizzata quindi la seguente formula:

$$[RNA]_{\mu g/\mu l} = \frac{A_{260} \times 0,04 \left(\frac{\mu g}{\mu l} \right) \times 354 \mu l}{4 \mu l}$$

Digestione con DNAsi I

La DNAsi I è un'endonucleasi che digerisce il DNA a doppio e singolo filamento in oligo e mononucleotidi. La DNAsi è stata utilizzata per eliminare il DNA da preparazioni di RNA.

- A ciascun campione sono stati aggiunti 2,5 µl di Reaction Buffer e 2,5 µl di Amplification Grade DNAsi I;
- Il campione è stato quindi incubato 15 minuti a temperatura ambiente in modo da eliminare il DNA contaminante;
- Successivamente sono stati aggiunti 2,5 µl di stop solution e il campione è stato incubato 10 minuti a 70° C per inattivare l'azione della DNAsi I e denaturare l'RNA.

Preparazione del gel 1,2% w/v

E' stato preparato il gel sciogliendo 0,42 g di agarosio in polvere in 35 ml di tampone TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X [Tabella 4.16]; la miscela è stata scaldata fino a completo scioglimento dell'agarosio, quindi sono stati aggiunti circa 0,3 µl di bromuro di etidio (10 µg/µl).

La miscela è stata versata in un opportuno supporto ed è stato inserito il pettine per i pozzetti, si attendevano circa 40 minuti per la solidificazione del gel.

Preparazione del campione

All'RNA è stato aggiunto un appropriato volume di Loading Dye 6X [Tabella 4.5] in modo che la sua concentrazione finale nella miscela sia 1X.

Nei pozzetti del gel sono stati caricati 4 µg di campione (porto a 20 µl il volume della mix con TBE 1X e aggiungo 4 µl di Loading Dye).

Il gel, posizionato nell'apparato di corsa, è stato ricoperto di TBE 1X [Tabella 4.16] e sottoposto ad un voltaggio costante di 100 V per un tempo di circa 20 minuti.

Composizione TBE 1X

Tris borato	90 mM
EDTA	2 mM

Tabella 4.16 – Composizione del TBE 1X, tampone utilizzato per la preparazione del gel per l'elettroforesi del'RNA.

Composizione Loading Dye 6X

Blu di bromo fenolo	0,2 %
Xilene cyanol FF	0,2 %
Glicerolo	60 %
EDTA	60 mM

Tabella 4.17 – Composizione del Loading Dye 6X.

4.9.2 RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione è la reazione che consente di ottenere, a partire da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA ad esso complementare (cDNA).

L'enzima necessita però di una breve sequenza nucleotidica d'innescio (primer) per poter iniziare la retrotrascrizione dell'RNA.

Sfruttando la caratteristica dell'RNA messaggero di possedere una coda di circa 150–200 adenine (poliA) all'estremità 3', è possibile utilizzare come innescio un oligonucleotide costituito da una catena di timine (oligodT) complementari alle adenine presenti nel messaggero.

La retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando protocollo e reagenti forniti dalla Promega.

Per realizzare la retrotrascrizione sono state preparate, sotto cappa, in condizioni di sterilità ed in modo da evitare contaminazioni, due mix di reazione, così composte [Tabella 4.18-4.19]:

Composizione mix 1: RNA (volume finale 5 µl)

RNA	2 µg
Random primers	1 µl
H ₂ O	

Tabella 4.18 - Composizione della mix 1 della reazione di retro trascrizione.

Composizione mix 2: RT (volume finale 15 µl)

ImProm-II™ 5X Reaction Buffer	4 µl
MgCl ₂	2,4 µl
dNTP mix	1 µl
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
Im Prom-II™ Reverse Transcriptase	1 µl
H ₂ O	6,1 µl

Tabella 4.19 - Composizione della mix 2 della reazione di retro trascrizione.

Una volta aggiunto il template, all'esterno della cappa, alla mix 1, essa è stata messa in un termociclatore, secondo un protocollo che prevedeva le seguenti fasi:

- 70°C 5 minuti
- 4°C 5 minuti

Completati questi 2 cicli le 2 mix sono state unite, messe nel termociclatore e sottoposte al seguente protocollo:

- 25°C 5 minuti
- 42°C 60 minuti
- 70°C 15 minuti

Il cDNA così ottenuto viene conservato a -80°.

4.9.3 REAL TIME

La Real Time PCR è un metodo che si basa sull'amplificazione e quantificazione del DNA. La tecnica a differenza di una tradizionale PCR "end point" sfrutta l'utilizzo di molecole fluorescenti o sonde che permettono di seguire in tempo reale e quantificare la reazione di amplificazione.

Nel nostro caso, è stata utilizzata la sonda SYBR Green I una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppia elica.

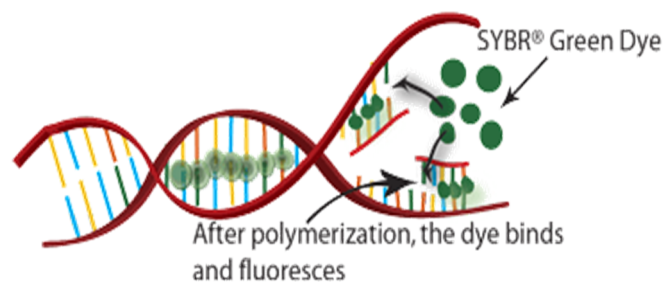


Figura 17: Meccanismo d'azione del colorante SYBER GREEN.

Per realizzare la RT-PCR è stata preparata, sotto cappa, in condizioni di sterilità ed in modo da evitare contaminazioni, una mix di reazione, del volume finale di 25 µl, così composta [Tabella 4.20]:

Composizione miscela di reazione per PCR

H ₂ O	10 µl
Syber Green Master Mix	12,5 µl
primer senso 50 µM	0,75 µl
primer antisenso 50 µM	0,75 µl

Tabella 4.20 - Composizione della miscela di reazione per PCR.

Il template alla concentrazione di 50 ng/µl e 10 ng/µl, e in quantità di 1µl, è stato aggiunto alla reazione all'esterno della cappa.

I primers utilizzati sono i seguenti:

1. primers ACTINA:

- primer senso: 5' *gatgaccagatcatgtttgagacc* 3'
- primer antisenso: 5' *accactggcatcgtgatggact* 3'

2. primers GCLC:

- primer senso: 5' *acaccctcatgagcatagacacca* 3'
- primer antisenso: 5' *aactccctcatccatctggcaact*- 3'

3. primers GCLM:

- primer senso: 5' *ggcacaggtaaaaccaaatagtaac* 3'
- primer antisenso: 5' *caaattgttagcaaatgcagtca* 3'

4. primers GPx1:

- primer senso: 5' *cgcaacgatgttgctggaacttt* 3'
- primer antisenso: 5' *aggctcgatgtcaatggtctggaa* 3'

5. primers GPx2:

- primer senso: 5' *taagtgggctcaggcctctct* 3'
- primer antisenso: 5' *ggtcatagaaggacttggcaatg* 3'

6. primers GPx3:

- primer senso: 5' *gacaagagaagtccaagatg* 3'
- primer antisenso: 5' *cttctgtagtgattcagtt* 3'

7. primers GR:

- primer senso: 5' *aacatcccaactgtgggtcttcagc* 3'
- primer antisenso: 5' *ttggtaactgcgtgatacatcggg* 3'

La reazione è stata eseguita utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Il protocollo utilizzato per la reazione di amplificazione del gene consiste di 4 passaggi:

- Un ciclo di pre-incubazione di 10 minuti a 95° C per attivare la HotStart Taq polimerasi e denaturare il DNA;
- 45 cicli di amplificazione, ognuno di essi diviso in una fase in cui il campione viene portato a 94° C per 15 secondi per permettere la denaturazione, una fase di 30 secondi a 60° C in cui si ha l'annealing dei primer e una fase di 30 secondi a 72° C in cui si ha l'allungamento del filamento di DNA. In quest'ultima fase la sonda si intercala al DNA e si acquisisce la fluorescenza fondamentale per la quantificazione;
- Analisi della curva di melting. Tale fase è costituita da un unico ciclo in cui la temperatura viene portata da 95° C a 55° C molto rapidamente e riportata a 95° C molto lentamente (all'incirca 0,1° C al secondo). Durante l'aumento della temperatura si può valutare specificamente la temperatura alla quale il frammento di DNA si separa: a questo valore di temperatura si ha un calo della fluorescenza dovuto al fatto che il fluoroforo si intercala solo su DNA duplex. In questo modo possiamo determinare la temperatura di melting, ossia quella temperatura a cui un frammento di DNA caratteristico si separa

in base alla composizione nucleotidica. Se la fluorescenza di alcuni frammenti non decade a questa temperatura, allora essi saranno prodotti aspecifici;

- Raffreddamento dello strumento. La temperatura viene portata a 40° C in 30 secondi.

Il software collegato allo strumento ABI PRISM 5700 consente di rappresentare i risultati in un grafico in cui in ascisse si trova il numero di cicli e in ordinata il logaritmo della fluorescenza, che si misura al termine della fase di allungamento. In tale grafico, ogni campione, quindi, descrive una sigmoide, in cui si può osservare una regione ad incremento esponenziale. I dati sono analizzati automaticamente dal software una volta scelto il punto centrale del tratto esponenziale della curva per il campione a maggiore concentrazione (quello cioè che raggiunge il ciclo-soglia dopo un numero minore di cicli).

Nella quantificazione relativa, la concentrazione del gene di interesse (target) viene espressa in funzione della concentrazione di un gene di riferimento (gene housekeeping), che si assume essere costante tra i diversi tessuti di un organismo, a tutti gli stadi di sviluppo (espresso costitutivamente) e non dovrebbe subire modificazioni in seguito al trattamento sperimentale. Nel nostro caso, per normalizzare i campioni è stato scelto il gene housekeeping la β -actina perché si è visto che la sua espressione non varia.

Per prima cosa abbiamo realizzato una Real Time PCR per il solo gene housekeeping, per poter così calibrare tutti i campioni, e portarli alla stessa concentrazione iniziale. Successivamente la differenza di espressione degli altri geni è stata valutata attraverso una quantificazione relativa basata sul ciclo soglia (Ct).

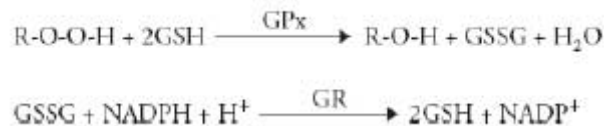
Gli mRNA di cui si voleva valutare l'espressione sono stati oggetto di almeno tre determinazioni indipendenti. Misurando l'incremento di fluorescenza, dovuto alla formazione di nuovo prodotto di reazione, all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione del template di interesse.

4.10 Valutazione dell'attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx)

Le glutatione perossidasi sono una famiglia di enzimi che giocano un ruolo importante nella protezione dell'organismo dai danni ossidativi.

L'attività della GPx è stata determinata attraverso un metodo che utilizza cumene-idroperossido (Cayman) come substrato.

E' un metodo di determinazione enzimatica indiretta basato sull'ossidazione del GSH a GSSG, catalizzato dalla GPx. La rigenerazione del GSH è ottenuta accoppiando la precedente reazione a quella catalizzata dalla glutatione reduttasi (GR) che riduce il GSSG a GSH. La riduzione del GSSG si accompagna all'ossidazione del NADPH a NADP⁺. La diminuzione di assorbanza a 340 nm, lunghezza d'onda che rappresenta il massimo di assorbimento del NADPH, indica l'entità dell'ossidazione del NADPH a NADP⁺. Questo è indicativo dell'attività della GPx, poiché la reazione catalizzata dalla GPx rappresenta la tappa limitante dell'intero processo catalitico.



A 24 ore dal trattamento delle cellule 16 HBE con PBS (controllo), CSE, S-CMC-Lys o CSE+S-CMC-Lys:

- Il terreno di coltura è stato eliminato dalle piastre da 6 cm di diametro;
- Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X;
- Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di PBS 1X;
- Le cellule sono state staccate dal fondo della piastra utilizzando uno scraper e sono state raccolte in eppendorf;
- Le eppendorf sono state centrifugate a 1000 g, 4 °C per 10 minuti;
- Il sovrnatante è stato eliminato;
- Il pellet di cellule è stato lisato in 80 µl di Buffer di Lisi [Tabella 4.21] addizionato di inibitori delle proteasi;

- Si procedeva con due cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare;
- Il pellet è stato quindi centrifugato a 4 °C, 10000 g per 15 minuti per eliminare i debris cellulari;
- Del sovrantante così ottenuto se ne prelevava una parte (circa 5 µl) per i dosaggi proteici, la restante parte veniva conservata a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Per misurare la concentrazione delle proteine viene utilizzato il metodo Bradford (1979).

- 70 µg di proteine totali (20 µl) sono stati aggiunti alla soluzione contenente 100 µl di GPx Assay Buffer [Tabella 4.22] e 50 µl di co-substrate mixture (contenente NADPH, glutatione e glutatione reduttasi);
- Alla soluzione sono stati aggiunti 20 µl di cumene-idroperossido per far iniziare la reazione.

La densità ottica (OD) è stata misurata a 340 nm usando un programma cinetico. L'attività della GPx è stata determinata misurando la diminuzione della OD a 340 nm ($1 \text{ mU} / \text{mL GPx} [A_{340}/\text{min}] / 0.0062$), con sottrazione del bianco. I valori sono stati normalizzati per il numero totale di cellule misurato in ciascuna condizione in diversi pozzetti.

Composizione del Buffer di Lisi

K ₃ PO ₄	50 mM
EDTA	1 mM

Tabella 4.21 – Composizione del Buffer di Lisi per l'omogenizzazione di proteine totali, pH 7,5.

Composizione di GPx Assay Buffer

Tris-HCl	50 mM
EDTA	5 mM

Tabella 4.22 – Composizione del Buffer GPx Assay Buffer, pH 7,6.

4.11 Analisi statistiche

Tutti i dati sono espressi come media aritmetica più o meno errore standard.

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test T di Student per i dati non appaiati o il test Anova (Dunnet's post hoc test) a una via usando il CSE come categoria di riferimento mediante il programma Prism (Graph Pad 5, San Diego, California). Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p\text{-value} < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1 Effetti del CSE sulla vitalità cellulare

Come primo step abbiamo caratterizzato il nostro sistema sperimentale valutando gli effetti dell'esposizione delle cellule a diverse concentrazioni di CSE a tempi brevi e prolungati.

5.1.1 Analisi della vitalità cellulare mediante Trypan blue

La vitalità cellulare è stata valutata mediante la colorazione con Trypan Blue.

Le cellule 16-HBE sono state trattate con concentrazioni crescenti di CSE pari a 2.5%, 5% e 10% e, dopo 3 o 24 ore dal trattamento, le cellule sono state contate mediante emocitometro dopo l'aggiunta dell'appropriato colorante. Come controllo sono state utilizzate cellule 16 HBE trattate con PBS.

Gli istogrammi A e C mostrano il numero di cellule totali espressi come percentuale rispetto al controllo alle 3 e alle 24 ore rispettivamente, gli istogrammi B e D mostrano invece la percentuale di cellule morte normalizzate rispetto al numero totale di cellule alle 3 e alle 24 ore rispettivamente [Figura 5.6].

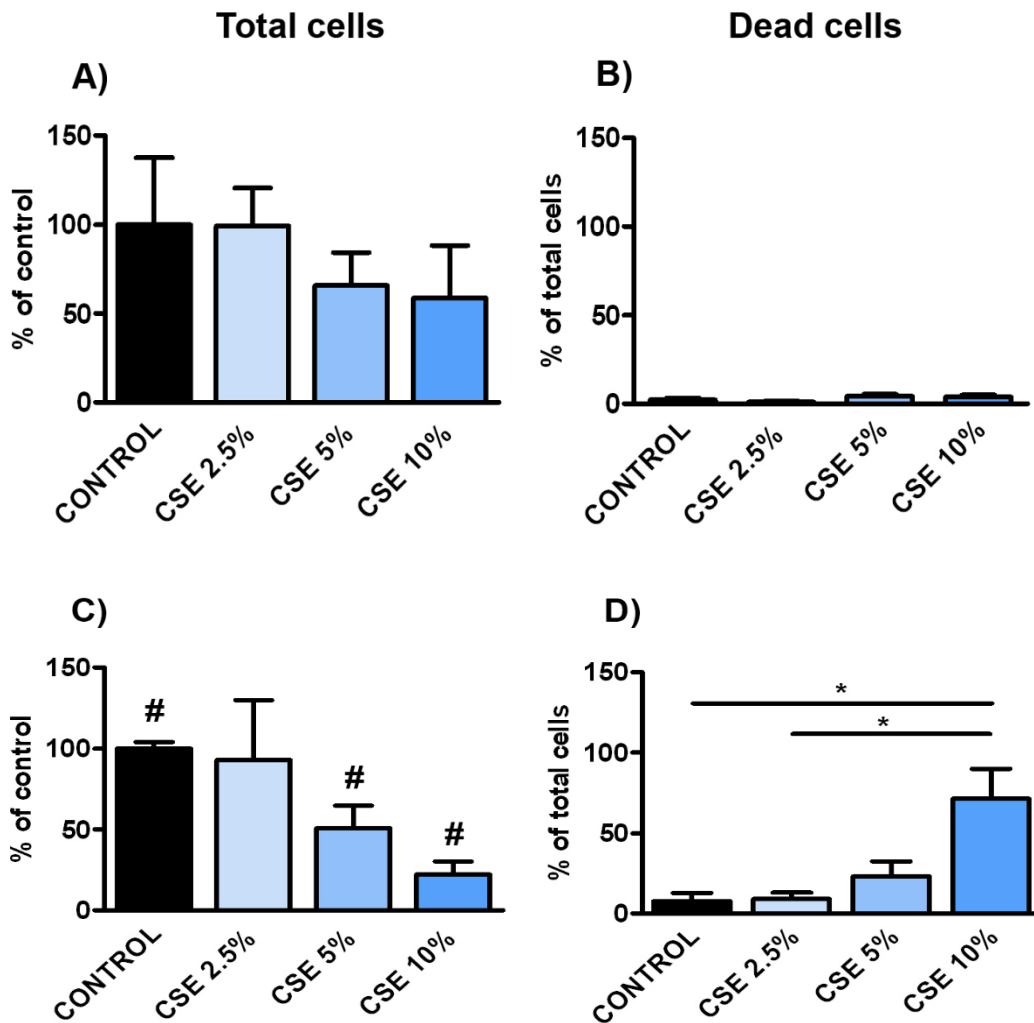


Figura 5.1 - Vitalità cellulare nelle cellule 16-HBE in presenza di concentrazioni crescenti di CSE (2.5%, 5% e 10%). A) numero totale di cellule espresso come percentuale rispetto al controllo, dopo 3 ore di esposizione al CSE (n=4); B) mortalità cellulare valutata con il test di esclusione con il Trypan blu, espressa come percentuale di cellule morte rispetto alle cellule totali, dopo 3 ore di esposizione al CSE (n=4); C) numero totale di cellule, espresso come percentuale rispetto al controllo, dopo 24 ore di esposizione al CSE (n=6); D) mortalità cellulare valutata con il test di esclusione con il Trypan blu, espressa come percentuale di cellule morte rispetto alle cellule totali, dopo 24 ore di esposizione al CSE (n=4)

* = $p < 0.05$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento. # = $p < 0.05$ con t-test

Come si può osservare nella figura 5.1 le cellule non sono state influenzate in modo significativo in termini di vitalità e mortalità dopo un'esposizione di 3 ore alle tre concentrazioni provate [Figura 5.1 A, B]. Al contrario, in seguito ad un'esposizione prolungata [Figura 5.1 D, E], il CSE si è rivelato in grado di indurre un aumento dose

dipendente della mortalità cellulare (controllo $7.75 \pm 4.96\%$, $n=3$; CSE 2.5% $8.96 \pm 4.21\%$, $n=3$; CSE 5% $23.13 \pm 9.36\%$, $n=3$ $p<0.05$; CSE 10% $71.26 \pm 1.76\%$, $n=6$ $p<0.05$). L'effetto sulla mortalità cellulare in seguito ad un trattamento prolungato con CSE al 10% è risultato significativamente differente sia dal relativo controllo ($p<0.05$) che dal risultato ottenuto dopo 3 ore di esposizione alla stessa concentrazione di CSE (CSE 10% 3 ore $3.8 \pm 0.99\%$, $n=4$; CSE 10% 24 ore $71.26 \pm 18.76\%$, $n=6$).

5.1.2 Analisi della vitalità cellulare mediante MTT assay

Dal momento che la colorazione con Trypan blue permette una valutazione indiretta della vitalità cellulare poiché considera unicamente l'integrità della membrana, gli effetti del CSE sono stati valutati anche attraverso un saggio fluorimetrico che misura il metabolismo ossidativo mitocondriale delle cellule.

E' infatti possibile che la vitalità cellulare risulti compromessa anche se l'integrità della membrana viene (almeno inizialmente) mantenuta.

A tale scopo abbiamo utilizzato il test dell'MTT nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate precedentemente.

Come controllo sono state utilizzate cellule 16 HBE trattate con PBS.

Gli istogrammi mostrano l'assorbanza espressa come percentuale rispetto al controllo a 3 [Figura 5.2 A] e a 24 ore [Figura 5.2 B] rispettivamente.

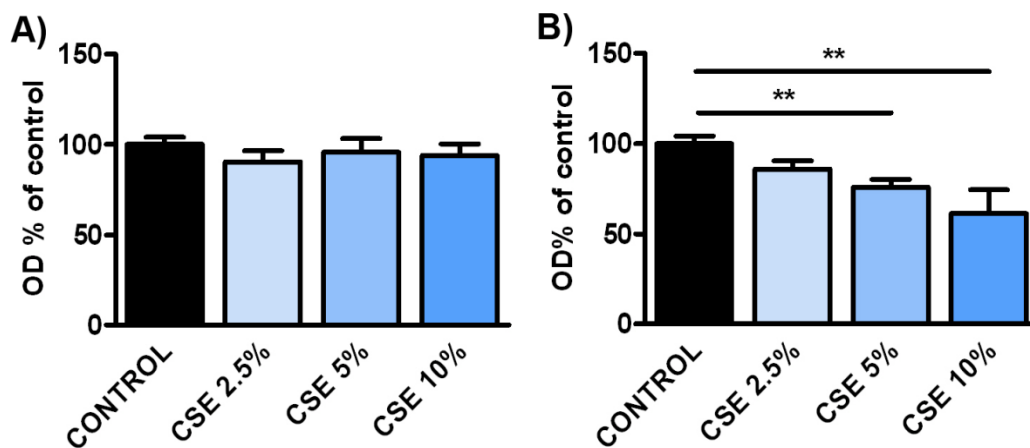


Figura 5.2 – Proliferazione cellulare valutata mediante il saggio dell'MTT nelle cellule 16-HBE in presenza di concentrazioni crescenti di CSE (2.5%, 5% e 10%) dopo 3 ore di esposizione al CSE (n=6) (A), e dopo 24 ore di esposizione (n=6) (B).

** = P < 0.01, con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

Come si può osservare dai grafici della figura 5.2 non si sono osservate differenze significative tra cellule trattate e controllo a seguito di un trattamento breve.

In seguito ad un trattamento prolungato si osserva invece una diminuzione della proliferazione cellulare in presenza di concentrazioni crescenti di CSE (controllo $100.0 \pm 4.14\%$, n=24; CSE 2.5% $85.82 \pm 4.72\%$, n=6; CSE 5% $75.68 \pm 4.4\%$, n=12 p<0.01; CSE 10% $61.18 \pm 13.19\%$, n=6 p<0.01).

5.1.3 Analisi della risposta apoptotica

Lo studio è proseguito per verificare se fosse il meccanismo apoptotico alla base del fenomeno di morte cellulare osservato in seguito a trattamento con CSE.

A tale scopo le cellule sono state trattate con CSE al 5% per 24 ore.

Il kit fluorimetrico utilizzato permette di valutare l'espressione della fosfatidilserina sulla superficie esterna della membrana cellulare, uno dei segnali precoci di apoptosi.

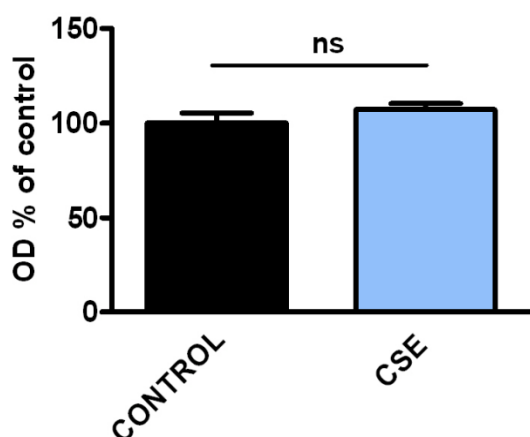


Figura 5.3 – Risposta apoptotica delle cellule 16-HBE in presenza di CSE al 5% valutata mediante il kit fluorimetrico Apopercantage (Biocolor). Numero di cellule apoptotiche espresse come percentuale rispetto al controllo, dopo 24 ore di esposizione al CSE (n=10). Non si riscontrano differenze significative tra trattamento e controllo (t-test).

Come si può osservare nella figura 5.3 non abbiamo misurato nessuna variazione significativa della densità ottica (indice di apoptosi in atto) tra il controllo ($100,0 \pm 5,3\%$, $n = 10$) e le cellule trattate con CSE ($107,2 \pm 3,2\%$, $n = 10$), suggerendo che l'aumento della mortalità osservata in presenza di CSE non dipenda da un processo apoptotico.

5.2 Effetti del CSE sul contenuto intracellulare di Glutazione ridotto GSH

Il ruolo del GSH è particolarmente importante nel polmone, che è costantemente esposto a ossidanti metabolici endogeni, nonché a sostanze ossidative inquinanti presenti nell'aria vale a dire ozono, biossido di azoto, gas di scarico, fumo di sigaretta. Poiché gli effetti provocati dal CSE nel nostro modello sperimentale riguardo la vitalità e il metabolismo cellulare sembrano essere concentrazione e tempo dipendenti, abbiamo studiato l'effetto della S-CMC-Lys e del CSE alle diverse concentrazioni (2,5% e 5%) sia alle 3 ore che alle 24 ore di trattamento sul livello intracellulare di GSH.

Per determinare il contenuto intracellulare dei tioli liberi in particolare di Glutazione (GSH) è stata impiegata una tecnica basata sulla fluorescenza.

Come indicatore fluorescente è stato utilizzato il MonoChloroBimane (MCB) la cui intensità di fluorescenza è proporzionale alla quantità di tiolo intracellulare e come condizione di controllo sono state utilizzate cellule 16 HBE trattate con PBS.

Inizialmente abbiamo voluto verificare la possibile azione antiossidante della S-CMC-Lys.

La S-CMC-Lys ha dimostrato infatti di avere un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo in altre linee cellulari (Garavaglia et al., 2008; Pace et al., 2013).

A tale scopo abbiamo quindi valutato il solo effetto della Carbossimetilcisteina 100 μ M sul contenuto intracellulare di Glutathione ridotto.

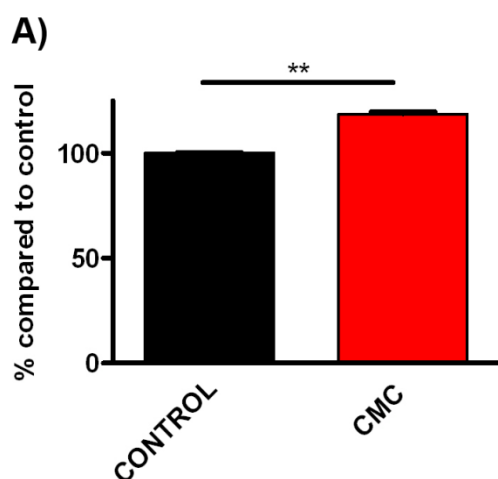
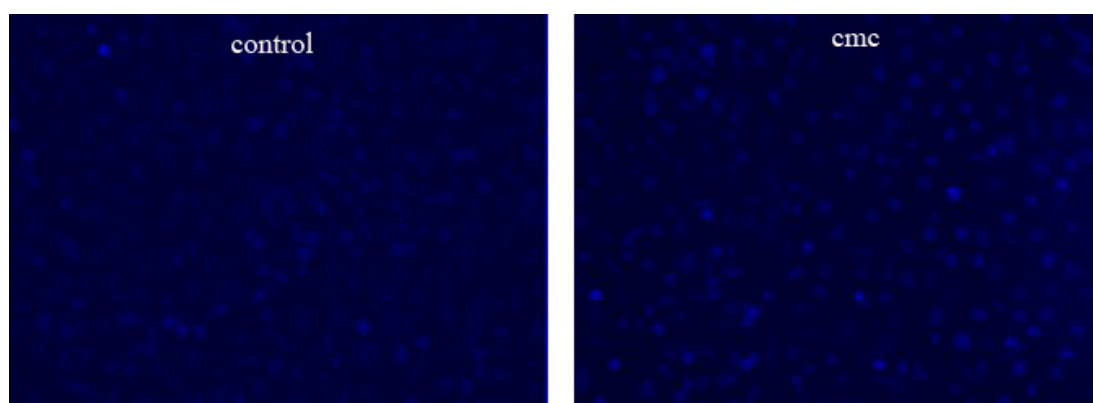


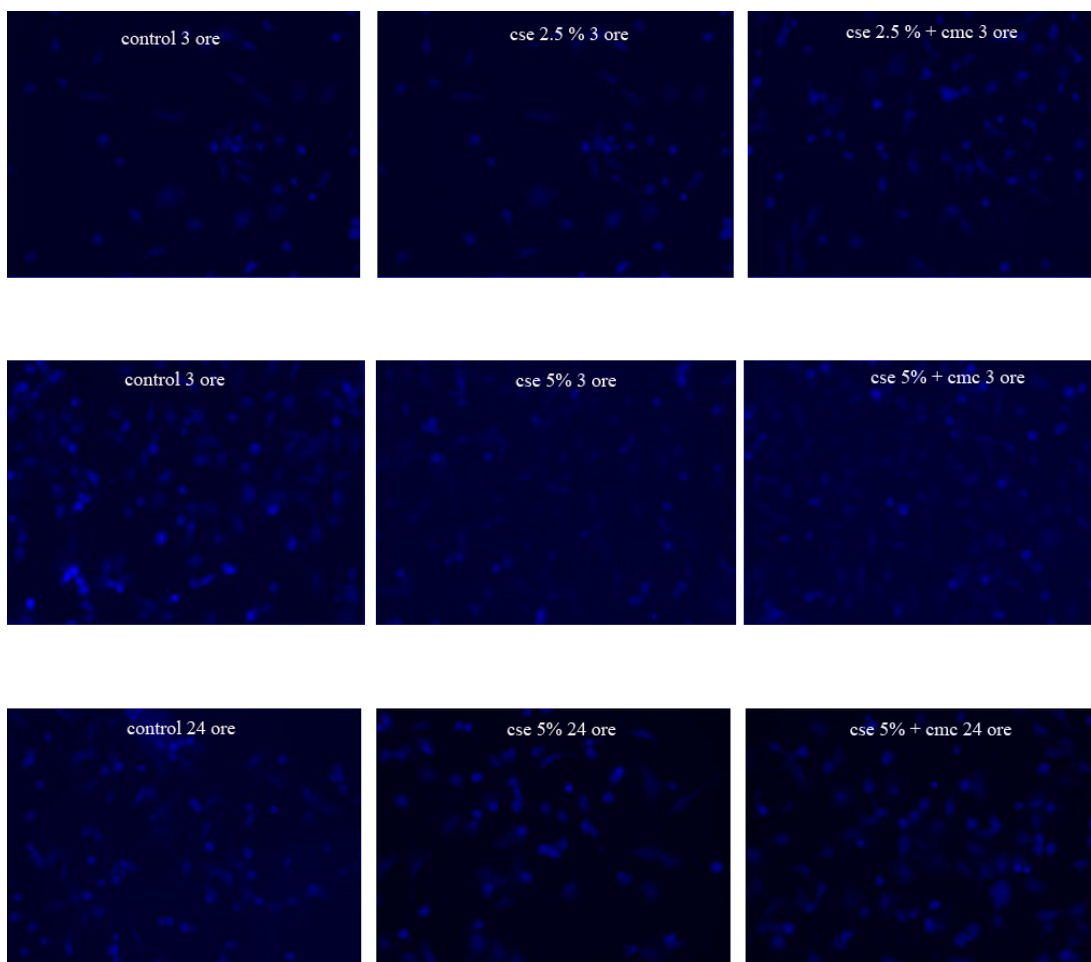
Figura 5.4 - Effetto del CSE sui livelli intracellulari di GSH in cellule 16-HBE.

Esempi di immagini originali di microscopia a fluorescenza. Ogni immagine rappresenta una ROI (regione di interesse). I grafici rappresentano la media dell'intensità media di fluorescenza misurata

in tutte le ROI, espressa come percentuale rispetto alla condizione di controllo misurata in cellule trattate con PBS (CONTROL: controllo) e S-CMC-Lys 100µm (CMC) per 3 ore (n = 30). n rappresenta il numero delle ROIs. ** = p <0.01 t-test.

Gli istogrammi mostrano la percentuale di fluorescenza media espressa come percentuale rispetto al controllo alle 3 [Figura 5.4 A] e alle 24 ore [Figura 5.4 B].

Un trattamento di 3 ore con S-CMC-Lys 100 µM ha provocato un aumento significativo di GSH in cellule 16-HBE rispetto alle cellule di controllo non trattate (controllo: 100,0 ± 0,48%, n=30; S-CMC-Lys: 118,7 ± 1,05% n=30). Siamo quindi passati a valutare l'effetto del CSE e del co-trattamento con Carbossimetilcisteina.



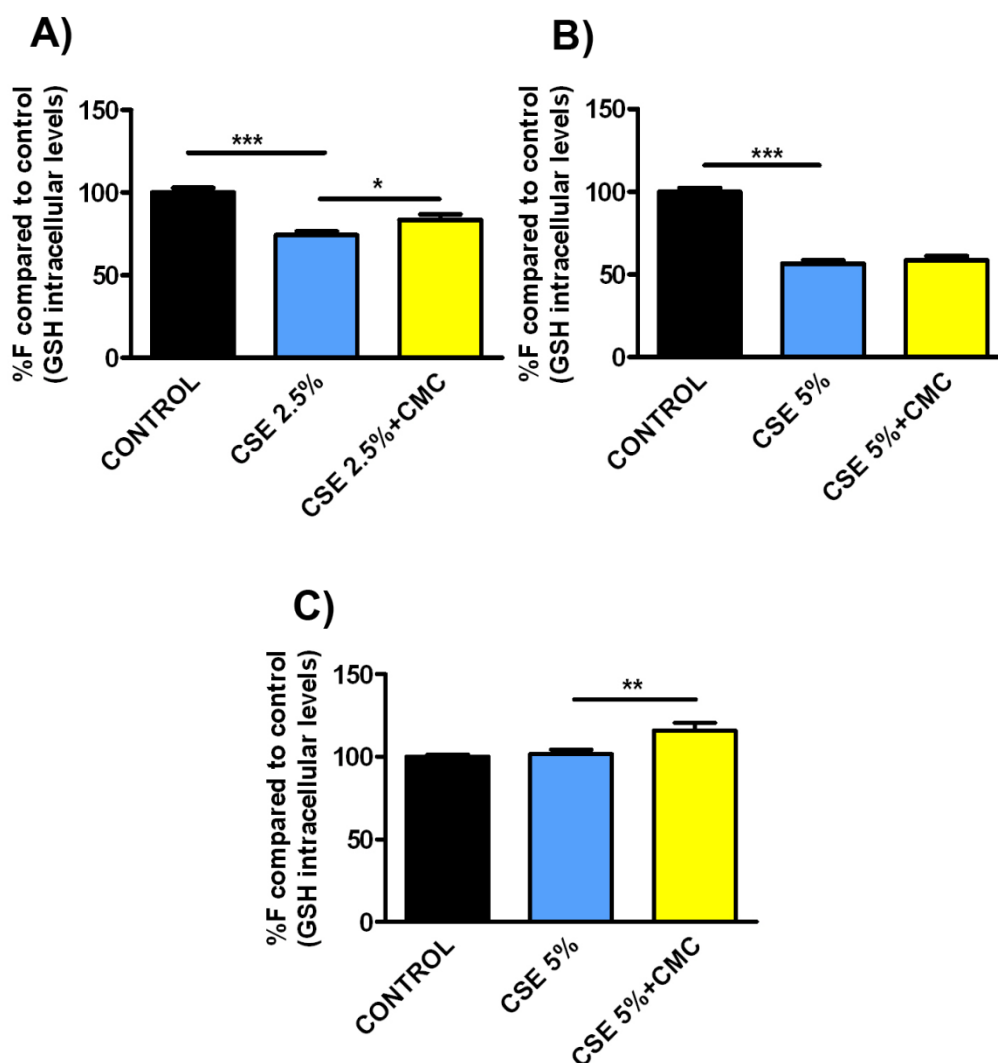


Figura 5.5 - Effetto del CSE sui livelli intracellulari di GSH in cellule 16-HBE.

Esempi di immagini originali di microscopia a fluorescenza. Ogni immagine rappresenta una ROI (regione di interesse). I grafici rappresentano la media dell'intensità media di fluorescenza misurata in tutte le ROI, espressa come percentuale rispetto alla condizione di controllo misurata in cellule trattate con A) PBS (CONTROL: controllo), CSE 2.5% (CSE) e CSE 2.5%+S-CMC-Lys 100 μ m (CSE+CMC) per 3 ore (n = 25); B) PBS (CONTROL: controllo), CSE 5% (CSE) e CSE 5%+S-CMC-Lys 100 μ m (CSE+CMC) per 3 ore (n = 25); C) PBS (CONTROL: controllo), CSE 5% (CSE) e CSE 5%+S-CMC-Lys 100 μ m (CSE+CMC) per 24 ore (n = 60);

n rappresenta il numero delle ROIs.

* = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001 con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

Come si può osservare dai grafici in seguito a brevi esposizioni, sia il CSE al 2,5% sia il CSE al 5% [Figura 5.5 A, B] hanno causato una significativa riduzione di GSH

intracellulare (controllo: $100 \pm 2,9\%$ n=25; CSE 2,5%: $74,32 \pm 2,22\%$ n=25; controllo: $100 \pm 2,29\%$ n=25, CSE 5%: $56,47 \pm 2,04\%$ n=25 $p < 0,001$).

Nel caso di co-trattamento per un tempo breve con S-CMC-Lys 100 μ M e CSE si può osservare che l'effetto dell'esposizione delle cellule al CSE 2,5% potrebbe essere parzialmente ripristinato [Figura 5.5 A], i livelli di GSH intracellulare infatti aumentano significativamente rispetto al solo trattamento con CSE anche se il GSH cellulare risulta ancora inferiore rispetto alla condizione di controllo (CSE 2,5%: $74,32 \pm 2,22\%$ n = 25; CSE+S-CMC-Lys: $83,56 \pm 3,3\%$ n = 25, $p < 0,01$).

L'effetto dell'esposizione al CSE 5% non viene invece influenzato dal trattamento con carbossimetilcisteina (CSE 5%: $56,47 \pm 2,04\%$ n = 25; CSE+S-CMC-Lys: $58,6 \pm 2,59\%$ n = 25) [Figura 5.5 B].

Al contrario in seguito ad un trattamento prolungato al CSE 5% non si sono osservati cambiamenti significativi nei livelli di GSH rispetto alla condizione di controllo (controllo: $100 \pm 1,33\%$ n=60; CSE 5%: $101,7 \pm 2,63\%$ n = 60). Il co-trattamento con S-CMC-Lys ha invece causato un aumento statisticamente significativo della concentrazione di tiolo (CSE 5%: $101,7 \pm 2,63\%$ n = 60; CSE+S-CMC-Lys: $115,08 \pm 4,61\%$ n = 60 $p < 0,01$) [Figura 5.5 C].

5.3 Effetti del CSE sui livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Una delle conseguenze dello stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta è la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che determina un danno cellulare. Abbiamo pertanto condotto degli esperimenti per valutare la concentrazione intracellulare degli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS); le cellule sono state quindi trattate sia per tempi brevi che prolungati con CSE 5% e S-CMC-Lys. 100 μ M.

Anche in questa serie sperimentale come condizione di controllo sono state utilizzate cellule 16 HBE trattate con PBS.

Come sonda fluorescente è stata utilizzata la diidro-2',7'-diclorofluorescina diacetato, un derivato della fluorescina, la cui intensità di fluorescenza è proporzionale ai livelli di ROS intracellulare.

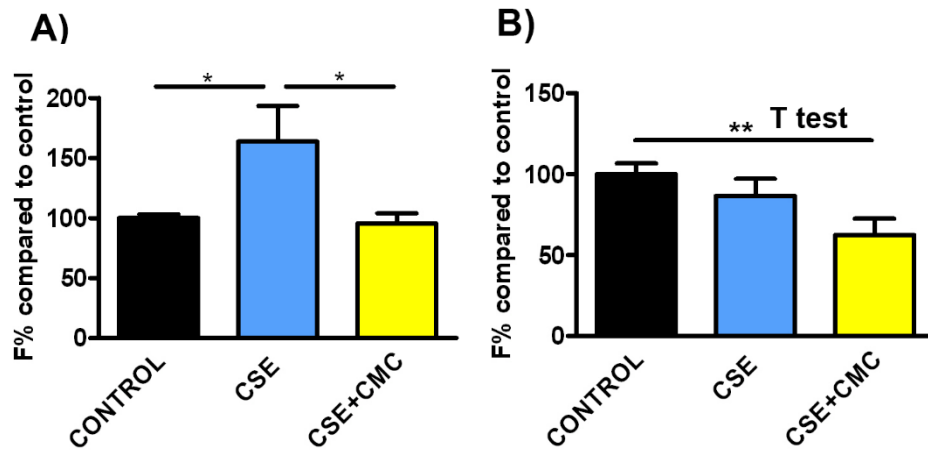
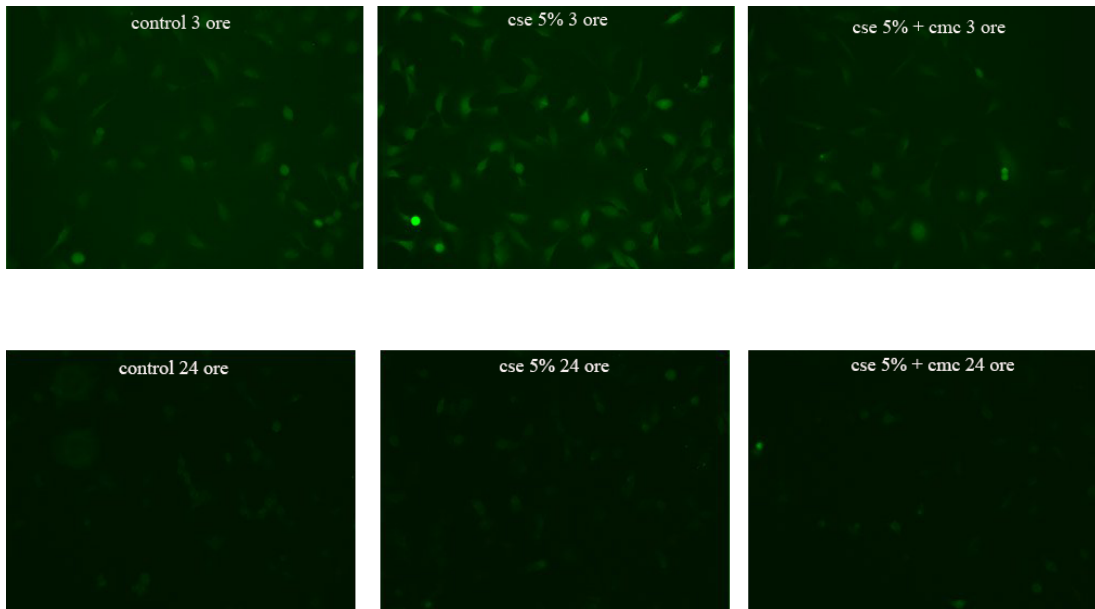


Figura 5.6 - Effetto del CSE sui livelli intracellulari di ROS in cellule 16-HBE.

Esempi di immagini originali di microscopia a fluorescenza. Ogni immagine rappresenta una ROI (regione di interesse). I grafici rappresentano la media dell'intensità media di fluorescenza misurata in tutte le ROI, espressa come percentuale rispetto alla condizione di controllo misurata in cellule trattate con PBS (CONTROL: controllo), CSE 5% (CSE) e CSE 5%+S-CMC-Lys 100 μ M (CSE+CMC) per 3 ore (A) (n = 70) e 24 ore (B) (n = 12).

n rappresenta il numero delle ROIs. Scala barra = 100 μ m.

* = p < 0.05 con Anova test (post hoc test di Dunnett) usando il CSE come categoria di riferimento, ** = p < 0.01 t-test.

Gli istogrammi mostrano che in seguito a trattamenti brevi i livelli intracellulari di ROS sono notevolmente aumentati dopo l'esposizione al CSE (controllo: $100 \pm 2,99\%$ n=70; CSE 5%: $163,7 \pm 29,72\%$ n=70 $p < 0,05$) e che la S-CMC-Lys può avere un effetto benefico sul contenuto di ROS intracellulari ripristinando i livelli ad un valore simile al controllo (CSE 5%: $163,7 \pm 29,72\%$ n=70; CSE+S-CMC-Lys: $95,27 \pm 8,41\%$ n=70 $p < 0,5$) [Figura 5.6 A]. In seguito ad un trattamento prolungato invece si sono osservati valori simili tra controllo e CSE (controllo: $100 \pm 6,67\%$ n=12; CSE 5%: $86,49 \pm 10,51\%$ n=12) mentre la S-CMC-Lys ha la tendenza ad abbassare i ROS (controllo: $100 \pm 6,67\%$ n=12; CSE+S-CMC-Lys: $62,44 \pm 9,9\%$ n=12 $p < 0,01$ T test) [Figura 5.6 B] in accordo con quanto osservato con il monoclorobimane negli esperimenti di valutazione dei livelli intracellulari di GSH.

5.4 Effetti del CSE sugli enzimi coinvolti nella sintesi del Glutazione

5.4.1 Esperimenti di Real Time PCR

Numerosi studi hanno evidenziato la capacità di uno stress ossidativo di alterare l'espressione e l'attività di vari fattori trascrizionali (Brigelius-Flohé et al., 1999).

Tramite Real-Time PCR è stata dunque valutata l'espressione genica di alcuni enzimi espressi nelle cellule epiteliali delle vie aeree (GCS, GR e GPxs) che svolgono un ruolo chiave nel metabolismo del glutatione.

Sono state valutate cinque condizioni: controllo (cellule trattate con PBS) , 3 e 24 ore di esposizione al CSE 5 % e 3 e 24 ore di co-trattamento con la S-CMC-Lys 100 μ M.

I dati sono espressi come percentuale relativa rispetto al gene housekeeping dell'actina. E' stata scelta l'actina come gene di riferimento poiché è espressa in modo ubiquitario e costante all'interno della cellula.

Glutammil-Cistein Sintetasi e Glutazione Reduttasi

Dopo il consumo di glutatione in pathways antiossidanti e di disintossicazione, la cellula può ripristinare i livelli di GSH mediante sintesi *ex novo* tramite l'enzima

glutammil-cistein sintetasi (GCS) o mediante rigenerazione da glutatione ossidato (GSSG) tramite l'attività della glutatione reduttasi (GR).

La GCS è l'enzima limitante nella sintesi del glutatione, è una proteina composta da una subunità catalitica e una modulatoria.

La subunità catalitica (GCLC) è la più grande delle due subunità (73 KDa) e contiene il sito attivo responsabile del legame ATP-dipendente tra il gruppo amminico della cisteina e il gruppo carbossilico del glutammato. La subunità modulatoria (GCLM) è invece più piccola (31 KDa) e, interagendo con la GCLC, ne aumenta l'efficienza catalitica.

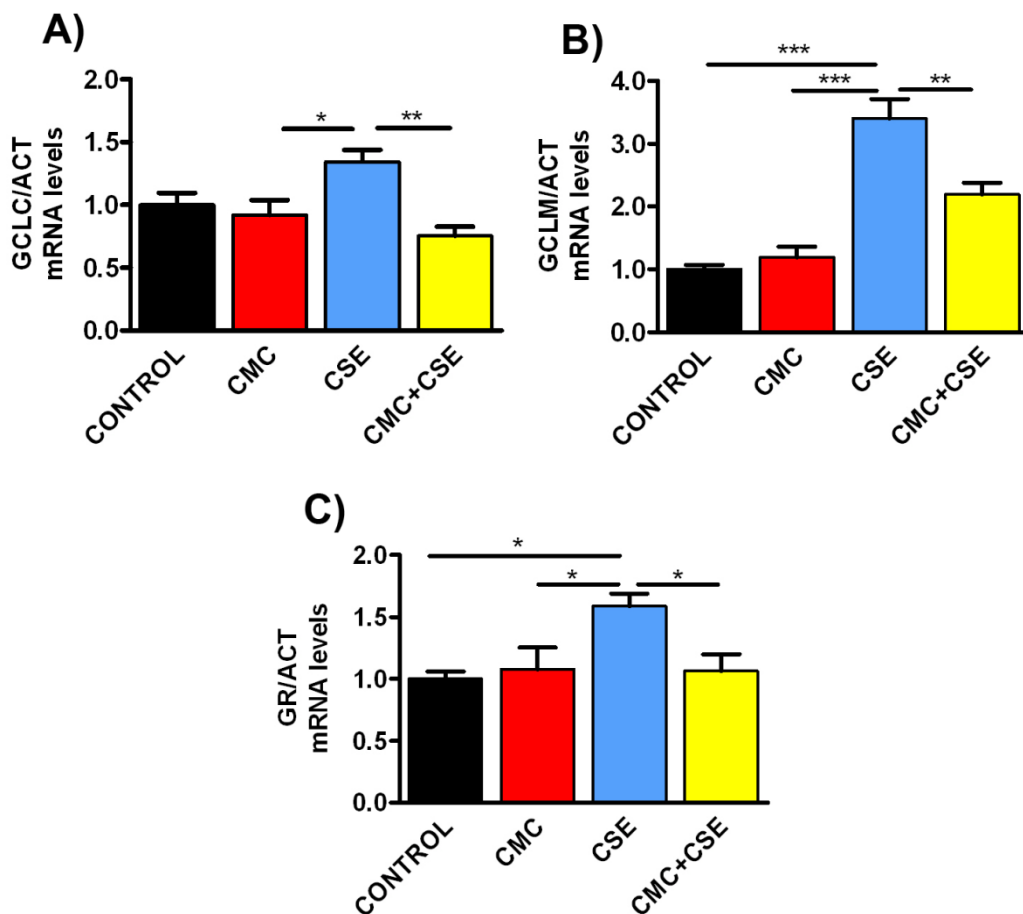


Figura 5.7 – Effetto del CSE sui livelli di espressione dell'mRNA dei principali enzimi coinvolti nella sintesi di glutatione: subunità catalitica della GCS (GCLC), subunità modulatoria della GCS (GCLM) e glutatione reduttasi (GR) in cellule 16-HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo) CSE 5% (CSE), CSE 5% e S-CMC-Lys 100 μ M (CSE + CMC) per 3 ore. L'mRNA della β -actina (ACT) è stato usato per normalizzare i livelli del template. Gli istogrammi rappresentano i cambiamenti dei livelli di mRNA

espressi come percentuale rispetto alla condizione di controllo. A) livelli di espressione della GR (n=6), B) livelli di espressione della GCLC (n=4), C) livelli di espressione della GCLM (n=4).
 * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

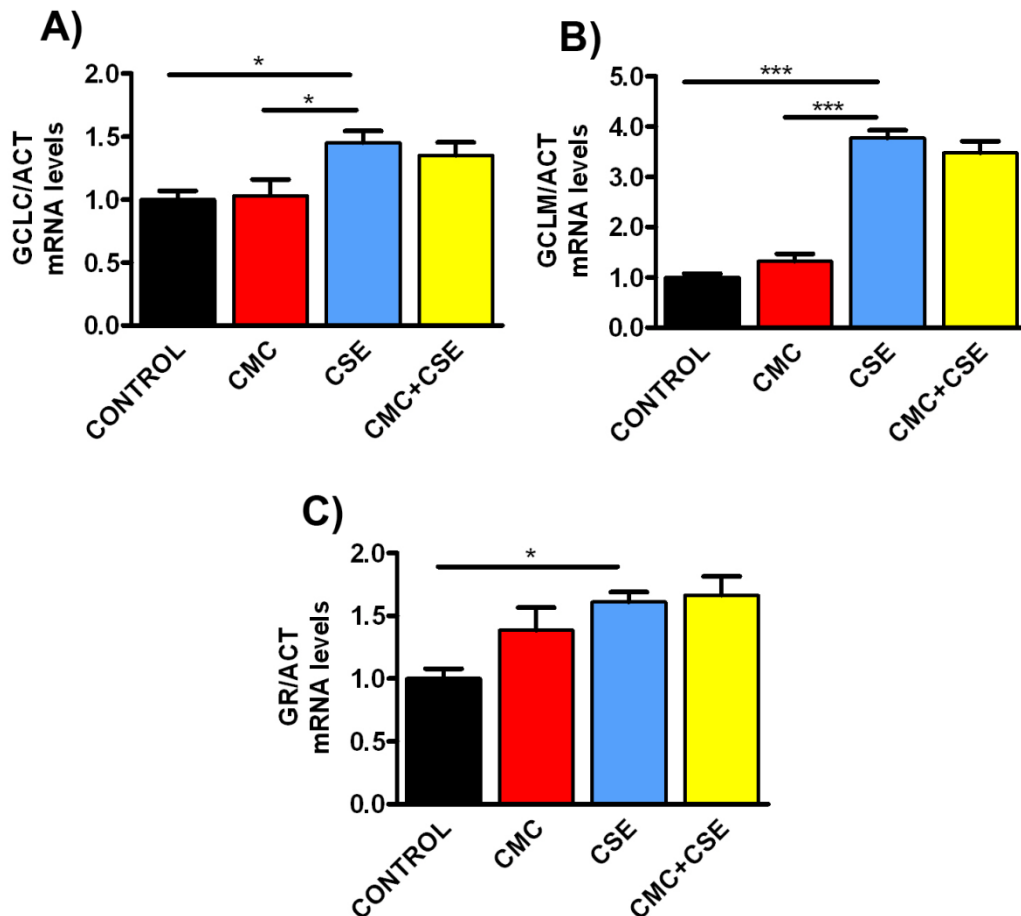


Figura 5.8 – Effetto del CSE sui livelli di espressione dell'mRNA dei principali enzimi coinvolti nella sintesi di glutatione: subunità catalitica della GCS (GCLC), subunità modulatoria della GCS (GCLM) e glutatione reduttasi (GR) in cellule 16-HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo) CSE 5% (CSE), CSE 5% e S-CMC-Lys 100 μ M (CSE + CMC) per 24 ore. L'mRNA della β -actina (ACT) è stato usato per normalizzare i livelli del template. Gli istogrammi rappresentano i cambiamenti dei livelli di mRNA espressi come percentuale rispetto alla condizione di controllo. A) livelli di espressione della GR (n=5), B) livelli di espressione della GCLC (n=4), C) livelli di espressione della GCLM (n=5).
 * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

I risultati mostrano che i livelli di espressione dell'mRNA di GCLC aumentano significativamente sia dopo una breve (controllo: $1,00 \pm 0,09\%$ n=4; CSE 5%: $1,34 \pm 0,09\%$ n=4) che dopo una lunga esposizione al CSE 5 % (controllo: $1,00 \pm 0,07\%$ n=4; CSE 5%: $1,45 \pm 0,09\%$ n=4 $p < 0,05$) [Figura 5.7 A e 5.8 A]. Analogamente, il CSE induce

un aumento dell'espressione di GCLM in seguito ad entrambe le esposizioni (3 ore: controllo: $1,00 \pm 0,07\%$ n=4; CSE 5%: $3,4 \pm 0,03\%$ n=4 $p < 0,001$; 24 ore: controllo: $1,00 \pm 0,07\%$ n=4; CSE 5%: $3,76 \pm 0,16\%$ n=4 $p < 0,001$) [Figura 5.7 B e 5.8 B].

La S-CMC-Lys potrebbe ripristinare l'effetto del CSE sui livelli di espressione dell'mRNA di GCLC e GCLM solo in seguito ad una breve esposizione (GCLC: CSE 5%: $1,34 \pm 0,09\%$ n=4, CSE+S-CMC-Lys $0,75 \pm 0,07\%$ n=4: $p < 0,01$; GCLM: CSE 5%: $3,4 \pm 0,3\%$ n=4 CSE+S-CMC-Lys: $2,19 \pm 0,19\%$ n=4 $p < 0,01$) [Figura 5.7 A e 5.7 B].

Dopo un'esposizione prolungata, l'espressione di GCLC e GCLM in presenza sia di CSE che di S-CMC-Lys non è infatti significativamente differente da quello osservato in presenza di solo CSE (GCLC: CSE 5%: $1,45 \pm 0,09\%$ n=4, CSE+S-CMC-Lys $1,35 \pm 0,1\%$ n=4; GCLM: CSE 5%: $3,76 \pm 0,16\%$ n=4 CSE+S-CMC-Lys: $3,47 \pm 0,23\%$ n=4) [Figura 5.8 A e 5.8 A].

In seguito ad un'esposizione sia breve [Figura 5.7 C] che prolungata [Figura 5.8 C] con CSE anche i livelli di espressione della GR aumentano significativamente rispetto al controllo (3 ore: controllo: $1,00 \pm 0,06\%$ n=6; CSE 5%: $1,59 \pm 0,1\%$ n=6 $p < 0,05$; 24 ore: controllo: $1,00 \pm 0,07\%$ n=6; CSE 5%: $1,6 \pm 0,08\%$ n=5 $p < 0,05$). Come osservato per la GCS, il co-trattamento con la S-CMC-Lys induce una significativa riduzione dell'espressione dell'mRNA della GR che torna ad un valore simile al controllo dopo un breve trattamento (CSE 5%: $1,6 \pm 0,08\%$ n=5; CSE+S-CMC-Lys $1,66 \pm 0,15\%$ n=5 $p < 0,05$) [Figura 5.7 C], ma non dopo esposizione prolungata (CSE 5%: $1,34 \pm 0,09\%$ n=4, CSE+S-CMC-Lys $0,75 \pm 0,07\%$ n=4) al CSE [Figura 5.8 C].

In entrambi i casi, sia per la GCS [Figura 5.7 A, B e 5.8 A,B] che per la GR [Figura 5.7 C e 5.8 C], un trattamento con la sola S-CMC-Lys non ha determinato cambiamenti significativi rispetto al controllo.

Glutathione Perossidasi

Ci sono diversi enzimi coinvolti nelle vie antiossidanti che consumano GSH.

Poiché lo stress ossidativo indotto dal CSE è dovuto principalmente alla produzione di H_2O_2 (Downs et al., 2011), abbiamo valutato i livelli di espressione dell'mRNA di

diverse isoforme della glutatione perossidasi (GPx1, 2 e 3) che sono note per essere espresse nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie (Brigelius-Flohé et al., 1999). La glutatione perossidasi è infatti l'enzima che catalizza la riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno a spese del glutatione ridotto.

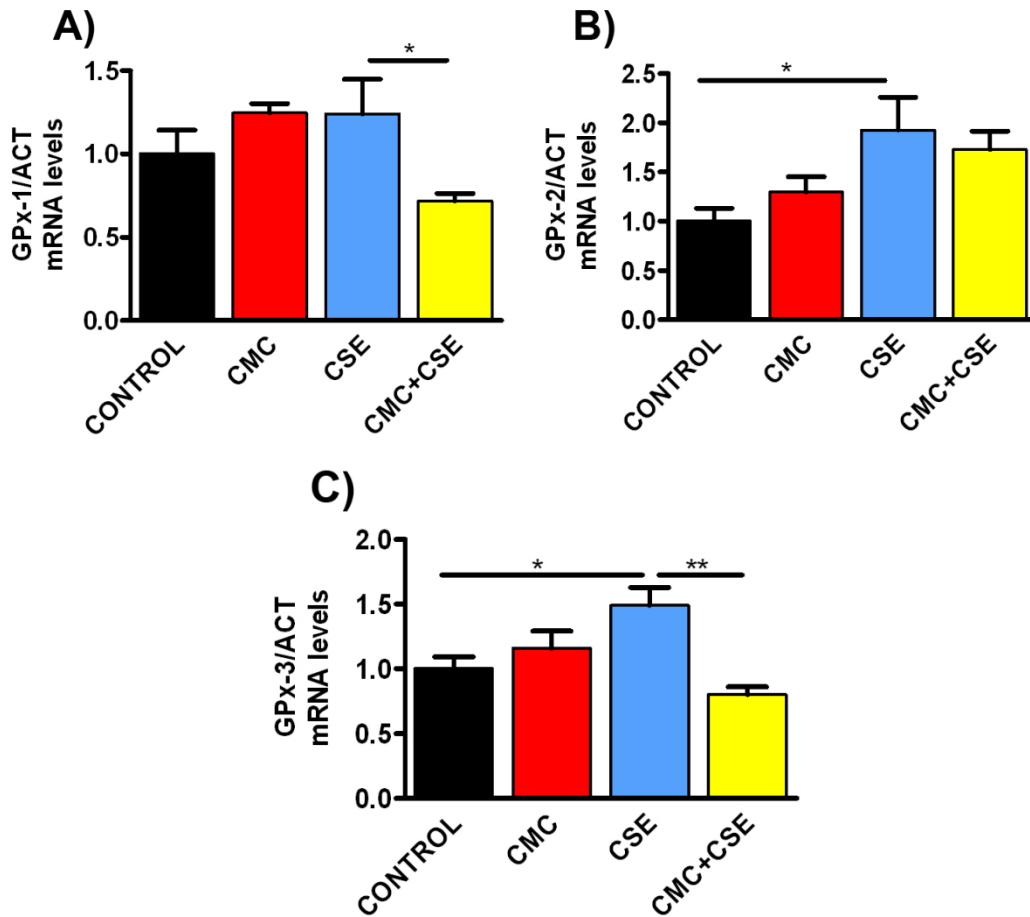


Figura 5.9 – Effetto del CSE sui livelli di espressione dell'mRNA dei principali enzimi coinvolti nella sintesi di glutatione: subunità catalitica della GCS (GCLC), subunità modulatore della GCS (GCLM) e glutatione reduttasi (GR) in cellule 16-HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo) CSE 5% (CSE), CSE 5% e S-CMC-Lys 100 μ M (CSE + CMC) per 3 ore. L'mRNA della β -actina (ACT) è stato usato per normalizzare i livelli del template. Gli istogrammi rappresentano i cambiamenti dei livelli di mRNA espressi come percentuale rispetto alla condizione di controllo. A) livelli di espressione della GPx-1 (n=5), B) livelli di espressione della GPx-2 (n=4), C) livelli di espressione della GPx-3 (n=4). * = $p < 0.05$; ** = $P < 0.01$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

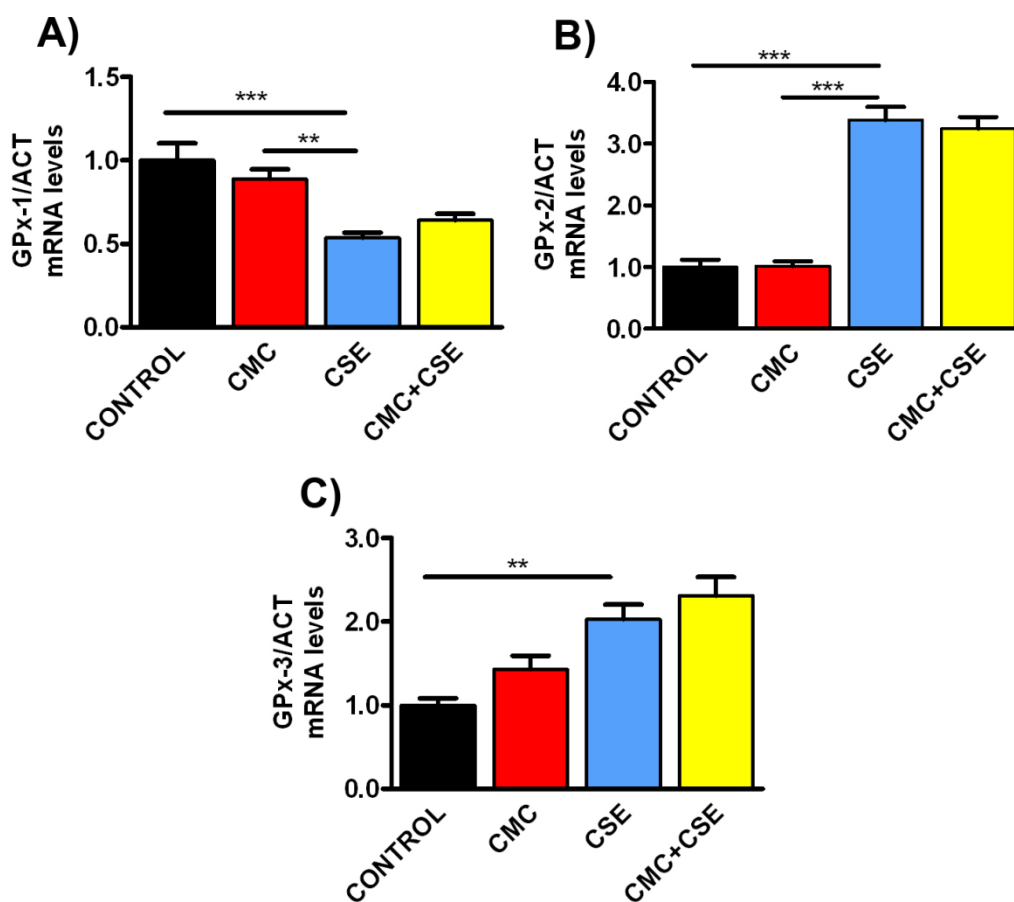


Figura 5.10 – Effetto del CSE sui livelli di espressione dell'mRNA delle glutatione perossidasi (GPxs) in cellule 16-HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo) CSE 5% (CSE), CSE 5% e S-CMC-Lys 100 μ M (CSE + CMC) per 3 ore. L'mRNA della β -actina (ACT) è stato usato per normalizzare i livelli del template. Gli istogrammi rappresentano i cambiamenti dei livelli di mRNA espressi come percentuale rispetto alla condizione di controllo. A) livelli di espressione della GPx-1 (n=6), B) livelli di espressione della GPx-2 (n=4), C) livelli di espressione della GPx-3 (n=5). ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

In seguito ad un'esposizione di 3 ore con CSE [Figura 5.9 A, B, C], l'espressione dell'mRNA della GPx-2 (controllo: $1,00 \pm 0,13\%$ n=4; CSE 5%: $1,93 \pm 0,33\%$ n=4 $p < 0,05$) e della GPx-3 (controllo: $1,00 \pm 0,09\%$ n=4; CSE 5%: $1,49 \pm 0,14\%$ n=4 $p < 0,05$) era significativamente maggiore rispetto ai controlli [Figura 5.9 B, C]. Al contrario, sembra che la GPx1 non sia influenzata da un breve trattamento con CSE (controllo: $1,00 \pm 0,14\%$ n=5; CSE 5%: $1,23 \pm 0,2\%$ n=5) [Figura 5.9 A]. Il co-trattamento con la S-CMC-Lys ha indotto una significativa diminuzione dell'espressione dell'mRNA della GPx-1 (CSE: $1,23 \pm 0,2\%$ n=5; CSE+S-CMC-Lys: $0,71 \pm 0,05\%$ n=5 $p < 0,05$) e della GPx-

3 (CSE: $1,49 \pm 0,14\%$ n=4; CSE+S-CMC-Lys: $0,8 \pm 0,06\%$ n=4 $p < 0,01$) rispetto al CSE [Figura 5.9 A, C], mentre espressione della GPx2 è rimasta invariata (CSE: $1,93 \pm 0,33\%$ n=4; CSE+S-CMC-Lys: $1,73 \pm 0,19\%$ n=4) [Figura 5.9 B]. Il profilo di espressione dei geni delle GPx risultava cambiato dopo un'esposizione prolungata al CSE [Figura 5.10 A, B, C]. Sono aumentati significativamente, rispetto al relativo controllo, i livelli di espressione dell'mRNA di GPx-2 ($p < 0,001$) e GPx-3 ($p < 0,01$) [Figura 5.10 B, C] mentre l'espressione di GPx-1 [Figura 5.10 A] è diminuita ($p < 0,01$). Il co-trattamento con S-CMC-Lys non ha pregiudicato ulteriormente i livelli di espressione delle GPx [Figura 5.10 A, B, C].

Anche in questo caso un trattamento con la sola S-CMC-Lys non ha determinato cambiamenti significativi rispetto al controllo.

5.4.2 Esperimenti di Western Blot

L'espressione dell'enzima GCLC è stata valutata anche a livello proteico mediante esperimenti di Western Blot.

Si sono svolti esperimenti sui lisati totali di cellule 16 HBE trattate per 3 ore o 24 ore con PBS (controllo), S-CMC-Lys 100 μ M (CMC), CSE 5% (CSE) e S-CMC-Lys+ CSE 5% (CSE+CMC).

Gli anticorpi specifici utilizzati erano in grado di riconoscere le due subunità, GCLC (subunità catalitica) e GCLM (subunità modulatoria), le due subunità si separavano durante la corsa elettroforetica per via del differente peso molecolare.

Dall'analisi della lastra è stato quindi possibile identificare due diverse bande: una con un peso molecolare di circa 72 kDa, corrispondente alla GCLC ed una 30 kDa, corrispondente alla GCLM.

L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata normalizzando il segnale della GCLC per il segnale della tubulina e il segnale della GCLM per il segnale della GAPDH utilizzati come controlli interni di caricamento.

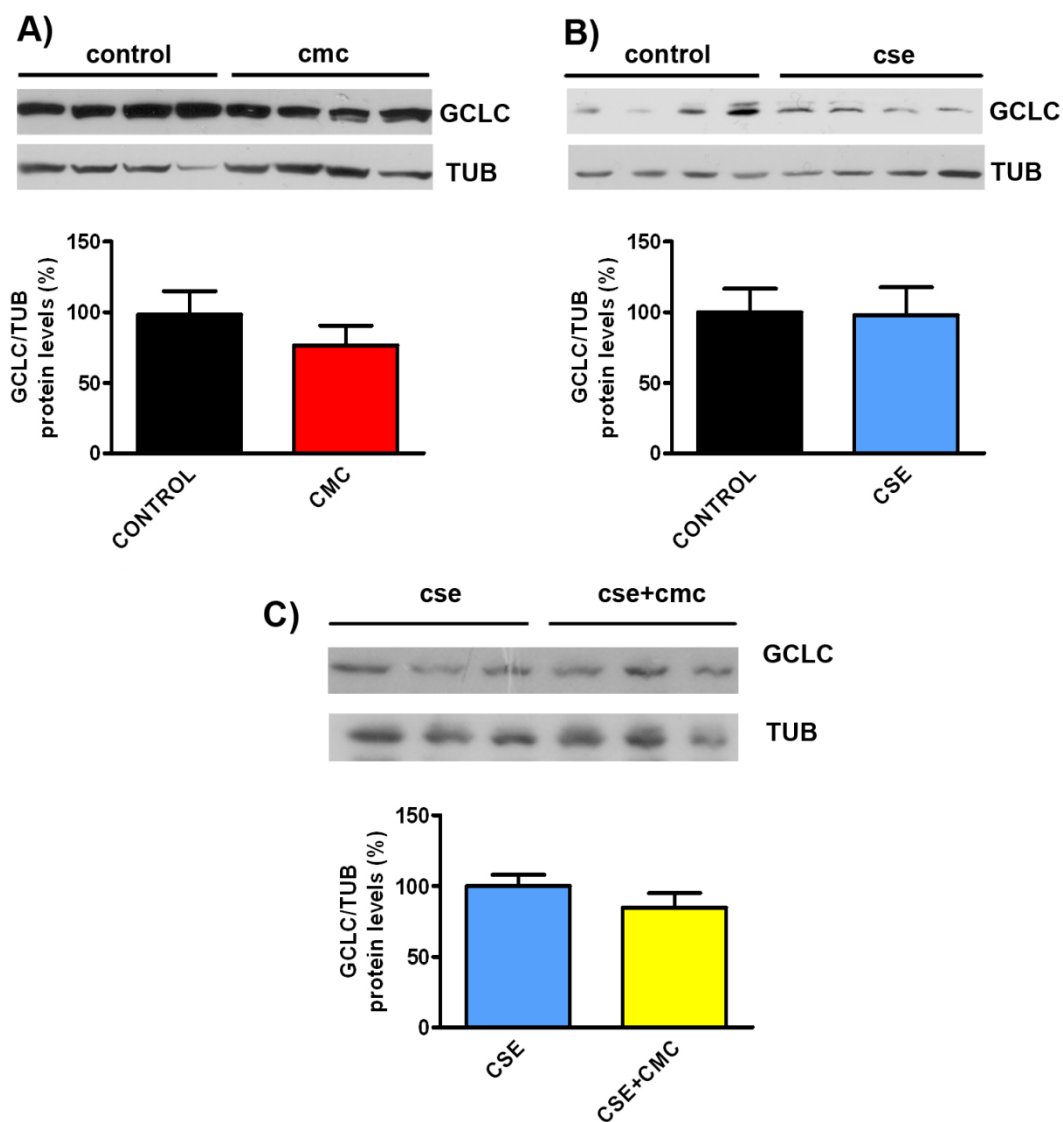


Figura 5.11 – Effetto del CSE sui livelli proteici della subunità catalitica (GCLC) della γ -glutamyl cistein sintetasi nelle cellule 16 HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo), S – CMC - Lys 100 μ M (CMC), CSE 5% e CSE 5%+S - CMC - Lys (CSE + CMC) per 3 ore.

A, B, C) Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GCLC (GCLC), nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-tubulina (TUB) usato come controllo. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica del rapporto tra le intensità di banda della GCLC e della tubulina ($OD\ GCLC/OD\ TUB$) A) controllo: n=16, CMC: n=16; B) controllo: n=12, CSE: n=12; C) CSE: n=9, CSE+CMC: n=8.

Non si riscontrano differenze significative nella densità ottica tra trattamento e controllo (t-test).

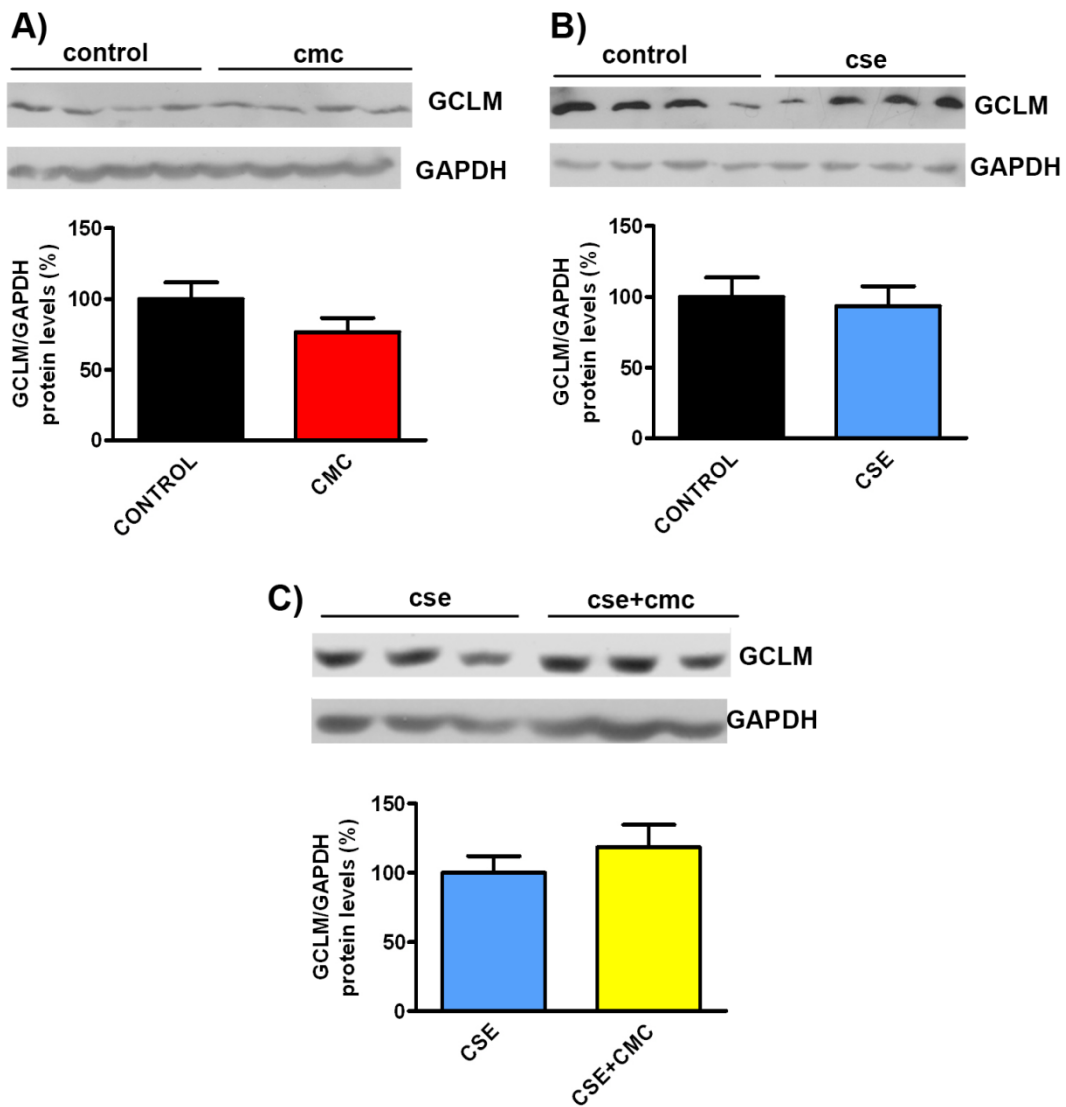


Figura 5.12 – Effetto del CSE sui livelli proteici della subunità modulatoria (GCLM) della γ -glutammina cistein sintetasi nelle cellule 16 HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo), S – CMC - Lys 100 μ M (CMC), CSE 5% e CSE 5%+S - CMC - Lys (CSE + CMC) per 3 ore.

A, B, C) Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GCLM (GCLM), nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GAPDH (GAPDH) usato come controllo. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica del rapporto tra le intensità di banda della GCLC e della tubulina ($OD\ GCLC/OD\ TUB$) A) controllo: n=19, CMC: n=19; B) controllo: n=16, CSE: n=16; C) CSE: n=18; CSE+CMC: n=17.

Non si riscontrano differenze significative nella densità ottica tra trattamento e controllo (t-test).

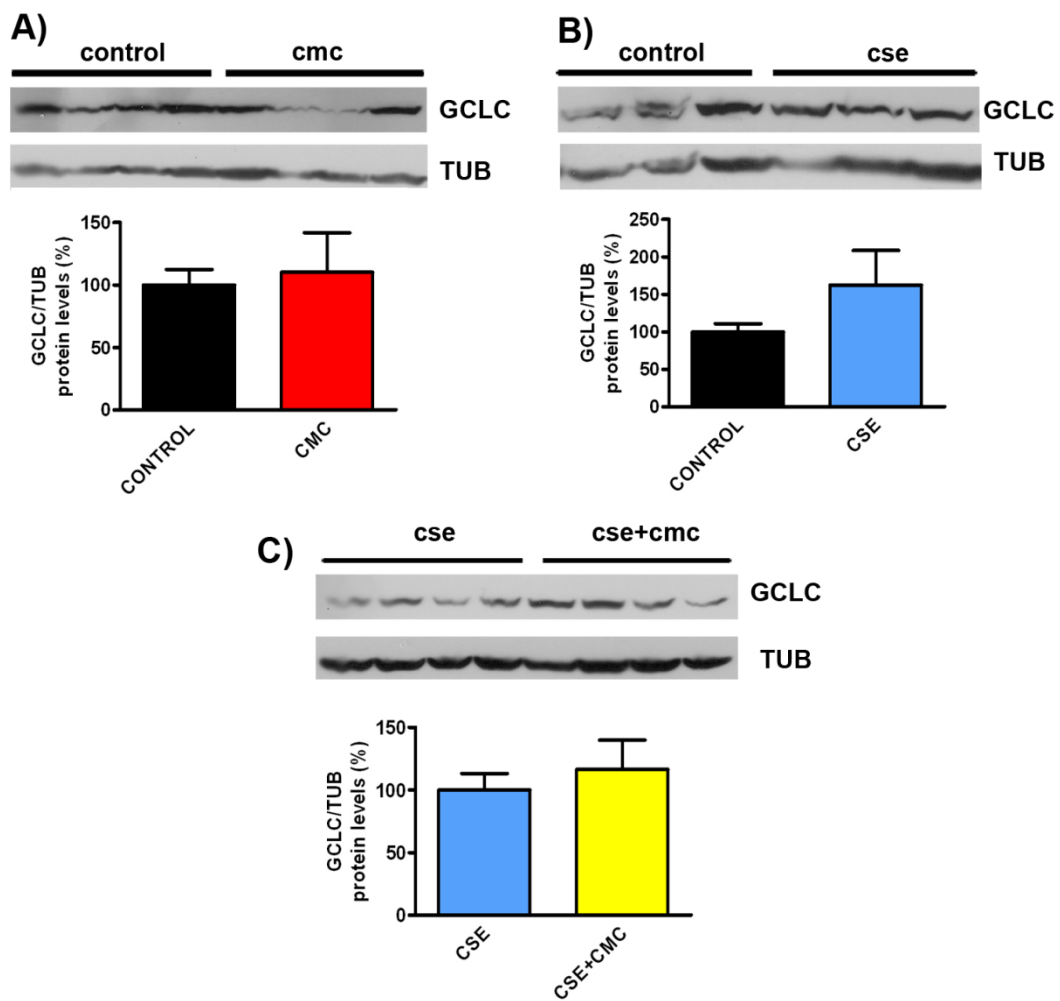


Figura 5.13 – Effetto del CSE sui livelli proteici della subunità catalitica (GCLC) della γ -glutammina cistein sintetasi nelle cellule 16 HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo), S – CMC - Lys 100 μ M (CMC), CSE 5% e CSE 5%+S - CMC - Lys (CSE + CMC) per 24 ore.

A, B, C) Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GCLC (GCLC), nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-tubulina (TUB) usato come controllo. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica del rapporto tra le intensità di banda della GCLC e della tubulina ($OD\ GCLC/OD\ TUB$) A) controllo: n=11, CMC: n=10; B) controllo: n=12, CSE: n=12; C) CSE: n=8; CSE+CMC: n=8.

** = $p < 0.01$ t-test.

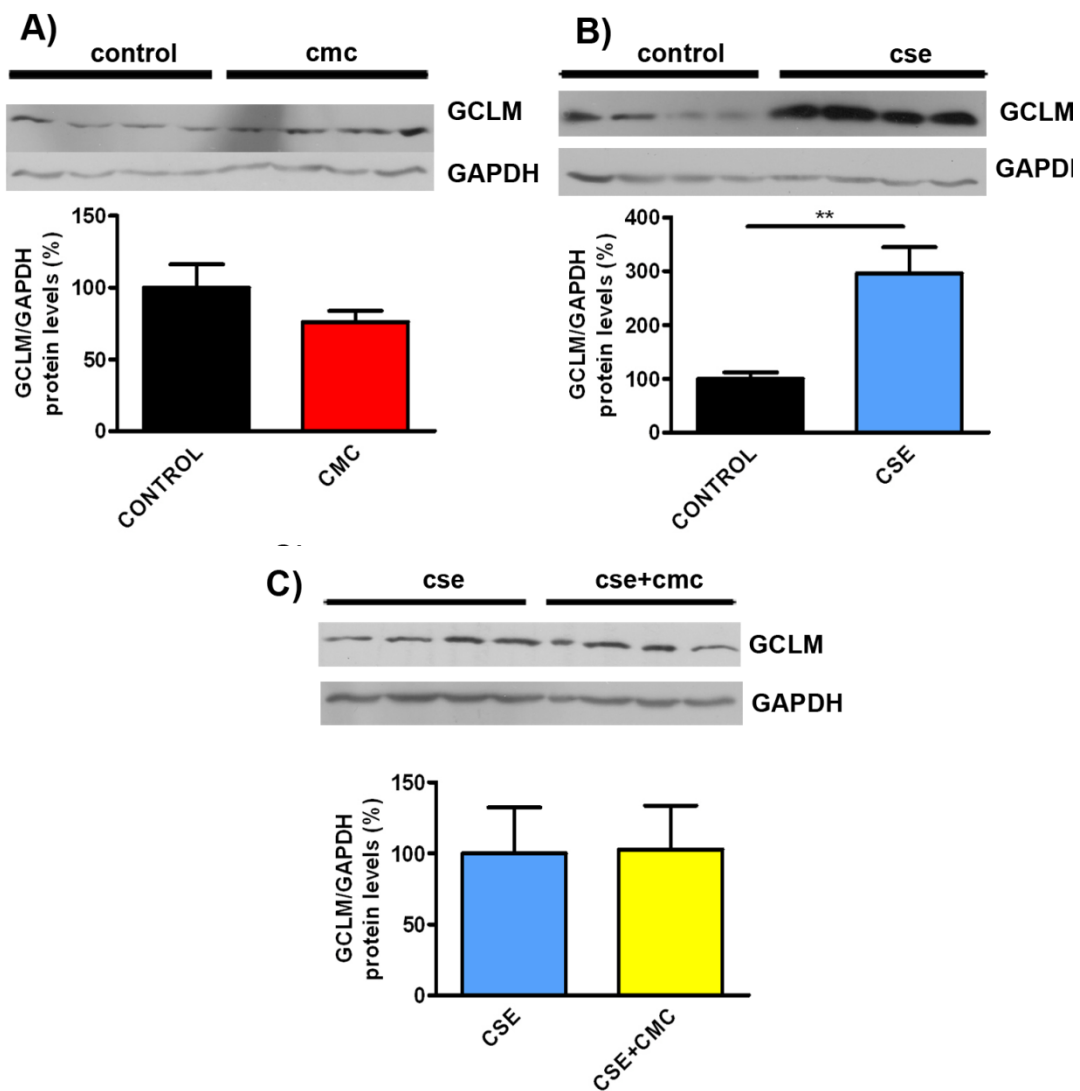


Figura 5.14 – Effetto del CSE sui livelli proteici della subunità modulatoria (GCLM) della γ -glutammina cistein sintetasi nelle cellule 16 HBE esposte a PBS (CONTROL: controllo), S – CMC - Lys 100 μ M (CMC), CSE 5% e CSE 5%+S - CMC - Lys (CSE + CMC) per 24 ore.

A, B, C) Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GCLM (GCLM), nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-GAPDH (GAPDH) usato come controllo. L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica del rapporto tra le intensità di banda della GCLM e della tubulina ($OD\ GCLM/OD\ TUB$) A) controllo: n=8, CMC: n=8; B) controllo: n=8, CSE: n=8; C) CSE: n=4; CSE+CMC: n=4.

Non si riscontrano differenze significative nella densità ottica tra trattamento e controllo (t-test).

A livello dell'espressione delle proteine non abbiamo osservato nessuna variazione significativa delle subunità della GCS dopo 3 ore di esposizione al CSE [Figura 5.11 e 5.12], ma al contrario dopo 24 ore di esposizione i livelli di espressione della GCLM sono significativamente aumentati rispetto al controllo ($p < 0,01$) [Figura 5.14], e i

livelli di espressione della GCLC mostrano un leggero, anche se non significativo, incremento.

I trattamenti con la S-CMC-Lys sia a breve che a lungo termine non mostrano differenze significative tra controllo e trattamenti.

5.5 Effetti del CSE sull'attività dell'enzima Glutazione Perossidasi

La Glutazione perossidasi 3 (GPx3) è un'isoforma extracellulare attiva e, essendo secreta nel liquido di rivestimento epiteliale (ELF) svolge un ruolo primario nella protezione delle vie aeree (Comhair et al., 2001).

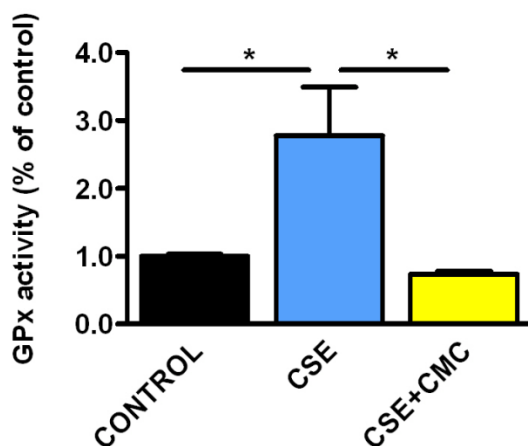


Figura 5.15 – Attività dell'enzima Glutazione Perossidasi nelle cellule 16-HBE in seguito a trattamento per 24 ore con PBS (control), 5% CSE (CSE) e 5% CSE+100 μ M S-CMC-Lys (CSE+CMC).

I valori sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

* = $p < 0.05$; ** = $P < 0.01$ con Anova test (post hoc test di Dunnet) usando CSE come categoria di riferimento.

L'attività della GPx nel terreno cellulare [Figura 5.15], misurata dopo un'esposizione di 24 ore al CSE, aumenta significativamente (controllo: $1,00 \pm 0,33\%$ $n=3$; CSE 5%: $2,77 \pm 0,7\%$ $n=3$ $p < 0,05$), mentre il trattamento con S-CMC-Lys riduce significativamente l'attività enzimatica della GPx riportandola al valore di controllo (CSE 5%: $2,77 \pm 0,7\%$ $n=3$, CSE+S-CMC-Lys $0,74 \pm 0,04\%$ $n=3$).

Tale risultato riflette i cambiamenti nell'espressione dell'mRNA di questa isoforma descritti dai dati delle RT-PCR, l'attività enzimatica rappresenta infatti una misura dell'accumulo della GPx secreta nel terreno di coltura cellulare nel corso delle 24 ore.

6. DISCUSSIONE

Il fumo di sigaretta contiene alti livelli di sostanze tossiche e cancerogene e specie reattive (Pryor et al., 1993) e può indurre la produzione di ossidanti cellulari (Pryor et al., 1998), con conseguenze paragonabili a quelle presenti in alcune patologie come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) o altre infiammazioni acute o croniche delle vie respiratorie, che portano ad una riduzione del contenuto di GSH nel fluido extracellulare, conseguente allo stress ossidativo determinato dallo sviluppo della risposta infiammatoria.

Il termine stress ossidativo identifica una modificazione del normale equilibrio intracellulare esistente tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente dalle cellule durante i processi metabolici, e dell'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti, tra cui quello del GSH. Quando le sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevalgono e/o le sostanze antiossidanti si riducono, si instaura una condizione di stress ossidativo.

Un ruolo fondamentale nello stress ossidativo è svolto dal glutatione, uno dei più importanti agenti antiossidanti presenti nel citoplasma delle cellule e nel fluido che ricopre le vie aeree superiori.

Studi precedenti hanno dimostrato che la secrezione di glutatione viene stimolata dalla carbocisteina sale monoidrato di lisina (S-CMC-Lys) un farmaco già utilizzato come mucoregolatore nelle affezioni delle vie aeree superiori (Garavaglia e t al., 2008). Tale dato è stato il nostro punto di partenza per valutare se tale sostanza potesse svolgere un ruolo protettivo nei confronti dei danni ossidativi indotti da fumo di sigaretta.

6.1 Effetti del CSE sulla vitalità cellulare

Poiché è noto che lo stress ossidativo influenza la vitalità e la proliferazione cellulare (Matès et al., 2012; Jaeschke et al., 2012), abbiamo inizialmente valutato questi due aspetti nelle cellule 16-HBE, la linea cellulare di epitelio respiratorio umano che abbiamo utilizzato come modello sperimentale, in seguito all'esposizione con il fumo di sigaretta (CSE).

Il CSE (cigarette smoke extract) è ampiamente accettato come sistema modello per studiare in vitro gli effetti in vivo del fumo di sigaretta (Kode et al., 2008; Orasz et al., 2007) e contiene la maggior parte dei prodotti chimici inalati dai fumatori (Shapiro et al., 2004).

I nostri risultati dimostrano che il fumo di sigaretta (CSE) aumenta la mortalità cellulare in un modo dose e tempo-dipendente. I saggi con l' MTT, hanno permesso di dimostrare inoltre che la proliferazione cellulare è influenzata dal CSE solo in seguito ad un'esposizione prolungata (24 ore) e in un modo dose-dipendente.

L'aumento della mortalità cellulare inseguito all'esposizione con CSE non è dovuto ad un processo apoptotico, in accordo con i risultati presentati da Pace et al. (Pace et al., 2013) nello stesso tipo cellulare, dove è stato escluso anche un effetto necrotico. Attualmente l'esatto meccanismo con cui il fumo di sigaretta provoca la perdita dello strato epiteliale non è ancora chiarito. In alcuni studi sono state escluse sia l'apoptosi che la necrosi (Pace et al., 2013; Liu et al. 2005), mentre in altri lavori sono state riportate apoptosi (Hoshino et al., 2001) necrosi (Wickenden et al., 2003) e senescenza, uno stato di arresto irreversibile della crescita (Tsuji et al., 2004).

La mortalità osservata nelle cellule 16-HBE dopo esposizione al CSE, osservato anche in altri tipi cellulari (Mai et al., 2012), potrebbe essere dovuta ad una diversa forma di morte cellulare, ad esempio una morte cellulare autofagica, come quella riportata nelle cellule epiteliali delle vie aeree (Zhu et al., 2013), le cui caratteristiche morfologiche e biomediche sono diverse dagli altri pathway di morte cellulare (Jyothula et al., 2013).

6.2 Effetti del CSE sul contenuto intracellulare di Glutazione ridotto (GSH) e sui livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Il glutatione è presente in cellula in due forme: il glutatione ridotto (GSH) con azione antiossidante e il glutatione ossidato (GSSH) presente solo in minima quantità.

Variazioni del rapporto tra la forma ridotta e ossidata (GSH/GSSG) possono influenzare una vasta gamma di risposte fisiologiche.

Il ruolo del GSH è particolarmente importante nel polmone, che è costantemente esposto a ossidanti metabolici endogeni, nonché a sostanze ossidative inquinanti presenti nell'aria: ozono, biossido di azoto, gas di scarico, fumo di sigaretta, ecc. (MacNee et al., 1996).

Per tale motivo sono stati condotti esperimenti fluorimetrici con lo scopo di determinare il contenuto intracellulare di GSH e l'accumulo di ROS in seguito a stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta.

L'esposizione delle cellule 16-HBE al CSE causa una significativa diminuzione dei livelli intracellulari di GSH in seguito ad un trattamento breve, effetto che aumenta proporzionalmente alla concentrazione di CSE. Al tempo stesso è stato osservato un aumento intracellulare di ROS dopo trattamento con CSE, suggerendo che il CSE provoca uno stress ossidativo alla cellula, che è contrastato dal sistema GSH/GSSG.

Dopo 24 ore di esposizione abbiamo invece osservato che il CSE, anche ad alte concentrazioni, non ha effetti significativi sui livelli intracellulari di GSH. Questo risultato è in accordo con risultati riportati anche da altri che mostrano che i livelli di glutatione totale intracellulari in questo tipo cellulare non risentono dell'effetto del CSE in seguito ad un trattamento di 18 ore (Pace et al., 2013).

Questo fenomeno, che è stato osservato anche in altre cellule epiteliali delle vie aeree (Rahman et al., 1996a, Rahman et al., 1996B, Kariya et al., 2008), potrebbe essere spiegato come una risposta adattativa che la cellula mette in atto in seguito ad una esposizione cronica al CSE. In alcuni casi è stato addirittura riportata una sovrapproduzione di GSH nel polmone che causa un aumento della concentrazione

di GSH anche nel liquido di rivestimento epiteliale (ELF), in seguito ad un'esposizione prolungata al CSE (Gould et al., 2012; Gould et al., 2011).

Poiché studi precedenti in una diversa linea cellulare di epitelio respiratorio (WI26-VA4) avevano dimostrato che la S-CMC-Lys aumenta i livelli intracellulari di GSH e limita l'aumento intracellulare dei ROS dopo l'esposizione ossidante (Garavaglia et al., 2008), abbiamo voluto valutare anche nel nostro modello sperimentale l'efficacia di questo farmaco sul contenuto di GSH e sulla sua capacità di limitare il danno ossidativo in seguito al trattamento con CSE.

Come già dimostrato per le cellule WI26-VA4 (Garavaglia et al., 2008), la S-CMC-Lys è in grado di potenziare il contenuto di GSH intracellulare nelle cellule 16-HBE, un effetto che probabilmente è legato alla sua attività di donatore di cisteine.

La sintesi di GSH è infatti regolata da due fattori principali: la quantità di L-cisteina (che funge da substrato) e i livelli di γ -glutammina-cistein-sintetasi (GCS) presente in cellula, enzima che catalizza la trasformazione della cisteina in glutatione.

Il co-trattamento per tempi brevi con S-CMC-Lys e CSE è in grado di ridurre la caduta di GSH indotta dal CSE in presenza di basse concentrazioni di CSE (CSE2,5% 3 ore di esposizione).

Al contrario, dopo una breve esposizione con il CSE al 5%, apparentemente la S-CMC-Lys non è più in grado di prevenire la caduta di GSH indotta dal CSE. Tuttavia la S-CMC-Lys si è rivelata comunque in grado di riportare i livelli intracellulari di ROS ad un valore non significativamente differente dal controllo, in accordo con quanto già osservato in studi precedenti anche in seguito ad un'esposizione prolungata al 10 % di CSE (Pace et al., 2013).

In questa condizione di stress indotta da alte concentrazioni di CSE, che ha un forte impatto sui livelli di GSH, è probabile che il GSH intracellulare, la cui produzione è stimolata dalla S-CMC-Lys, venga immediatamente utilizzato per eliminare i ROS, con una conseguente diminuzione dello stress ossidativo per la cellula senza che si registri un aumento visibile nei livelli di GSH. Inoltre, è possibile che la S-CMC-Lys, analogamente al composto analogo N-Acetylcisteina (NAC), possa avere un effetto

diretto sui ROS, interagendo con il suo gruppo tiolico con i gruppi elettrofili dei ROS (Sarir et al., 2009), contribuendo ad abbassarne il livello delle specie reattive.

E' interessante notare come in caso di un'esposizione prolungata al CSE 5%, una condizione in cui le cellule hanno già ripristinato i livelli di GSH intracellulare, la presenza della S-CMC-Lys era in grado di portare il GSH a valori ancora più alti rispetto alla condizione di controllo, supportando ulteriormente l'ipotesi che essa possa funzionare da donatore di cisteine e, in accordo con ciò, di diminuire significativamente i livelli di ROS.

6.3 Effetti del CSE sugli enzimi coinvolti nella sintesi del Glutatione

A causa della sua importanza nella regolazione dello stato redox cellulare e, di conseguenza, nelle vie di segnale regolate dagli stati redox, il metabolismo del GSH è strettamente regolato nelle cellule.

Il contenuto intracellulare di GSH dipende dall'equilibrio tra il suo impiego e la sua sintesi.

A questo scopo abbiamo valutato attraverso esperimenti di Real-Time PCR e Western Blot, i livelli di espressione di diversi enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare di GSH.

L'eliminazione del GSH avviene in differenti modi: a) coniugazione con composti elettrofili non enzimatici se l'elettrofilo è molto reattivo, o, più spesso, mediante l'azione della glutatione S-transferasi (GST) (Strange et al., 2001) b) interazione diretta con il radicale ($R \cdot$) che permette, insieme con la superossido dismutasi (SOD), di prevenire un danno ossidativo alle cellule (Winterbourn et al., 1993) c) reazione con H_2O_2 o altri idroperossidi lipidici mediata famiglia di enzimi della glutatione perossidasi (GPxs) (Brigelius-Flohè et al., 2013).

Abbiamo quindi valutato l'espressione delle diverse isoforme della GPx perché, come già stato dimostrato in altri studi, il CSE induce principalmente nelle cellule epiteliali delle vie aeree un aumento di H_2O_2 (Downs et al., 2011).

La glutatione perossidasi (GPx) è l'enzima che catalizza la riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno a spese del glutatione ridotto.

Finora sono state identificate otto isoforme della famiglia della glutatione perossidasi (GPx-1 – GPx-8), quattro di queste (GPx-1 - 4) sembrano essere espresse e funzionali nelle cellule delle vie aeree dove sembrano avere una funzione antiossidante in diversi compartimenti cellulari (Brigelius-Flohè et al., 2013).

La GPx-1 è ubiquitariamente espressa nel citosol e nei mitocondri, la GPx-2, isolata nell'epitelio intestinale, è espressa anche nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie dove può proteggere da infiammazione indotta da allergene (Dittrich et al., 2010). La GPx-3 è invece un'isoforma extracellulare attiva ed, essendo secreta nel liquido di rivestimento epiteliale (ELF) svolge un ruolo primario nella protezione delle vie aeree (Comhair et al., 2001). Abbiamo escluso dalla nostra valutazione la GPx-4 perché essa a differenza delle altre isoforme prese in considerazione appare per lo più coinvolta nella protezione delle membrane dai danni ossidativi e nella prevenzione di danni cellulari causati da lipidi idroperossidi.

Le isoforme della GPx sono gli enzimi coinvolti nel metabolismo del glutatione più studiati; tuttavia rimane ancora poco chiaro il meccanismo con il quale il fumo di sigaretta influisca sull'espressione delle GPx.

Nei fumatori, la risposta antiossidante delle cellule alveolari può variare con l'abitudine al fumo, la storia e la patologia del polmone di ciascun individuo (Thorley et al., 2007).

Nel caso del nostro modello cellulare, l'mRNA della GPx-2 e 3 era significativamente up-regolato in seguito a 3 e 24 ore di esposizione al CSE, mentre l'mRNA della GPx-1, che sembrava non essere influenzato dopo 3 ore, diminuiva significativamente dopo un'esposizione prolungata.

Una riduzione dell'espressione della GPx1 dopo 24 ore di esposizione al CSE è stata osservata anche in altre linee cellulari (Russo et al., 2011) nelle quali è stato ipotizzato che il sovraccarico dei radicali liberi indotto dal CSE potrebbe essere responsabile dell'inibizione dell'espressione di enzimi antiossidanti e del danno cellulare.

E' comunque interessante sottolineare come nel nostro modello sperimentale una prolungata esposizione al CSE apparentemente è in grado di alterare il pattern di espressione delle diverse isoforme, suggerendo così ruoli leggermente diversi, nonostante una simile localizzazione intracellulare, come nel caso di GPx-1 e GPx-2. In realtà un differente effetto del CSE sulle diverse GPx sè già stato osservato anche in altri studi eseguiti sui fumatori (Rahman et al., 1999; Kariya et al., 2008), dove la GPx-2 e la GPx-3 sembrano essere il bersaglio principale, analogamente a quanto emerge dai nostri dati. Nel caso della GPx3 invece, l'aumento dell'espressione e della secrezione nel polmone potrebbe aiutare a contrastare il carico di ROS nel liquido di rivestimento. (Comhair et al., 2001; Hackett et al., 2003).

Il co-trattamento con la S-CMC-Lys, che è inefficace nel contrastare gli effetti del CSE su tutte le tre isoforme analizzate dopo 24 ore di esposizione, induce invece una riduzione significativa dell'espressione dell'mRNA della GPx-3 nelle prime 3 ore di esposizione al CSE.

Questo effetto sull'espressione della GPx-3, (che rappresenta la principale isoforma di secrezione) in accordo con il risultato ottenuto nei saggi di valutazione di attività, che hanno dimostrato una ridotta secrezione dell'enzima nel mezzo cellulare. Questa è probabilmente una conseguenza del ridotto stress ossidativo a cui sono sottoposte le cellule nella fase iniziale del trattamento che potrebbe diminuire l'intensità della risposta adattativa della cellula.

In seguito ad una condizione di stress prolungato (24ore), quando la perdita iniziale di GSH è recuperata e la tossicità cellulare provocata dal CSE diventa significativa, la S-CMC-Lys non è più in grado di influenzare la risposta indotta dal CSE sull'espressione delle GPx.

Un simile effetto S-CMC-Lys è stato osservato anche nel caso di altri enzimi fondamentali nella produzione di GSH (GCL e GR).

La γ -glutamilmcisteinsintetasi (GCS) è l'enzima chiave del metabolismo del glutatione, esso infatti catalizza la sintesi *ex novo* del glutatione. La GCS è una proteina composta da una subunità catalitica e una modulatoria. La subunità catalitica (GCLC) è la più grande delle due subunità e contiene il sito attivo

responsabile del legame ATP-dipendente tra cisteina e glutammato, la subunità modulatoria è la più piccola e aumenta l'efficienza catalitica di GCLC. (Franklin et al., 2008).

La glutatione reduttasi (GR) è invece l'enzima che permette il riciclo del glutatione ossidato in glutatione ridotto.

L'mRNA della glutatione reduttasi è aumentato sia dopo 3 che 24 ore di esposizione al CSE, indicando che anche questo enzima è coinvolto nella risposta cellulare allo stress ossidativo indotta del CSE.

Come osservato per le GPx, la S-CMC-Lys contrasta questo effetto nelle prime ore di esposizione, ma l'effetto di un'esposizione a lungo termine con CSE non è risultato influenzato dal farmaco.

Analoghe considerazioni possono essere fatte nel caso delle due subunità della GCS (catalitica e modulatoria).

Anche in questo caso abbiamo osservato un incremento dell'mRNA sia della GCLC che della GCLM dopo 3 o 24 ore di esposizione al CSE, questo effetto viene contrastato dalla S-CMC-Lys solo dopo una breve esposizione al CSE e non dopo un'esposizione prolungata.

L'effetto del CSE risulta più marcato nel caso della subunità modulatoria, suggerendo che questa potrebbe essere l'obiettivo principale della regolazione dell'attività enzimatica.

A livello di proteine, non abbiamo potuto osservare una variazione significativa di espressione sia della GCLC che della GCLM in seguito ad una breve esposizione con CSE, sia in presenza che in assenza di S-CMC-Lys.

La discrepanza tra l'effetto del CSE a livello di mRNA e a livello di espressione della proteina potrebbe essere spiegata dal fatto che la correlazione tra proteine e mRNA spesso non è univoca, soprattutto nel caso di geni coinvolti nella regolazione di processi biologici (Guo et al., 2008).

Solo dopo 24 ore di esposizione il CSE tende ad aumentare l'espressione della GCLC (anche se l'aumento non risulta significativo) e aumenta invece significativamente i livelli di espressione della GCLM. Tale dato conferma che la subunità modulatoria,

causando una aumentata attività enzimatica della GCS, potrebbe essere il principale responsabile del recupero iniziale dei livelli di GSH.

Un'upregolazione dell'espressione della GCS in seguito a stress ossidativo è stata riportata anche in altri studi ed è stata correlata alla maggior produzione di citochine infiammatorie, come TNF- α , che inducono la traslocazione di fattori di trascrizione, come Nrf - 2, NF - κ B e c- Jun, nel nucleo (Kode et al., 2008; Yang et al., 2005).

Per quanto riguarda un possibile utilizzo della CMC da un punto di vista terapeutico, i dati suggeriscono che oltre alla già nota azione come farmaco mucolitico, S-CMC-Lys può quindi in qualche misura contrastare il carico ossidativo indotto dal CSE, e potrebbe quindi essere utile per il trattamento di patologie associate al fumo di sigaretta. In tale ottica sarebbe interessante valutarne gli effetti su modelli animali e sull'uomo.

BIBLIOGRAFIA

Asti C, Melillo G, Caselli GF, Daffonchio L, Hernandez A, Clavenna G, Omini C (1995). Effectiveness of carbocysteine lysine salt monohydrate on models of airway inflammation and hyperresponsiveness. *Pharmacol Res*, 31(6):387-92.

Avti PK, Kumar S, Pathak CM, Vaiphei K, Khanduja KL (2006). Smokeless tobacco impairs the antioxidant defense in liver, lung, and kidney of rats. *Toxicol Sci*, 89:547-553.

Balasubramanian VP, Varkey B (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: Effects beyond the lungs. *Curr Opin Pulm Med*, 12:106-112.

Barnes PJ (2010). Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs. *PLoS medicine*, 7 (3), pp. e1000220.

Bentley AR, Emrani P, Cassano PA (2008). Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of copd: A systematic review. *Thorax*, 63:956-961.

Bertram KM, Baglole CJ, Phipps RP, Libby RT (2009). Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: Implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297:C1200-1210.

Biswas SK, Rahman I: Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation (2009). The role of glutathione. *Mol Aspects Med*, 30:60-76.

Braga PC, Allegra L, Rampoldi C, Ornaghi A, Beghi G (1990). Longlasting effects on rheology and clearance of bronchial mucus after short-term administration of high doses of carbocysteine-lysine to patients with chronic bronchitis. *Respiration*, 57:353-358.

Brigelius-Flohé R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10):951-65.

Brigelius-Flohé R, Maiorino M (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*; 1830:3289-3303.

Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG (1987). Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol*, 63:152-157.

Chakravarthy S, Bulleid NJ (2004) Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J Biol Chem*, 279: 39872-39879.

Chung TK, Funk MA, Baker DH (1990). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate as a cysteine precursor: efficacy for growth and hepatic glutathione synthesis in chicks and rats. *J Nutri*, 120:158-165.

Comhair SA, Bhatena PR, Farver C, Thunnissen FB, Erzurum SC (2001). Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: Evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J*, 15:70-78.

Corti A., De Tata V., Pompella A. (2009). Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana. *Ligand Assay*, 14: 9-16.

Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*, 1763:747-58.

Dittrich AM, Meyer HA, Krokowski M, Quarcoo D, Ahrens B, Kube SM, Witzernath M, Esworthy RS, Chu FF, Hamelmann E (2010). Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. *Eur Respir J*, 35:1148-1154.

Downs CA, Montgomery DW, Merkle CJ (2011). Age-related differences in cigarette smoke extract-induced h₂O₂ production by lung endothelial cells. *Microvasc Res*, 82:311-317.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, 267(16):4912-6

Duong C, Seow HJ, Bozinovski S, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R (2010). Glutathione peroxidase-1 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299(3):L425-33.

Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med*, 30:86-98.

Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ (1999). Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis air way epithelia. *Am J Physiol*, 277: L113-L118.

Garavaglia ML, Bononi E, Dossena S, Mondini A, Bazzini C, Lanata L, Balsamo R, Bagnasco M, Conese M, Bottà G, Paulmichl M, Meyer G (2008). S-cmc-lys

protective effects on human respiratory cells during oxidative stress. *Cell Physiol Biochem*, 22:455-464.

Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A (1998). Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol*, 152:269-278.

Gould NS, Min E, Gauthier S, Martin RJ, Day BJ (2011). Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir Res*, 12:133.

Gould NS, Min E, Martin RJ, Day BJ (2012). Cftr is the primary known apical glutathione transporter involved in cigarette smoke-induced adaptive responses in the lung. *Free Radic Biol Med*, 52:1201-1206.

Griffith OW (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 27:922-935.

Griffith OW and Meister A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 82:4668-4672.

Guizzardi F, Rodighiero S, Binelli A, Saino S, Bononi E, Dossena S, Garavaglia ML, Bazzini C, Bottà G, Conese M, Daffonchio L, Novellini R, Paulmichl M, Meyer G (2006). S-cmc-lys-dependent stimulation of electrogenic glutathione secretion by human respiratory epithelium. *J Mol Med (Berl)*, 84:97-107.

Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S, Deng H (2008). How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*; 40:426-436.

Hackett NR, Heguy A, Harvey BG, O'Connor TP, Luettich K, Flieder DB, Kaplan R, Crystal RG (2003). Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Bio*, 29:331-343.

Hausmann HJ: Use of hazard indices for a theoretical evaluation of cigarette smoke composition. *Chem Res Toxicol*, 25:794-810.

Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J Biol Chem*, 268:11380-11388

Hooper C, Calvert J (2008). The role for S-carboxymethylcysteine (carbocysteine) in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 3(4):659-69.

Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T (2001). Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type ii cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281:L509-516.

Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, 44:88-106.

Jeong YY, Park HJ, Cho YW, Kim EJ, Kim GT, Mun YJ, Lee JD, Shin JH, Sung NJ, Kang D, Han J(2012). Aged red garlic extract reduces cigarette smoke extract-induced cell death in human bronchial smooth muscle cells by increasing intracellular glutathione levels. *Phytother Res*, 26:18-25.

Jyothula SS, Eissa NT (2013). Autophagy and role in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 19:30-35.

Kariya C, Chu HW, Huang J, Leitner H, Martin RJ, Day BJ (2008) Mycoplasma pneumoniae infection and environmental tobacco smoke inhibit lung glutathione adaptive responses and increase oxidative stress. *Infect Immun*, 76:4455-4462.

Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294:L478-488.

Lee IT, Yang CM (2012). Role of nadph oxidase/ros in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol*, 84:581-590.

Liu X, Conner H, Kobayashi T, Kim H, Wen F, Abe S, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Bitterman P, Rennard SI (2005). Cigarette smoke extract induces dna damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33:121-129.

Lu SC (2000). Regulation of glutathione syntesis. *Curr Top Cell Regul*, 36:95-116

Macciò A, Madeddu C Panzone F and Mantovani G. (2009) Carbocysteine: clinical experience and new perspectives in the treatment of chronic inflammatory diseases. *Expert Opin. Pharmacother*, 10(4):693-703

MacNee W, Morrison D, Rahman I, Li XY, Donaldson K (1996). Cigarette smoke and ozone-induced epithelial perturbation in vivo and in vitro. The role of glutathione. *Chest*, 109:39S.

Mai Y, Higashi T, Terada K, Hatate C, Nepal P, Horiguchi M, Harada T, Miwa S, Horinouchi T (2012). Nicotine- and tar-free cigarette smoke extract induces cell injury via intracellular Ca^{2+} -dependent subtype-specific protein kinase C activation. *J Pharmacol Sci*, 120:310-314.

Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2012). Oxidative stress in apoptosis and cancer: An update. *Arch Toxicol*, 86:1649-1665.

Mohammad Yousser, Rafea Shaaban, Bassam Abou Al-Zahab, Nikolai Khaltaev, Jean Bousquet, and Basim Dubaybo (2013). Impact of active and passive smoking as risk factors for asthma and COPD in women presenting to primary care in Syria: first report by the WHO-GARD survey group. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 8: 473–482.

Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, 15:351-69

Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z (2007). Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: Role of nad(p)h oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292:H130-139.

Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S, Cipollina C, Gerbino S, Cigna D, Caputo V, Balsamo R, Lanata L, Gjomarkaj M (2013). Comparative cytoprotective effects of carbocysteine and fluticasone propionate in cigarette smoke extract-stimulated bronchial epithelial cells. *Cell Stress Chaperones*

Pasciu V., Posadino AM., Cossu A., Sanna B., Tadolini B., Gaspa L., Marchisio A., Dessole S., Capobianco G., Pintus G. (2010). Akt downregulation by flavin oxidase-

induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants. *Toxicol Sci.* 114(1):101-12.

Pryor WA (1997). Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 4:875-882.

Pryor WA, Stone K (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate. *Ann N Y Acad Sci*, 686:12-27; discussion 27-18.

Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermúdez E (1998). Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: Fractions that contain the tar radical cause dna damage. *Chem Res Toxicol*, 11:441-448.

Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, Macnee W, Smith CA (1996 a). Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 229:832-837.

Rahman I, MacNee W (1999) Lung glutathione and oxidative stress: Implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol*, 277:L1067-1088.

Rahman I, MacNee W (2012) Antioxidant pharmacological therapies for COPD. *Curr Opin Pharmacol*, 12:256–265

Rahman I, Smith CA, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W (1996 b). Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with ap-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett*, 396:21-25.

Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, Bezerra FS, Pinho RA, Valenca SS, Porto LC (2010). Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit*, 16:BR218-226.

Russo M, Cocco S, Secondo A, Adornetto A, Bassi A, Nunziata A, Polichetti G, De Felice B, Damiano S, Serù R, Mondola P, Di Renzo G (2011). Cigarette smoke condensate causes a decrease of the gene expression of cu-zn superoxide dismutase, mn superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and free radical-induced cell injury in sh-sy5y human neuroblastoma cells. *Neurotox Res*, 19:49-54.

Saitoh M, Nishitih H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK). *EMBO J*, 17:2596-2606.

Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, Nijkamp FP, Folkerts G (2009). Cigarette smoke regulates the expression of tlr4 and il-8 production by human macrophages. *J Inflamm (Lond)*, 6:12.

Shapiro SD (2004). Smoke gets in your cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 31:481-482.

Sidle EH, Casselman R, Smith GN (2007). Effect of cigarette smoke on placental antioxidant enzyme expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293:R754-758.

Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohé R, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S (2006). Glutathione Peroxidase 2, the Major Cigarette Smoke-Inducible Isoform of GPX in Lungs, Is Regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(6):639-50.

Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH (1996). Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxic Appl Pharmacol*, 140: 1-12

Soh N (2006). Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem*, 386(3): 532–543.

Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, Mohammad HA, Butterfield DA, St. Clair DK (2008). A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*, 153: 120–130.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482:21-26.

Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER (1998). Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19:819-825.

Thorley AJ, Tetley TD (2007). Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2:409-428.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57:145-155

Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31:643-649.

Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W (2003). Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:562-570.

Winterbourn CC (1993). Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic Biol Med*, 14:85-90.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134:489-492.

Yang H, Magilnick N, Ou X, Lu SC (2005). Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat gsh synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1. *Biochem J*, 391:399-408.

Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Yamada M, Asada M, Yoshida M, Suzuki T, Nishimura H, Sasaki H (2006). Carbocysteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Eur Respir J*, 28(1):51-8.

Zhu L, Barret EC, Xu Y, Liu Z, Manoharan A, Chen Y (2013). Regulation of cigarette smoke (cs)-induced autophagy by nrf2. *PLoS One*, 8:e55695.