

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE
E PATOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO CEREBRALE
XVII CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DEGLI EFFETTI DEI COMPONENTI DEL
FUMO DI TABACCO IN CELLULE NEURONALI IN UN
MODELLO DI STRESS OSSIDATIVO IN VITRO**

**COORDINATORE
CHIAR.MO PROF. LUCIO ANNUNZIATO**

**TUTORE
CHIAR.MO PROF.
GIANFRANCO DI RENZO**

**CANDIDATA
DOTT. MICHELA RUSSO**

ANNO ACCADEMICO 2004-2005

INDICE

INTRODUZIONE	3
NICOTINA.....	5
<i>CHIMICA DELLA NICOTINA</i>	8
<i>METABOLISMO DELLA NICOTINA</i>	9
<i>MECCANISMO D'AZIONE</i>	11
Struttura molecolare dei recettori nicotinici	11
Effetti Farmacologici.....	13
Nicotina e malattie neurodegenerative	16
CONDENSATO	23
<i>TOSSICITÀ DEL CONDENSATO</i>	25
<i>EFFETTI DEI SINGOLI COSTITUENTI DEL CSC A LIVELLO DEL SNC</i>	28
STRESS OSSIDATIVO	33
<i>MECCANISMI DI DIFESA DAL DANNO DA STRESS OSSIDATIVO</i>	38
NICOTINA, CONDENSATO E STRESS OSSIDATIVO.....	40
TIPI DI DANNO CELLULARE INDOTTO DAL FUMO DI SIGARETTA	45
<i>APOPTOSI E NECROSI</i>	45
SCOPI DEL LAVORO.....	48
MATERIALI E METODI.....	50
LINEA CELLULARE E COLTURA.....	50
STRESS OSSIDATIVO	52
VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE ATTRAVERSO IL TEST DEL TRYPAN BLUE	53
DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE VALUTATA COME ATTIVITÀ MITOCONDRIALE (MTT TEST)	53
RILEVAZIONE DELLA PRODUZIONE DEI RADICALI LIBERI MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA ATTRAVERSO IL PROBE DCF.....	54
PROTOCOLLO SPERIMENTALE	55
HOECHST-33258	55
AGENTI UTILIZZATI	56
RISULTATI	57
EFFETTO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI NICOTINA SULLA VITALITÀ CELLULARE.....	57
EFFETTO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI t-BOOH SULLA VITALITÀ CELLULARE.....	58
STUDIO DELL'EVENTUALE EFFETTO NEUROPROTETTIVO DELLA NICOTINA DA DANNO OSSIDATIVO	59
EFFETTO DI UNA PRE-INCUBAZIONE ALLA NICOTINA SUL DANNO CELLULARE DA t-BOOH.....	60
EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A DIVERSE CONCENTRAZIONI DI CSC SULLA VITALITÀ CELLULARE.....	61

EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE AL CSC SULLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI.	62
TIME-COURSE DELLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI STIMOLATA DALL'ESPOSIZIONE AL CSC.....	64
EFFETTO DELLA VITAMINA E SULLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI E SUL DANNO CELLULARE INDOTTI DA ESPOSIZIONE A CSC.....	65
DISCUSSIONE.....	68
NICOTINA.....	68
CONDENSATO	71
CONCLUSIONI.....	74
BIBLIOGRAFIA	75

INTRODUZIONE

La coltivazione, la masticazione e il fumo del tabacco erano noti agli indigeni dell'America e dell'Australia all'epoca delle prime esplorazioni europee in questi paesi. Nei secoli successivi, la pianta del tabacco comparve come un prodotto d'esportazione dalle nuove terre scoperte. La prima persona che impiantò e coltivò la pianta da tabacco, fu il francese Jean Nicot, in onore del quale il botanico e naturalista Jean Liebault denominò la pianta "**Nicotiana Tabacum**" e il principio attivo della pianta "**nicotina**".

Nel corso dei secoli sono stati studiati gli effetti del fumo e la farmacologia in particolare si è occupata degli effetti biologici e tossicologici della nicotina e del suo abuso.

Oggi il tabagismo costituisce un importante problema socio-sanitario su cui sono state condotte innumerevoli ricerche. È noto che il fumo di tabacco è costituito da due ingredienti: la nicotina e il condensato. Ciononostante, anche se sono ben conosciuti tutti gli effetti farmacologici della nicotina, poco si sa delle sostanze che costituiscono quello che viene chiamato "**condensato**".

La maggior parte degli studi finora svolti ha evidenziato gli effetti farmacologici della nicotina e del condensato a carico dell'apparato respiratorio e di riflesso su altri organi. Tuttavia, la tesi riguarderà prevalentemente alcuni effetti di nicotina e condensato a livello del sistema nervoso centrale (SNC) in cui gli aspetti della nicotina sono già stati ampiamente descritti e riportati in letteratura, mentre poco o niente si sa degli effetti che il condensato svolge a tale livello.

NICOTINA

La nicotina ha una lunga ed interessante storia scientifica che origina dagli studi di Possett e Reiman i quali per primi isolarono la nicotina dalle foglie di *Nicotiana Tabacum* nel 1828. Da questo momento in poi l'interesse per la nicotina e le sue azioni fisiologiche sono aumentate gradualmente e si sono sviluppate fino ad oggi.

I primi esperimenti farmacologici che coinvolgevano la nicotina cominciarono con Orfila nel 1843. A tali studi seguirono quelli di Langley e Dickinson i quali identificarono il primo sito di interazione della nicotina all'interno del sistema nervoso degli animali.

La nicotina è un alcaloide estratto dalla pianta del tabacco che assume colorazione bruna e tipico odore di tabacco dopo esposizione all'aria e si presenta in forma liquida. E' estremamente solubile in acqua dove forma immediatamente sali acquosi; la nicotina è altresì solubile in solventi organici.

Queste interessanti proprietà fisico-chimiche, le quali sono pH-dipendenti hanno un ruolo importantissimo sul tipo e il modo di utilizzo dei prodotti del tabacco e sono intimamente connessi ai processi biologici che avvengono nell'organismo. La nicotina

determina effetti fisiologici, farmacologici, psicologici, biochimici e tossicologici.

Quantificare la dose di nicotina, che deriva dal fumo di sigaretta, durante l'inalazione è un problema davvero complesso. Un sistema per calcolare la quantità di nicotina che si assorbe consiste nel misurare le differenze tra la nicotina inalata e quella esalata, che ovviamente si riduce per l'assorbimento nel tessuto polmonare. Ad ogni modo questa serie di studi comportano un problema di quantificazione analitica del reale assorbimento della nicotina. Si sta cercando in qualche modo di stabilire il livello di nicotina trattenuta in seguito ad un'inalazione. I fattori più importanti da prendere in considerazione sono costituiti dal sito di *uptake* della nicotina e se effettivamente essa viene assorbita come bolo. Questi due parametri hanno effetti significativi sulla natura e l'interpretazione dei dati farmacocinetici. [Goodman e Gilman 1999].

Quando la nicotina viene assorbita attraverso i polmoni, essa arriva direttamente al cuore, insieme al sangue ossigenato e raggiunge gli altri tessuti nel flusso sanguigno arterioso, rendendosi disponibile immediatamente al cervello: impiega, infatti, solo 7 secondi a raggiungerlo. Tale capacità ha fatto pensare che inalare fumo equivale ad iniettare nicotina direttamente nell'arteria carotide.

[Benowitz et al. 1997; Hukkanen et al. 2005]. Nell'uomo sono stati effettuati studi campionando il sangue dei fumatori prima e dopo aver fumato una sigaretta; i valori di nicotina nel plasma aumentano in un *range* di 0-50 ng/mL. Basandosi su questa osservazione è possibile fare alcune estrapolazioni per stimare il destino e la distribuzione della nicotina assorbita. Assumendo una media del peso corporeo di 70 Kg, il volume corrispondente di sangue è di circa 4 L con un picco medio di 25 ng/ml dopo aver fumato 1 mg di nicotina rilasciato dalla sigaretta. [Benowitz et al. 1990].

CHIMICA DELLA NICOTINA

E' composta da un anello piridinico cui è legato in posizione meta un anello pirrolidinico che presenta un azoto legato ad un gruppo metilico. Si tratta di una base levogira che può assumere differenti conformazioni, a seconda che il carbonio 3 dell'anello pirrolidinico si trovi dalla parte dell'idrogeno 4 dell'anello piridinico (conformazione I), o si trovi dal lato del carbonio 2 dell'anello piridinico (conformazione II). Il conformero I è più stabile del conformero II, tuttavia la conformazione preferita in soluzione è la II.

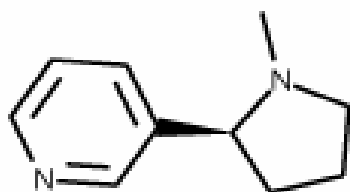


Fig1. struttura chimica della nicotina

METABOLISMO DELLA NICOTINA

La maggiore via di metabolizzazione nel corpo umano coinvolge la C-ossidazione attraverso l'isoenzima P4502A6 per formare la (-)-cotinina, che è il principale metabolita della nicotina nel cervello. [Soto-Otero et al. 2002]. Il fegato è il maggiore organo che detossifica la nicotina. Altri tessuti che partecipano all'eliminazione della nicotina sono i polmoni ed i reni. La conversione metabolica della nicotina a cotinina è un processo relativamente lento paragonato alla distribuzione totale della nicotina all'interno del corpo. A questo proposito, alcuni studi mostrano la distribuzione utilizzando sigarette con nicotina marcata. Simultaneamente la formazione della cotinina viene determinata allo stesso modo e con questo metodo si valuta la velocità di conversione della nicotina a cotinina. In condizioni normali, ciascuna sigaretta eleva la dose di nicotina nel corpo e ciò contribuisce al *pool* di cotinina e di altri metaboliti.

La quantità di nicotina presente in ciascuna sigaretta va dai 0.5 mg a 2 mg e dipende essenzialmente dalle condizioni di crescita della pianta e dalla lavorazione.

La nicotina interagisce con siti recettoriali nicotinici dislocati a livello dei gangli del sistema nervoso periferico (SNP), a livello del SNC e a livello delle giunzioni neuromuscolari.

MECCANISMO D'AZIONE

I recettori nicotinici sono ampiamente espressi nel sistema nervoso dove essi portano la trasmissione colinergica alle sinapsi nei gangli periferici in varie aree del cervello. Nel SNC, l'innervazione colinergica che agisce attraverso i recettori per l'acetilcolina (ACh) regola processi come il rilascio di trasmettitori, l'eccitabilità cellulare e l'integrazione neuronale, operazioni cruciali per il mantenimento della rete neurale e per le funzioni fisiologiche. Il sistema colinergico, infatti, può essere considerato il più importante e vecchio sistema dal punto di vista filogenetico.

Struttura molecolare dei recettori nicotinici

I recettori nicotinici dell'acetilcolina (ACh) sono recettori canale che presentano differenti sottotipi, ciascuno dei quali ha caratteristiche farmacologiche, e fisiologiche differenti, e tessuto-specificità relativa ai siti di distribuzione. Essi appartengono alla superfamiglia dei canali ionici operati da ligandi che includono i recettori dell'acido gamma aminobutirrico (GABA_A E GABA_C), la glicina e la 5-idrossitriptamina. [Lena et al. 1997].

Alcuni studi hanno dimostrato l'eterogeneità dei recettori nicotinici. Esistono dodici geni che codificano per le subunità del recettore nicotinic. Tali geni sono stati clonati e divisi in due sottofamiglie di 9 subunità neuronali α (α_2 - α_{10}) e tre subunità β (β_2 - β_4). [Lindstrom et al. 2000]. Le subunità α presentano due cisteine adiacenti che sono omologhe a quelle in posizione 192-193 della subunità α_1 del recettore muscolare nicotinic, laddove nelle subunità β mancano le due cisteine adiacenti. Le due subunità insieme contribuiscono alla specificità farmacologica del recettore. [Luetje et al. 1991].

Le subunità α possono essere presenti da sole, formando canali omomerici, o combinarsi con le subunità β formando canali eteromerici. Si presume che sia le unità omomeriche che eteromeriche del recettore della nicotina abbiano una struttura pentamerica, con le subunità organizzate intorno ad un canale centrale: i recettori omo-oligomerici hanno cinque siti di legame identici per l'ACh, mentre i recettori etero-oligomerici hanno due subunità α e tre β e quindi ci sono due siti di legame per molecole localizzate all'interfaccia tra le subunità α e β . Da un punto di vista funzionale i diversi sottotipi recettoriali possono esistere in quattro distinte conformazioni: a riposo, aperti, e due stati in cui i canali chiusi sono desensibilizzati, I o D, e che risultano refrattari

all'attivazione rispettivamente nell'ordine di millisecondi (I) o di minuti (D), e che presentano alta affinità per agonisti. In sistemi eterologhi, l'espressione delle subunità α_7 - α_9 da sole produce canali a recettore omomero, attivati da ACh e bloccati da concentrazioni nanomolari di alfa-bungarotossina, che presentano inoltre, alta affinità al calcio e vengono rapidamente desensibilizzati. [Gotti et al. 2004]. Infatti, studi sui recettori α_7 hanno dimostrato che essi sono altamente permeabili allo ione calcio, come i recettori per l'NMDA, ma a differenza di questi ultimi non richiedono la depolarizzazione della membrana plasmatica per promuovere influssi di calcio. Alte concentrazioni di calcio, infatti, facilitano il rilascio del neurotrasmettitore; quando i recettori α_7 sono attivati, il calcio entrante depolarizza le cellule post-sinaptiche e agisce come secondo messaggero per iniziare processi cellulari importanti, e tra queste la sopravvivenza neuronale. [Messi et al. 1997]. Le funzioni del recettore α_7 sono modulate anche da altri ioni divalenti come zinco, magnesio, piombo e cadmio [Hogg et al. 2003].

Effetti Farmacologici

Nel Sistema nervoso periferico, la principale azione si esplica a livello dei gangli autonomi. Essa consiste in una iniziale

stimolazione seguita da una persistente depressione dei gangli. Un'azione bifasica si verifica pure a carico della midollare del surrene (basse dosi stimolano il rilascio di catecolamine mentre dosi più alte prevengono il rilascio delle stesse). Bifasica è anche l'azione della nicotina a livello della giunzione neuro-muscolare dove però l'azione iniziale di tipo stimolatorio è molto breve e quindi c'è una rapida insorgenza della paralisi muscolare.

Nel *Sistema Nervoso Centrale*, la nicotina determina fondamentalmente effetti di tipo stimolatorio: aumentata attività psicomotoria, migliorata funzione cognitiva, migliorata capacità di concentrazione e d'attenzione, tremori, stimolazione dei centri del respiro, vomito, convulsioni. La depressione (grave) si verifica con dosi molto elevate e comunque sempre dopo una fase di stimolazione. Sono descritte interazioni con altri sistemi neurotrasmettitoriali: la nicotina agisce su recettori nicotinici presinaptici determinando l'aumentato rilascio di altri neurotrasmettitori, quali ad esempio la **dopamina** nell'area ventro-tegmentale [Goodman e Gilman 1999].

L'esposizione cronica alla nicotina determina una "*up regulation*" dei recettori nicotinici con meccanismo non ancora chiarito. [Benowitz 1996].

E' descritta anche la liberazione da parte dell'ipotalamo di ADH (ormone antidiuretico) e la riduzione (con meccanismo incerto) del tono della muscolatura scheletrica da parte della nicotina.

La nicotina è anche in grado di svolgere azione anoressizzante e rinforzante. Quest'ultima è probabilmente correlabile all'attivazione indiretta dei neuroni dopaminergici mesencefalici.

Nel sistema cardiovascolare, in conseguenza della stimolazione simpatica gangliare e della midollare surrenalica si ha un aumento della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa. Un contributo a tali effetti è dato dalla attivazione dei chemocettori aortici e carotidei e dell'aumentata liberazione di glucocorticoidi.

Il tratto gastrointestinale presenta un aumento del tono e della peristalsi intestinale in conseguenza dell'attivazione dei gangli parasimpatici.

Nicotina e malattie neurodegenerative

Il potenziale beneficio terapeutico espletato dalla nicotina nel Morbo dell'Alzheimer è basato sul fatto che la nicotina aumenta la memoria negli animali, in soggetti sani e nei pazienti affetti da Alzheimer. [Newhouse et al. 1997]. L'attivazione dei recettori dell'ACh modulano il rilascio di diversi neuromediatrici [Wonnacott et al. 1997] che regolano meccanismi fisiologici importanti incluse le funzioni cognitive. La somministrazione dell'antagonista nicotinico mecamilamina a soggetti di media età e a pazienti affetti da Alzheimer ha mostrato un indebolimento cognitivo progressivo. [Newhouse et al. 2000].

La somministrazione in acuto di nicotina a pazienti affetti da Alzheimer ha dato come risultato un miglioramento delle performance nell'apprendimento, nella memoria a breve termine e nell'attenzione. [Jones et al. 1992]. L'effetto terapeutico non sembra diminuire durante la somministrazione cronica [Wilson et al. 1995].

Sebbene gli studi epidemiologici mostrino dati conflittuali in merito al fatto che il fumo potrebbe rallentare l'insorgenza dell'Alzheimer [Van Duijn et al. 1995], i dati sperimentali suggeriscono invece che gli effetti positivi contro la β -amiloide potrebbero essere ottenuti

stimolando il recettore nicotinico dell'ACh [Kihara et al. 1997, Zamani et al. 1997], cosa che potrebbe avere grosse implicazioni per il futuro.

E' noto che un deficit o una mutazione nella neurotrasmissione colinergica è stata osservata in un grande numero di disordini neurologici, ma in particolare nella malattia dell'Alzheimer, il sistema colinergico è il target principale. Ovviamente ciò non preclude il coinvolgimento di altri sistemi di neurotrasmissione, anche se il deficit colinergico osservato nell'Alzheimer precede cronologicamente di molto i deficit funzionali e fisiologici di altri sistemi di neurotrasmissione. Ciò ha condotto alla conclusione che il deficit presente in altri sistemi neurotrasmettitoriali può essere una conseguenza di un danno sul sistema colinergico. Le placche senili caratteristiche della malattia dell'Alzheimer sono generate da una deposizione nel cervello umano di fibrille del peptide β -amiloide, un frammento derivato dalla processazione proteolitica del precursore della proteina amiloide. La proteina precursore dell'amiloide (APP) appartiene ad una famiglia di glicoproteine transmembrana presenti ubiquitariamente in diversi tipi di cellule. [Maccioni et al. 2001].

Diversi studi hanno messo in evidenza la correlazione la β -amiloide e il sistema colinergico [Zamani et al. 2001], e in molti casi la tossicità da β -amiloide può essere significativamente indotta attivando il sistema nicotinico.

Il grado di protezione è significativamente maggiore quando i campioni sono pretrattati con nicotina per 5 giorni (in cronico) piuttosto che con 15 minuti di esposizione alla nicotina [Zamani et al. 1997]. L'effetto protettivo della nicotina è mediata da recettori. Infatti, la co-somministrazione di mecamilamina e nicotina a colture ippocampali per cinque giorni ha diminuito significativamente la neuroprotezione esercitata dalla nicotina. Il pretrattamento con mecamilamina da sola non modifica la vitalità neuronale né previene la tossicità da β -amiloide. [Kihara et al. 1997,1998].

Il sistema muscarinico non sembra essere implicato nella neuroprotezione, dato che l'applicazione della muscarina da sola non offre nessuna protezione alle cellule trattate con β -amiloide [Kihara et al. 1997]. Vi sono inoltre specifiche subunità dei recettori nicotinici la cui attivazione è responsabile della neuroprotezione. La citisina, un agonista specifico dei recettori α_4 - β_2 mostrano un effetto neuroprotettivo dose-dipendente.

Altri studi per contro hanno dimostrato che la subunità implicata è il recettore α_7 , dato che l'agonista parziale 3-(4-idrossi-2-metossibenzilidene) anabaseina ha mostrato effetti protettivi contro la tossicità indotta da β -amiloide. Tuttavia, la mancanza di protezione contro la β -amiloide dopo esposizione acuta alla nicotina contrasta con gli studi finora riportati. Le spiegazioni possibili per questo tipo di risposta possono essere ricercate nelle concentrazioni di β -amiloide, l'invecchiamento delle placche e la durata dell'esposizione dei neuroni al frammento amiloide.

In concomitanza con la ridotta tossicità da β -amiloide è stato riscontrato anche un rilascio ridotto di ACh e dopamina, e una riduzione nell'attività della colina acetiltransferasi. [Itoh et al. 1996].

Altri dati raccolti nel corso degli anni, inoltre, dimostrano come non solo i recettori nicotinici siano coinvolti nella neuroprotezione esercitata dalla nicotina, ma come la nicotina sia in grado di prevenire l'attivazione attraverso il β -amiloide della fosfolipasi A2 e della fosfolipasi D, ma non sia in grado di interferire con l'attivazione della fosfolipasi C. Ciò implicherebbe il coinvolgimento di un *pathway* di acetilcolinico atipico, non sensibile all'azione di farmaci come l'esametonio e la D-tubocurarina. Il rifornimento continuo della nicotina nel SNC di pazienti fumatori potrebbe

comportare una *downregulation* del sistema colinergico che ha come conseguenza un rilascio aumentato di neurotrasmettitore alle sinapsi colinergiche; ciò potrebbe spiegare in parte il miglioramento delle funzioni cognitive in pazienti affetti da Alzheimer ma anche nei controlli sani.

La nicotina può indurre anche la produzione di fattori trofici. In colture ippocampali sottoposte a vari frammenti di β -amiloide è stato visto che pretrattando le cellule con concentrazioni depolarizzanti di K^+ si induceva la produzione di una serie di fattori che le rendeva resistenti all'attacco della β -amiloide. La nicotina è in grado di depolarizzare le cellule attivando la subunità $\alpha 7$. [Pike et al. 1996]

Alcuni dati invece, suggeriscono che la nicotina può proteggere dal danno da β -amiloide inducendo il rilascio di forme modificate di β -amiloide. Queste forme modificate sono in grado di attivare i canali inattivatori rapidi del potassio. [Furukawa et al. 1996].

E' noto in letteratura che la forma fosforilata di Akt compare subito dopo l'applicazione di nicotina. Akt è una protein chinasi a serina/treonina ed è un effettore di PI3K (fosfatidilinositolo-3-kinasi) che quando è attivato fosforila Akt. Ciò è confermato dal fatto che la contemporanea somministrazione di LY294002 blocca

la fosforilazione di Akt indicando che PI3K è coinvolto nel processo, mentre l'antagonista delle MAPK, PD98059 non è in grado di inibire tale fosforilazione. [Shimohama et al. 2001]. E' stato inoltre riportato che l'attivazione di Akt porta all'iperespressione di Bcl-2. Bcl-2 e Bcl-x sono proteine antiapoptotiche in grado di prevenire la morte cellulare da parte di agenti tossici. [Matsuzaki et al. 1999]. La nicotina è in grado di attivare Akt; infatti, è stato osservato che un trattamento di 24 ore con nicotina incrementava i livelli di Bcl-2 e Bcl-x e il fatto che ciò accadesse in seguito al coinvolgimento di PI3K è confermato dalla inibizione esercitata da parte del composto LY294002. Questi risultati suggeriscono che la stimolazione del recettore nicotinico protegge i neuroni dalla citotossicità indotta dal glutammato, attraverso la stimolazione di PI3K, che a sua volta attiva Akt ed aumenta l'espressione di Bcl-2 e Bcl-x. [Shimohama et al. 2001]. Altri studi hanno dimostrato che la nicotina, agendo attraverso i recettori nicotinici, può aumentare la sopravvivenza neuronale contro una serie di agenti tossici. [Chen et al. 1995, Zamani et al. 1997]. In aggiunta a quanto finora detto, anche il recettore α_7 nicotinico possiede un ruolo importante nella neuroprotezione mediata da recettori. È stato osservato, infatti, che gli agonisti del recettori α_7 prevengono la tossicità indotta da

β -amiloide e l'attivazione di tale recettore promuove la sopravvivenza dei motoneuroni danneggiati nel midollo spinale. [Messi et al. 1997]. Anche il recettore $\alpha 7$ stimola la famiglia Src che a sua volta attiva la PI3K. [Shimohama et al. 2001].

CONDENSATO

Il condensato (CSC) è costituito da una miscela di circa 4.800 composti chimici che presentano attività genotossica e citotossica.

Le sigarette commerciali sono costituite assemblando diversi tipi di foglie di tabacco e di tabacco trattato [Carmines et al. 2002].

Durante questi processi di trattamento vengono addizionati umettanti come il glicerolo e il glicole propilenico al fine di aumentare la capacità di miscelamento del tabacco mentre gli ingredienti aromatici vengono utilizzati per completare le caratteristiche soggettive del fumo [Rustemeier et al. 2002]. Questi ingredienti includono composti non volatili come zucchero e liquirizia e composti volatili altamente aromatici come il mentolo, anisolo, alcool benzilico, vanillina e alcuni oli essenziali. Molti dei composti presentati sono naturalmente presenti nella foglia di tabacco. Altri tipi d'ingredienti utilizzati per aumentare l'aromaticità del tabacco sono alimenti quali il cioccolato e il cacao e spezie come vaniglia, crema di nocciole e zenzero. [Vanscheeuwijck et al. 2002]

La maggior parte degli ingredienti volatili aggiunti al tabacco nelle sigarette non subiscono pirolisi ma vengono trasferiti immutati al fumo di sigaretta [Smith et al. 2000].

Per essere analizzati questi composti vengono raccolti con la macchina da fumo ("*Puffing machine*") su un filtro. La macchina aspira fumo elettricamente e viene impostata seguendo una serie di parametri convenzionalmente accettati [Stabbert et al. 2003]. I composti vengono estratti da una sigaretta definita standard, e prodotta solo per la macchina da filtro. Queste sigarette sono IR4F e IR5F riferendosi rispettivamente ad un contenuto leggero e ultra-leggero di tabacco. [Borgerding et al. 1998].

Alla luce di quanto detto, risulta chiaro che è difficile predire che il danno da esposizione a CSC sia prodotto da una sostanza piuttosto che da altre, in quanto dalla trattazione che seguirà, risulterà chiaro come i componenti siano responsabili in eguale misura del danno e al tempo stesso nessuno di essi da solo è direttamente responsabile dell'interazione con siti bersaglio predefiniti.

La tossicità effettiva di un costituente chimico è funzione della concentrazione, del destino metabolico e della capacità di raggiungere tessuti target. Le mucose dell'albero respiratorio sono probabilmente la sede dove si verificano i principali danni istopatologici nei ratti esposti a fumo di tabacco. Tuttavia, è conosciuta la capacità di alcuni composti che costituiscono il

condensato (le nitrosamine, i composti aromatici) ad attraversare la barriera emato-encefalica e a indurre stress ossidativo nel cervello di ratto [Bhagwat et al. 1998].

TOSSICITÀ DEL CONDENSATO

La IARC (Agenzia Internazionale Per La Ricerca Sul Cancro) ha inserito il fumo di sigaretta e il fumo passivo nel I gruppo delle sostanze ambientali nocive.

Molti fattori possono contribuire all'effettiva tossicità del fumo di sigaretta e questi includono fattori quali la concentrazione, il destino metabolico, la potenza delle attività biologiche misurate e la lipofilia dei costituenti. Dei composti identificati nel CSC sono tossici in una serie di test *in vitro* che includono mutagenesi batterica (Ames test) aberrazioni cromosomiche in cellule CHO (*chinese hamster ovary*), scambi di cromatidi fratelli in cellule CHO; modifica della sintesi del DNA in epatociti di ratto. [Doolittle et al. 1990]. Ad ogni modo fare una correlazione comune tra proprietà biologiche e attività del CSC è improprio in quanto vi sono differenze chimiche e fisiche notevoli tra i componenti che lo compongono. [Smith et al. 2000].

La lipofilicità è causa anch'essa dell'effetto tossico del CSC. I composti che hanno alta lipofilicità, infatti, possono superare le barriere ad alto contenuto di lipidi come la barriera ematoencefalica [Hauptmann et al. 2001], e la placenta [Seller et al 1995], per citare i più importanti, e anche il fegato, dove i composti vengono modificati per permettere l'escrezione più rapida da parte dell'apparato renale. Tuttavia, proprio questo tentativo di detossificazione, porta invece alla formazione di metaboliti elettrofilici reattivi che possono legare DNA e proteine. [Hoffmann et al. 1996]. Quindi molti composti idrofobici che di per sé sarebbero innocui perché non in grado di raggiungere un sito di azione, con la modificazione del metabolismo di passaggio epatico, diventano invece potenzialmente dannosi. L'idrofobicità inoltre favorisce l'induzione del cit-P450, infatti, i composti idrofobici in concentrazione elevata possono anche svolgere una tossicità non specifica perturbando il doppio strato lipidico che circonda le cellule. [Hansch et al. 1995].

Le amine aromatiche sono ben rappresentate nel fumo di sigaretta nel fumo attivo e passivo. Si utilizzano come intermedi di fabbricazione nella confezione dei pesticidi, nei prodotti cosmetici e infine anche in alcuni composti farmaceutici. Tali composti si ritrovano in diversi tipi di sigarette. Tuttavia, la formazione delle

amine aromatiche cambia a seconda del tipo di sigaretta fumata. La considerazione che sta alla base della modificazione della composizione delle amine, ci viene in realtà dall'agricoltura, poiché come stabilito dal ciclo di Krebs, un minor contenuto di nitrato comporta una minore quantità di proteine e aminoacidi durante la crescita; quindi, l'ammontare della quantità di aminoacidi liberi che danno luogo poi alle amine aromatiche durante il fumo, diminuisce. [Stabbert et al. 2003]. Tali composti passano attraverso la barriera emato-encefalica e producono danni anche a quel livello, come dimostra un lavoro di Bhagwat che ha ricercato gli effetti della nicotina e di un composto chiamato 4-(*N*-metil-*N*-nitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (**NNK**), una nitrosamina, ritrovata nel cervello di ratto dove era in grado di produrre stress ossidativo a livello cellulare e mitocondriale. [Bhagwat et al. 1998].

EFFETTI DEI SINGOLI COSTITUENTI DEL CSC A LIVELLO DEL SNC

Alla luce di quanto affermato in precedenza andiamo adesso ad analizzare in maniera dettagliata i composti che fanno parte del CSC.

Si tratta per lo più di sostanze che hanno una struttura aromatica e quindi in generale lipofila.

In base alla classificazione eseguita da Rodgman [Rodgman et al. 2003] ritroviamo come prima classe quella degli idrocarburi aromatici polinucleari, gli aza-areni, le amine aromatiche, le amine-N-eterocicliche, le N-nitrosamine, le aldeidi semplici, gli acidi, i chetoni, i fenoli a catena lineare e quelli aromatici, gli idrocarburi volatili, gli eterocicli policlorurati, i composti nitro-organici, e una miscela di composti organici, tra cui compaiono l'acrilammide, il benzofurano, il DDT, e gli acidi ftalici. Vi sono poi composti inorganici, come ammonio, idrazina, ossido nitrico, biossido solforico. Non mancano inoltre i metalli dall'arsenico al mercurio e piombo fino al selenio. Vi è da dire comunque che questi composti chimici in parte vengono acquisiti durante i processi di lavorazione, in parte le quantità che ritroviamo sono già presenti nelle foglie di tabacco che risentono dell'inquinamento ambientale. Gli effetti tossicologici di uno specifico componente nel CSC è di solito derivato dall'estrapolazione dell'effetto osservato in

uno o più saggi biologici con il solo componente. È noto ormai che composti chimici presenti nel fumo di sigaretta sono sottoposti a modificazioni chimiche correlati all'accensione della sigaretta, il cosiddetto *tobacco burning*. In quest'ottica dobbiamo considerare la tossicologia dei composti da fumo: infatti, anche il processo di aspirazione e di combinazione con l'ossigeno nei polmoni può modificare le sostanze. Un esempio importante è costituito dalla conversione dell'NO a NO₂ che è significativamente differente nell'aerosol di sigaretta rispetto ad un sistema comprendente solo NO e O₂.

Un'ulteriore considerazione da aggiungere è che nei composti del fumo non sono presenti solo sostanze tossiche ma anche sostanze che hanno effetti anticarcinogeni e antimutageni. Tra queste sostanze sono comprese anche quelle che contrastano gli effetti di altri composti cancerogeni presenti nel fumo di tabacco. Tali composti sono estrapolati dalla tabella pubblicata nell'articolo di Rodgman. Gli idrocarburi alifatici saturi sono, per esempio, scarsamente reattivi e per questo non sono tossici. Il D-limonene è un composto attivo contro le nitrosamine. Benzene, naftalene e antracene, che di per sé sono sostanze che hanno un'attività tossica notevole, sono tuttavia utili perché riducono la tossicità degli idrocarburi aromatici policiclici. I fenoli a loro volta abbassano

la reattività d'idrocarburi aromatici policiclici e nitrosamine. Tra questi composti vi è anche una piccola quota di **vitamina E** che è attiva contro tutti i composti del CSC. Inoltre, sempre secondo questa tabella la nicotina avrebbe effetti positivi sulle nitrosamine, come pure la cotinina. La conclusione di quanto riportato è che il CSC ha un effetto citotossico e genotossico, il quale sarebbe attenuato da una serie di reazioni casuali dei composti chimici presenti che modificano le loro proprietà e quindi determinano a livello polmonare tipi diversi di danno nei soggetti fumatori.

Gli esempi riportati di seguito sono quelli di composti chimici che fanno parte del CSC e che sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica.

Un protipo di agente cancerogeno è costituito dal benzo[a]pirene. La sua cancerogenicità è aumentata quando applicato una volta come "iniziatore" (di una reazione chimica a catena) seguito poi dall'applicazione ripetuta di un promotore. Ciò indica che i promotori hanno un ruolo fondamentale nella progressione della cancerogenesi. Dato che il fumo di sigaretta coinvolge l'esposizione protratta ai costituenti del fumo, i co-carcinogeni simulano tale effetto. Una serie di 21 componenti del tabacco sono stati testati per verificare se mostravano un'attività co-carcinogenica. Le classi dei composti esaminati erano fenoli, idrocarburi alifatici, idrocarburi

aromatici non cancerogeni, acidi e alcoli a lunga a catena: catecolo, pirogallolo, decano, benzopirene, e un estere del forbolo; i controlli erano costituiti da acetone. Il catecolo, il fenolo più abbondante nel fumo di sigaretta, ha una forte attività co-carcinogenetica, ma non un'attività promuovente l'insorgenza dei tumori. Sette dei 21 composti testati hanno mostrato un'attività co-carcinogenetica; nessuno di questi però mostra un'attività statisticamente significativa come promotore tumorale da solo. Questi risultati hanno valore nell'ottica di simulare l'esposizione simultanea ai componenti per lunghi periodi di tempo. Il meccanismo di azione dei co-carcinogeni è sconosciuto, ma ciò che è sicuro è che, trattandosi di composti diversi i meccanismi di azione non possono essere simili ma soltanto comparabili. Quattro composti esaminati avevano la capacità di inibire completamente l'attività del benzopirene: i composti fenolici, esculina e quercetina, l'idrocarburo alifatico squalene e l'acido oleico, un acido grasso a lunga catena alifatica. [Rubin, 2001].

Uno studio relativamente recente [Luo et al. 2004] riporta un ruolo diverso del condensato, in quanto il CSC sarebbe in grado di contribuire alle aberrazioni cromosomiche nelle cellule. Infatti, questi ricercatori hanno osservato che il CSC induce dei ponti anafasici in cellule umane in coltura, che in breve condurrebbero ad

uno squilibrio genomico. La frequenza dei ponti indotti all'interno dell'intera popolazione decresce col tempo, e questo decremento non è dipendente dal *pathway* apoptotico mediato dalla proteina p53. Inoltre, il CSC produce danni alla doppia elica del DNA, sia nelle cellule in coltura che nel DNA purificato. Questo effetto viene mediato attraverso la produzione di specie ossigeno-reattive, dato che alcuni *scavenger* di ROS come la 2'-deossiguanosina-5'-monofosfato (dGMP) previene la formazione del ponte anafasico indotto dal CSC e lo squilibrio genomico. [Luo et al. 2004].

STRESS OSSIDATIVO

I radicali liberi sono presenti in tutti gli organismi aerobi come prodotti del metabolismo dell'ossigeno e la loro azione tossica sui sistemi biologici svolge un importante ruolo nel processo di invecchiamento.

Un radicale libero è una specie chimica che contiene uno o più elettroni spaiati, in altre parole un elettrone che occupa da solo un orbitale molecolare o atomico. Questa disposizione rende l'atomo o la molecola altamente instabili, per cui la reattività chimica dei radicali è generalmente molto elevata. A temperatura intorno a 37°C la maggior parte dei radicali è notevolmente reattiva così che la loro concentrazione diventa bassissima.

A livello cellulare i ROS sono prodotti soprattutto all'interno dei mitocondri nel corso delle reazioni della fosforilazione ossidativa che è rappresentata da un sistema multienzimatico (complessi I-V) le cui subunità proteiche sono in parte sintetizzate dal genoma mitocondriale.

Tra i radicali liberi, le specie molecolari che conosciamo sono: radicale superossido, radicale idroperossidico, perossido d'idrogeno, radicale ossidrilico.

Numerosi enzimi catalitici citosolici contribuiscono alla generazione del radicale superossido, al radicale ossidrilo e al perossido d'idrogeno. Localizzate all'interno della cellula, le ossidasi sono presenti in varie concentrazioni all'interno dei perossisomi. I perossisomi contengono anche diverse quantità di catalasi in grado di abolire potenzialmente i danni provocati dalla presenza di H_2O_2 . Il sistema xantina-ossidasi è un'altra fonte ben conosciuta generante ioni superossido, come indicato dalla sua abilità di ridurre il cit.C.

Nel corso delle reazioni proprie della fosforilazione ossidativa circa il 2% dell'ossigeno utilizzato non viene ridotto ad acqua ma trasformato in radicale superossido. Due componenti della catena respiratoria, l'ubichinone e il citocromo b566 del complesso III subiscono con l'avanzare dell'età, alterazioni funzionali tali da favorire l'iperproduzione di superossido, che attraverso una serie di reazioni chimiche può condurre alla formazione di un altro radicale altamente reattivo, il radicale idrossilico. Quest'ultimo è in grado a sua volta di reagire con lipidi, proteine, acidi nucleici, danneggiandoli irreversibilmente.

I composti derivanti da danno ossidativo possono accumularsi nella cellula -in particolare nel DNA- contribuendo a quelle alterazioni funzionali che si traducono in ciò che definiamo

invecchiamento. Al danno appare più sensibile il DNA mitocondriale rispetto al DNA nucleare, sia per la vicinanza che il primo presenta con la membrana mitocondriale interna, area in cui sono presenti gli enzimi della fosforilazione ossidativa, sia per la quasi totale assenza nel DNA mitocondriale di sequenze genomiche non codificanti, di istoni protettivi e di efficaci meccanismi di riparazione. Ciò giustifica la frequenza delle mutazioni riscontrabili con l'invecchiamento nel DNA mitocondriale rispetto al DNA nucleare.

Danni nel DNA mitocondriale possono dar luogo ad un'errata trascrizione del codice genetico ed all'alterazione di alcune proteine della fosforilazione ossidativa. Ciò da un lato comporta maggiore formazione di ROS ed un aumento del danno ossidativo nelle molecole organiche, dall'altro, riduzione nella capacità energetica della cellula. È chiaro che le alterazioni nell'espressione genica e nell'attività enzimatica sono mediati attraverso il ruolo multiplo delle vie di segnale che si incrociano nella cellula. Tra queste vie ci sono quelle delle protein-chinasi attivate da stress, SAPK che sono i mediatori centrali che propagano i segnali di stress dalla membrana al nucleo. Nelle cellule neuronali, stimoli potenzialmente deleteri come deprivazione di fattori trofici, radiazioni UV, radicali liberi, ipossia, ischemia, shock termico e citochine provocano una risposta

intracellulare allo stress che conduce all'apoptosi o a adattamenti difensivo-protettivi. Le SAPK e i loro effettori a cascata sono le principali molecole coinvolte in questa risposta bifasica che può sfociare in neurodegenerazione o neuroprotezione che dipende dalle condizioni cellulari e ambientali così come la cooperazione con altre vie di segnale. JNK/SAPK e p38/SAPK2 sono le SAPK meglio conosciute. Anche nell'Alzheimer è riconosciuto il ruolo di SAPK come modulatore patologico, anche se più ricerche devono essere fatte in questo senso. [Zhu et al. 2004].

La ridotta capacità funzionale mitocondriale, ed il conseguente deficit energetico, sembra sia di fondamentale importanza in quel meccanismo di morte neuronale, che viene definita di eccitotossicità lenta, indotta dall'attivazione dei recettori degli aminoacidi eccitatori quali il glutammato. L'accumulo di calcio intraneuronale, dovuto all'attivazione dei canali del glutammato, nonché alla pompe protoniche di membrana, è a sua volta causa di tutta una serie di alterazioni funzionali e morfologiche della cellula nervosa che danno luogo ad una progressiva riduzione dell'attività ed infine alla morte neuronale. [Annunziato et al. 2003].

Il deficit energetico legato al danno mitocondriale appare dunque essere di primaria importanza nel determinismo di quelle

alterazioni della cellula nervosa che sono alla base della stragrande maggioranza di patologie neurodegenerative.

MECCANISMI DI DIFESA DAL DANNO DA STRESS OSSIDATIVO

Esiste un apparato di difese cellulari per controbilanciare la presenza dei ROS nella cellula. Questo tipo di difese comprendono sia antiossidanti enzimatici che non enzimatici che abbassano le concentrazioni allo stato stazionario dei radicali liberi e riparano i danni ossidativi cellulari. Gli scavenger sono compartimentalizzati in organelli subcellulari; tra questi sono presenti la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi (CT) e la glutatione-perossidasi (GSH-Px) che non solo sono distribuite nel citosol ma si trovano anche nel mitocondrio, dove sono prodotti la maggior parte di radicali liberi intracellulari.

Ci sono tre isoforme di SOD: una isoforma extracellulare di SOD ed una SOD intracellulare rame/zinco; vi è inoltre una terza isoforma, la manganese SOD mitocondriale. Tutte e tre convertono lo ione superossido a perossido d'idrogeno. La maggior parte del perossido d'idrogeno prodotto nel cervello è rimosso dalla glutatione-perossidasi (GSH-Px). Il GSH è il principale tiolo a basso peso molecolare presente nel citoplasma e rappresenta la maggiore riserva di cisteina. Il GSH in combinazione con il riducente NADPH può ridurre i lipidi perossidici, i radicali liberi, e H_2O_2 . Anche la

catalasi, presente a basse concentrazioni nel cervello, rimuove il perossido d'idrogeno. L'ossidazione ciclica ad un elettrone e la riduzione del chinone endogeno è anch'esso una fonte di ione superossido intracellulare. Il complesso formato da NADPH chinone-reduttasi, usando in maniera ambivalente sia NADPH che NADH, riduce i chinoni presenti a composti meno tossici, gli idrochinoni.

La transferrina lega ferro e quindi limita la sua compartecipazione nella perossidazione lipidica. La ceruloplasmina ossida il ferro senza il rilascio dei ROS e inibisce la perossidazione lipidica. L'acido urico lega tenacemente il ferro e il rame, spazza via i radicali, e inibisce la perossidazione lipidica. Le proteine quali le metallotioneine e l'eme-ossigenasi vengono prodotte in seguito a stress ossidativo, e presentano anch'esse funzioni antiossidanti. Le **vitamina E** e la **vitamina C** sono dei composti antiossidanti molto potenti, il primo è altamente lipofilo, a differenza del secondo che invece è altamente idrofilo. [Reichman et al. 2000].

NICOTINA, CONDENSATO E STRESS OSSIDATIVO

Non molti studi hanno esaminato la relazione tra nicotina e stress ossidativo. Ciò sembra sorprendente soprattutto alla luce di quanto osservato recentemente. Infatti, studi epidemiologici suggeriscono che il fumo di sigaretta sia inversamente proporzionale all'incidenza della malattia di Parkinson, [Morens et al. 1995] e ad una maggiore latenza nello sviluppo dell'Alzheimer [van Duijn et al. 1991], affezioni in cui si ritiene che lo stress ossidativo possa svolgere un certo ruolo nel determinismo del danno neuronale.

Gli studi che hanno esaminato la relazione tra nicotina di per sé e lo stress ossidativo, sono stati effettuati in vitro usando differenti tipi cellulari. Yildiz et al (1999) hanno dimostrato che la nicotina è in grado di ridurre i livelli di glutathione, aumentare i livelli di malondialdeide (MDA) e della lattato deidrogenasi (LDH) in cellule CHO. Mentre l'aumento dei livelli di MDA è un indicatore di perossidazione lipidica, l'incremento di LDH indica il danno ossidativo a livello delle membrane cellulari come risultato di danno citoplasmatico causato dalla perossidazione lipidica. Che la nicotina e i suoi enantiomeri inducessero danno ossidativo era dimostrato dal fatto che l'aggiunta di enzimi detossificanti i radicali, come la

SOD e la catalasi al mezzo di coltura inibiva le riduzioni di GSH e l'aumento di LDH indotto dalla nicotina. L'effetto pro-ossidante è stato successivamente confermato dallo stesso Autore (1999), nello stesso modello cellulare, in cui si paragonavano gli effetti della nicotina pura a quella derivante da un estratto di tabacco non fumato.

Tale attività ossidativa della nicotina è stata anche dimostrata in vivo negli esperimenti che hanno utilizzato tessuto pancreatico omogeneizzato di ratti, in cui è stata trovata una correlazione positiva tra la dose di nicotina e la perossidazione lipidica, e tale risposta indotta dalla nicotina è stata abolita utilizzando SOD e catalasi. [Wetscher et al. 1995].

Questi studi forniscono una forte evidenza che la nicotina è in grado di per sé stessa di indurre stress ossidativo almeno nelle CHO in coltura. I meccanismi della generazione dei radicali liberi da parte della nicotina non sono chiari. È stato riportato che la nicotina è in grado di alterare la catena respiratoria mitocondriale con conseguente aumento della generazione degli anioni superossido e perossido d'idrogeno. [Gvozdjakova et al. 1992; Torok et al. 2000]. Al contrario, una serie di dati presenti in letteratura suggerisce che la nicotina espliciti un effetto antiossidante. Infatti, Guan (2002) ha

dimostrato che la nicotina è in grado di determinare un aumento della sopravvivenza cellulare in cellule PC12 differenziate esposte all'agente ossidante H_2O_2 , e di inibire la produzione di perossidazione lipidica. Gli effetti antiossidanti della nicotina sono stati anche dimostrati in un sistema in vitro privo di cellule. [Ferber et al. 1998]. Lo stesso effetto neuroprotettivo della nicotina è stato messo in evidenza anche in modelli di malattie neurodegenerative sia in vitro che in vivo. Infatti, la nicotina si è dimostrata in grado di migliorare in maniera significativa la sopravvivenza cellulare e di inibire la produzione della perossidazione lipidica in cellule esposte alla β -amiloide, modello in vitro utilizzato per lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nel determinismo del morbo di Alzheimer. D'altro canto, la nicotina *in vivo* è in grado di esercitare un effetto neuroprotettivo sui terminali dopaminergici nigrostriatali in un modello di morbo di Parkinson indotto nel ratto mediante la somministrazione di 6-OH-dopamina.[Soto-Otero et al. 2002].

Per quanto riguarda l'effetto antiossidante, è stato ipotizzato che tale proprietà sarebbe legata alla capacità da parte della nicotina di chelare il ferro attraverso l'anello piridinico: due molecole di nicotina chelano un atomo di ferro, sotto forma ferrosa, impedendo la seguente reazione

$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\cdot + \text{OH}^-$; in tal modo non si forma il radicale libero. In assenza di nicotina, il radicale **HO^\cdot** reagisce con i composti lipidici della cellula provocando reazioni di perossidazione a catena [Soto-Otero et al. 2002].

Esistono infine dati sperimentali che negano che la nicotina espliciti un effetto pro-ossidante o antiossidante. Infatti, è stato dimostrato *in vitro* che su tessuti neocorticali di ratti di 5 mesi trattati con varie dosi di nicotina non ci sono differenze significative nella produzione della perossidazione lipidica dei ratti trattati rispetto ai controlli. In esperimenti *in vivo*, ratti di 2 mesi trattati con 0.8mg/Kg di nicotina due volte al giorno per 4 giorni non mostravano una riduzione significativa dei ROS nella neocorteccia, nell'ippocampo e nel neostriato, né vi era una significativa riduzione della perossidazione lipidica, sebbene per contro, i ratti trattati con nicotina hanno dimostrato una performance cognitiva aumentata nel test del *water maze* rispetto ai controlli. [Linert et al. 1999].

Per quanto riguarda il CSC, Nel fumo di sigaretta sono stati identificati due differenti gruppi di radicali liberi: radicali a lunga vita nella fase corpuscolata (fase TAR) e radicali a vita breve, nella fase aeriforme (fase gas). I primi arrivano ai bronchi e agli alveoli,

e producono il danno radicalico a tale livello. Quelli presenti nella fase aeriforme agiscono a livello delle vie aeree superiori.

TIPY DI DANNO CELLULARE INDOTTO DAL FUMO DI

SIGARETTA

APOPTOSI E NECROSI

L'apoptosi è una risposta programmata ben definita che comporta modificazioni precise all'interno della cellula con cambiamenti biochimici e morfologici, come la condensazione e la frammentazione del materiale nucleare. Parecchie condizioni patologiche danno luogo ad una apoptosi impropria, tra queste ricordiamo i processi di cancerogenesi e delle patologie neurodegenerative. La necrosi è invece una risposta passiva a stimoli ambientali estremi come calore, raggi ultravioletti ed è caratterizzata da un rigonfiamento cellulare, perdita dell'integrità di membrana ed eventuale lisi cellulare. Gli effettori meglio caratterizzati nella morte cellulare di tipo apoptotico sono le caspasi, una famiglia di proteasi a cisteina che interagiscono l'una con l'altra in modo gerarchico. [Thornberry et al 1998]. Un primo *pathway* coinvolge l'induzione dell'apoptosi attraverso il legame dei recettori di morte cellulare presenti sulla superficie della cellula, come *Fas* e *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Questo *pathway* viene

chiamato estrinseco e comporta un'autoattivazione della caspasi-8, e il seguente clivaggio a procaspasi-3 nelle sue subunità attive.

Il *pathway* intrinseco riguarda quello mitocondriale che può essere attivato in risposta a stimoli di stress ossidativo e comporta il rilascio da parte del citocromo c del mitocondrio che inizia la formazione del complesso apoptosoma. L'apoptosoma che consiste di APAF-1, il citocromo-C, e la caspasi-9 in presenza di dATP si ha l'autoattivazione della caspasi-9 ed ancora l'attivazione dell'effettore caspasi-3. [Li et al. 1997]. Attraverso il clivaggio di una serie di substrati cellulari, la caspasi-3 inizia molti dei cambiamenti chiave riportati durante l'apoptosi. È stato dimostrato che una interferenza qualsiasi con uno o più di questi stadi può inibire l'intero processo apoptotico. [Concha et al. 2002].

Le specie ossigeno-reattive (ROS) sono molecole implicate nel processo apoptotico. I ROS, in maniera dipendente dalle loro concentrazioni, sono in grado sia di promuovere l'apoptosi sia di inibirla. [Hampton et al. 2002]. Alcuni studi hanno anche dimostrato che composti ossidanti come il perossido di idrogeno, inibiscono i processi apoptotici; è stato proposto che l'inibizione della cascata delle caspasi e l'attivazione della poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) sia un possibile meccanismo per l'inibizione

mediata da ossidanti dell'apoptosi. La PARP è una famiglia di proteine, recentemente scoperte, coinvolte nella riparazione del DNA che viene danneggiato in seguito all'attivazione del *pathway* dell'apoptosi. [Amé et al. 2004].

Per quanto riguarda gli effetti della nicotina molti lavori indicano che questo alcaloide può avere sia effetto proapoptotico, sia prevenire l'apoptosi.

Per quanto riguarda le cellule trattate con CSC attraverso l'aggiunta di citocromo-c e dATP, non si produce un'attivazione delle caspasi-3 e delle caspasi -9. Ciò indica che il CSC può alterare i livelli dei fattori proapoptotici e antiapoptotici nei mitocondri e impedire di fatto la formazione dell'apoptosoma. Ciò permette di suggerire che la morte cellulare che si verifica nelle cellule dopo trattamento con CSC sia dovuto essenzialmente a necrosi e non ad apoptosi. [Wickenden et al. 2003].

SCOPI DEL LAVORO

Come emerge dalla letteratura presa in considerazione e citata nell'introduzione non è ancora chiaro se la nicotina esplica un'azione pro-ossidante o antiossidante a livello del SNC e quali sono gli effetti del CSC a livello neuronale.

Lo scopo del lavoro presentato in questa tesi è stato quello di chiarire quali fossero gli effetti delle due componenti del fumo, nicotina e CSC, a livello neuronale in diverse condizioni sperimentali. In particolare:

1. Abbiamo studiato l'effetto di numerose concentrazioni di nicotina su neuroni in coltura, al fine di individuare eventuali concentrazioni tossiche.
2. Per valutare l'eventuale effetto neuroprotettivo, rivelato in alcune condizioni sperimentali in cui si ipotizza un danno ossidativo, è stato esaminato l'effetto della nicotina sul danno neuronale indotto da un agente ossidante, il *tert*-butile idroperossido, in grado di indurre apoptosi neuronale attraverso la produzione di ROS [Amoroso et al. 1999, 2002].
3. In maniera analoga, abbiamo effettuato esperimenti anche sul danno indotto da condensato, determinando le

concentrazioni tossiche ed indagando sul possibile meccanismo dell'effetto neurotossico. In particolare è stata valutata l'ipotesi che il danno fosse provocato dai ROS, considerato che in letteratura pochissimi dati esistono sugli effetti del CSC a livello neuronale.

4. Infine, poiché la vit.E è uno scavenger dei radicali liberi [Martin et al. 1981], abbiamo esaminato l'ipotesi che tale vitamina sia in grado di inibire il danno prodotto da CSC.

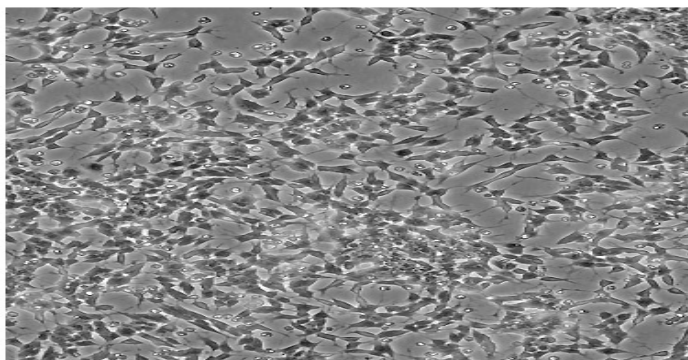
MATERIALI E METODI

LINEA CELLULARE E COLTURA

Le cellule SH-SY5Y sono un subclone derivato dalla linea cellulare umana di neuroblastoma. Hanno piccoli corpi cellulari rotondi, citoplasma allungato, neuriti che assomigliano a processi citoplasmatici e formano densi aggregati (pseudogangli).

Questo clone esprime tirosina -idrossilasi e dopamina β -idrossilasi, che sono enzimi specifici dei neuroni catecolaminergici, e trasportatori della dopamina.

Le cellule inoltre esprimono le subunità α_3 , α_5 , α_7 e β_2 e β_4 del recettore nicotinico dell'Acetilcolina.



Le cellule sono state piastrate a monostrato in piastre di polistirene, e mantenute in coltura

Foto al microscopio.: cellule SH-SY5Y a confluenza.

con RPMI medium, 10 % di siero fetale bovino, 1% della soluzione 100 x di aminoacidi non essenziali, 100IU/mL di penicillina e 100 μ g/mL di streptomina L-glutamina.

Le cellule sono state coltivate in un incubatore umidificato a 37°C, e con il 5% di CO₂.

STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è stato indotto esponendo le cellule al tert-butile idroperossido. L'esposizione delle cellule SH-SY5Y a tale ossidante in grado di permeare le membrane causa un rapido aumento della formazione di radicali liberi che a loro volta sostengono un forte aumento del calcio intracellulare [Amoroso et al. 1999].

VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE ATTRAVERSO IL TEST DEL TRYPAN BLUE

Le cellule tripsinizzate in coltura sono state centrifugate e colorate con il colorante Trypan Blue. 50 μ L di Trypan Blue vengono preventivamente diluiti con 50 μ L di PBS; da questa soluzione si prelevano 90 μ L di colorante a cui vengono aggiunti 10 μ L di cellule in sospensione. La conta è stata realizzata su una media di 9 quadrati della cameretta di Bürker. Le cellule in cui il colorante non è riuscito ad entrare attraverso la membrana cellulare sono quelle vive.

DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE VALUTATA COME ATTIVITÀ MITOCONDRIALE (MTT TEST)

La vitalità cellulare valutata come attività mitocondriale è stata quantificata misurando l'attività deidrogenasica delle cellule in coltura, utilizzando il saggio dell'1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT). Il saggio è basato sulla capacità delle cellule vive di convertire il composto MTT solubile nel sale insolubile formazano. La quantità di formazano prodotto è quindi, proporzionale al numero di cellule vive.

La tecnica consiste nell'incubare le cellule in 1 mL di soluzione di MTT (0.5 mg/mL) per 1 h in incubatore. In seguito, il medium viene rimosso e le cellule vengono trattate con 1 mL di DMSO, che è un composto organico in grado di solubilizzare il sale di formazano. L'assorbanza viene letta a 540 nm.

RILEVAZIONE DELLA PRODUZIONE DEI RADICALI LIBERI MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA ATTRAVERSO IL PROBE DCF

Il dosaggio dei radicali liberi è stato effettuato mediante l'utilizzo di un probe fluorescente il 2'-7' -diclorofluoresceina di acetato (DCF). Questo composto è idrolizzato dalle esterasi cellulari a 2'-7'-diclorofluoresceina, una molecola non fluorescente che viene ridotta a 2'-7' DCF dai radicali liberi presenti nella cellula. In questo modo diviene visibile al microscopio a fluorescenza, attraverso l'utilizzo di particolari filtri che permettono di rilevare l'emissione dei radicali. A questo scopo le cellule SH-SY5Y sono incubate al buio per mezz'ora con una soluzione di PBS completo contenente 2 μ L di DCF. I vetrini alla fine della mezz'ora sono stati lavati con una soluzione di PSB completo per due volte in maniera tale da eliminare tutta la fluorescenza residua.

Le immagini sono state poi acquisite attraverso una telecamera CoolSnap (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA) e successivamente analizzate usando il software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc.).

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Le cellule vengono piastrate in una multiwell da 24 (2 x 105 cellule) e si lasciano in incubatore (37°C, CO2 5%) senza cambiare il mezzo.

Si elimina il mezzo di coltura, si sostituisce con mezzo fresco e direttamente nel mezzo di coltura, si incubano le cellule i diversi agenti (nicotina, condensato, vit. E etc.) per i tempi esplicitati nei risultati.

HOECHST-33258

La metodica della colorazione nucleare con Hoechst-33258 è stata usata per valutare la morfologia nucleare, tipicamente alterata in caso di apoptosi. Le cellule SH-SY5Y sono state fissate con paraformaldeide al 4% e poi incubate per 5 minuti in PBS contenente 1 µM/ml di Hoechst-33258 a 37 °C. Quindi, i vetrini

sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza Eclipse E400 (Nikon, Torrance, CA, USA). Le immagini sono state poi acquisite attraverso una telecamera CoolSnap (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA) e successivamente analizzate usando il software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc.).

Nelle immagini così ottenute, i nuclei patologici possono essere caratterizzati da condensazione della cromatina (picnosi), frammentazione del nucleo o riduzione delle dimensioni nucleari.

AGENTI UTILIZZATI

Nicotina sciolta in acqua fornita dalla BAT Italia (soluzione stock 100mM); CSC (condensato) sciolto in DMSO preparato dal laboratorio BAT Italia, la cui concentrazione è espressa in µg/mL. Vit. E (SIGMA-Italia; soluzione stock 100mM) sciolta in DMSO; MTT (SIGMA-Italia, in polvere 0.5mg/mL) sciolta in PBS; DMSO (SIGMA-Italia già pronto);

RISULTATI

EFFETTO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI NICOTINA SULLA VITALITÀ CELLULARE

Come mostrato nella *figura 2* la nicotina esercita un effetto citotossico solo alla concentrazione di 10mM, la quale è molto elevata e lontana da quelle che si ottengono in un fumatore. [Benowitz et al. 1990].

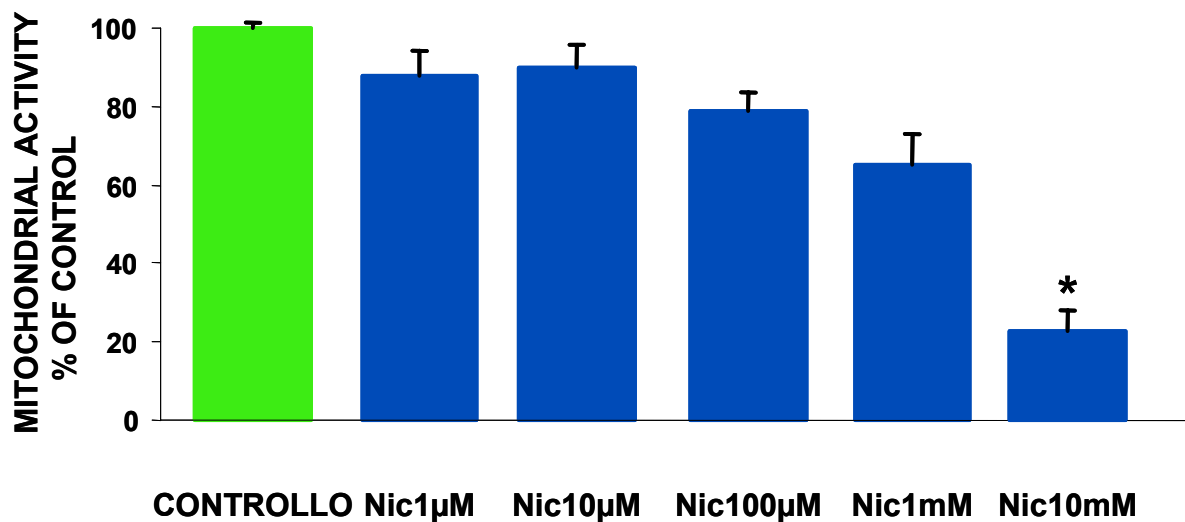


Figura 1: Curva dose-risposta della nicotina. * $p < 0.05$ vs tutti gli altri gruppi sperimentali.

EFFETTO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI *t*-BOOH SULLA VITALITÀ CELLULARE

Il protocollo sperimentale ha previsto l'esposizione delle SH-SY5Y per 5 ore a diverse concentrazioni di *t*-BOOH (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M). Come si può vedere nella *figura 1* il *t*-BOOH induce un danno dose-dipendente. E' stata scelta, come dose da utilizzare nella successiva fase sperimentale, la concentrazione di *t*-BOOH 10 μ M che causa una mortalità cellulare prossima al 40%. Tale percentuale è stata selezionata allo scopo di valutare la capacità delle cellule di recuperare il danno da stress ossidativo.

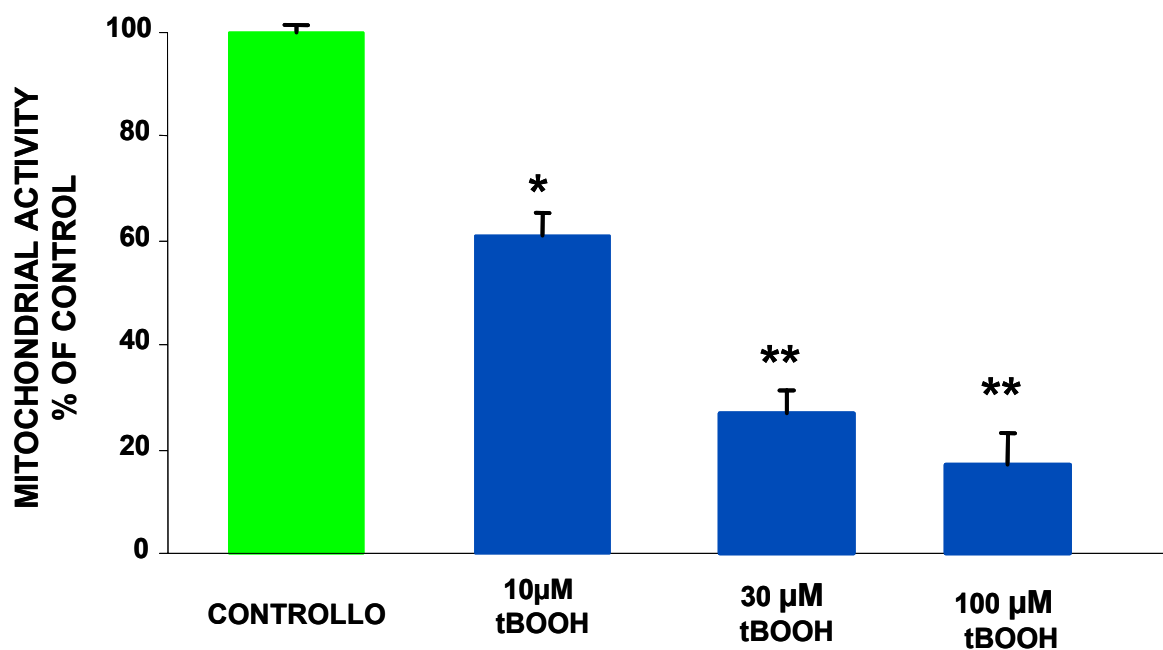


Figura 2: Curva dose-risposta del *t*-BOOH. * $p < 0.05$ vs CTL
** $p < 0.01$ vs t-BOOH 10 μ M

STUDIO DELL'EVENTUALE EFFETTO NEUROPROTETTIVO DELLA NICOTINA DA DANNO OSSIDATIVO

Per valutare il possibile effetto neuroprotettivo della nicotina, le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a trattamento simultaneo con *t-BOOH* e nicotina per 5 ore. Come riportato nelle *figura 3*, il trattamento con nicotina, alle concentrazioni di 10 e 100 μM , che in altri modelli sperimentali si erano dimostrate in grado di proteggere i neuroni da diversi tipi di danno, [Kihara et al. 1997, 1998, Linert et al. 1999, Newhouse et al. 1997]. non si traduce in un miglioramento della vitalità cellulare.

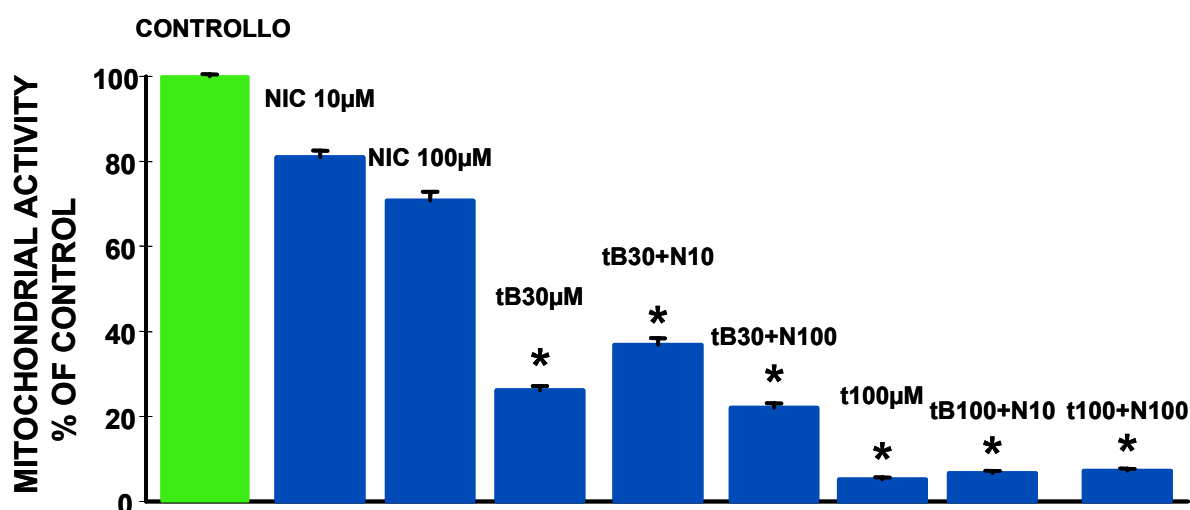


Figura 3: Trattamento con nicotina e *tert*-butile a 5 h. * $p < 0.05$ vs CONTROLLO e NIC 10 e 100 μM

EFFETTO DI UNA PRE-INCUBAZIONE ALLA NICOTINA SUL DANNO CELLULARE DA *t*-BOOH.

Poiché è stato riportato che l'esposizione prolungata alla nicotina è in grado di proteggere sia dal danno indotto da ossidazione *in vitro* che da quello prodotto *in vivo* da MPTP nei ratti [Ferber et al. 1998; Fowler et al. 2003], abbiamo pensato di studiare gli effetti dello stress ossidativo dopo una pre-incubazione per 24 ore con la nicotina 10 μ M e 100 μ M prima della esposizione delle cellule a *tert*-butile. Tuttavia, come si evince dalla *figura 4*, tale pre-incubazione con la nicotina non protegge da danno indotto da *tert*-butile.

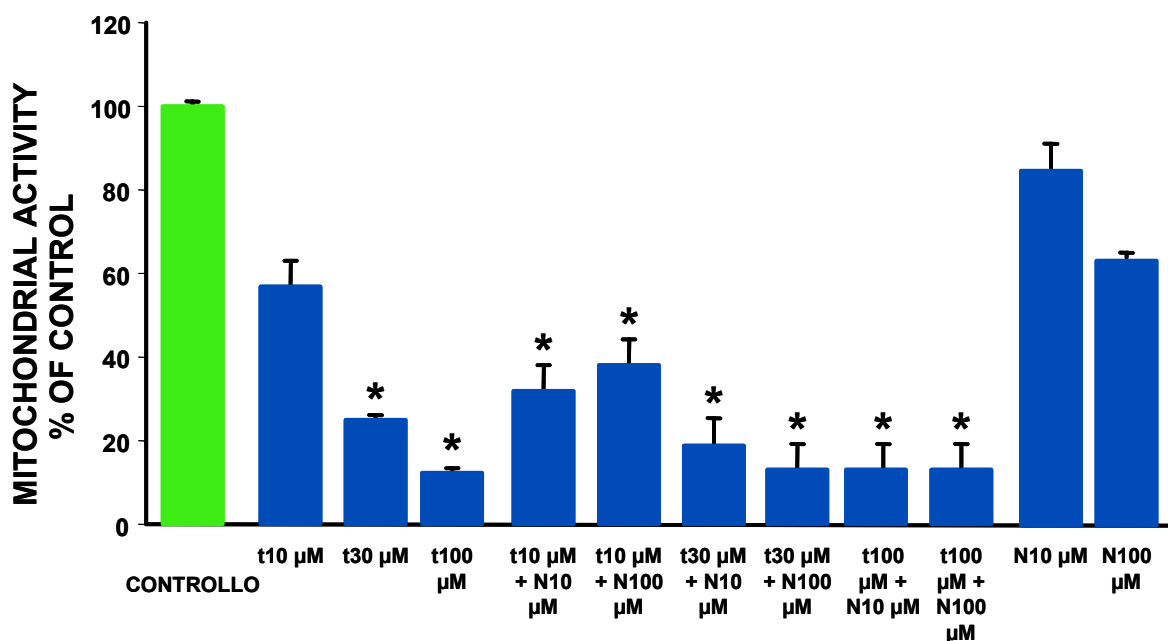


Figura 4: Effetto di una pre-incubazione per 24 h con nicotina sulla vitalità cellulare.
* $p < 0.05$ vs CTL e NIC 10 e 100 μ M

EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A DIVERSE CONCENTRAZIONI DI CSC SULLA VITALITÀ CELLULARE

È stato studiato l'effetto sulla vitalità cellulare di diverse dosi di CSC allo scopo di individuare quelle concentrazioni in grado di causare danno neuronale. Come è possibile vedere dalla figura 5, il CSC è in grado di indurre un danno citotossico alle concentrazioni di 50, 100 e 150 µg/mL. La dose che produceva una mortalità cellulare intorno al 50% è stata quella di 50 µg/mL. Le cellule erano esposte a diverse concentrazioni di CSC per 24 ore.

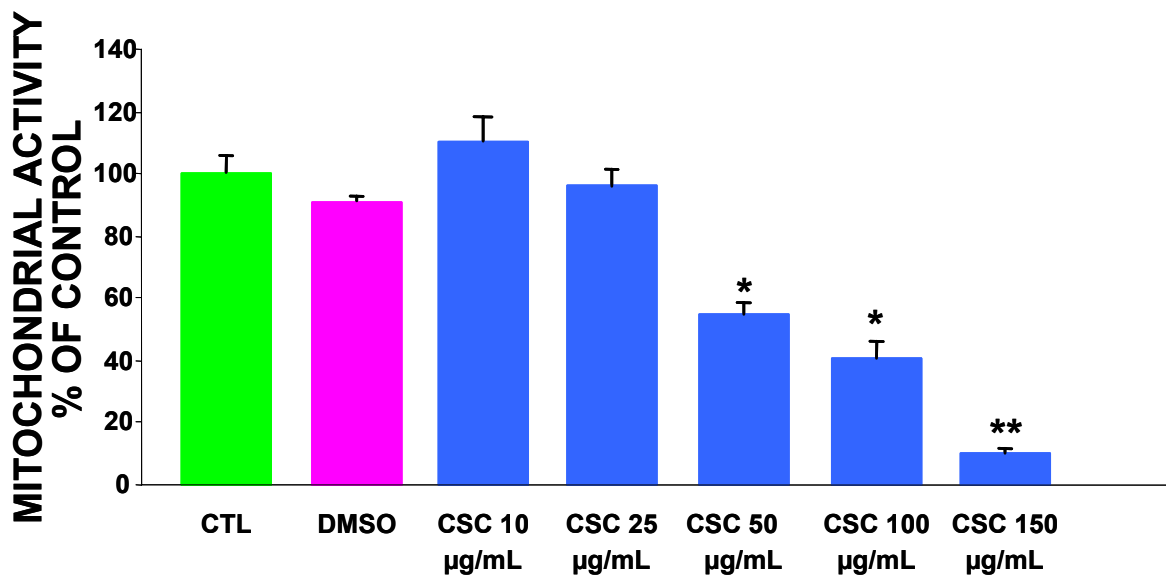


Figura 5: vitalità cellulare dopo esposizioni per 24 h a diverse concentrazioni di CSC .
* p<0.05 vs CTL; ** p<0.05 vs CSC 50 µg/mL, 100 µg/mL.

EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE AL CSC SULLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI.

Come si può vedere dalla *figura 6*, il CSC (50,100,150 µg/mL) alle stesse concentrazioni a cui aveva determinato un danno citotossico è in grado di stimolare la produzione di radicali liberi valutati come intensità di fluorescenza della DCF, espressa in unità arbitrarie, e rappresentativa delle aree al microscopio.

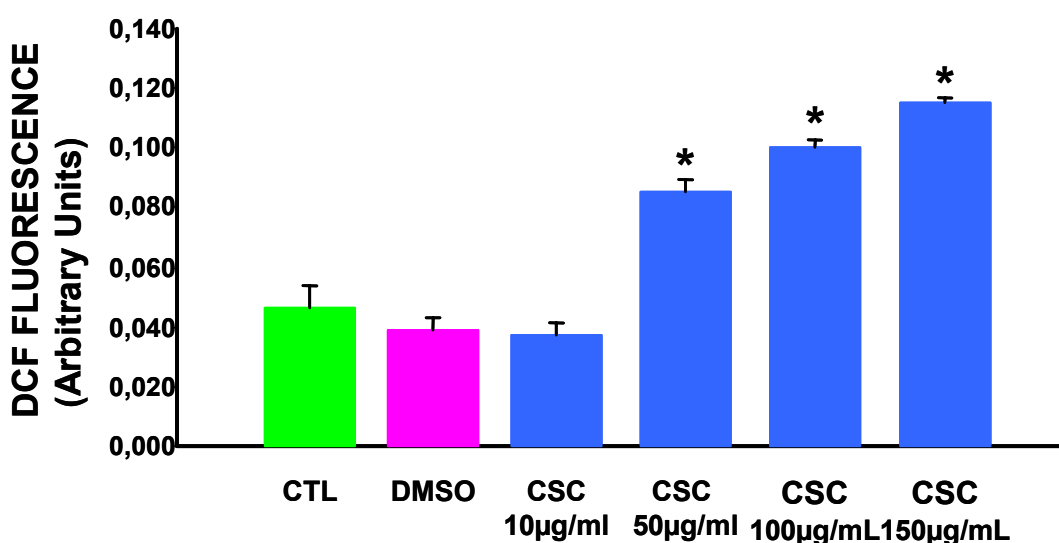


Figura 6: produzione di ROS in cellule esposte a diverse concentrazioni di CSC;
* $p < 0.05$ vs CTL, DMSO e CSC 10 µg/mL.

Come si può vedere dall'immagine 1, le aree contenenti cellule che presentano una fluorescenza marcata al microscopio sono state contate e quantificate. Nel controllo, ovviamente questa

fluorescenza era molto ridotta o mancava del tutto, indicando nelle cellule non trattate l'assenza della produzione dei radicali liberi.

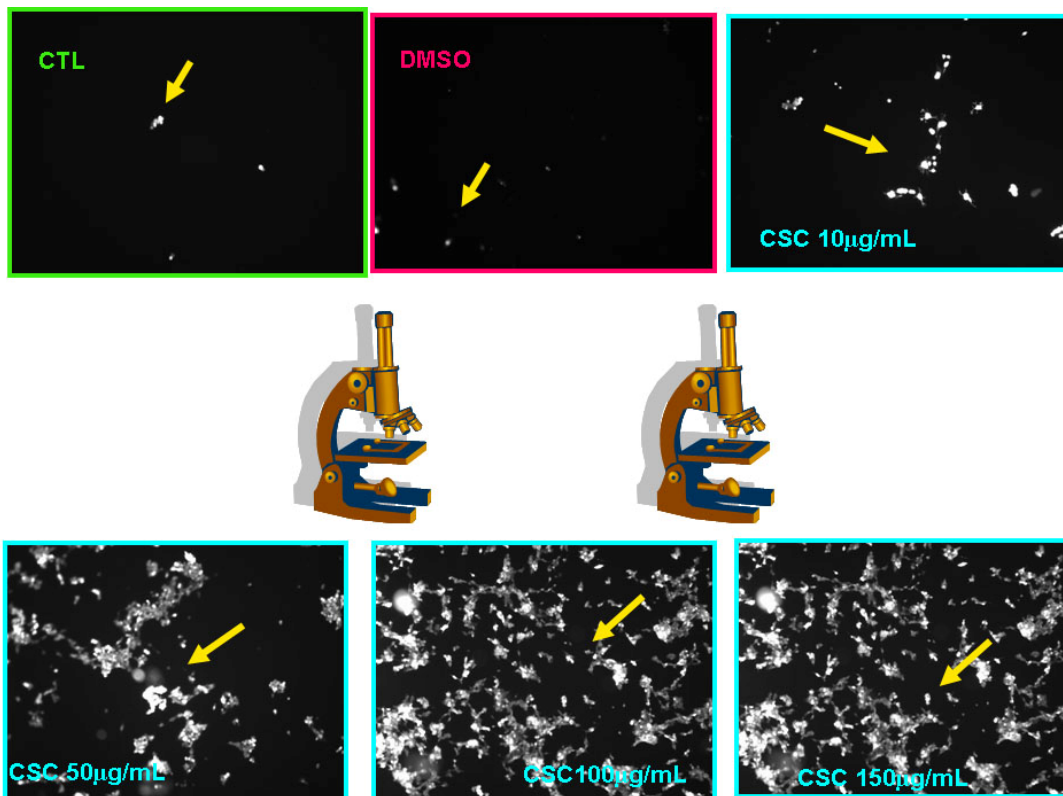


Immagine 1: produzione di ROS indotta da diverse dosi di condensato in cellule incubate con DCF

**TIME-COURSE DELLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI
STIMOLATA DALL'ESPOSIZIONE AL CSC**

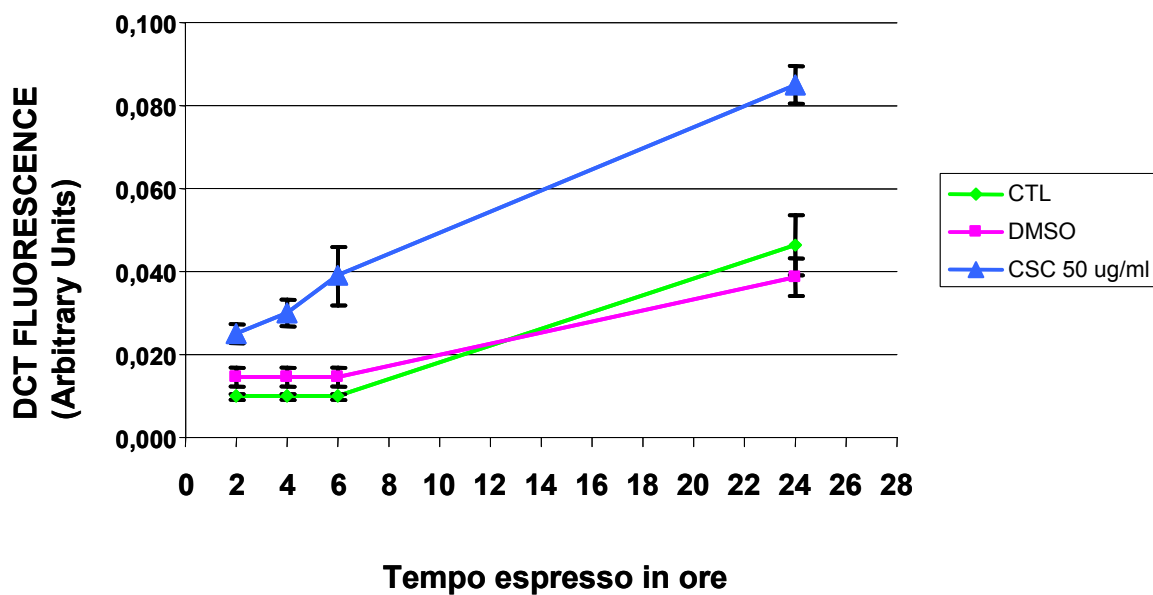


Figura 7: la produzione dei radicali liberi è stata rilevata a 2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore.

Come si può notare nella *figura 7*, già a 6 ore si ha un innalzamento significativo della produzione dei ROS rispetto al controllo e al controllo di comparazione con DMSO ed al tempo in cui si valuta il danno da CSC (24h) la produzione dei radicali è massima.

EFFETTO DELLA VITAMINA E SULLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI E SUL DANNO CELLULARE INDOTTI DA ESPOSIZIONE A CSC

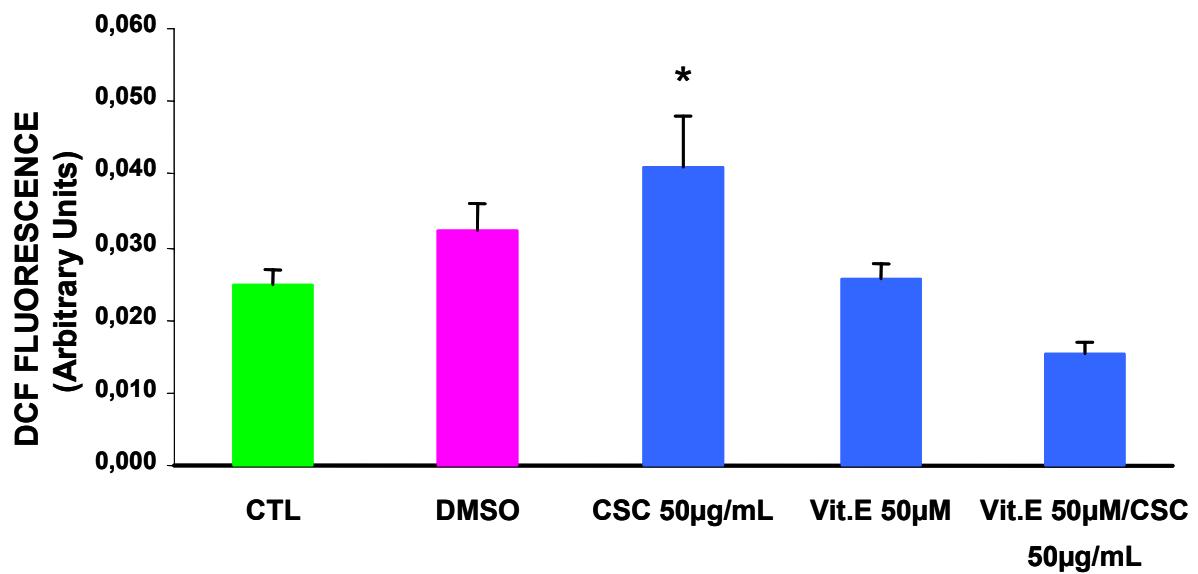


Figura 8: produzione di radicali liberi e protezione da parte della Vit.E.
p < 0.05 vs tutti gli altri gruppi.

Come si vede dalla figura 8 l'α-tocoferolo, alla concentrazione di 50 µM è in grado di ridurre in maniera significativa la produzione di ROS stimolata dal CSC.

Nell'immagine 2 riportiamo i risultati espressi in precedenza, dove le cellule trattate con vit. E, presentano anche ad occhio una riduzione notevole della produzione di radicali liberi indicata dalle cellule fluorescenti presenti nell'immagine.

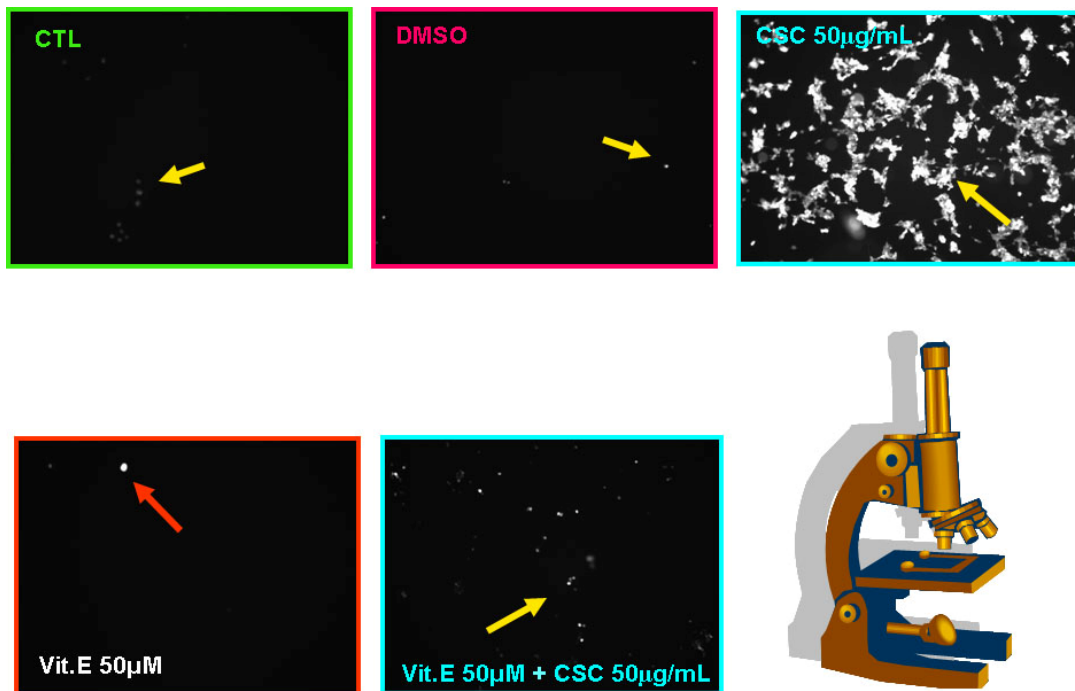


Immagine 2: effetto della vit. E 50µM sulla produzione di ROS indotta da condensato 50µg/mL, in cellule incubate con DCF.

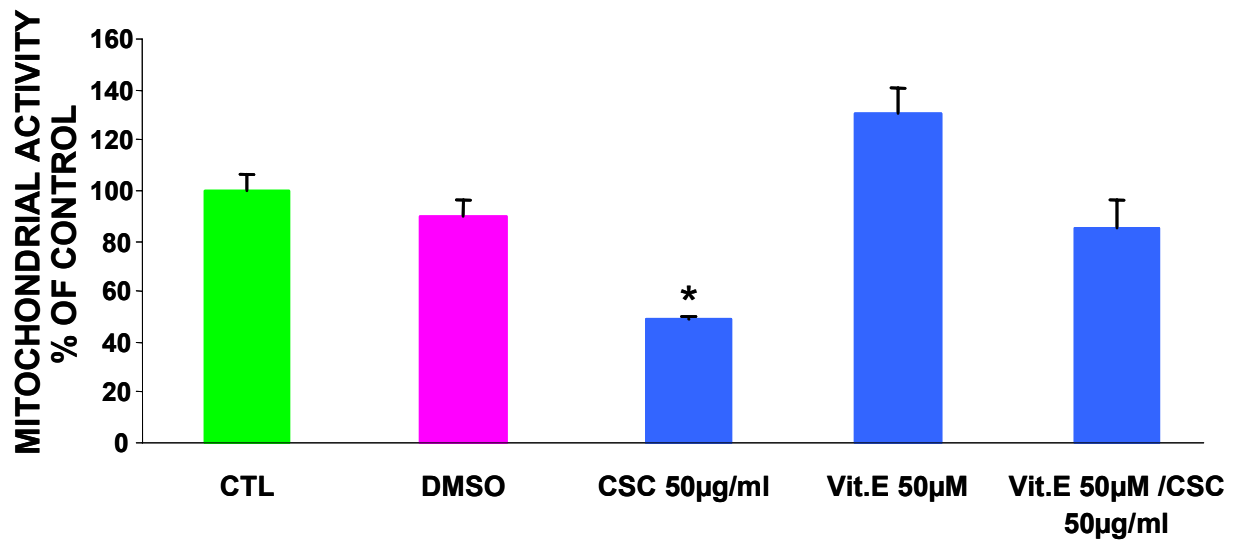


Figura 9: trattamento di vit.E e condensato. * $p < 0.01$ vs tutti gli altri gruppi

Parimenti, si evince dalla figura 9, che la vit. E, alla concentrazione di 50 µg/mL è in grado di proteggere i neuroni dall'insulto provocato da CSC.

DISCUSSIONE

NICOTINA

L'analisi dei dati ottenuti valutando l'effetto di diverse concentrazioni di nicotina sulla vitalità cellulare dimostra che tale alcaloide è in grado di esercitare un effetto citotossico [Herning et al. 1983] a livello neuronale a concentrazioni estremamente elevate e lontane da quelle che si possono ottenere nei forti fumatori. [Patterson et al. 2003]

A concentrazioni paragonabili a quelle che si possono raggiungere nella suddetta popolazione (10 μM e 100 μM) [Jacob et al. 1990; Benowitz et al. 1997] la nicotina non modifica la vitalità cellulare.

Per quanto concerne poi l'effetto delle suddette concentrazioni sul danno cellulare indotto dallo stress ossidativo, i risultati sembrano indicare che l'alcaloide non è in grado di espletare un effetto neuroprotettivo. Questi risultati non confermano quanto riportato in letteratura da Guan et al. (2003) che hanno dimostrato che alla concentrazione di 10 μM , la nicotina era in grado di inibire la perossidazione lipidica e la mortalità cellulare da esposizione ad H_2O_2 e β - amiloide. Tale diversità di comportamento potrebbe essere spiegata dalla differente linea cellulare utilizzata, e dal diverso agente inducente lo stress ossidativo. Infatti, Guan et al.

hanno utilizzato le cellule PC12 differenziate che hanno caratteristiche diverse rispetto alla linea cellulare SH-SY5Y da noi utilizzata. Inoltre, il t-BOOH, agente inducente lo stress ossidativo utilizzato nel presente lavoro, induce la produzione di radicali perossidrilici derivanti dalla membrana mitocondriale che presentano una lunga catena alifatica che può essere satura o insatura e che in virtù del loro ingombro sterico, sono metabolizzati più lentamente rispetto al perossido d'idrogeno –utilizzato da Guan et al.- il quale invece, essendo una molecola piccola e molto mobile all'interno della cellula, può reagire più rapidamente con diversi substrati cellulari. D'altra parte, che la nicotina possa essere priva di effetti antiossidanti è stato dimostrato *in vitro* su tessuti neocorticali di ratti di 5 mesi trattati con varie dosi di nicotina in cui non state evidenziate differenze significative nella produzione della perossidazione lipidica. [Linert et al. 1999]. In accordo con tale ipotesi è stato anche evidenziato che il trattamento con nicotina non era in grado di ridurre in maniera significativa la produzione dei ROS nella neocorteccia, nell'ippocampo e nel neostriato, [Seller et al. 1995].

Per quanto concerne l'effetto neuroprotettivo espletato nei confronti della tossicità da β -amiloide [Shimohama et al. 2001; Zamani et al. 1997, 2001; Itoh et al. 1996; Kihara et al. 1997,

1998] è stato suggerito che essa sia da attribuire alla modulazione dei recettori colinergici. Infatti, l'effetto neuroprotettivo nei confronti della citotossicità espletata dalla β -amiloide è ridotto dall'antagonista recettoriale alfa-bungarotossina. [Shimohama et al. 2001]. In conclusione i nostri risultati suggeriscono che la nicotina, non possiede un effetto antiossidante diretto almeno nel modello sperimentale utilizzato.

CONDENSATO

Per quanto riguarda il CSC molto è stato detto sulla sua tossicità in svariati sistemi cellulari ed apparati. I sistemi più studiati sono stati quello respiratorio e cardiovascolare, mentre i dati riguardanti gli effetti a livello del SNC sono carenti. D'altra parte, è stato dimostrato che molti singoli componenti del CSC in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. [Bhagwat et al. 1998; Castagnoli et al. 2001; Hansch et al. 1995; Hauptmann et al. 2001].

L'analisi dei risultati ottenuti valutando l'effetto di diverse concentrazioni di condensato sulla vitalità neuronale ha dimostrato che il CSC è in grado di produrre un effetto citotossico a livello neuronale a concentrazioni molto elevate che non sono raggiunte nel forte fumatore.

Per quanto concerne il possibile meccanismo di tale effetto tossico, i nostri risultati mostrano che le concentrazioni citotossiche di CSC sono in grado di stimolare una massiccia produzione di radicali liberi. Che tale produzione possa essere responsabile dell'effetto citotossico espletato dal CSC è dimostrato dal fatto che la vitamina E era in grado di ridurre la produzione di radicali liberi stimolata dal CSC [Pannaccione et al. 2005; Bruno et al. 2005] e di proteggere

dal danno citotossico prodotto dalla formazione di radicali liberi. Infatti, l' α -tocoferolo è un tocotrienolo che presenta una lunga catena alifatica insatura ed un anello aromatico; esso è in grado di interrompere le reazioni a catena dei radicali liberi grazie al gruppo OH presente sull'anello aromatico; la sua lipofilicità inoltre, ne fa un composto altamente liposolubile, capace di attraversare le membrane e proteggerle dagli insulti radicalici. [Tucker et al. 2005].

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che il meccanismo citotossico del CSC a livello neuronale sia simile a quello espletato dal CSC a livello dell'apparato respiratorio. Infatti, è stato evidenziato da diversi studi la possibilità che i radicali liberi indotti da CSC siano responsabili della tossicità sui fibroblasti 3T3 una linea cellulare derivante dall'apparato respiratorio [Lee et al. 1989; Leanderson et al. 1992].

Per quanto riguarda la problematica del tipo di morte indotta dal CSC non è noto se la tossicità da CSC sia prodotta in seguito all'attivazione dei *pathway* apoptotici o in seguito a necrosi cellulare. Ancora una volta la letteratura a questo proposito è contraddittoria: secondo alcuni studi il CSC attiva il fattore nucleare NF-KappaB [Shishodia et al. 2004; Hellerman et al. 2002], è in grado di modificare il *pathway* della proteina p53 [Palozza et al.

2004], mentre secondo altri ricercatori il CSC indurrebbe una risposta necrotica, attraverso l'inibizione delle caspasi [Wickenden et al. 2003], e inibendo in cellule alveolari epiteliali il fattore nucleare NF-KappaB [Moodie et al. 2004].

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno mostrato che la nicotina, risulta neurotossica a concentrazioni estremamente elevate non raggiunte nei fumatori abituali. L'alcaloide, inoltre, non è in grado di indurre neuroprotezione nello stress ossidativo indotto da t-BOOH.

Per quanto riguarda il condensato invece, è stato evidenziato che esso è neurotossico a concentrazioni superiori a 50 µg/mL, mentre concentrazioni inferiori non producono un effetto citotossico.

L'effetto neurotossico espletato dal CSC sembra legato alla produzione di radicali liberi come dimostrato dalla reversione di tale effetto da parte della vitamina E.

BIBLIOGRAFIA

Alkondon M., Pereira E.F., Barbosa C.T., Albuquerque E.X.: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; **283** (3): 1396-411.

Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G.: The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004; **26** (8): 882-93.

Amoroso S., Gioielli A., Castaldi M., Di Renzo G.F., Annunziato L.: In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{2+} increase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1452**: 151-160.

Amoroso S., D'Alessio A., Sirabella R., Di Renzo G.F., Annunziato L.: Ca^{2+} - independent caspase -3 but not Ca^{2+} -dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. *Journal of Neuroscience Research* 2002; **68** (4): 454-462.

Annunziato L., Amoroso S., Pannaccione A., Cataldi M., Pignataro G., D'Alessio A., Sirabella R., Secondo A., Sibaud L., Di Renzo G.F.: Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicology Letters* 2003 **139**: 125-133.

Benowitz N.L.: Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence. *Ciba Found Symp.* 1990; **152**: 186-200.

Benowitz N.L.: Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; **36**: 597-613.

Benowitz N.L., Jacob P. 3rd.: Individual differences in nicotine kinetics and metabolism in humans. *NIDA Res Monogr.* 1997; **173**: 48-64.

Bhagwat S.V., Raza V.H., Mullick J., Avadhani N.G.: Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. *Biochem Pharmacol.* 1998; **56** (7): 831-9.

Borgerding M.F., Bodnar J.A., Chung H.L., Mangan P.P., Morrison C.C., Risner C.H., Rogers J.C., Simmons D.F., Uhrig M.S., Wendelboe F.N., Wingate D.E., Winkler L.S.: Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 1. Chemical composition of mainstream smoke. *Food and Chem Toxicol* 1998; **36** (7): 169-82.

Bruno R.S., Traber M.G.: Cigarette smoke alters human vitamin E requirements : *J Nutr.* 2005; **135** (4): 671-4.

Buccafusco J.J., Terry A.V. Jr.: The potential role of cotinine in the cognitive and neuroprotective actions of nicotine. *Life Sci.* 2003; **72** (26): 2931-42.

Carmines E.L.: Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: Cigarette design, testing approach, and review of results. *Food and Chem Toxicol* 2002; **40**: 77-91.

Castagnoli K.P., Steyn S.J., Petzer J.P., Van der Schyf C.J., Castagnoli N. Jr.: Neuroprotection in the MPTP Parkinsonian C57BL/6 mouse model by a compound isolated from tobacco. *Chem Res Toxicol*. 2001; **14** (5): 523-7.

Cesquini M., Torsoni M.A., Stoppa G.R., Ogo S.H.: t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed Pharmacother*. 2003; **57** (3-4): 124-9.

Chen Y., Ogren S.O., Bjelke B., Bolme P., Eneroth P., Gross J., Loidl F., Herrera-Marschitz M., Andersson K.: Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat. *Neuroscience* 1995; **68** (2): 531-8.

Choi D.W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*. 1988; **11** (10): 465-9.

Concha N.O., Abdel-Meguid S.S.: Controlling apoptosis by inhibition of caspases. *Curr Med Chem*. 2002; **9** (6): 713-26.

Dajas-Bailador F.A., Soliankov L., Wonnacott S.: Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$, via the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 2002; **80**: 520-530.

Dajas-Bailador F.A., Mogg A.J., Wonnacott S.: Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} -channels and Ca^{2+} -stores. *Journal of Neurochemistry* 2002; **81**: 606-614.

De Rosa M.J., Esandi Mdel C., Garelli A., Rayes D., Bouzat C.: Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 2005; **160** (1-2): 154-61.

Doolittle D.J., Lee C.K., Ivett J.L., Mirsalis J.C., Riccio E., Rudd C.J., Burger G.T., Hayes A.W.: Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environ Mol Mutagen*. 1990; **15** (2): 93-105.

Emilien G., Beyreuther K., Masters C.L., Maloteaux J.M.: Prospects for pharmacological intervention in Alzheimer disease. *Archives Neurology* 2001; **57** (454-9).

Fang M.A., Frost P.J., Iida-Klein A., Hahn T.J.: Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991; **12** (4):283-6.

Ferger B., Kuschinsky K.: Biochemical studies support the assumption that dopamine plays a minor role in the EEG effects of nicotine. *Psychopharmacology* (Berlin) 1997; **129** (2): 192-6.

Ferger B., Spratt C., Earl C.D., Teismann P., Oertel W.H., Kuschinsky K.: Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1998; **358** (3): 351-9.

Fowler J.S., Logan J., Wang G.J., Volkow N.D.: Monoamine oxidase and cigarette smoking. *Neurotoxicology.* 2003; **24** (1): 75-82.

Furukawa K., Barger S.W., Blalock E.M., Mattson M.P.: Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 1996; **379** (6560): 74-8.

Gvozdjakova A., Kucharska J., Gvozdjak J.: Effect of smoking on the oxidative processes of cardiomyocytes. *Cardiology.* 1992; **81** (2-3): 81-4.

Gotti C., Clementi F.: Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004; **74** (6): 363-96.

Guan Z.Z., Yu W.F., Nordberg A.: Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry International* 2003; **43**: 243-249.

Hagen K., Eckes K., Melefors O., Hultcrantz R.: Iron overload decreases the protective effect of tumour necrosis factor-alpha on rat hepatocytes exposed to oxidative stress. *Scand J Gastroenterol.* 2002; **37** (6): 725-31.

Hampton M.B., Orrenius S.: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997; **414** (3): 552-6.

Hansch C., Telzer B.R., Zhang L.: Comparative QSAR in toxicology: examples from teratology and cancer chemotherapy of aniline mustards. *Crit Rev Toxicol.* 1995; **25** (1): 67-89.

Hauptmann N., Shih J.C.: 2-Naphthylamine, a compound found in cigarette smoke, decreases both monoamine oxidase A and B catalytic activity. *Life Sci.* 2001; **68** (11): 1231-41.

Helen A., Krishnakumar K., Vijayammal P.L., Augusti K.T.: Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*, Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicol Lett.* 2000; **116** (1-2): 61-8.

Hellermann G.R., Nagy S.B., Kong X., Lockey R.F., Mohapatra S.S.: Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2002; **3** (1): 22.

Herning R.I., Jones R.T., Benowitz N.L., Mines A.H.: How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin Pharmacol Ther* 1983; **33** (1): 84-90.

Hoffmann G.R.: Genetic Toxicologic. In *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, ed.C D. Klaassen, M.O. Amdur, and J.Doull **5th** edn, pp 269-300. MacGraw-Hill, New York.

Hogg R.C., Raggenbass M., Bertrand D.: Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003; **147**: 1-46.

- Horster M., Brechtelsbauer H., Wilson P., Schmolke M.: Effects of nicotine on epithelial nephron cells in culture. *Klin Wochenschr.* 1984; **62** (2):86-91.
- Hukkanen J., Jacob P. 3rd, Benowitz N.L.: Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005; **57** (1): 79-115.
- Itoh A., Nitta A., Nadai M., Nishimura K., Hirose M., Hasegawa T., Nabeshima T.: Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta- protein-infused rats. *J Neurochem.* 1996; **66** (3): 1113-7.
- Jacob P. 3rd, Shulgin A.T., Benowitz N.L.: Synthesis of (3'R,5'S)-trans-3'-hydroxycotinine, a major metabolite of nicotine. Metabolic formation of 3'-hydroxycotinine in humans is highly stereoselective. *J Med Chem.* 1990; **33** (7): 1888-91.
- Jones G.M., Sahakian B.J., Levy R., Warburton D.M., Gray J.A.: Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl).* 1992; **108** (4): 485-94.
- Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Kimura J., Kume T., Kochiyama H., Maeda T., Akaike A.: Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann Neurol.* 1997; **42** (2): 159-63.
- Kihara T., Shimohama S., Urushitani M., Sawada H., Kimura J., Kume T., Maeda T., Akaike A.: Stimulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.* 1998; **792** (2): 331-4.
- Konno S., Oronsky B.T., Semproni A.R., Wu J.M.: The effect of nicotine on cell proliferation and synthesis of secreted proteins in BALB/C 3T3 cells. *Biochem Int.* 1991; **25** (1):7-17.
- Leanderson P., Tagesson C.: Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact.* 1992; **81** (1-2): 197-208.
- Lee C.K., Brown B.G., Rice W.Y. Jr, Doolittle D.J.: Role of oxygen free radicals in the induction of sister chromatid exchanges by cigarette smoke. *Environ Mol Mutagen.* 1989; **13** (1): 54-9.
- Lee H.S., Park C.W., Kim Y.S.: MPP⁺ increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. *Experimental Neurology* 2000; **165**: 164-171.
- Lena C., Changeux J.P.: Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J Neurosci.* 1997; **17** (2): 576-85.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.: Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; **91** (4): 479-89.

- Li X., Huang J., May J.M.: Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; **305** (3): 656-61.
- Lichtensteiger W., Hefti F., Felix D., Huwyler T., Melamed E., Schlumpf M.: Stimulation of nigrostriatal dopamine neurones by nicotine. *Neuropharmacology* 1982; **21** (10): 963-8.
- Lindstrom J.: Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol.* 1997; **15** (2): 193-222.
- Linert W., Bridge M.H., Huber M., Bjugstad K.B., Grossman S., Arendash G.W.: In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1454**:143-152.
- Luetje C.W., Patrick J.: Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 1991; **11** (3): 837-45.
- Luo L.Z., Werner K.M., Gollin S.M., Saunders W.S.: Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat Res.* 2004; **554** (1-2): 375-85.
- Maccioni R.B., Munoz J.P., Barbeito L.: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 2001; **32** (5): 367-81.
- Martin W.J. 2nd, Gadek J.E., Hunninghake G.W., Crystal R.G.: Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J Clin Invest.* 1981; **68** (5): 1277-88.
- Matsuzaki H., Tamatani M., Mitsuda N., Namikawa K., Kiyama H., Miyake S., Tohyama M.: Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1999; **73** (5): 2037-46.
- McMahon L.L., Yoon K.W., Chiappinelli V.A.: Nicotinic receptor activation facilitates GABAergic neurotransmission in the avian lateral spiriform nucleus. *Neuroscience* 1994; **59** (3): 689-98.
- Meneghini R.: Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free radical Biology and Medicine* 1997; **23** (5):783-792.
- Messi M.L., Renganathan M., Grigorenko E., Delbono O.: Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* 1997; **411** (1): 32-8.
- Meyer E.M., Kuryatov A., Gerzanich V., Lindstrom J., Papke R.L.: Analysis of 3-(4-hydroxy-2-Methoxybenzylidene)anabaseine selectivity and activity at human and rat alpha-7 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; **287** (3): 918-25.

Moodie F.M., Marwick J.A., Anderson C.S., Szulakowski P., Biswas S.K., Bauter M.R., Kilty I., Rahman I.: Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 2004; **18** (15): 1897-9.

Morens D.M., Grandinetti A., Reed D., White L.R., Ross G.W.: Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology* 1995; **45** (6): 1041-51.

Nakayama T., Kaneko M., Kodama M., Nagata C.: Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature.* 1985; **314** (6010): 462-4.

Newhouse P.A., Kelton M.: Nicotinic systems in central nervous systems disease: degenerative disorders and beyond. *Pharm Acta Helv.* 2000; **74** (2-3): 91-101.

Newhouse P.A., Potter A., Levin E.D.: Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* 1997; **11** (3): 206-28.

Ochiai T., Ohno S., Soeda S., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H.: Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. *Neurosci Lett.* 2004; **362** (1): 61-4.

Olanow C.W., Arendash G.W.: Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol.* 1994; **7** (6): 548-58.

Palozza P., Serini S., Di Nicuolo F., Boninsegna A., Torsello A., Maggiano N., Ranelletti F.O., Wolf F.I., Calviello G., Cittadini A.: beta-Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate. *Carcinogenesis.* 2004; **25** (8): 1315-25.

Pannaccione A., Secondo A., Scorziello A., Cali G., Taglialatela M., Annunziato L.: Nuclear factor-kappaB activation by reactive oxygen species mediates voltage-gated K⁺ current enhancement by neurotoxic beta-amyloid peptides in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells and hippocampal neurones. *J Neurochem.* 2005; **94** (3): 572-86.

Parain K., Hapdey C., Rousselet E., Marchand V., Dumery B., Hirsch E.C.: Cigarette smoke and nicotine protect dopaminergic neurons against the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Parkinsonian toxin. *Brain Res.* 2003; **984** (1-2): 224-32.

Patterson F., Benowitz N., Shields P., Kaufmann V., Jepson C., Wileyto P., Kucharski S., Lerman C.: Individual differences in nicotine intake per cigarette. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; **12** (5): 468-71.

Piga R, Saito Y, Chen Z, Yoshida Y, Niki E.: Characterization of monochloramine toxicity on PC12 cells and protective effect of tocopherol via antioxidative function. *Arch Biochem Biophys.* 2005; **436**(1): 101-9.

- Pike C.J., Balazs R., Cotman C.W.: Attenuation of beta-amyloid neurotoxicity in vitro by potassium-induced depolarization. *J Neurochem.* 1996; **67** (4): 1774-7.
- Pryor W.A., Hales B.J., Premovic P.I., Church D.F.: The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications; **220** (4595): 425-7.
- Radcliffe K.A., Fisher J.L., Gray R., Dani J.A.: Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; **868**: 591-610.
- Reichman W.E.: Alzheimer's disease: clinical treatment options. *Am J Manag Care.* 2000; **6** (22 Suppl): S1125-32.
- Rodgman A., Green C.R.: Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-Hazard and hoopla. *Beiträge zur Tabakforschung International / Contributions to Tobacco research* 2003; **20** (8):481-545.
- Roemer E., Tewes F.J., Meisgen T.J., Veltel D.J., Carmines E.L.: Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: In vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food and Chem Toxicol* 2002; **40**: 105-11.
- Rubin H.: Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 2001; **22** (12): 1903-30.
- Rustemeier K., Stabbert R., Haussmann H.-J., Roemer E., Carmines E.L.: Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *Food and Chem Toxicol* 2002; **40**: 93-104.
- Seller M.J., Bnait K.S.: Effects of tobacco smoke inhalation on the developing mouse embryo and fetus. *Reprod Toxicol.* 1995; **9** (5): 449-59.
- Shimohama S., Kihara T.: Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 2001; **49**(3): 233-9.
- Shishodia S., Aggarwal B.B.: Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res.* 2004; **64** (14): 5004-12
- Singh U., Devaraj S., Jialal I.: Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr.* 2005; **25**: 151-74.
- Smith C.J., Hansch C.: The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. *Food and Chem Toxicol* 2000; **38**: 637-46.
- Smith C.J., Livingston S.D., Doolittle D.J.: An international literature survey of "IARC group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food and Chem Toxicol* 1997; **35**: 1107-30.

Smith C.J., Perfetti T.A., Rumple M.A., Rodgman A., Doolittle D.J.: "IARC group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chem Toxicol* 2000; **38**: 371-83.

Smith C.J., Perfetti T.A., Rumple M.A., Rodgman A., Doolittle D.J.: "IARC group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chem Toxicol* 2001; **39**: 183-205.

Soto-Otero R., Mendez-Alvarez E., Hermida- Ameijeiras A., Lopez-Real A.M., Labandeira-Garcia J.L.: Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxidopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology* 2002; **64**: 125-135.

Stabbert R., Schafer K.H., Biefel C., Rustemeier K.: Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; **17** (18): 2125-32.

Stabbert R., Voncken P., Rustemeier K., Hausman H.-J., Roemer E., Schaffernicht H., Patskan G.: Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *J Appl. Toxicol.* 2003; **23**: 329-39.

Strahlendorf J.C., Acosta S., Miles R., Strahlendorf H.K.: Choline blocks AMPA-induced dark cell degeneration of Purkinje neurons: potential role of the $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Brain Research* 2001; **901**: 71-78.

Sun X., Liu Y.L., Hu G., Wang H.: Protective effects of nicotine against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Biol Letters* 2004; **9**: 409-22.

Takahashi H., Kosaka N., Nakagawa S.: alpha-Tocopherol protects PC12 cells from hyperoxia-induced apoptosis. *J Neurosci Res.* 1998; **52** (2): 184-91.

Thornberry N.A., Lazebnik Y.: Caspases: enemies within. *Science.* 1998; **281** (5381): 1312-6.

Tizabi Y., Manaye K.F., Taylor R.E.: Nicotine blocks ethanol-induced apoptosis in primary cultures of rat cerebral cortical and cerebellar granule cells. *Neurotox Res.* 2005; **7** (4): 319-22.

Torok J., Gvozdjakova A., Kucharska J., Balazovjeh I., Kysela S., Simko F., Gvozdjak J.: Passive smoking impairs endothelium-dependent relaxation of isolated rabbit arteries. *Physiol Res.* 2000; **49** (1): 135-41.

Tsuda S., Matsusaka N., Ueno S., Susa N., Sasaki Y.F.: The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol Sci.* 2000; **54** (1): 104-9

Tsurutani J., Castillo S.S., Brognard J., Granville C.A., Zhang C., Gills J.J., Sayyah J., Dennis P.A.: Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2005; **26** (7): 1182-95.

- Tucker J.M., Townsend D.M.: Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed Pharmacother.* 2005; **59** (7): 380-7.
- Van Duijn C.M., Hofman A.: Relation between nicotine intake and Alzheimer disease. *British Medical Journal* 1991; **302** (6791): 1491-4.
- Vanscheeuwijck P.M., Teredesai A., Terpstra P.M., Verbeeck J., Kuhl P., Gerstenberg B., Gebel S., Carmines E.L.: Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 4: subchronic inhalation toxicity. *Food and Chem Toxicol* 2002; **40**: 113-31.
- Wetscher G.J., Bagchi M., Bagchi D., Perdakis G., Hinder P.R., Glaser K., Hinder R.A.: Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med.* 1995; **18** (5):877-82.
- Wickenden J.A., Clarke M.C., Rossi A.G., Rahman I., Faux S.P., Donaldson K., MacNee W.: Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;**29** (5): 562-70.
- Wilson A.L., Langley L.K., Monley J., Bauer T., Rottunda S., McFalls E., Kovera C., McCarten J.R.: Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; **51** (2-3): 509-14.
- Wonnacott S.: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997; **20**(2): 92-8.
- Yildiz D., Ercal N., Armstrong D.W.: Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology.* 1998; **130** (2-3): 155-65.
- Yildiz D., Liu Y.S., Ercal N., Science. 1983 Apr 22;220(4595):425-7.D.W.: Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; **37** (4): 434-9.
- Xin M., Deng X.: Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005; **280** (11): 10781-9.
- Zamani M.R., Allen Y.S., Owen G.P., Gray J.A.: Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport* 1997; **8** (2): 513-7.
- Zamani M.R., Allen Y.S.: Nicotine and its interaction with beta-amyloid protein: a short review. *Biol Psychiatry.* 2001; **49** (3):221-32.
- Zanardi A., Leo G., Biagini G., Zoli M.: Nicotine and neurodegeneration in ageing. *Toxicol Lett.* 2002; **127** (1-3): 207-15.
- Zhao Z., Reece E.A.: Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2005; **74** (5): 383-91.
- Zhu X., Raina A.K., Lee H.G., Casadesus G., Smith M.A., Perry G.: Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2004;**1000** (1-2): 32-9.