

MILANO
CENTRO CONGRESSI ATAHOTEL EXECUTIVE
Via Don L. Sturzo, 45 – MILANO
Tel. 02/62941

SABATO 2 OTTOBRE 2004
ORE 09.15 – 17.00

**La FONDAZIONE
"M. e C. CANOVA"**
organizza



con il patrocinio della
**FONDAZIONE MONDIALE RICERCA
E PREVENZIONE AIDS**

sotto l'egida dell'**UNESCO**

Regione Lombardia

COMUNE DI MILANO


con il patrocinio dell'
**ORDINE PROVINCIALE dei MEDICI-CHIRURGHI
e degli ODONTOIATRI di MILANO**


programma preliminare


SIMPOSIO SCIENTIFICO
**Stress ossidativo
e medicina
preventiva:
comunicare
con la scienza**


Sabato **2 ottobre 2004**
milano
CENTRO CONGRESSI
ATAHOTEL EXECUTIVE
Via Don L. Sturzo, 45 - Tel. 02.62941
Fax 02.29010238 - www.atahotels.it

■ *Con il patrocinio di*

 **FONDAZIONE MONDIALE RICERCA
E PREVENZIONE AIDS**

 **UNESCO**

 **Regione Lombardia**

 **COMUNE DI MILANO**

con il patrocinio dell'
**ORDINE PROVINCIALE dei MEDICI-CHIRURGHI
e degli ODONTOIATRI di MILANO**

■ *Presidente del Simposio*
L. MONTAGNIER

■ *Invitato d'onore*
U. VERONESI


■ *Comitato scientifico*
P. MANTELLO
V. MARIGLIANO
F. MAROTTA
L. MONTAGNIER

■ *Moderatori*
F. G. ALBERGATI
V. CALABRESE
V. MARIGLIANO
F. MAROTTA
L. PACKER

■ *Segreteria scientifica*
F. MAROTTA
M. E. WEKSLER

■ *Segreteria organizzativa*
FONDAZIONE CANOVA
Tel. e fax 039.6064886
N. verde 800336377
E-mail: fondazionecanova2004@libero.it

SI RINGRAZIANO PER L'AIUTO ORGANIZZATIVO:

 Via Lega Lombarda, 33
20050 Lesmo (MI)
Tel. 039.698501 - Fax 039.6985030
e-mail: info@named-srl.it
www.named.it
www.immunage.it

OSATO
INTERNATIONAL
GIFU-Japan
www.osatofpp.com

SIMPOSIO SCIENTIFICO: STRESS OSSIDATIVO E MEDICINA PREVENTIVA: COMUNICARE CON LA SCIENZA

- 8.30 **Registrazione partecipanti**
- 9.15 **Saluto delle autorità (che patrocinano)**

SINDACO DI MILANO
Dott. G. ALBERTINI
PRESIDENTE REGIONE LOMBARDIA
Dott. R. FORMIGONI

Introduzione del Presidente del Simposio
Prof. L. MONTAGNIER
(Presidente Fondazione Mondiale Ricerca e Prevenzione AIDS)

■ *Lecture magistrali*

- 9.30-9.50 U. VERONESI (I)
(Direttore Scientifico Istituto Europeo di Oncologia - Milano e fondatore della Fondazione U. Veronesi)
La medicina preventiva nella cura del cancro
- 9.50-10.10 L. MONTAGNIER (F)
(Presidente Fondazione Mondiale Ricerca e Prevenzione AIDS)
Ambiente, stress ossidativo e malattie croniche

■ *Lecture*

MODERATORI
V. MARIGLIANO, F. MAROTTA, F. G. ALBERGATI

- 10.10-10.40 L. PACKER (USA)
(Professore di farmacologia molecolare e tossicologia - University of Southern California)
Azione dell'FPP sulle cellule del sistema immunitario
- 10.40-11.00 M.E. WEKSLER (USA)
(Professore di geriatria - Weill Cornell Medical College New York)
Antiossidanti e risposta immunitaria
- 11.00-11.30 P. MANTELLO (F)
(Direttore scientifico Osato Research Institute)
La modulazione delle difese naturali con FPP
- 11.30-11.45 **Coffee break**

■ *Lecture*

MODERATORI
F. G. ALBERGATI, V. CALABRESE, E. OLIVA

- 11.45-12.15 V. MARIGLIANO (I)
(Professore Ordinario di Geriatria, Università di Roma "La Sapienza")
Ruolo del sistema immunitario e dello stress ossidativo nella genesi della demenza
- 12.15-12.45 F. MAROTTA (I)
(Unità di Epato-Gastroenterologia - Ospedale S. Giuseppe Milano)
Nutraceutici in gastroenterologia: l'esperienza dell'FPP in alcune patologie gastrointestinali
- 12.45-13.15 **Discussione**
- 13.15-14.15 **Lunch**

■ *Lecture*

MODERATORI
M. E. WEKSLER, L. PACKER, F. MAROTTA

- 14.15-14.45 L. MONTAGNIER (F)
(Presidente Fondazione Mondiale Ricerca e Prevenzione AIDS)
Terapie complementari nella cura dell'AIDS
- 14.45-15.15 V. CALABRESE (I)
(Biologia molecolare e biochimica, Dipartimento di chimica, Facoltà di Medicina, Università di Catania)
Regolazione Redox della Risposta Cellulare allo Stress nell'Invecchiamento e nei Disturbi Neurodegenerativi: il Ruolo dei Vitageni
- 15.15-15.45 E. RACHMILEWITZ (ISR)
(Capo dipartimento di Ematologia - Wolfson Medical Center Holon, Israele)
Stress ossidativo ed FPP: studio clinico sulla talassemia
- 15.45-16.15 F. G. ALBERGATI (I)
(Direttore Centro di microangiologia e microcircolazione - Policlinico Universitario Monza/Mi)
Ageing e matrice extracellulare: il ruolo dei vasi sanguigni
- 16.15-16.45 **Discussione**
- 17.00 **Chiusura lavori e consegna attestati**

Ambiente, stress ossidativo e malattie croniche

Relatore: Prof. L. Montagnier

ABSTRACT

One central health problem of our times is the increasing burden of chronic diseases in aging people: cancers, cardiovascular, arthritic, neurodegenerative diseases are the source of premature deaths or are crippling the last years of life.

According to a recent study, 35% of the disease burden of European countries is devoted to the care of brain diseases, and the prevalence of Alzheimer disease has increased five times since the last 5 decades. As regards cancers, there is a continuous increase of some cancers not linked to tobacco consumption (breast, prostate) which is not only due to an improvement of diagnostic methods and awareness. Moreover, the incidence of cancers of children is increasing by about 1% each year starting 30 years ago.

While there are many factors involved in this alarming progression (food and pollution, psychological stress, increase exposure to electromagnetic radiations, etc.), there is a common denominator involved in all these diseases and in aging : oxidative stress, leading to immune dysfunctions and deficiencies. Oxidative stress is the result of an unbalance between free radicals (highly reactive oxygen species or ROS, and the antioxidant defences of the organism. An excess of ROS can create profound damages to our lipids, proteins, DNA and carbohydrates.

Although oxidative stress starts in all people from the age of 45-50, it could begin earlier in some individuals, increasing their risks to be hit by one of the life-endangering diseases. This is favoured by the practice of competition sports which also induces an oxidative stress. It is possible, in a rational approach to decrease the risks caused by oxidative stress by an appropriate diagnostic and a personalized treatment.

There are now available new diagnostic tests to measure the various parameters of the oxidative stress, evaluate the abnormal activation of the immune system leading to immune deficiency, identifying infectious factors possibly generating ROS. On the other hand, there are new antioxidants which have very promising results in re-establishing to normal values the blood parameters of oxidative stress.

The likely postulate is that by a personalized treatment with some products of natural origin, we will decrease the incidence of debilitating or lethal diseases not only in aging people, but also in the younger, active population.

Azione dell'FPP sulle cellule del sistema immunitario

Relatore: Prof. L. Packer - University of Southern California, Molecular Pharmacology & Toxicology School of pharmacy, Los Angeles, California.

ABSTRACT

Healthy aging and disease prevention by micronutrients is increasingly a subject of public health interest and biomedical research because aging and chronic diseases have been demonstrated to be largely avoidable by lifestyle changes. Important factors underlying health include preventing oxidative stress, improving antioxidant defense, and enhancing immune system functions. These properties are exhibited by FPP, a fermented Papaya preparation. FPP induces

- antioxidant activity
- A respiratory burst in neutrophils leading to Hydrogen peroxide production
- Nitric oxide and cytokine production in macrophages.

The molecular and cellular mechanisms of FPP action on antioxidant activity and immune system functions is discussed

Antiossidanti e risposta immunitaria

Relatore: Prof. M.E. Weksler - Wright Professor of Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021

ABSTRACT

Gompertz was the first to demonstrate that humans suffer an exponential increase in risk of mortality with age. Harman proposed a free-radical theory of aging as the physiologic basis for the increasing risk of death during aging. Walford suggested that immune senescence underlies the physiological process of aging. It now appears reasonable to suggest that oxidant stress contributes to the age-associated impairment in immune function that contributes to the diseases of aging including infection, atherosclerosis, and Alzheimer's Disease. .

Death of elderly humans following influenza infection contributes importantly to excess mortality during the aging. The excess death rate of elderly infected with influenza is associated with the impaired antibody response of elderly to the influenza virus. Treating patients with the antioxidant Vitamin E can ameliorate the defect in the anti-influenza antibody response. FPP has been shown to reverse impaired lymphocyte function following oxidant stress. A clinical study of the effect of FPP on the antibody response to influenza vaccine in elderly is now being planned.

La modulazione delle difese naturali con FPP

Relatore: Dr. P. Mantello - Director of Osato Research Institute, Paris.

ABSTRACT

Since our first life's minutes we begin until the end a permanent fight against our environment, and this permanent fight is definition of life. For this we are equipped with two main systems: our antioxidant and immune systems and our lifespan depend largely about their status.

Quality of environment, lifestyle, diseases and aging are factors we have to fight.

FPP, a natural fermented papaya preparation is able to support these two systems when

they are insufficient or becoming less and less active. Indeed, FPP by regulation of both immune and antioxidative systems helps the body's defence and could be use as well as protection against free radicals attacks and linked oxidative stress than support immune system. Different uses will be discussed.

Ruolo del sistema immunitario e dello stress ossidativo nella genesi della demenza

Relatore: Prof. V. Marigliano

ABSTRACT

Oggi si sta dedicando sempre maggiore attenzione allo studio ed alla comprensione del processo di invecchiamento. In questo senso, qualsiasi ipotesi casuale dovrebbe essere in grado perché l'organismo va incontro a progressive ed irreversibili modificazioni fisiologiche e perché esiste diversità nelle durata media della vita tra le diverse specie. L'individuazione delle basi biologiche dell'invecchiamento potrebbe inoltre aiutare a comprendere le patologie involutive e degenerative che si possono manifestare in età avanzata a carico di diversi organi e apparati. In questo contesto assumono particolare importanza per la frequenza e per il carico di disabilità che comportano, i processi neurodegenerativi dell'encefalo. L'espressione delle alterazioni e del danno varia da modificazioni modeste delle principali funzioni neurotrasmettitoriali e metaboliche che portano a compromissione della funzionalità neuronale, fino a modificazioni morfologiche micro e macroscopiche della struttura stessa dell'encefalo.

I precisi meccanismi molecolari che stanno alla base di tali processi non sono noti e soprattutto non è nota la loro sequenza temporale, la gerarchia e la soglia tra fisiologia e patologia. Da qui l'incertezza sull'eziopatogenesi dei processi neurodegenerativi che deve essere considerata eterogenea e multifattoriale. Tutto questo ha portato a formulare diverse ipotesi dirette su più fronti di lavoro, non sempre ricomposte in un quadro d'insieme e spesso trasversali a più patologie. La domanda di fondo è rivolta a sapere se i meccanismi di neurodegenerazione che vengono di volta in volta individuati siano specifici per una patologia (malattia di Parkinson, malattia di Alzheimer, forme vascolari) o comuni a più di esse.

Una di queste ipotesi trasversale all'invecchiamento e a più stati morbosi, associa l'accumulo di danno ossidativi con la perdita di funzionalità. Dal punto di vista molecolare l'accumulo di stress ossidativi associato all'età può essere ricondotto a tre diversi fattori: 1) un aumento della velocità con cui vengono prodotti metabolici reattivi dell'ossigeno, 2) un declino dei sistemi antiossidanti di difesa e 3) una diminuita efficienza nel degradare e riparare molecole danneggiate.

Altri studi hanno inoltre suggerito che possano contribuire difetti nel metabolismo energetico e fenomeni di eccitotossicità.

Non è irragionevole pensare all'esistenza di interazioni tra tutti questi meccanismi. Ad esempio: un difetto nel metabolismo energetico causato dall'azione di alcuni radicali può portare a depolarizzazione neuronale, rilascio di glutammato, attivazione di recettori eccitatori e accumulo intracellulare di calcio, dando origine ad un circolo che si autosostiene e produce degenerazione. Il problema sta nel capire se tali interazioni, dimostrabili in sistemi sperimentali, hanno luogo anche in vivo, se sono parallele o in cascata e a che livello diventano irreversibili.

In relazione quanto detto, la medicina di questo inizio millennio, almeno sul piano della ricerca scientifica, appare particolarmente interessata al significato biologico ed alle implicazioni patologiche dello stress ossidativo. Non ci sono più dubbi che esso si associa alle principali patologie croniche dell'adulto, che sono di carattere degenerativo e con un'evoluzione parallela al processo di invecchiamento. Ci si riferisce in particolar modo alle patologie cardiovascolari, metaboliche, neurodegenerative, tumorali, infiammatorie sistemiche o a carico di singoli organi.

I radicali liberi

Dobbiamo chiarire innanzitutto il significato dello stress ossidativo. Nell'organismo sano esiste un equilibrio fra meccanismi ossidativi e difese antiossidative. I responsabili dei processi ossidativi sono i radicali liberi, prodotti prevalentemente nel corso della respirazione cellulare.

Un radicale libero è una molecola che per qualche ragione ha uno o più elettroni spaiati. Questa caratteristica le conferisce un'intrinseca grande reattività chimica, caratteristica ad esempio del radicale superossido (O₂·) o di quello idrossilico (·OH), oppure del radicale ossido nitrico (NO·), capaci tutti di danneggiare le cellule, agendo su vari bersagli, oltre la membrana cellulare, quali mitocondri, nucleo, DNA, proteine ed enzimi vari, e determinando finanche la morte cellulare.

Radical Scavengers

I radicali liberi sono molecole che svolgono anche un ruolo positivo, avendo, ad esempio, attività battericida e modulando il processo infiammatorio, fondamentale tappa di difesa. Parlando di stress ossidativi si intende però quella condizione dannosa in cui queste molecole, in eccesso, superano la capacità dell'organismo di neutralizzarle (attività "spazzina" o "scavenger").

Questa capacità è dovuta sia ad una serie di enzimi quali la superossido dismutasi, la glutatione per ossidasi o la catalasi, sia a numerose molecole di produzione endogena, come il gluatone o introdotte con la dieta, quali i flavonodi, le vitamine C ed E ed altre ancora.

Queste sono molecole che hanno la capacità di catturare il radicale libero poiché in grado di accettare l'elettrone spaiato e poi distribuirlo. Le più adatte sono le molecole con anelli aromatici, particolarmente quelle con numerosi gruppi ossidrilici come i polifenoli.

Patologie da stress ossidativi

Lo stato antiossidante totale del plasma è sotto stretto controllo genetico. Ad esempio nei maschi è inferiore rispetto alle femmine. Ma non c'è dubbio che lo stress ossidativo favorisce (ed è favorito) numerose patologie.

Gli eventi ossidativi sono esaltati in varie condizioni, quali l'ipossia, l'infiammazione, l'irradiazione da raggi ultravioletti, l'eccesso di alcool e lo stesso, ineluttabile, invecchiamento.

Nella tabella seguente è riportato un elenco parziale delle patologie in cui è implicato lo stress ossidativo, che, come vedete, rappresentano la maggior parte delle malattie croniche significative che affliggono l'adulto.

- ATEROSCLEROSI
- CARDIOPATIA ISCHEMICA
- INSUFFICIENZA VASCOLARE CEREBRALE
- COMPLICANZE DEL DIABETE
- IPERTENSIONE
- NEFROPATIA
- RETINOPATIA
- CATARATTA
- EPATOPATIE CRONICHE
- PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE (Mal. di ALZHEIMER, M. DI PARKINSON)
- TUMORI
- IMMUNODEFICIENZE
- COLITI CRONICHE

L'aterosclerosi, ad esempio, non è più considerata una patologia legata soltanto ai livelli plasmatici di colesterolo, buono o cattivo che sia. Certo, la colesterolemia e i livelli delle lipoproteine vanno tenuti d'occhio, ma dovremmo, a breve, credo, se si potrà avere la possibilità pratica, monitorare anche il grado di stress ossidativi. Infatti è accertato che il passaggio fondamentale per la formazione dell'ateroma è l'ossidazione delle LDL nell'endotelio vascolare: le LDL ossidate sono fagocitate dai macrofagi a formare le cellule schiumose, macrofagi che sono stati richiamati dalla circolazione nella parete vascolare dalle stesse LDL ossidate. Queste ultime hanno anche un'azione citotossica sull'endotelio, che favorisce, attraverso varie tappe, tra cui anche la produzione di radicali liberi di ossigeno, la vasocostrizione e la trombosi. È evidente che in questo modello gli antiossidanti possono intervenire favorevolmente a vari livelli del processo aterosclerotico.

Stress ossidativi e malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è tra le più comuni cause di demenza nell'uomo, responsabile di un declino progressivo e permanente delle diverse funzioni intellettuali, tale da interferire in maniera profonda con la normale attività sociale. L'età avanzata è un fattore che predispone alla malattia, tuttavia sarebbe sbagliato considerare il morbo di Alzheimer come una malattia inevitabilmente associata all'invecchiamento. Le manifestazioni cliniche iniziali sono sfuggenti, insidiose e sono prevalentemente a carico della memoria degli eventi recenti.

Le caratteristiche salienti a livello cerebrale sono costituite dalla morte e dalla scomparsa dei neuroni della corteccia cerebrale e dall'accumulo di materiale filamentoso (grovigli neurofibrillari) e dallo sviluppo delle cosiddette placche senili o neuritiche costituite da neuroni addensati e raggruppati a forma di anelli attorno a depositi sferici di fibrille di amiloide (sostanza amorfa).

La TC e la RMN mostrano un'estesa atrofia delle circonvoluzioni cerebrali della regione frontale, parietale e temporale.

Dando per accettato il coinvolgimento di specie radicaliche del processo di invecchiamento come sopra indicato, e considerando che esiste una stretta associazione tra quest'ultimo e la malattia di Alzheimer, diversi gruppi hanno indirizzato la loro attenzione alla comprensione del ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi della malattia di Alzheimer.

Questa ipotesi è supportata dal fatto che il cervello è un organo particolarmente suscettibile al danno ossidativo. Il metabolismo cerebrale richiede elevati livelli energetici ed è strettamente dipendente dalle condizioni aerobiche; esso è inoltre particolarmente ricco di acidi grassi poliinsaturi, facilmente ossidabili, e di metalli di transizione, che possono favorire la formazione del radicale OH \cdot . Il cervello è caratterizzato infine da un minore contenuto di sistemi antiossidanti, se paragonato ad altri organi. Un eccesso di attività pro-ossidanti o la caduta di meccanismi antiossidanti di difesa legati alla patologia potrebbero quindi far superare facilmente la soglia oltre la quale il danno neurodegenerativo diventerebbe importante.

In alternativa, le alterazioni del metabolismo ossidativo presenti nell'età avanzata potrebbero rendere il cervello più suscettibile al danno da peptici neurotossici come beta amiloide in forma solubile o fibrillare.

Marker di danno ossidativo nella malattia di Alzheimer

Studi su tessuto cerebrale post-mortem di pazienti affetti da malattia di Alzheimer hanno mostrato un notevole incremento di marker tipici del danno ossidativo di seguito riassunti.

Perossidazione lipidica: i livelli di perossidazione lipidica determinati mediante l'analisi delle sostanze reattive per l'acido tiobarbiturico (TBARS), quali la MDA, risultano essere aumentati in diverse regioni cerebrali tra cui la corteccia frontale e temporale. Altro indice

di perossidazione lipidica è rappresentato dalla HNE: i livelli della forma libera di questa aldeide risultano elevati in diverse aree del cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e nel liquor ventricolare.

Ossidazione delle proteine: le specie reattive dell'ossigeno possono interagire con residui aminoacidici (in particolare istidina, arginina e lisina) formando funzioni carboniliche. La valutazione del contenuto di carbonilproteine costituisce quindi un ulteriore indice utile per l'identificazione del danno ossidativo dei tessuti. Alcuni autori hanno rilevato che i livelli cerebrali di questi composti aumentano con l'invecchiamento senza notare tuttavia una significativa differenza tra i tessuti provenienti da soggetti anziani e tessuti di pazienti con malattia di Alzheimer. Studi successivi, tuttavia, indicherebbero una maggior presenza di carbonilproteine nell'ippocampo e nel lobulo parietale inferiore del cervello dei malati di Alzheimer.

Glicossidazione: i monoscaccaridi possono indurre una modificazione irreversibile delle proteine mediante due distinti meccanismi. Il primo consiste nella formazione di radicali liberi in presenza di metalli di transizione e ciò potrebbe originare gruppi carbonilici reattivi. Il secondo prevede il coinvolgimento di una glicazione non enzimatica che si traduce nella formazione di composti stabili noti come composti finali di glicazione o AGE.

Recentemente, maggiore attenzione è stata posta sul fenomeno della modificazione delle proteine da parte dei composti AGE. Tali proteine modificate sembrerebbero in grado di legarsi a recettori specifici presenti in diverse linee cellulari con conseguente aumento della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno. Secondo alcuni studi recentemente condotti l'utilizzo di anticorpi specifici localizza questi composti con la proteina tau iperfosforilata nei gomitoli neurofibrillari presenti nel cervello dei dementi. Studi successivi ne hanno dimostrato la presenza anche nelle placche neuritiche e ciò suggerisce che l'eccessiva glicossidazione della proteine potrebbe essere un evento precoce della degenerazione cellulare.

Sistemi enzimatici antiossidanti: un ultimo contributo alla valutazione del danno ossidativo deriva dalla constatazione che nella malattia di Alzheimer si hanno alterati livelli dei sistemi enzimatici antiossidanti. A tale proposito uno studio ha dimostrato una sensibile riduzione dell'enzima catalasi a livello dell'ippocampo e del cervelletto, nonché un aumento parallelo dell'enzima Mn-superossido dismutasi. I risultati esposti non concordano tuttavia con una ricerca precedente in cui si dimostrava, nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale una riduzione della superossidodismutasi pari al 25-35%.

Nonostante vi sia discordanza sui dati ottenuti, va comunque sottolineato che in entrambe i casi si giunge alla ulteriore dimostrazione che nei soggetti con malattia di Alzheimer vi è un aumento del danno ossidativo. La carenza di catalasi e l'incremento dell'enzima superossidodismutasi causano un accumulo di H_2O_2 . da una lato ne viene infatti ridotta la degradazione e dall'altro ne viene aumentata la produzione a partire dall'anione O_2^- . In presenza di metalli di transizione, H_2O_2 origina il radicale $OH\cdot$, molto tossico e non eliminabile per via enzimatica. La riduzione dell'attività della superossidodismutasi causa invece un aumento di O_2^- . Che non essendo convertito a H_2O_2 rappresenta esso stesso l'agente tossico.

β -amiloide e meccanismi di danno ossidativo.

La scoperta di β -amiloide ($A\beta$) quale componente principale della placche senili ha dato avvio a numerose ricerche, mirate a definirne con esattezza il ruolo nello sviluppo della malattia.

Accertato che il peptide svolge un ruolo attivo nell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer, gli studi attuali sono indirizzati a evidenziare meccanismi cellulari conseguenti alla deposizione di $A\beta$. $A\beta$ è fisiologicamente prodotto dalle cellule neuronali ed è presente in piccole concentrazioni nel liquor; nella malattia di Alzheimer esso forma aggregati

fibrillari insolubili che si depositano nel parenchima di diverse regioni cerebrali provocando degenerazione neuronale.

L'azione tossica di A β sarebbe da attribuire alla sua forma fibrillare e non alla sua forma solubile suggerendo che sia il processo fisico-chimico coinvolto nella formazione delle fibrille o la struttura fibrillare a promuovere tale degenerazione. Studi in vitro evidenziano come le proprietà neurotossiche di A β possano essere mediate da alcune specie radicaliche dell'ossigeno. Le cellule esposte al peptide mostrano elevati livelli di H₂O₂ che, come si è detto in presenza può originare il radicale OH \cdot .

Questi risultati nascono dall'osservazione che l'aggiunta di catalasi al medium di crescita cellulare protegge dall'azione tossica di A β . studi successivi hanno tuttavia dimostrato che, sebbene la catalasi sia capace di attenuare la tossicità del peptide tale aggiunta non è in grado di ridurre gli aumenti dei livelli di H₂O₂, segno che questo non è il mediatore della tossicità di A β . Un secondo meccanismo che prevede che A β si possa legare ai recettori per i prodotti finali di glicazione (RAGE), inducendo in questo modo la produzione di specie reattive dell'ossigeno, anche se studi recenti ipotizzano il coinvolgimento di altre proteine in grado di legare A β .

Nonostante non vi sia ancora chiarezza sull'effettivo contributo di ciascuna delle fonti di radicali liberi, è comunque in generale accertato che A β causi ossidazione di componenti essenziali alla corretta funzionalità cellulare come le membrane, i mitocondri e il DNA nucleare. La perossidazione lipidica membranale indotta da A β altera l'attività di proteine quando pompe ioniche Na⁺/K⁺ - ATPasi e Ca²⁺ -ATPasi con conseguente alterazione dell'omeostasi del calcio. Questo fenomeno sembra sia mediata dalla HNE, che è uno dei prodotti della reazione di per ossidazione dei lipidi. HNE è infatti in grado di interferire direttamente con la Na⁺/K⁺ - ATPasi e di aumentare la concentrazione intracellulare di calcio, rendendo in questo modo le cellule neuronali maggiormente suscettibili ad eccitotossicità. I dati forniti da Shearman e al. indicano inoltre che A β causa alterazioni a livello della funzionalità mitocondriale inducendo una riduzione della produzione di ATP.

Tale difetto del metabolismo energetico si ripercuote poi direttamente sullo scambio ionico promosso dalle pompe ATP-dipendenti. Uno studio del 1989 dimostrò che nelle cellule cerebrali di soggetti affetti da malattia di Alzheimer vi è una ridotta capacità di assimilazione del glucosio.

Esperimenti in vitro hanno evidenziato che A β è in grado di interferire con i sistemi di trasporto del glucosio mediante un meccanismo dipendente dalla perossidazione lipidica.

La deplezione di ATP risulterebbe, quindi, una conseguenza dei difetti legati al metabolismo del glucosio e A β si inserirebbe in questo contesto come il fenomeno scatenante della serie di eventi tossici.

Intervento antiossidante?

È noto che un regime alimentare ipocalorico adeguatamente integrato con elementi nutritivi essenziali prolunga la durata media della vita negli animali di laboratorio.

Considerando lo stress ossidativo come una delle principali cause dell'invecchiamento e delle patologie neurodegenerative ad esso connesse, il beneficio apportato dalla restrizione calorica andrebbe collegato ad un abbassamento dei livelli di stress ossidativo e ad un aumento del potenziale metabolico, i risultati sperimentali confermano tale ipotesi. Gli animali sottoposti ad alimentazione ipocalorica mostrano, infatti, un'attenuazione della produzione di O₂⁻ e di H₂O₂ al livello mitocondriale e un minor accumulo di danno ossidativo. Allo stesso modo anche sostanze dotate di proprietà antiossidanti o in grado di potenziare i sistemi endogeni di difesa dai radicali liberi dovrebbero prevenire l'insorgenza di stati di demenza, inclusa la malattia di Alzheimer. Da tempo è stata descritta l'attività antiradicalica di sostanze quali il selenio, la vitamina C e la vitamina E. Alcuni studi su ratti anziani evidenziano come l'integrazione alimentare con vitamina E riesca a

controbilanciare la diminuzione fisiologica di glutatione per ossidasi in relazione all'età, parificando le concentrazioni dell'enzima con quelle dei ratti giovani.

Anche nell'uomo è stata evidenziata, già da almeno 2 decadi, una possibile correlazione tra fattori dietetici, invecchiamento cerebrale, disfunzioni cognitive e rischio di demenza.

In particolare una dieta ricca di acidi grassi ed una contemporanea carenza di sostanze antiossidanti potrebbero aggravare e/o potenziare il danno ossidativo.

Al contrario una corretta integrazione alimentare con vit. C, vit. E, β carotene e polifenoli (tutte sostanze in grado di neutralizzare l'azione dei radicali liberi) porterebbe ad un miglioramento delle capacità cognitive.

Inoltre, studi più recenti di intervento con antiossidanti nella malattia di Alzheimer hanno prodotto risultati significativi anche se modesti. Il problema di questa letteratura rimane l'incertezza, nel caso dei dati sulla dieta, sul reale contenuto in antiossidanti.

Studi recenti dimostrano ad esempio la presenza di potenti antiossidanti in diversi vegetali, ma il processo di cottura potrebbe alterarne il contenuto, inoltre, mentre è relativamente facile dimostrarne l'attività in vitro, poco si sa su assorbimento, distribuzione ed efficacia in vivo. Relativamente agli studi di intervento condotti, si è in attesa di conferma in altri studi indipendenti.

Queste osservazioni portano a pensare che qualsiasi trattamento capace di ridurre o di rallentare il processo ossidativo si inserisce in questo contesto come un possibile approccio preventivo, più che terapeutico, al trattamento delle patologie neurodegenerative. Se si pensa che una dieta ricca in antiossidanti è probabilmente una dieta bilanciata (anche dal punto di vista calorico), variata, ricca in fibre e vegetali, potenzialmente utile anche nella prevenzione di malattie cardiovascolari al di là degli specifici meccanismi e delle prove scientifiche di efficacia, costituisce un suggerimento di stile di vita sicuramente proponibile.

Più cauto il giudizio sull'intervento farmacologico con antiossidanti, la cui opzione costituisce, per ora, una scelta individuale operata dal medico.

Nutraceutici in gastroenterologia: l'esperienza dell'FPP in alcune patologie gastrointestinali

Relatore: Dr. F. Marotta

ABSTRACT

La messe di supporti offerti dai riscontri della scienza di base e di qualche preliminare lavoro nell'uomo ha offerto le basi per la pianificazione di alcuni studi clinici. Negli anni 1995-99 un gruppo di ricercatori italiani, francesi e giapponesi coordinavano una serie di studi in tema di epatopatia alcolica che dimostravano come Immun-Age sia in grado di ridurre lo stress ossidativo nell'etilista (riduzione dei livelli plasmatici ed eritrocitari di malonildialdeide e dei lipoperossidi plasmatici) sia che si trovi nelle prime fasi di un periodo di astinenza (Marotta F et al. HepatoGastroenterol. 1997; 44:1360-1366) quando

si può osservare la persistenza dell'attivazione del sistema microsomiale di ossidazione dell'etanolo, con conseguente perpetuazione di uno stato pro-ossidativo, che in corso di abuso alcolico cronico (fig 1).

BLOOD ANTIOXIDANT STATUS

Baseline and after placebo or FPP

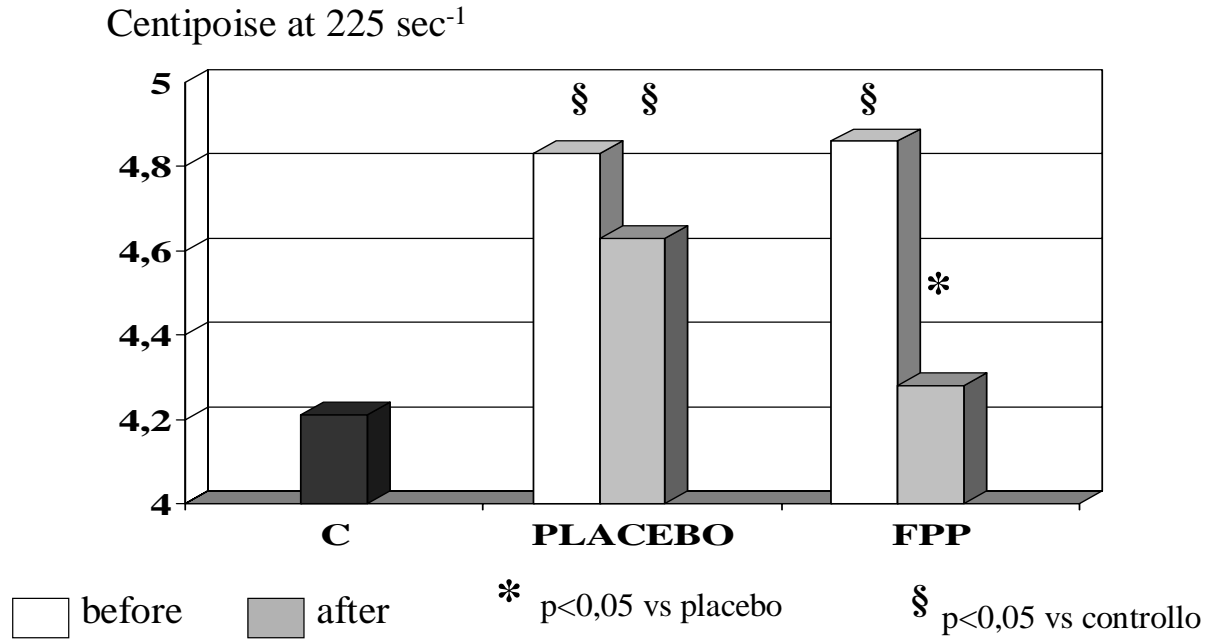
| | control | alcohol | + placebo | + FPP |
|----------------------|-----------|------------|------------|----------------------|
| α -tocopherol | 32.4±5.2 | 26.5±3.7* | 24.6±5.7* | 24.3±4.7* |
| ascorbic ac. | 39.5±10.3 | 23.6±16.5* | 22.8±11.6* | 23.9±18.4* |
| selenium | 0.97±0.5 | 0.68±0.8* | 0.71±0.4* | 0.64±0.8* |
| MDA | 2.5±0.4 | 4.3±0.5* | 4.4±0.6* | 2.9±0.5 [§] |
| L-hydroper. | 2.5±0.4 | 10.7±2.3* | 11.2±3.1* | 4.9±1.8 [§] |

* p<0.01 vs control § p<0.05 vs placebo

In particolar modo, in considerazione della bassa compliance nella pratica clinica della comunque ricercabile astinenza, è stato verificato come la concomitante assunzione di Immun-Age in etilisti attivi sia in grado:

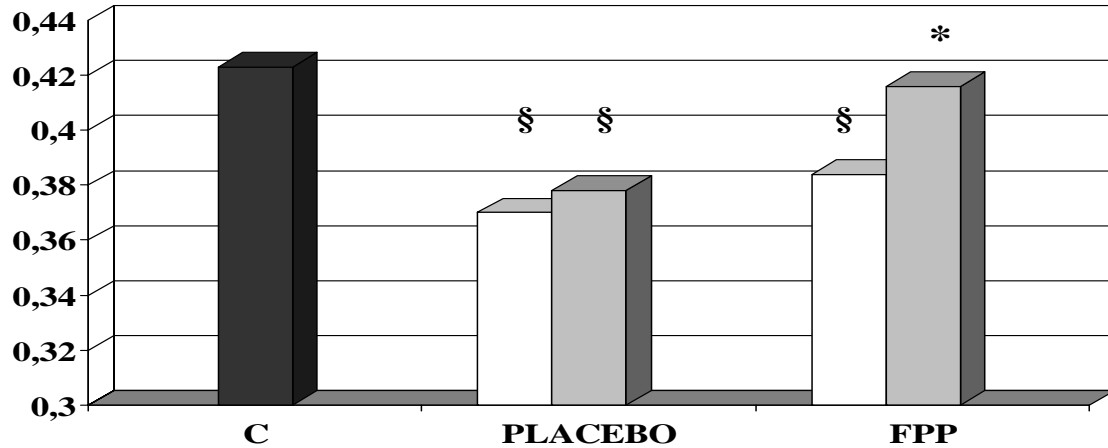
1. di migliorare significativamente la emoreologia (con riduzione della viscosità del sangue intero, ripristino della deformabilità degli eritrociti ed incremento della filtrabilità del sangue stesso attraverso specifiche membrane) (Marotta F et al.. Hepato-Gastroenterology 2001; 48: 511-17) (fig. 2-4).

Viscosità del sangue



Deformabilità eritrocitaria

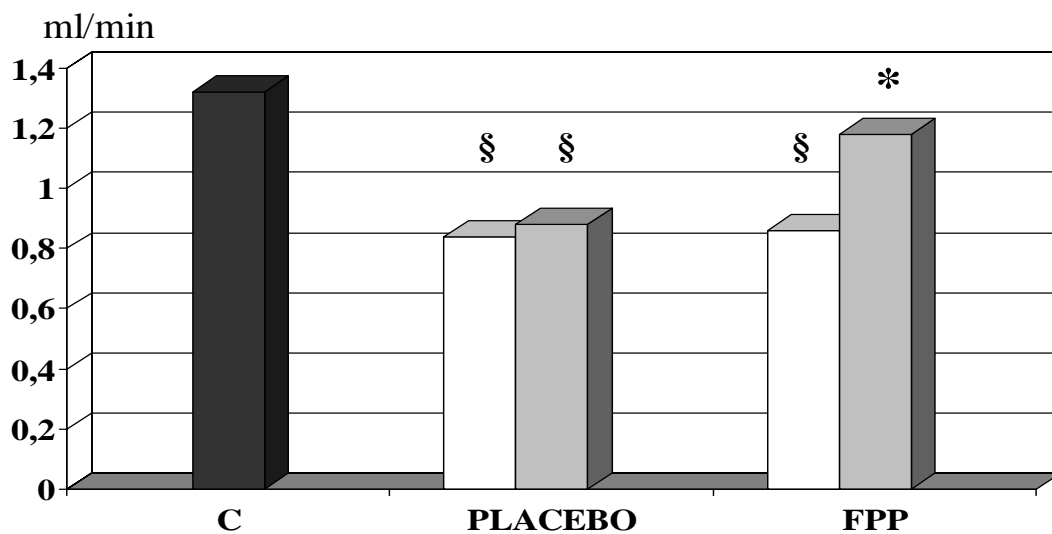
Elongation Index (5Pa)



* $p < 0.01$ vs placebo

§ $p < 0.01$ vs control

Filtrabilità del sangue intero



* $p < 0.01$ vs placebo e pretrattamento

§ $p < 0.01$ vs controllo

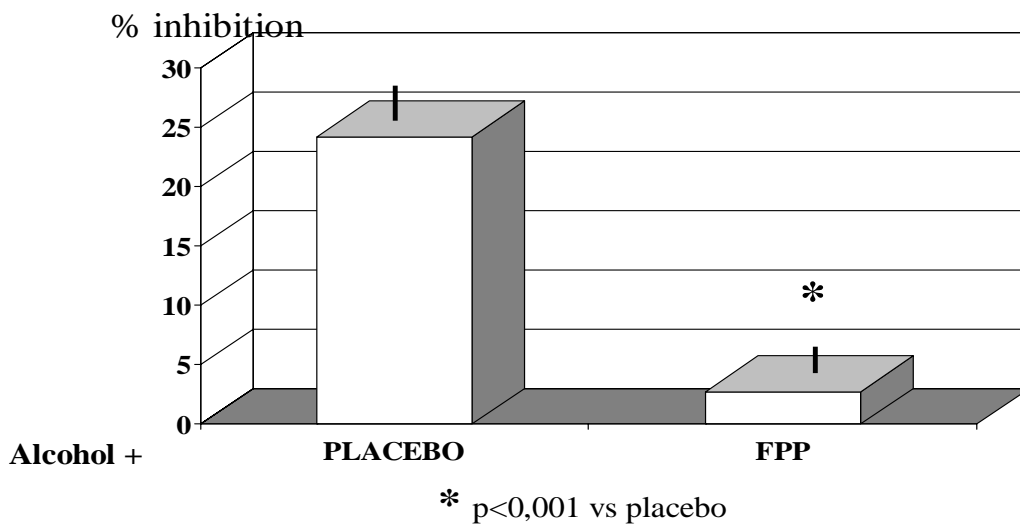
Questo in quanto il marcato incremento della concentrazione della malonildialdeide negli eritrociti degli etilisti cronici determina, attraverso fenomeni lipoperossidativi, una destabilizzazione dell'asimmetria lipidica. Questi dati sono oggetto di interesse da parte di un autorevole gruppo di lavoro sulla talassemia israeliano (Prof. Rachmilewitz, ORI Report, UNESCO, Parigi 2002) che ha ottenuto alcuni dati preliminari *in vitro* circa l'effetto protettivo da parte di Immun-Age su eritrociti prelevati da soggetti con β -talassemia.

2. di ripristinare lo stato latente di malassorbimento di vitamina B12 determinato dalla interferenza dei fenomeni ossidativi alcol-indotti della mucosa gastrica sui siti di

legame tra fattore intrinseco e cianocobalamina (Marotta F, Hepato-Gastroenterology 2000; 47: 1189-94) (5, 6).

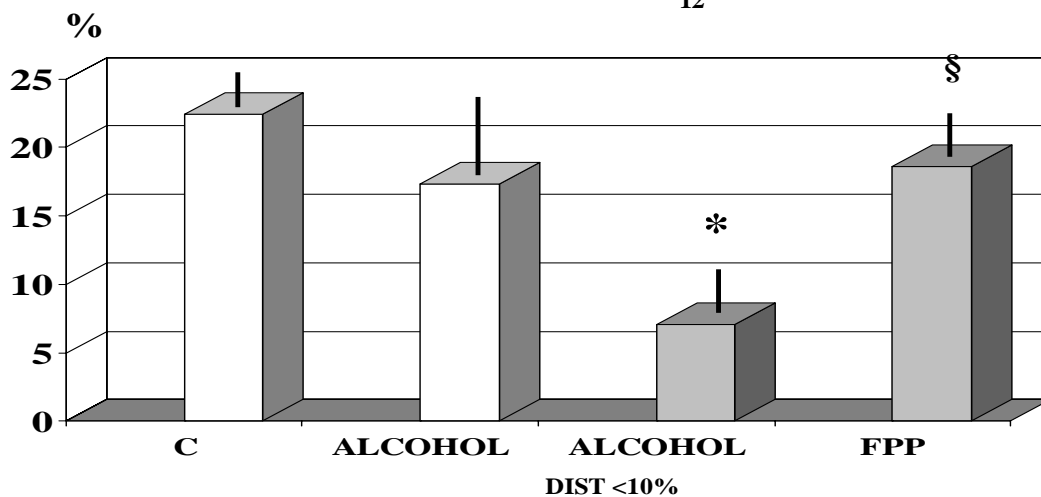
Vitamin B₁₂ binding by Intrinsic Factor (IF)

IN VITRO INCUBATION OF IF WITH ⁵⁷Co-LABELLED CYANOCOBALAMIN



DUAL ISOTOPE SCHILLING TEST

Free ⁵⁸Co-Vitamin B₁₂ Excretion



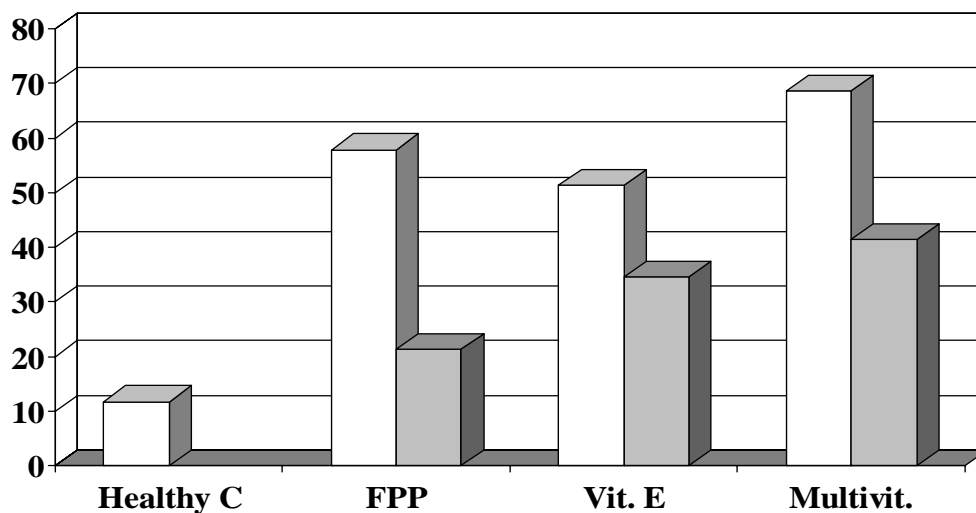
§ p<0.01 vs sottogruppo con DIST <10%

**SIMPOSIO SCIENTIFICO: STRESS OSSIDATIVO E MEDICINA PREVENTIVA:
COMUNICARE CON LA SCIENZA**

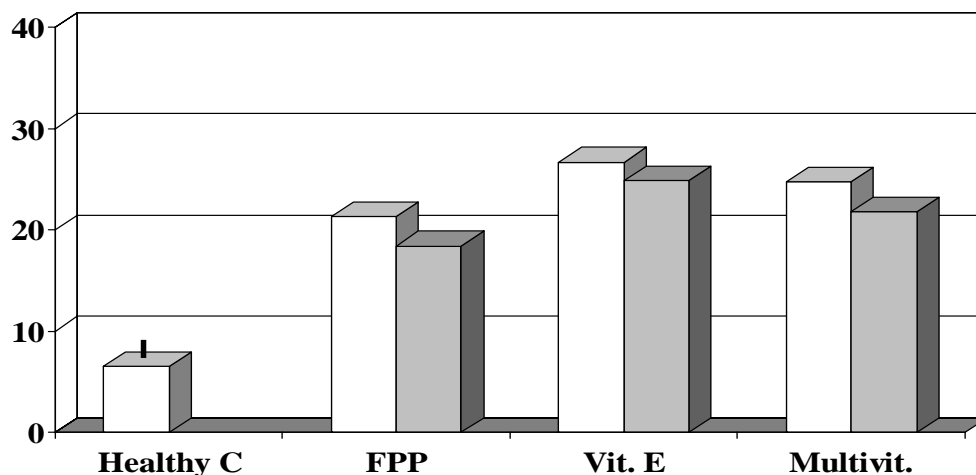
Questi dati di efficacia di Immun-Age sullo stress ossidativo indotto dall'alcol sulla mucosa gastrica avevano peraltro preso lo spunto dal concomitante riscontro del significativo effetto protettivo (sia macro- che microscopico che biochimico) in soggetti sani dopo assunzione di una prefissata dose-test di etanolo (40ml di etanolo all' 80%) (Marotta F et al. Digestion 1999; 60: 538-43).

Sulla base inoltre di precedenti segnalazioni circa un effetto antigenotossico e di protezione del DNA in vitro da parte di Immun-Age provenienti sia dal gruppo del Prof. Mori (deCastro-Bernas G et al. Med Sci Res 1993; 21:107-108) e, più recentemente, dal Prof. Packer (Rimbach G et al. Anticancer Res 2000; 20:2907-2914) che ha messo in luce anche un effetto chelante il ferro, è stato avviato uno lavoro clinico mirato allo studio delle precancerose gastriche. Un gruppo infatti di ricercatori italiani e giapponesi ha dimostrato in uno studio controllato e randomizzato eseguito per sei mesi su pazienti con gastrite cronica atrofica esenti da *helicobacter pylori* che sia una miscela generica di antiossidanti che la vitamina E ad alto dosaggio e Immun-Age erano in grado di ridurre alcuni markers mucosali di stress ossidativo. Tuttavia solo Immun-Age è stato in grado di ridurre significativamente i due marker utilizzati quali espressione di alterazione biochimica a significato precanceroso, ossia la ornitino decarbossilasi e, soprattutto, la 8-oxoguanina che rappresenta uno dei più utilizzati marcatori biologici di danno ossidativo al DNA in quanto, essendo una base alterata può indurre gravi errori replicativi e mutazioni) (Marotta F et al. Annals N Y Acad Sci, 2004) (7, 8).

**MUCOSAL ODC ACTIVITY IN CHRONIC GASTRITIS: EFFECT OF
ANTIOXIDANTS SUPPLEMENTATION**



**MUCOSAL 8-OHdG LEVEL IN CHRONIC GASTRITIS: EFFECT OF
ANTIOXIDANTS SUPPLEMENTATION**



Rimane certamente imperativo il consiglio di assumere una dieta ricca in alimenti di origine vegetale che, se opportunamente seguita, offre una disponibilità di micronutrienti ed antiossidanti sufficiente a soddisfare il fabbisogno di un organismo in condizione di salute normale ed in assenza di evidenti importanti carichi di lavoro psico-fisico. Tutto ciò, oltre che essere riconducibile al buon senso, è stato da anni sottolineato da un'autorevole struttura internazionale no-profit ("Antioxidant: Scientific Basis, Regulatory Aspects and Industry Perspectives", Antioxidant Task Force-Intl. Life Science Institute symposium, Bruxelles, 1996) che ha ribadito come una sana alimentazione non può essere abdicata verso una incontrollata supplementazione di integratori o sucedanei di alimenti sotto forma di preparati vitaminici, di estratti o liofilizzati tanto più qualora per questi prodotti non venga controllata la variabilità del singolo lotto (Ghosh S et al. Commercial Validity of Claims for Biological Activity and Regulatory Issues, Clinical Science; 2003 104:547-556) o, peggio, qualora non sia mai stata effettuata una titolazione certificata. Come tuttavia recentemente sottolineato dal Prof. Packer in un convegno di caratura internazionale (International Symposium on Free Radicals and Health: Molecular Intervention and Protection of Lifestyle-Related Disease, 23-25 Ottobre 2003, Sakata, Giappone) stiamo assistendo ad una evoluzione degli antiossidanti che prevede lo studio come alcuni di questi da una semplice funzione scavenger abbiano i requisiti per poter interagire in modo complesso con il network dell'equilibrio redox ed immuno-modulatorio tramite la regolazione genica. Immun-Age rappresenta certamente un Functional Food che può soddisfare le caratteristiche della nuova categoria dei nutrigenomici.

Terapie complementari nella cura dell'AIDS

Relatore: Prof. L. Montagnier

ABSTRACT

The combination of several inhibitors of HIV replication (reverse transcriptase and protease inhibitors) has been an important advance in the medical management of HIV infection and AIDS.

However it is a long term, life-long treatment which does not lead to the eradication of the infection, has important side effects and allows the emergence of mutants of the virus resistant to the treatment. Moreover, the restoration of the immune system thus achieved is not complete. Therefore, there is a need to use complementary treatments, aimed at improving the restoration of the immune system and reducing the intensity and duration of antiretroviral therapy.

Among these treatments, the use of antioxidants and immunostimulants or of preparations which are endowed with both properties, will be advisable.

We will report the first results obtained in this way with the Fermented Papaya Preparation and discuss its possible adjunction in combined treatments aimed at controlling, if not eradicating the HIV infection.

Regolazione Redox della Risposta Cellulare allo Stress nell'Invecchiamento e nei Disturbi Neurodegenerativi: il Ruolo dei Vitageni

Relatore: Prof. V. Calabrese - Dept of Chemistry, Biochemistry & Mol. Biol. Section, Faculty of Medicine, University of Catania. Viale Andrea Doria 6 - 95100 Catania - ITALY. Email: calabres@mbox.unict.it

ABSTRACT

Oxidative damage plays a crucial role in the brain aging process and induction of heat shock protein (HSPs) is critically utilized by brain cells in the repair process following

various pathogenic insults. This basic information has been exploited to develop novel strategies in clinical therapeutics. Perturbation of cellular oxidant / antioxidant balance has been claimed to be involved in the neuropathogenesis of several disease states, including stroke, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and physiological aging¹. However, in contrast to the conventional idea that reactive species mostly serve as a trigger for oxidative damage of biological structures, we now know that low physiologically relevant concentration of reactive oxygen species can regulate a variety of key molecular mechanisms. Oxidative stress, in fact, has been demonstrated to modulate the expression and activity of important antioxidant enzymes as well as to enhance expression and/or DNA binding of numerous transcription factors, including fos, SAPK, NFkB and HSF (heat shock factor)². HSF is the transcriptional activator for the synthesis of cytoprotective proteins called heat shock proteins (HSPs). HSPs induction is not only a signal for detection of physiological stress, but is utilized by the cells in the repair process following a wide range of injuries³. Cells constitutively overexpressing HSPs are resistant to a variety of oxidants and to heat shock, and it has been suggested that the protective effect against oxidative injury may result from protection against oxidant-induced DNA damage⁴. In addition, an increasing body of evidence suggests that dysfunction of cell energy metabolism is an important factor in NO-mediated neurotoxicity and that the intracellular content of thiols is crucial in determining the sensitivity of cells to oxidative and nitrosative stress⁵. Recently, the involvement of the heme oxygenase (HO) pathway in antidegenerative mechanisms has received considerable attention, as it has been demonstrated that the expression of HO is closely related to that of amyloid precursor protein (APP). HO induction, which occurs together with the induction of other HSPs during various physiopathological conditions⁶, by generating the vasoactive molecule carbon monoxide and the potent antioxidant bilirubin could represent a protective system potentially active against brain oxidative injury⁷⁻¹⁰. We have recently focused our recent research on the role of carnitine system in cellular stress tolerance and antidegeneration. In the present study we investigated, in rats 6, 12 and 28 months old, and in rats 28 months old receiving for 6 months 1g/Kg/die acetylcarnitine (LAC), the role of heat shock signals on aging-induced changes in mitochondrial bioenergetics and antioxidant status. In all brain regions examined mRNA and protein synthesis of Hsp70 and Hsp60 increased with age up to 28 months; at this age the maximum induction was observed in the hippocampus and substantia nigra followed by cerebellum, cortex, and striatum. Hsps induction was associated with significant changes in glutathione (GSH) redox state and HNE levels. Interestingly, a significant positive correlation between decrease in GSH/GSSG ratio and increase in Hsp70 was observed in all brain regions examined during aging. Analysis of mitochondrial complexes showed a progressive decrease in Complex I activity and protein synthesis in all brain regions examined and this was associated with up-regulation of mRNA complex subunit expression. Interestingly, treatment with LAC resulted in a marked decrease in HNE and DPNH content associated with increased protein expression and activity of the heat shock protein (Hsp 32, HO-1) heme oxygenase-1, primarily in the hippocampus, cortex and cerebellum. Our results sustain a role for GSH redox state in Hsp expression. In particular, increase of heme oxygenase expression promotes the functional recovery of oxidatively damaged proteins and protects cells from progressive age-related cell damage¹¹⁻¹⁶. Conceivably, therapeutic strategies focussing on acetylcarnitine treatment, by up-regulating HO signal pathway and thus increasing bilirubin levels, may represent a crucial mechanism of defence against free radical-induced damage occurring in aging brain and in neurodegenerative disorders.

References

1. Calabrese, V., et al. (2001) Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemical Research* 26, 739-764.
2. Calabrese V., et al. (2002) Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 24, 40-56.
3. Calabrese V., et al. (2000) Endothelial Heme oxygenase-1 induction by hypoxia: modulation by inducible nitric oxide synthase (iNOS) and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 275, 13613-13620.
4. Calabrese V., et al. (2002) Regional distribution of heme oxygenase, hsp70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant / antioxidant balance and stress tolerance. *J. Neurosci. Res.* 67, 612-623.
5. Calabrese V., et al. (2003) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in in vitro stellate astrocytes and in vivo reactive astrocytes after electrically induced status epilepticus. *Neurochem. Res.* 28, 607-615.
6. Calabrese V., et al. (2002) Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol* 61, 554-561.
7. Calabrese V., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. 2003 Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *It. J. Biochemistry;* 52, 177-181.
8. Calabrese, V., et al. 2003. Disruption of thiol homeostasis and nitrosative stress in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis: evidence for a protective role of acetylcarnitine. *Neurochem. Res.* 28, 1321-1328.
9. Calabrese V., Scapagnini G., Ravagna A., Colombrita C., Spadaro F., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. 2004. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech. Age Dev.* 125, 325-335.
10. Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004 Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59, 478-493.
11. Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004. Free radicals and brain aging. *Clin. Geriatr. Med.* 20, 329-359.
12. Pocernich C.B., Sultana R., Hone E., Turchan J., Martins R.N., Calabrese V., Nath A., Butterfield D.A. 2004. Effects of apolipoprotein E on the human immunodeficiency virus protein tat in neuronal cultures and synaptosomes. *J. Neurosci. Res.* 77, 532-539.
13. Poon H.F., Joshi G., Sultana R., Farr S.A., Banks W.A., Morley J.E., Calabrese V., Butterfield D.A. 2004. Antisense directed at the A β region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res.* 1018, 86-96.
14. Calabrese V., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A., Scapagnini G. 2004 Redox Regulation in Neurodegeneration and Longevity: Role of the Heme Oxygenase and HSP70 Systems in Brain Stress Tolerance. *Antioxid Redox Signal.* 6, 895-913.
15. Scapagnini G., Butterfield D.A., Colombrita C., Sultana R., Pascale A., Calabrese V. 2004 Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 6, 811-818.
16. Calabrese V., Boyd-Kimball D., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004 Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo.* 18, 245-267.

Stress ossidativo ed FPP: studio clinico sulla talassemia

Relatore: Prof. E. Rachmilewitz

ABSTRACT

Pathophysiology

Hemoglobin (Hb) denaturation and degradation

The major pathophysiology of red blood cells (RBC) in the various forms of the thalassemia syndrome is caused by alterations in the oxidation pattern of Hb. Oxidation of Hb A ($\alpha_2\beta_2$), which occurs continuously throughout the lifespan RBC, results in the reversible formation of methemoglobin. In contrast, the oxidation of α , β , or γ Hb subunits results in the formation of hemichromes. The rate of formation of hemichromes is an important factor in determining the rate of hemolysis and, therefore, the severity of the anemia. Hemichromes derived from the different globin chains bind to and/or modify different components of the RBC membrane, such as protein band 3, 4.1 ankyrin, and spectrin. Because the α chains dissociate into monomers more readily than β or γ chains, they form hemichromes at a faster rate and precipitate within the RBC membrane early during the course of Hb synthesis. This is why β thalassemia is clinically much more severe than α thalassemia. Different mutations produce various defects in the β globin gene. The severity of β thalassemia is related to the degree of globin chain imbalance resulting from these various genetic mutations, and ranges from mild (minor), to moderate (intermedia), to severe (major).

After hemichromes become precipitated, heme is lost and "toxic" nontransferrin-bound iron (NTBI) species are released, followed by precipitation of the globin protein moiety. The resulting free iron can catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS). Iron-dependent oxidative reactions in RBC derived from patients with β -thalassemia and also from sickle cell anemia are involved in premature cell removal and anemia.

Potential role of antioxidants

A growing body of evidence now suggests that generation of ROS plays a significant role in the pathophysiology of thalassemia and sickle cell anemia. Thus, antioxidants may be useful for neutralizing the deleterious effects of ROS on thalassemic and sickle RBC, by protecting their membranes, extending their life span, and thereby prolonging patients' survival. Thalassemic and sickle patients have low serum levels of vitamin E (<0.5mg/ml). When vitamin E was administered to patients with β thalassemia intermedia, their RBC count and hematocrit were significantly increased, whereas there were no changes in their Hb levels. These patients also exhibited a marked decrease in the plasma level of malonyldialdehyde (MDA), a breakdown product of lipid peroxidation, which reflects oxidation processes in the body. Vitamin E treatment also prolonged RBC survival in a few patients.

In addition to vitamin E, plant flavinoids represent another group of antioxidants that could potentially be used to treat thalassemia, due to their ability to inhibit ROS generation in chemical and biological systems. An example of natural polyphenol is curcumin, which inhibited lipid peroxidation in thalassemic RBC ghosts, and in 5 out of 8 patients increased RBC survival. Polyphenols, which are a major component of tea, bind to ferric iron to form a redox-inactive complex and potentially also protect thalassemic RBC from oxidation. Deferiprone, an oral iron chelator, which penetrates through the RBC membrane and chelates free iron, may also represent a useful approach.

It may be possible to achieve a more significant therapeutic effect of antioxidants if a combination of a lipid antioxidant, such as vitamin E, is given with N-acetylcysteine, which

is a protein antioxidant that has been shown to improve several parameters in oxidized sickle RBC, and with an iron chelator, such as deferiprone. This approach involves relatively inexpensive medications administered orally.

Following this rationale, we gave FPP to 12 patients with thalassemia major and intermedia for 12 weeks and measured the generation of ROS and the intracellular content of antioxidants such as reduced glutathione (GSH), the major intracellular scavenger of ROS. The measurements were carried out by FACS analysis and showed that in all patients there was about 50% decrease in ROS both in RBC and platelets concomitant with a similar increase in the intracellular content of GSH. These studies are now repeated in a double blind study in similar patients comparing FPP and placebo.

Since generation of ROS has also been encountered in RBC, platelets and also in WBC from patients with both thalassemia and sickle cell anemia, a therapeutic trial with FPP is also being initiated in the latter disease.

Ageing e matrice extracellulare: il ruolo dei vasi sanguigni

Relatore: Prof. F. Albergati - Chief, "Center Of Microcirculation", Policlinico Di Monza - University Of Milan, University Of Pavia - ITALY

ABSTRACT

Lots of experimental and clinical findings put in evidence the importance of extracellular structures in the genesis and maintenance of several diseases, as far today mainly the sub-acute and chronic-ones. In fact, as today the majority of clinical data belong to vascular and lymphatic fields, where it has been demonstrated that microvascular structures behave better when in concomitant treatment with drugs capable to "drain" the extracellular components, better defined as Extracellular Matrix (EM). Deeply known by molecular biologist, mainly regarding its structures, EM is described in Molecular Biology as a structure composed by two main components (ground substance and fibrillar components), but an increasing number of clinical evidences highlight that both the components have a very sophisticated pattern of different biochemical and functional activities capable in different phases of vascular pathologies, i.e. in neoangiogenesis process where the neovascularization process goes on better when E.M. structures are capable to maintain their own physiologic pattern. Another important field of research is represented by lymphoedema, where drug capable to improve activity of E.M. components (MMP's) show higher activity in reducing limb oedema. Together with these clinical findings, coming from more than 5.000 patients treated in several years, there is a convincing evidence that the vascular endothelial cell is one of the major site of patho-physiologically relevant change in the blood flow wall that occurs not only in response of injury, infection, mechanical perturbation, haemorheologic changes, or other stimuli, but also in normal (physiologic) conditions. For instance, during the early phases of inflammatory process the leukocyte transmigration an accompanying increased vascular permeability are the cardinal signs of inflammations: in these earliest phases, many components of E.M. deeply modify their own activity on the basis of an "action-reaction chain cascade" leading to a mechanical and 3D modification of the whole structure and function of the same E.M: it seems reasonable, as far today clinical findings, to read these steps as an "allowing" the correct response of the extracellular space to the increasing

“needs” of the pathologic process. The effort of numerous investigators have identified and cloned several endothelial adhesion molecules which are provided with specific own cognate ligands for E.M. components such as cadherine, sialomucins, selectins, chemokines, p-selectin, vinculine, and many others. A primitive “activation” (or something-like that) in E.M. components linked with (micro-)vascular perlecan and syndecan is requested in order to physiological response of all components of microvessel-tissue activity during both physiologic and pathologic activities/responses. Another very attracting and exciting point of research should be the same endothelial cell apoptosis, since that there are *in vitro* and *in vivo* evidence for the anti-apoptotic effect of the same shear stress. This last concept brings with itself another important-one: that of “vascular ageing” as began from the “microvasculo-tissutal”one, and the last current tendencies run-on this looking forward novel therapies aimed to delay the process. In all these processes, a constant involvement of E.M., or many its structures, seems to be involved. At least, but not last, lymphatic pattern of haemorheology could be involved in many clinical trials: preliminary data suggest that also in these conditions E.M. plays an important role in steady-state keeping during physiologic activity of lymphatic capillaries, and patients treated with PKT plus conventional therapy (due to secondary limb lymphoedema) show a lower (-37%) benefit in oedema reduction when compared to those treated with a concomitant drugs capable to ameliorate E.M. activity.

Even if further experimental and clinical findings are obviously needed, data available today strongly continue to suggest the importance of E.M and their structures in better understanding the genesis and maintenance of several diseases, and spur us to continue in this important direction of research.

OSATO
INTERNATIONAL

