

Introduzione

1.1 Il sangue umano

1.1.1. Generalità

Il sangue è un tessuto fluido contenuto nei vasi sanguigni degli animali, dalla composizione complessa, che fa parte della più ampia categoria dei tessuti connettivi. Esso si presenta come un liquido di colore rosso che circola in un sistema di canali chiusi, spinto da un organo propulsore, il cuore (1) .

E' formato da una parte liquida e da una parte corpuscolata , costituita da cellule o frammenti di cellule (fig.1.1).

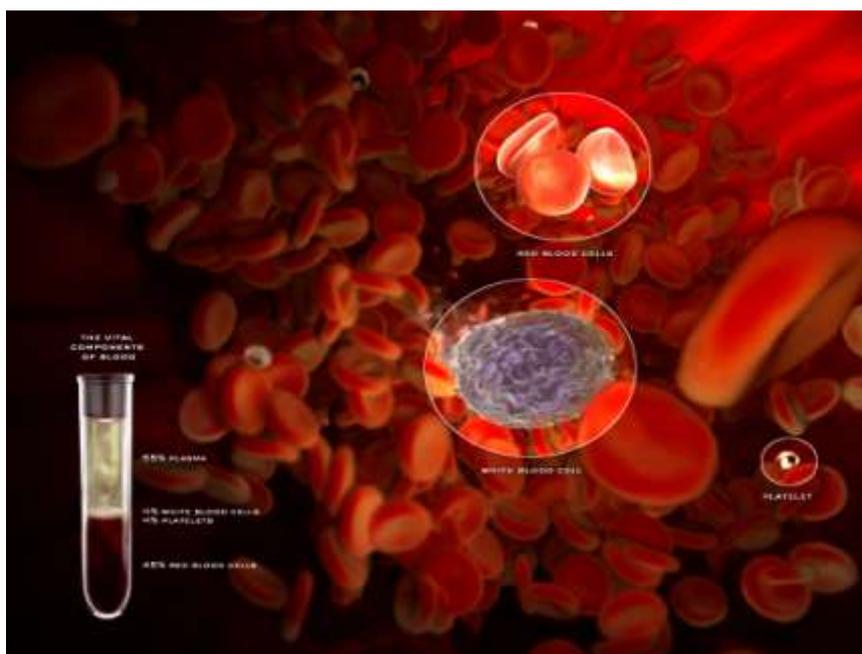


Fig.1.1 Composizione del Sangue

La parte liquida si chiama plasma ed è composta per il 90% da acqua e per il restante 10% da sostanze organiche , sali e numerose famiglie di proteine, di cui la più rappresentata è l'albumina, che svolgono svariate funzioni: omeostasiosmotica, trasporto di sostanze, regolazione della coagulazione ed altre; inoltre vi sono disciolti ormoni, elettroliti e gas. Il plasma sanguigno, pur

contenendo numerose sostanze aventi solubilità, peso molecolare e proprietà fisiche diverse, conserva sempre una fluidità che consente scambi metabolici attraverso la parete dei capillari tra il sangue ed i liquidi intercellulari. La composizione proteica e ionica del plasma, oltre a tenere conto della specifica funzione della singola proteina o ione, deve essere tale da determinare rispettivamente una pressione oncotica ed osmotica che faciliti gli scambi attivi di metaboliti e di acqua a livello tissutale. Il plasma è un fluido a reazione leggermente alcalina con un caratteristico colorito giallino (1) .

La composizione del plasma è molto complessa; in essa figurano numerose sostanze inorganiche ed organiche, tutte di grande importanza funzionale. Tra i sali inorganici meritano particolare rilievo il cloruro di sodio (NaCl), che conferisce la maggior parte della pressione osmotica al plasma, il NaHCO_3 , che partecipa al trasporto della CO_2 ed alla regolazione del pH, ed i due fosfati, acido ed alcalino, di sodio (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4) anch'essi fondamentali nella regolazione del pH ematico (2).

Le cellule del sangue si dividono in:

- ✓ eritrociti o globuli rossi ;
- ✓ leucociti o globuli bianchi , a loro volta distinguibili in:
 - granulociti: neutrofilo, eosinofilo e basofilo;
 - agranulociti: monociti (o macrofagi) e linfociti;
- ✓ piastrine o trombociti.

I **globuli rossi**, prodotti dal midollo osseo rosso delle ossa piatte, sono privi di nucleo, e hanno la funzione di trasportare l'ossigeno a tutte le cellule del corpo. Essi hanno la forma biconcava contenente l'emoglobina, una proteina contenente ferro capace di legare l'ossigeno ai globuli rossi. Il rapporto tra la superficie e il volume occupato da un eritrocita è vantaggioso rispetto a una cellula con forma sferica; il globulo rosso ha quindi a disposizione un'ampia superficie di scambio.

Gli eritrociti hanno una emivita di circa 4 mesi ed in media un uomo ne possiede circa 5 milioni per millimetro cubo di sangue (Fig. 1.2).

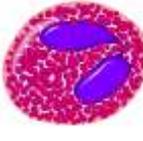
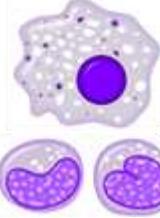


Fig.1.2 Globuli Rossi (o eritrociti)

I **globuli bianchi** sono cellule, contenenti un nucleo, più grandi ma meno numerose dei globuli rossi, in condizioni normali la loro concentrazione nel sangue è di circa 7000/mm cubo; essi hanno inoltre il compito di difendere l'organismo dagli attacchi di agenti patogeni quali batteri o virus (1).

I globuli bianchi circolanti nel sangue possono essere raggruppati in diverse categorie, a seconda delle caratteristiche funzionali e morfologiche che gli accomunano, in particolare distinguiamo:

- ✓ Fagociti (neutrofili, monociti e macrofagi) che hanno la capacità di inglobare e digerire le molecole estranee.
- ✓ Granulociti (basofili, eosinofili e neutrofili) che contengono grossi granuli di citoplasma, che conferiscono loro un aspetto granulare.
- ✓ Immunociti (linfociti T e B) che sono i globuli bianchi responsabili di risposte immunitarie specifiche e selettive contro gli antigeni esogeni.
- ✓ Cellule citotossiche (alcuni tipi di linfociti T ed eosinofili) che rilasciano sostanze in grado di uccidere le cellule che attaccano.
- ✓ Cellule che presentano l'antigene o APC (alcuni tipi di linfociti, macrofagi, monociti e cellule dendritiche). (Tab.1.1)

	Basofili e mastociti	Neutrofil	Eosinofili	Monociti e macrofagi	Linfociti e plasmacellule	Cellule dendritiche
						
% de globuli nel sangue	Rari	50-70%	1-3%	1-6%	20-35%	Assenti
Funzione primaria	Intervengono nella infiammazione e nelle risposte allergiche	Ingestione e distruzione degli invasori	Distruzione degli invasori, in particolari dei parassiti ricoperti anticorpi	Ingestione e distruzione dei invasori Presentazione dell'antigene	Risposte degli invasori inducono la produzione di anticorpi	Riconoscimento dei patogeni e attivazione del sistema immunitario per presentazione degli antigeni
Valori elevati nel sangue	Allergie, infiammazioni	Infezioni batteriche	Allergie o infestazioni parassiti	Infezioni di vario genere	Infezioni, soprattutto virali	-
Classificazioni	Fagociti					
	Granulociti					
			Cellule citotossiche		Cellule citotossiche (alcuni tipi)	
				Cellule che presentano l'antigene		

Tab.1.1 Leucociti e loro proprietà

Nonostante i leucociti circolino nel sangue, la loro attività si esplica soprattutto a livello tissutale. Essi, grazie a movimenti ameboidi, possono infatti attraversare le pareti dei vasi e muoversi negli spazi interstiziali secondo un processo chiamato diapedesi (3).

Le **piastrine**, infine, svolgono un ruolo essenziale nella coagulazione del sangue. Esse non sono vere cellule ma frammenti derivati da grandi cellule prodotte dal midollo osseo. Quando un vaso sanguigno è danneggiato, vengono richiamate nella zona interessata le piastrine, che si aggregano aderendo alla parete liberando una sostanza che trasforma il fibrogeno (proteina plasmatica) in fibrina. Questa

sostanza, forma una rete di fibre in cui si impigliano gli eritrociti formando un grumo (il coagulo). La barriera del sangue coagulato e delle piastrine, arresta la fuoriuscita del sangue (Fig. 1.3). La concentrazione delle piastrine nel sangue è di circa 250'000/mm cubo.

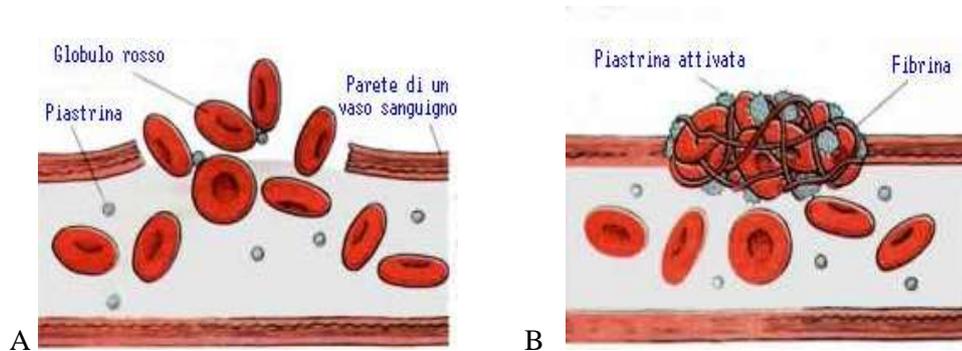


Fig. 1.3 a.Rottura di un vaso b.riparazione

Le cellule del sangue, nell'adulto, sono prodotte dal midollo osseo, dalle linfoghiandole (in particolare i leucociti), dalla milza, fra i principali organi del sistema linfatico. Per la loro funzione sono detti organi emopoietici. Se si impedisce la coagulazione mediante sostanze anticoagulanti (eparina, citrato di sodio), gli elementi corpuscolari sedimentano lentamente al fondo di una provetta. La velocità con cui gli eritrociti sedimentano costituisce la cosiddetta velocità di eritrosedimentazione o VES. In una provetta contenente sangue sedimentato si riconosce uno strato profondo di colorito rosso, formato dagli eritrociti, che costituisce la maggior parte del valore ematocrito (45%). Al di sopra di questo strato se ne trova uno intermedio, sottile, di colorito grigiastro, formato dalla sedimentazione dei globuli bianchi e delle piastrine (buffycoat), seguito da uno strato superficiale, costituito dal plasma, di colorito giallo.

Il sangue che circola nelle arterie ha colorito rosso rutilante per la presenza di emoglobina satura di ossigeno all'interno dei globuli rossi (ossiemoglobina), mentre il sangue venoso si presenta di colorito rosso scuro, in quanto la emoglobina possiede una percentuale ridotta di ossigeno, che ha ceduto ai tessuti ed un maggiore contenuto di anidride carbonica (desossiemoglobina). Il pH del sangue è di circa 7,40. la sua densità è legata al numero di elementi figurati e al contenuto in proteine del plasma e varia da 1.048 a 1.066. Il contenuto di elettroliti del plasma determina la pressione osmotica del sangue. La pressione

oncotica o colloidale- osmotica è legata al contenuto proteico del plasma ed è molto importante negli scambi di liquidi che avvengono all'estremità arteriosa dei capillari sanguigni, tra sangue e fluidi interstiziali (1).

1.1.2 Funzioni

Il sangue svolge numerose ed importanti funzioni. Infatti, nei mammiferi, la funzione di veicolo interposto tra il liquido interstiziale e l'ambiente, è svolta dal sangue. Le funzioni fondamentali del sangue sono:

- ✓ il trasporto delle sostanze nutritive (dagli organi di assorbimento o di deposito ai vari tessuti);
- ✓ il trasporto dei gas respiratori (ossigeno dai polmoni ai tessuti; anidride carbonica dai tessuti ai polmoni);
- ✓ il trasporto delle scorie cataboliche, prodotte nei tessuti, agli organi emuntori (sostanzialmente i reni);
- ✓ il trasporto degli ormoni (prodotti nelle ghiandole endocrine) ai tessuti ed agli organi sui quali esplicano la loro azione.

Il sangue inoltre partecipa in modo altrettanto fondamentale alla regolazione del pH dei liquidi organici, grazie alla presenza in esso di sistemi tampone, nonché alla regolazione termica dell'organismo.

Deve infine essere ricordata l'importanza del sangue nei processi di difesa dell'organismo operati mediante due meccanismi: il primo, aspecifico, affidato alla fagocitosi leucocitaria ed al potere battericida e complementare dei fattori serici; il secondo, mediante un meccanismo specifico costituito dalla risposta immunitaria, legata alle peculiari funzioni di due classi distinte di leucociti, i linfociti T e B (2).

Infine il sangue è responsabile del mantenimento della pressione osmotica ed oncologica (1).

1.2 Gli eritrociti

Gli eritrociti o emazia o globuli rossi sono gli elementi figurati del sangue di gran lunga più abbondanti. Nell'uomo sono contenuti circa 5 milioni di globuli rossi per mm^3 di sangue, mentre nella donna il numero è di 4,5 milioni per mm^3 (2,4).

Nell'uomo e in tutti gli altri mammiferi gli eritrociti sono cellule prive di nucleo, di forma lenticolare biconcava con diametro medio di $7,2\mu\text{m}$ (fig. 1.4). Negli altri vertebrati (anfibi, uccelli) essi posseggono il nucleo (1).

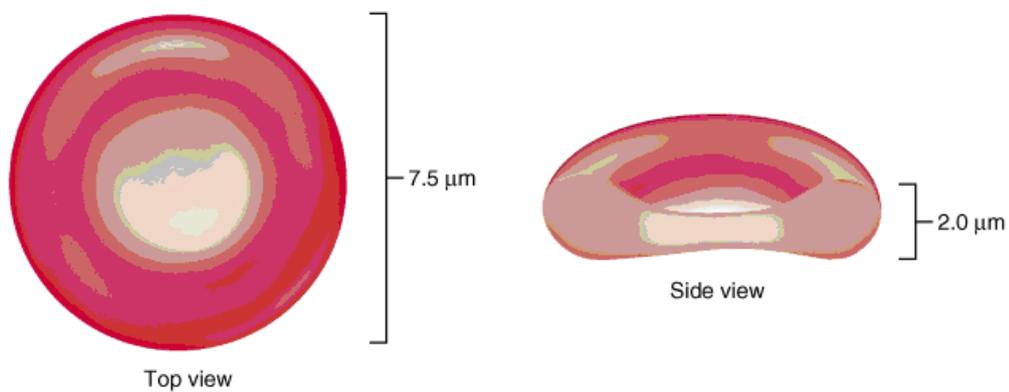


fig. 1.4 Diametro Globulo rosso

La loro funzione è principalmente quella di trasportare ossigeno ed una piccola frazione dell'anidride carbonica prodotta dal metabolismo (funzione che può essere svolta grazie alla presenza dell'emoglobina), la restante parte di anidride carbonica raggiunge i polmoni sciolta nel plasma sotto forma di carbonati (fig. 1.5).

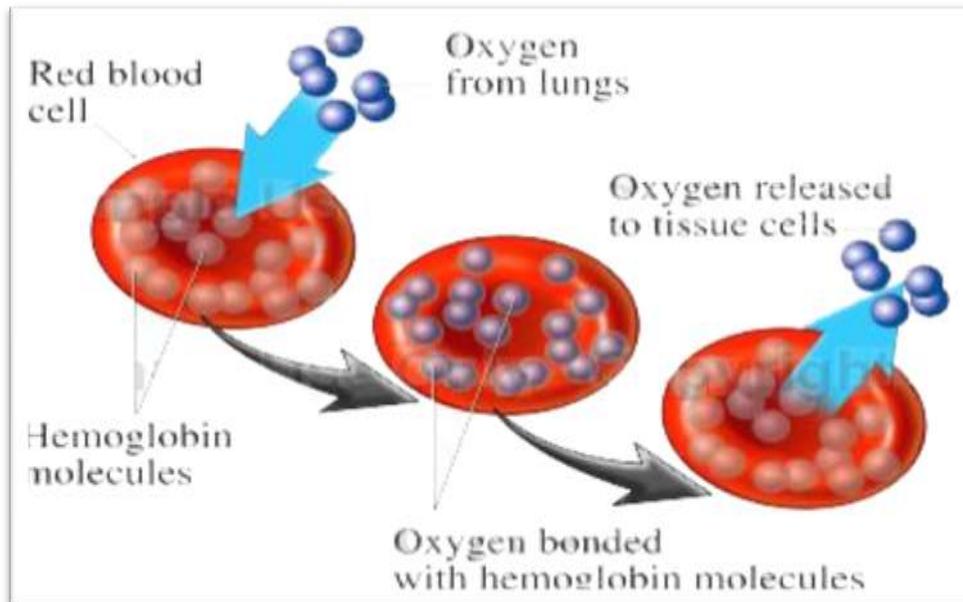


fig. 1.5 Funzione principale degli eritrociti

Gli eritrociti sono delimitati da una membrana che racchiude un'esile struttura citoplasmatica definita stroma, nelle cui maglie si trova il loro costituente fondamentale che è l'emoglobina (Hb).

I globuli rossi non possono riprodursi né riparare danni e hanno una vita breve (120-130 giorni). Con l'invecchiamento vanno incontro a un processo noto come *eritrocateresi* (5).

L'eritropoiesi inizia nell'embrione durante la terza settimana di gestazione, a livello del sacco vitellino. A partire dalla quarta settimana l'eritropoiesi comincia nel fegato, che diventa predominante alla fine del secondo mese. A partire dal quinto mese inizia a livello del midollo osseo, sede che diventa predominante alla fine della gestazione e resta l'unica sede nell'adulto.

L'eritropoiesi dura complessivamente 4-5 giorni durante i quali avvengono una serie di trasformazioni morfologiche nelle cellule precursori degli eritrociti, che al termine del processo diventeranno globuli rossi.

1. Nel primo stadio dell'eritropoiesi le cellule precursori vengono chiamate **Proeritroblasti**: esse hanno un diametro di circa 15-19 micron, un nucleo eucromatico e un citoplasma basofilo per via della presenza di numerosi poliribosomi. La divisione cellulare (mitosi) avviene numerose volte in questo

stadio; l'eritropoietina non è necessaria in questo stadio per il completamento del processo.

2. Nel secondo stadio i proeritroblasti diventano **eritroblasti basofili**: rispetto allo stadio precedente le dimensioni cellulari diminuiscono e la cromatina è molto addensata; il citoplasma è ancora molto basofilo e la cellula va ancora incontro a intense divisioni mitotiche. I recettori per la transferrina vengono espressi.

3. Nel terzo stadio le cellule precursori diventano **eritroblasti policromatici**, in quanto il citoplasma presenta colorazione mista; rispetto allo stadio precedente, le dimensioni del nucleo diminuiscono, la cromatina è ancora più addensata, scompare l'apparato di Golgi e il nucleolo non è più visibile.

4. Nel quarto stadio le cellule precursori diventano **eritroblasti ortocromatici**, caratterizzati da un nucleo piccolo e eterocromatico, da citoplasma acidofilo per l'accumulo di emoglobina e da assenza di mitosi.

5. Nel quinto stadio le cellule precursori diventano **reticolociti** in quanto in queste cellule è presente un reticolo dovuto alla precipitazione dei ribosomi causata dal colorante blu-cresile-brillante: questi sono globuli rossi immaturi, infatti sono ancora presenti ribosomi. Il nucleo è stato estruso dalla cellula.

6. Alla fine del processo di espulsione del nucleo dalla cellula si formano i **globuli rossi**; i nuclei espulsi vengono fagocitati da cellule specializzate dell'isolotto eritroblastico che avvolge i vari eritroblasti dette macrofagi. L'isolotto eritroblastico inoltre cede ai precursori ferritina, proteina essenziale per la sintesi di eme (fig.1.6). L'eritropoiesi viene regolata da vari meccanismi di controllo che fanno sì che avvenga una costante dismissione in circolo di nuovi elementi maturi che sostituiscano i vecchi globuli rossi fagocitati dai macrofagi. L'eritropoietina è uno di questi meccanismi di controllo: essa stimola la produzione di globuli rossi quando c'è carenza di ossigeno (per esempio in alta montagna) (6).

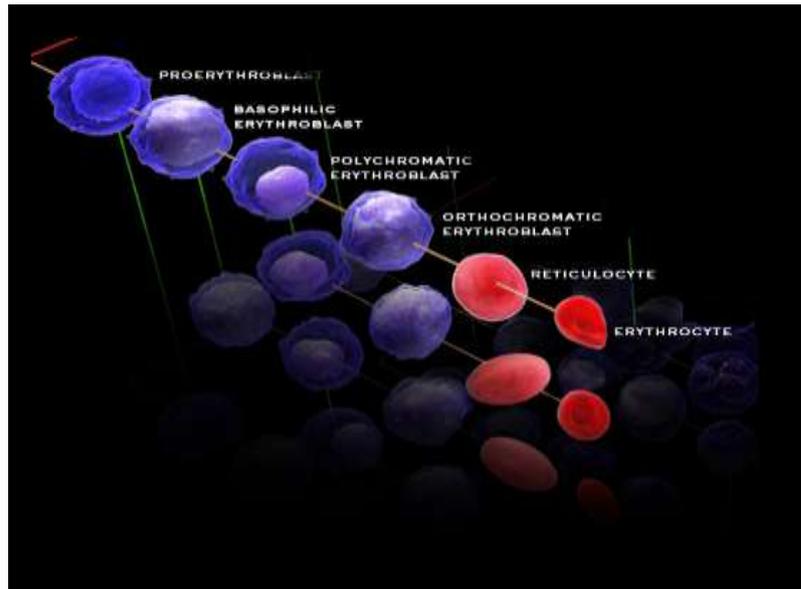


Fig.1.6 Eritropoiesi

1.2.1 L'emoglobina

I globuli rossi sono delimitati da una membrana che racchiude un'esile struttura citoplasmatica; lo stroma, nelle cui maglie si trova il loro costituente fondamentale: l'emoglobina (Hb); quest'ultima è una cromoproteina contenente Fe^{2+} , capace di combinarsi reversibilmente con l' O_2 e conferire al sangue la sua funzione di "veicolo" per questo gas. L'emoglobina è contenuta nei globuli rossi in concentrazione estremamente elevata, pari al 34% del loro peso; i globuli rossi possono quindi essere considerati dei veri e propri "contenitori di Hb": solo il 5% del loro peso è dovuto allo stroma (fig.1.7) (2).

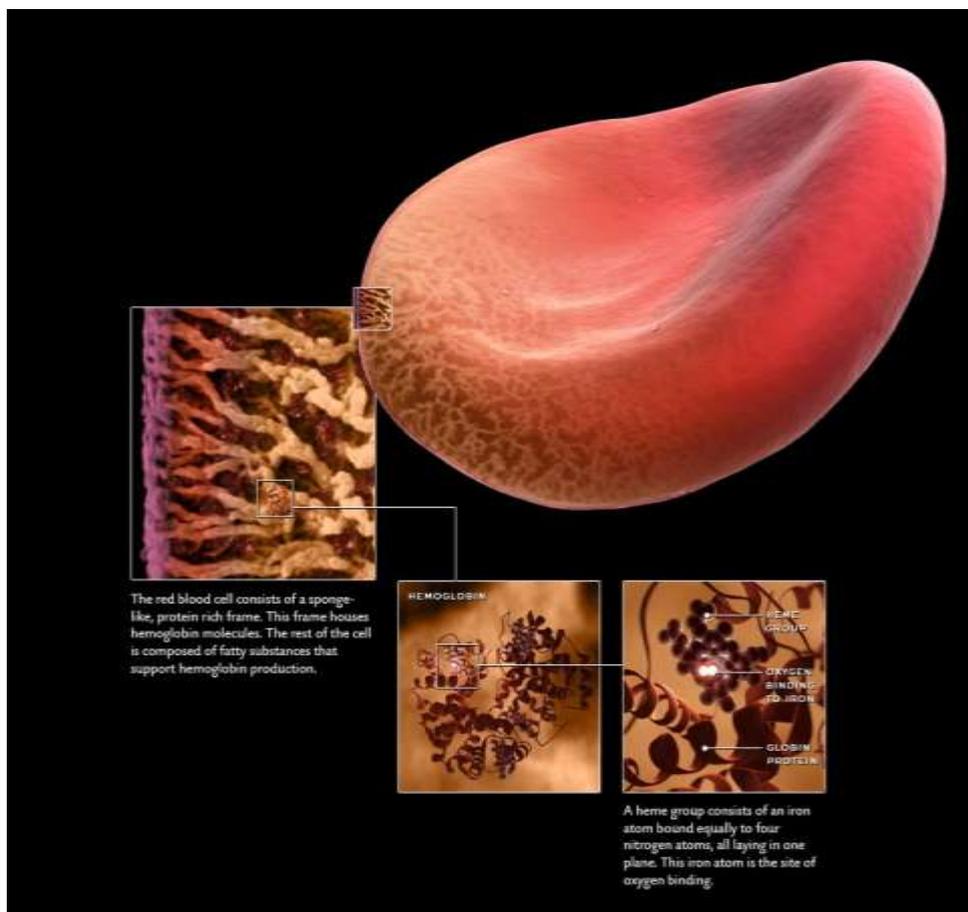


Fig. 1.7 Localizzazione molecola emoglobina

L'emoglobina (Hb), sia quantitativamente che funzionalmente, è il più importante costituente dei globuli rossi, dei quali rappresenta il "pigmento respiratorio". Si tratta di una proteina coniugata, di intenso color rosso (cromoproteina), costituita da una parte proteica: la globina, e da un gruppo prostetico: l'eme ferroso; l'emoglobina contiene, legata al gruppo prostetico, una elevata quantità di

Fe^{2+} : circa lo 0,34%. La molecola emoglobinica è infatti “tetramerica”, composta cioè da 4 subunità polipeptidiche a ciascuna delle quali è associato un eme con il rispettivo atomo di Fe^{2+} . In soluzioni acquose diluite la molecola dell’Hb tende tuttavia a scindersi in 4 monomeri (fig.1.8).

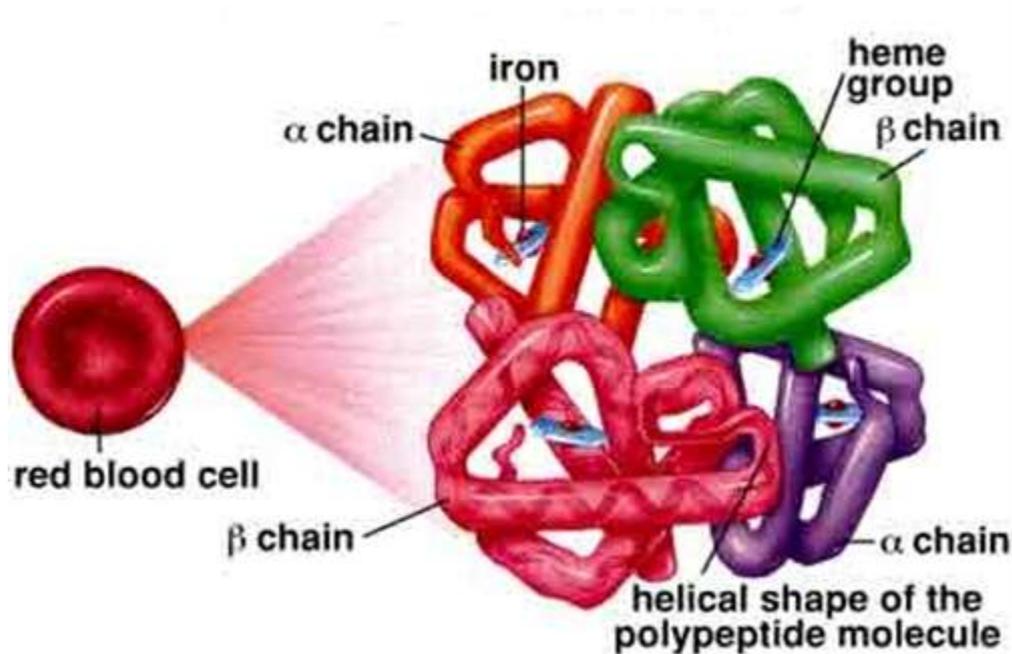


Fig.1.8 - Molecola di emoglobina contenuta nei globuli rossi

L’eme ha una struttura anulare, essendo composto da 4 gruppi pirrolici legati da ponti metinici ($-\text{CH}=\text{}$) a formare l’anello tetrapirrolico; questa struttura molecolare prende anche il nome di nucleo porfirinico. Nel nucleo porfirinico dell’eme, un atomo di Fe^{2+} bivalente è disposto al centro dell’anello; esso stabilisce due legami di valenza con gli atomi di azoto di due gruppi pirrolici e quattro legami di coordinazione: due con gli atomi di azoto degli altri due gruppi pirrolici, e gli altri due, più labili dei precedenti, con la molecola della globina (fig.1.9).

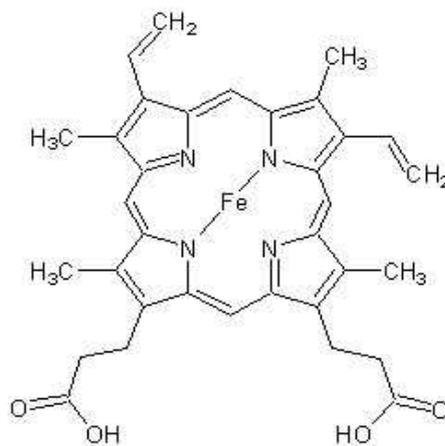


Fig.1.9 Gruppo Eme

Uno di questi è però disponibile per combinarsi con un molecola di ossigeno; è questo legame che, essendo facilmente reversibile, conferisce all'emoglobina la sua funzione di trasporto dell'ossigeno.

La struttura molecolare dell'Hb è ben conosciuta anche nella sua parte proteica. Essa comprende quattro catene polipeptidiche, due di tipo α , e due di tipo β ; la catena α contiene 141 aminoacidi e quella β 146. Ogni catena polipeptidica ha una disposizione spaziale convoluta pressoché identica ed è legata al proprio eme ferroso in una "nicchia" della sua struttura terziaria; i due legami di coordinazione del ferro che legano l'eme al polipeptide si stabiliscono con l'azoto imidazolico di due molecole di istidina, spazialmente affrontate alle due facce dell'eme (2).

L'equilibrio esistente nei legami tra l'eme e la globina è fortemente influenzato dalla presenza della molecola di ossigeno; questa infatti, per la sua configurazione elettronica, è fortemente elettronegativa e tende a legarsi al ferro interrompendo uno dei legami coordinativi dell'eme con l'istidina. Nell'emoglobina ossigenata perciò il ferro è legato con una sola molecola di istidina della catena polipeptidica, essendo l'altro legame coordinativo occupato dall'ossigeno. Lo stabilirsi del legame con l'ossigeno non comporta variazione di valenza dell'atomo di ferro, che rimane allo stato ferroso. La capacità dell'Hb per l'ossigeno è molto elevata; la capacità del sangue per l'ossigeno dipende dal suo contenuto in Hb. La modificazione molecolare che si accompagna con la combinazione dell'Hb con l'ossigeno cambia in modo caratteristico il colore delle sue soluzioni, che è rosso

rutilante nella forma ossigenata e rosso vinoso per quella ridotta: una differenza cromatica che distingue il sangue arterioso da quello venoso (fig.1.10) (2) .

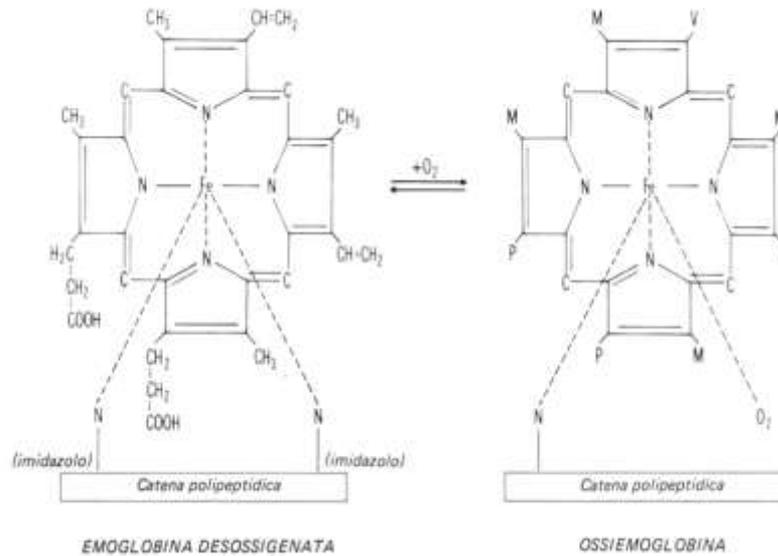


Fig .1.10 - Due forme dell'emoglobina

Per azione di energici ossidanti quali il ferrocianuro, l'Hb passa a metaemoglobina, nella quale il ferro diventa trivalente e si lega con un OH; la metaemoglobina è sprovvista della capacità di combinarsi con l'ossigeno, quindi anche della funzione respiratoria. Piccole quantità di metaemoglobina si formano normalmente nel sangue ma vengono rapidamente ridotte a Hb dai sistemi enzimatici ossido-riduttivi dei globuli rossi (2).

L'Hb oltre che con l'ossigeno, può anche combinarsi con un gas non respiratorio e molto velenoso: l'ossido di carbonio (CO), che si lega al ferro dell'Hb al posto dell'ossigeno. Si forma un composto: la carbossiemoglobina (HbCO), molto più stabile dell'ossiemoglobina; infatti l'affinità dell'Hb per il CO è 200 volte maggiore che per l'ossigeno. La tossicità del CO deriva dalla sua capacità di legarsi stabilmente con l'Hb, rendendola inutilizzabile per il trasporto dell'ossigeno (2).

1.2.2 La membrana degli eritrociti

La membrana cellulare è un sottile rivestimento, con spessore di 5nm che delimita le cellule in tutti gli organismi viventi, le separa con l'ambiente esterno e ne regola gli scambi con questo. Essa è formata in prevalenza da lipidi, e più precisamente da *fosfolipidi*.

Nella componente lipidica si vanno a collocare, con importanti funzioni fisiologiche, *proteine* e una piccola percentuale di *glucidi* (in forma di glicoproteine e glicolipidi) e di molecole di *colesterolo* che la stabilizzano (Fig.1.11).

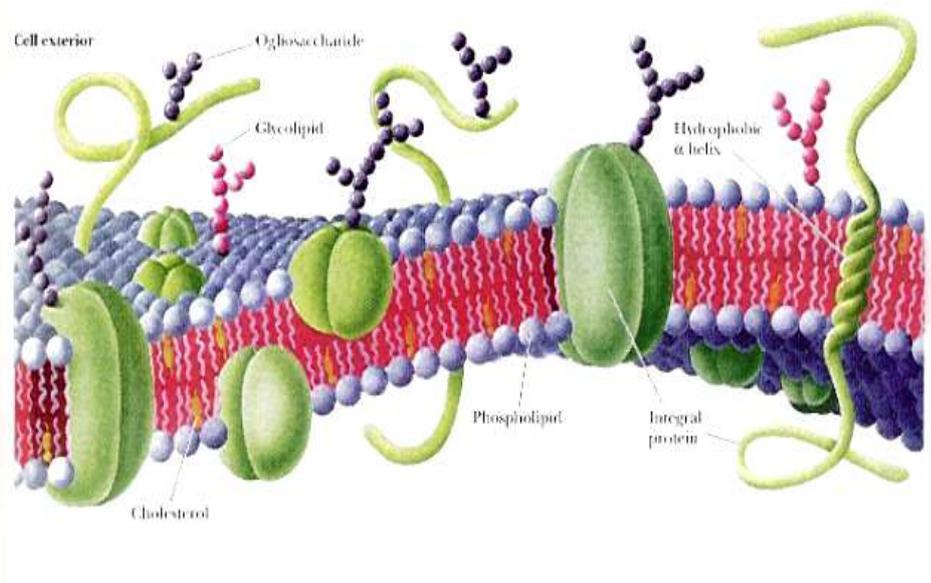


Fig.1.11 struttura delle membrane cellulari .

La membrana cellulare presiede all'omeostasi cellulare, grazie alla sua permeabilità selettiva.

Per la sua posizione di interfaccia, la membrana plasmatica, oltre alla funzione strutturale, svolge tre funzioni essenziali:

1. la funzione di *filtro selettivo*, che lascia passare alcune sostanze piuttosto che altre, assicurando così l'integrità biochimica del citoplasma;

2. la funzione di *superficie di comunicazione*, permettendo sia lo scambio di informazioni tra l'ambiente intra- ed extracellulare, sia l'interazione fisica con le strutture extracellulari circostanti.

3. la funzione di *superficie catalitica*, dato l'abbondante numero di enzimi ad essa legati.

Infine, la membrana cellulare partecipa a funzioni complesse: esocitosi (secrezione), endocitosi (ingestione di sostanze esterne mediante la formazione di vescicole), adesione e movimento cellulare ameboide (es. leucociti) (7) .

La membrana plasmatica dell'eritrocita è costituita da un doppio strato lipidico nel quale sono incorporate numerose proteine globulari, in conformità al modello classico a mosaico fluido della struttura della membrana. Le proteine della membrana eritrocitaria si dividono in integrali e citoscheletriche (Fig.1.12).

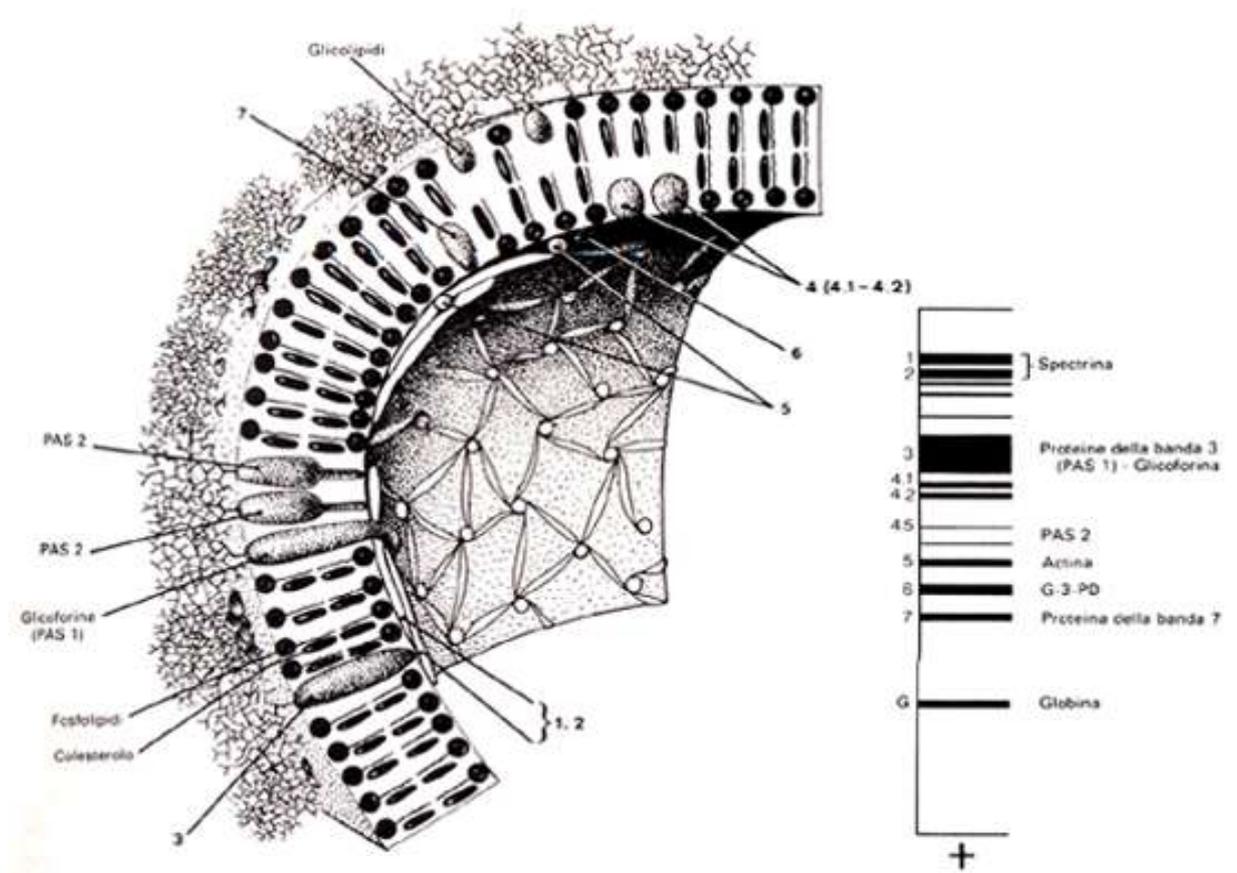


Fig.1.12 Schema illustrante la membrana eritrocitaria con le sue proteine più importanti. Nell'inserto sequenza delle proteine all'elettroforesi su gel di poliacrilamide. 1-2 , spectrina; 3 , proteine della banda 3; 4-1 e 4-2 , proteine della banda 4-1 e 4-2; 5 , actina ; 6 , gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi;7, proteina della banda 7 . La glicoforina appartiene alle proteine della banda 3.

Le **proteine integrali** sono costituite da una parte idrofobica che attraversa la membrana, una parte idrofila esposta verso l'esterno, che può legare catene glucidiche, ed un'altra parte idrofila esposta verso il citoplasma. Le proteine integrali della membrana eritrocitaria sono rappresentate dalla glicoforina e dalla proteina banda 3.

La **Glicoforina** è una proteina di transmembrana a singola elica; è stata la prima proteina di membrana di cui è stata determinata la sequenza completa degli amminoacidi; è costituita da 131 amminoacidi; la maggior parte della sua massa è sulla superficie esterna della membrana dove si trova la sua estremità N-terminale idrofila, che porta carboidrati. La grande maggioranza di carboidrati totali di superficie del globulo rosso è portata da molecole di glicoforina; essa porta anche il 90% dell'acido sialico e quindi la maggior parte della carica negativa di superficie. (Fig. 1.13)

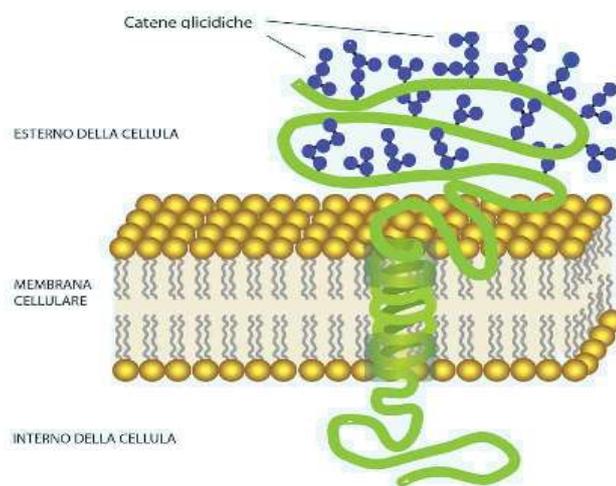


Fig.1.13 Struttura della Glicoforina

Sebbene si trovi solo nei globuli rossi, la sua struttura è rappresentativa di una classe comune di proteine di membrana, che attraversa il doppio strato lipidico come una singola elica (4).

La **Banda3** è una proteina di transmembrana a passaggi multipli; è costituita da 930 aa e attraversa 12 volte il doppio strato lipidico (Fig. 1.14) .

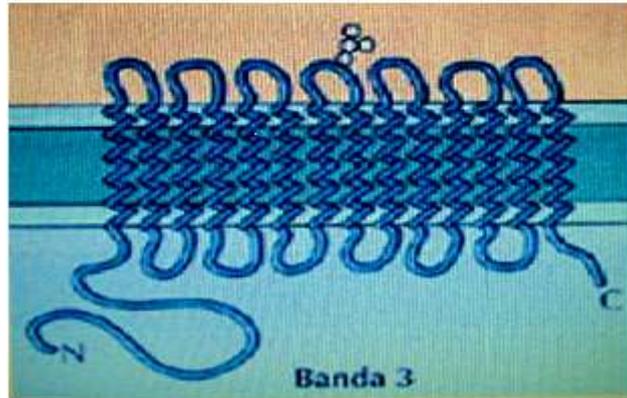


Fig.1.14 Struttura della Banda 3

La proteina Banda 3 essendo un trasportatore di anioni permette a HCO_3^- di attraversare la membrana scambiandosi con Cl^- rendendo la membrana del globulo rosso permeabile a HCO_3^- . Questo trasportatore aumenta dunque la quantità di CO_2 che il sangue può portare ai polmoni (4).

E' la più abbondante proteina integrale della membrana eritrocitaria e costituisce circa il 25 % del

totale delle proteine di membrana. E' composta da un dominio transmembrana e due domini citoplasmatici. I tre domini della banda 3 possiedono ben precise e distinte funzioni cellulari il dominio idrofobico transmembrana è una regione di circa 52 KDa, immersa nel doppio strato lipidico formando una serie di 12-14 ripiegamenti. Costituisce il canale anionico che consente lo scambio di Cl^- e HCO_3^- tra l'interno e l'esterno della cellula. Per questo motivo la banda 3 è chiamata anche lo scambiatore anionico o "anionexchanger1" (AE 1). Questo dominio lega catene oligosaccaridiche contenenti i determinanti antigenici per i gruppi sanguinei.

I tre domini della banda 3 possiedono ben precise e distinte funzioni cellulari (8):

- il dominio idrofilico N-terminale, di circa 43 KDa, comprende i residui aminoacidici 1-359 ed è chiamato il dominio citoplasmatico della banda 3 o "cytosolic domain of band 3" (cdb3). Esso forma un peduncolo flessibile che si protende verso il citoplasma e serve come sito di ancoraggio per la struttura citoscheletrica e per alcune proteine citoplasmatiche come emoglobina o aldolasi;

- il dominio idrofilico C-terminale comprende gli ultimi 33 residui aminoacidici ed è rivolto anch'esso verso il lato citoplasmatico della membrana cellulare. Negli eritrociti la banda 3 ha numerose funzioni biologiche (fig.1.15).

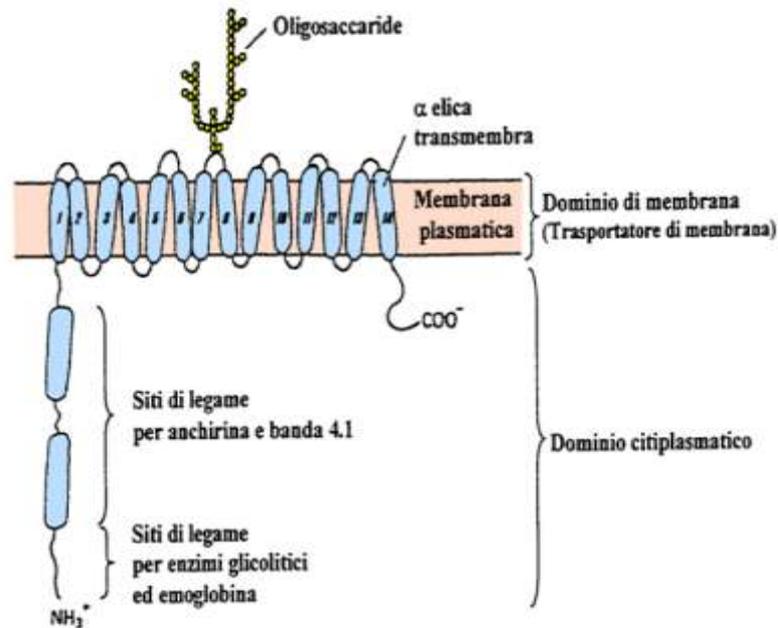


Fig. 1.15 Rappresentazione schematica della banda 3.

Come canale ionico gioca un ruolo cruciale nel trasporto dell'anidride carbonica (CO_2) dai tessuti ai polmoni. Il CO_2 , che diffonde dai tessuti al sangue, entra negli eritrociti e viene rapidamente idratata ad acido carbonico (H_2CO_3) grazie all'enzima anidrasi carbonica. H_2CO_3 quindi si dissocia in H^+ e HCO_3^- e l'anione bicarbonato che si è formato esce quindi dall'eritrocita attraverso la banda 3, contro uno ione Cl^- che entra (105 coppie al secondo). Questo scambio elettroneutro permette l'eliminazione dell' HCO_3^- dagli eritrociti. A livello polmonare, invece, HCO_3^- rientra negli eritrociti (in cambio di Cl^-) dove si associa con H^+ dando H_2CO_3 . Il ricostituito H_2CO_3 , per mezzo dell'anidrasi carbonica, si dissocia a CO_2 , che viene eliminata, e H_2O (fig.1.16). L'anidrasi carbonica è legata al dominio C-terminale idrofilico della banda 3 con un'interazione di tipo elettrostatico (9). Anche lo ione ossalato viene scambiato dagli eritrociti attraverso la banda 3.

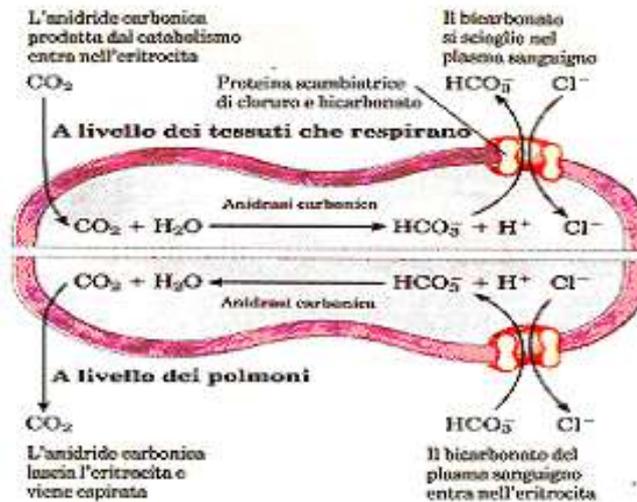


Fig .1.16 Meccanismo di conversione dell'anidride carbonica a bicarbonato e suo trasporto attraverso l'eritrocita

Come sito di ancoraggio, l'estremità N-terminale idrofila (cdb3) può legare proteine citoscheletriche quali anchirina, banda 4.1 e 4.2, regolando così la forma eritrocitaria. Inoltre, la regione cdb3 può legare proteine citoplasmatiche come enzimi glicolitici, che sono inattivi quando legati alla banda 3 e ritornano, invece, attivi quando rilasciati nel citoplasma. La banda 3 funge, quindi, anche da proteina regolatrice della glicolisi (10, 11,12, 13, 14).

Le **proteine citoscheletriche** sono situate sulla superficie interna della membrana degli eritrociti Fig. 1.17 e formano uno scheletro fibrillare aventi il ruolo di mantenere la forma dell'eritrocita.

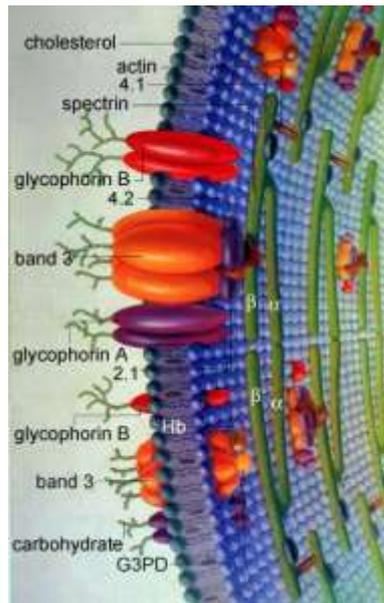


Fig.1.17 Organizzazione delle principali proteine del citoscheletro eritrocitario

La **Spettrina** è la proteina più abbondante della membrana plasmatica dei globuli rossi, funziona da citoscheletro (filamenti intermedi), è associata non covalentemente alla superficie citosolica della membrana plasmatica ed è un eterodimero composto da 2 grandi subunità (α e β) che si associano a formare una struttura a tetramero (Fig. 1.18).

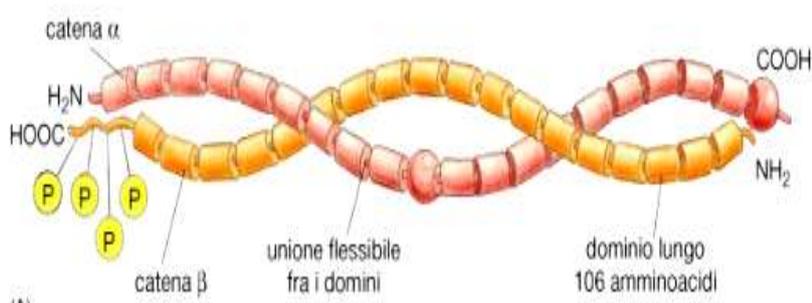


Fig.1.18 Struttura della spettrina

Il risultato di questa struttura reticolare basata su spettrina permette al globulo rosso di sopportare lo stress imposto alla membrana quando è forzato attraverso stretti capillari (4).

1.2.3 Permeabilità anionica degli eritrociti

Il mantenimento della forma e della deformabilità degli eritrociti, dipende dall'integrità funzionale e strutturale delle proteine e dei lipidi, e dalla loro interazione (15). La permeabilità anionica è una caratteristica della membrana, dipendente principalmente dalle proteine di scambio della banda 3, che regolano il trasporto di anioni Cl^- attraverso la membrana. La funzione di regolazione della banda 3 è collegata al quadro della membrana degli eritrociti. La mancanza di organizzazione dei lipidi, in seguito all'incremento dei prodotti di degradazione lipidica, può influenzare in modo significativo la permeabilità (15). I differenti legami dell'ossiemoglobina e della deossiemoglobina, all'estremità della banda 3, possono modulare la permeabilità di membrana attraverso vie di segnale, le quali coinvolgono anche altre parti del citoscheletro o altre vie di regolazione enzimatica (chinasi, fosfatasi), anch'esse associate con questi siti (16).

1.2.4 Comportamento osmotico dell'eritrocita, resistenza globulare e caratteristiche fisiologiche dell'eritrocita

La membrana plasmatica dell'eritrocita possiede spiccate proprietà osmotiche ed una permeabilità agli ioni, come il sodio e il potassio. Il gradiente di concentrazione di tali ioni, è garantito dalla presenza di meccanismi di trasporto attivo che operano appunto nella membrana dei globuli rossi. Tra questi, particolarmente efficiente è la pompa ionica di scambio Na^+/K^+ che mantiene a cavallo della membrana i due elevati gradienti di concentrazione per il Na^+ (diretto verso l'interno) e per il K^+ (diretto verso l'esterno), cui sono legati i flussi ionici passivi responsabili del potenziale di membrana, nonché i diversi trasporti attivi secondari (primo tra tutti il controtrasporto $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) correlati con il metabolismo delle emazie e con la loro funzione di "veicoli" dei gas respiratori. L'energia necessaria per il funzionamento della pompa ionica di scambio Na^+/K^+ delle emazie deriva, in forma di ATP, dal metabolismo glucidico ed in particolare dalla glicolisi; pertanto l'attività della pompa ionica di scambio Na^+/K^+ è facilmente ridotta o arrestata anche da modiche condizioni sfavorevoli (2).

L'acqua passa attraverso una membrana semipermeabile, come la membrana plasmatica dei globuli rossi, per osmosi, ossia passivamente, in base alle

differenze nel gradiente di concentrazione degli ioni o di altri soluti tra l'esterno e l'interno della cellula (1).

Gli eritrociti sono in equilibrio osmotico con il plasma che ha una pressione osmotica corrispondente a quella di una soluzione acquosa contenente 0,85 – 0,90 % di cloruro di sodio, quindi si dice che il plasma è isotonico rispetto al globulo rosso. Come tutte le cellule animali anche gli eritrociti, se posto in una soluzione isotonica, mantengono il proprio volume e la propria forma. Se gli eritrociti sono posti in una soluzione ipertonica l'acqua contenuta all'interno della cellula fuoriesce nell'ambiente extracellulare circostante con conseguente raggrinzimento dei globuli rossi. Al contrario, se gli eritrociti sono immersi in soluzioni ipotoniche, questi si rigonfiano assumendo una forma sferica, il volume degli eritrociti cresce di 1,6 - 2 volte il volume normale fino ad avere la sua lisi (17) (Fig.1.19).

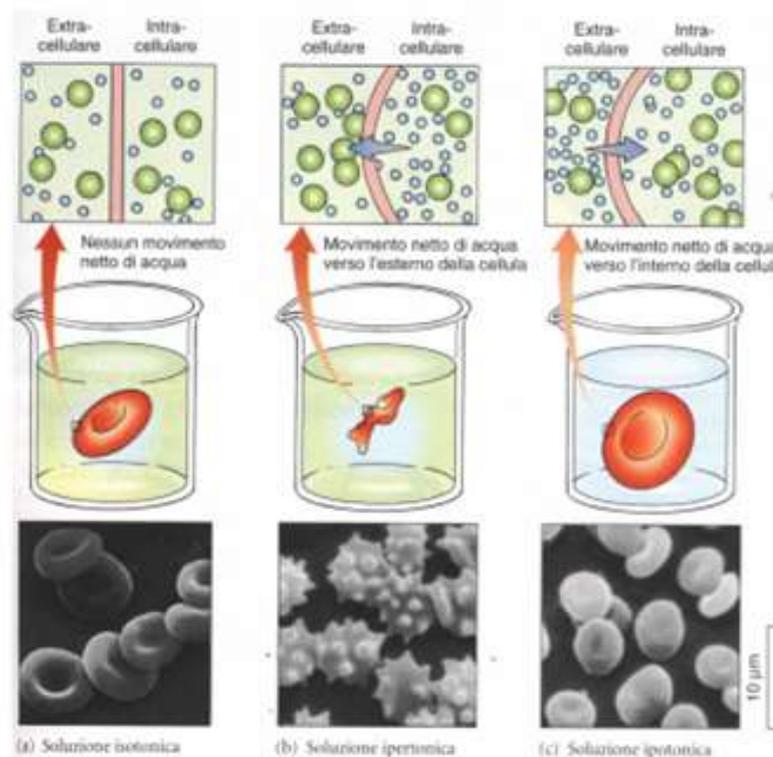


Fig.1.19 Effetti osmotici sull'eritrocita

Si definisce **resistenza globulare** l'indice che esprime la resistenza all'emolisi osmotica in una soluzione ipotonica. Nel sangue normale l'emolisi dei globuli

rossi più labili compare ad una concentrazione di 0,48% di NaCl (resistenza minima) ed è completa per tutte le emazie ad una concentrazione di 0,30% di NaCl (resistenza massima). La resistenza dei globuli rossi all'emolisi è normalmente maggiore in quelli più giovani e minore in quelli più vecchi e ciò trova riscontro nella loro diversa forma, che è maggiormente biconcava quanto più le emazie sono di recente formazione. Si ritiene che la membrana dell'eritrocita sia poco estensibile, quindi, quando esso ha raggiunto la forma sferica, ogni ulteriore rigonfiamento determina la rottura della membrana (2). La resistenza osmotica ovvero la resistenza alla rottura dei globuli rossi viene valutata in presenza di acqua distillata ed in varie soluzioni di NaCl (cloruro di sodio, il comune sale da cucina) con concentrazione crescente. Si riscontra un aumento dei valori in caso di sferocitosi, stomatocitosi, ellissocitosi. I valori, invece, diminuiscono nei pazienti che hanno subito una splenectomia (asportazione chirurgica della milza) ed in quelli affetti da talassemia o anemia falciforme. L'emolisi è un fenomeno che può essere ottenuto anche indipendentemente dall'effetto osmotico ad opera di diverse sostanze capaci di alterare la struttura della membrana nei globuli rossi. Inoltre, questa può essere dovuta anche ad alterazioni dei componenti intraeritrocitari (Hb o enzimi), ad alterazioni della membrana (permeabilità, struttura o contenuto lipidico) o ad alterazioni estrinseche al globulo rosso (anticorpi sierici, traumi intravascolari o agenti infettivi) (2) (fig.1.20).



Fig.1.20 Emolisi eritrocitaria

1.3 I radicali liberi

La teoria dei radicali liberi è stata introdotta nel 1956 da Denham Harman un ricercatore dell'Università del Nebraska (premio Nobel nel 1995), secondo la quale i radicali liberi sono delle molecole altamente reattive in virtù della presenza di un elettrone spaiato, peculiarità chimica che conferisce ad essi un'elevata instabilità e, di conseguenza, presentano l'urgenza di reazione per raggiungere un livello maggiore di stabilità (18) (fig.1.21).

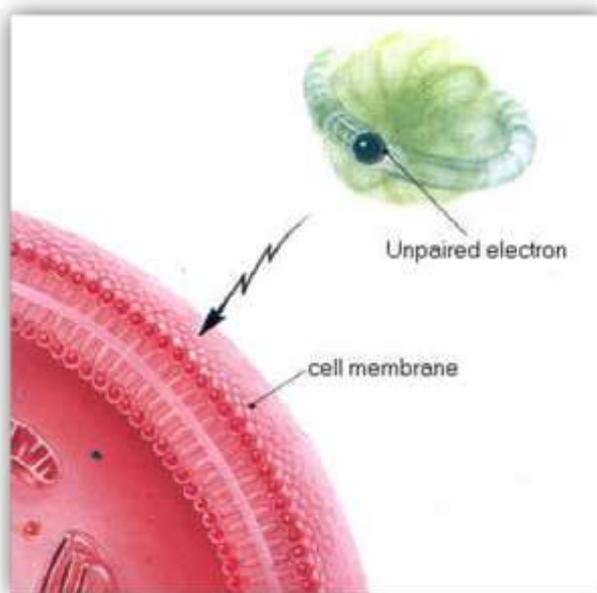


Fig. 1.21 Meccanismo d'azione dei radicali liberi

Il radicale libero, infatti, durante la sua breve esistenza è spinto a catturare un atomo di idrogeno da altre molecole, determinando così una reazione a catena che finisce per alterare irreversibilmente la struttura chimica delle componenti cellulari con cui viene a contatto. Essi provengono sia da fonti endogene che esogene al nostro corpo. Internamente essi vengono creati come scarto del processo metabolico (19), infatti i radicali liberi entrano in gioco costantemente anche svolgendo una lieve attività fisica, come camminare, e possono aumentare notevolmente svolgendo attività fisica intensa (20).

I radicali liberi possono anche provenire dall'ambiente esterno e penetrare nell'organismo attraverso la via cutanea, respiratoria o gastrointestinale. Le fonti esogene principali sono costituite da:

- ✓ il fumo di sigaretta
- ✓ le radiazioni solari e ionizzanti
- ✓ lo sforzo fisico intenso
- ✓ l'esercizio fisico inadeguato
- ✓ le infezioni
- ✓ le infiammazioni
- ✓ i fenomeni di ischemia (riduzione massiccia dell'apporto di sangue arterioso in un determinato distretto corporeo)
- ✓ le diete troppo ricche in proteine e grassi animali
- ✓ l'alimentazione squilibrata
- ✓ l'inquinamento ambientale
- ✓ l'uso di pillola contraccettiva e di terapia ormonale sostitutiva
- ✓ l'assunzione cronica di farmaci
- ✓ l'abuso di sostanze alcoliche (21) (fig. 1.22).

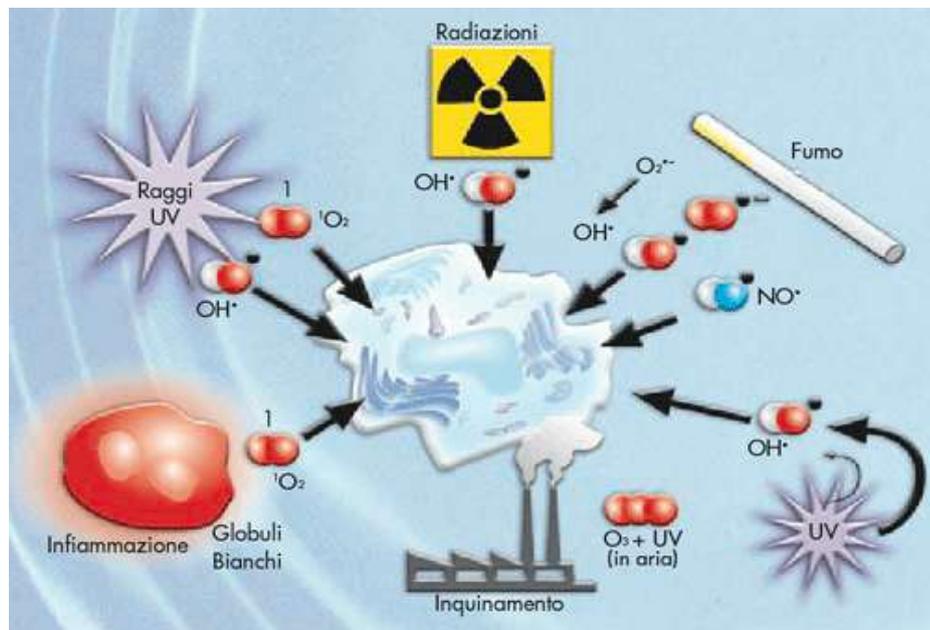


Fig.1.22 Agenti responsabili della produzione di radicali liberi

I radicali liberi, poiché sono altamente reattivi instabili, danno luogo a una successione di reazioni chimiche che possono portare a una serie di patologie correlate; un organismo stressato infatti, non è in grado di neutralizzare l'eccessivo livello di radicali liberi endogeni, e ciò può provocare un'accelerazione del processo fisiologico di invecchiamento.

Le patologie più evidenti, correlate all'azione dei radicali liberi, sono:

- ✓ forme tumorali (tumore al polmone, tumore alla prostata) (22);
- ✓ patologie del sistema circolatorio (ipertensione, aterosclerosi, ictus, infarto) (23, 24);
- ✓ patologie del sistema nervoso centrale (morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson) (25, 26).[1].

I radicali liberi vengono distinti in ROS (specie reattive dell'ossigeno) e RNS (specie reattive dell'azoto), tra quest'ultimi possiamo ricordare il monossido (NO) ed il biossido di azoto (NO₂) che sono fra i maggiori inquinanti atmosferici (27).

1.3.1 Le specie reattive dell'ossigeno

Buona parte dello stress ossidativo di derivazione endogena nasce a livello intracellulare dalla riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare mentre passa attraverso la catena di trasporto respiratoria nella membrana mitocondriale interna. Le cellule viventi, per generare energia, ossidano enzimaticamente i principi nutritivi (in particolare lipidi e carboidrati); ciò comporta una riduzione dell'ossigeno ad acqua. Per effettuare questa trasformazione, l'ossigeno molecolare viene sottoposto ad una serie di riduzioni e produce una serie di intermedi radicalici. Questi sono altamente instabili e reattivi e sono usualmente indicati in letteratura come "specie reattive dell'ossigeno" o ROS (reactive oxygen species) (28).

La loro formazione (e i problemi di tossicità che ne conseguono) si ha solamente quando l'ossigeno molecolare è impossibilitato a ricevere contemporaneamente i quattro elettroni di cui necessita per la riduzione ad acqua. Esistono diverse specie conosciute di ROS che si formano durante la riduzione dell'ossigeno (fig.1.23) fra cui le più studiate sono:

- radicale superossido

- perossido di idrogeno
- radicale idrossile
- ossigeno singoletto

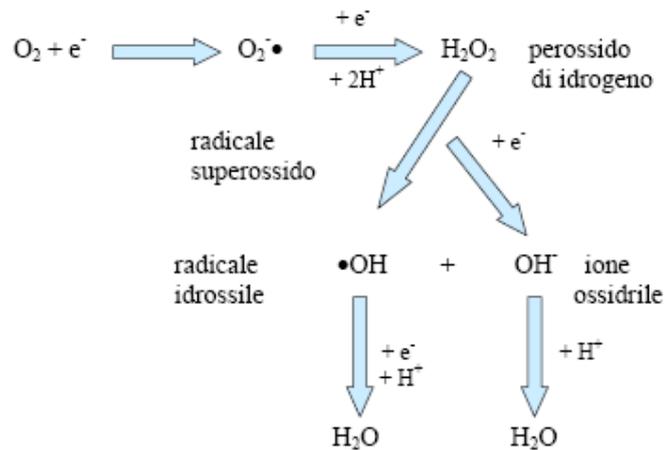
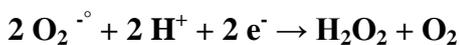


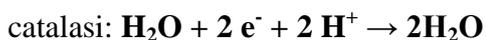
Fig.1.23 Formazione dei radicali dell'ossigeno

Il **radicale superossido** è un prodotto di scarto della respirazione mitocondriale oppure può essere prodotto da enzimi quali xantina ossidasi (NADPH ossidasi); è fortemente reattivo e citotossico, in quanto, comportandosi come energico ossidante, attacca un ampio numero di substrati per completare i propri orbitali. Il danno che può causare, però, è minimizzato dalla compartimentalizzazione biologica, poiché il radicale superossido non è in grado di attraversare la membrana mitocondriale, dall'attività dell'enzima protettivo superossido dismutasi (SOD) che lo converte a perossido di idrogeno e da composti come la vitamina A, in grado di sequestrarlo (29).



Perossido di idrogeno H_2O_2

Dalla reazione di dismutazione si forma perossido di idrogeno, normalmente non tossico, in quanto viene rapidamente neutralizzato dagli enzimi:



Il perossido di idrogeno si può formare anche direttamente a livello di microsomi, perossisomi e mitocondri. E' presente all'interno della cellula in concentrazioni

variabili e il rischio ad esso associato è dovuto alla sua capacità di attraversare velocemente le membrane cellulari, diffondendo in altri distretti dove può attivare processi perossidativi. Può inoltre reagire con ferro o rame ridotti (reazione di Fenton) e portare alla produzione del radicale ossidrilico:

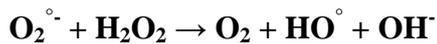


Può ossidare composti sulfidrilici (29).

Radicale idrossile HO°

Viene prodotto dalla decomposizione dei perossidi; è estremamente ossidante e in grado di attivare reazioni a catena. Non può essere eliminato mediante una reazione enzimatica ma con l'utilizzo di antiossidanti, come il glutatione.

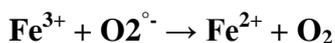
Si può generare dalla combinazione di una molecola di radicale superossido $O_2^{\circ-}$ ed una molecola di H_2O_2 secondo la reazione di Haber-Weiss, catalizzata da ioni Fe^{2+} o Cu^+ :



Il radicale idrossile si può formare anche dalla scissione di H_2O_2 ; tale reazione è favorita dal calore o da radiazioni ionizzanti, ma avviene anche in condizioni fisiologiche con interazione diretta fra H_2O_2 e ferro, secondo la reazione di Fenton:



Per la produzione del radicale idrossile è fondamentale la presenza di ferro allo stato di Fe^{2+} , anche se normalmente il metallo è legato a proteine di trasporto e di deposito (transferrina, ferritina), o a proteine funzionali (emoglobina, mioglobina). Per rendere libero il ferro, è sufficiente la presenza dello ione superossido o un abbassamento del pH dovuto, ad esempio, alla produzione di acido lattico (ischemia o anossia).



Il radicale idrossile è, fra i radicali dell'ossigeno, la molecola più tossica perché altamente reattiva e priva di ogni meccanismo di inattivazione endogena. Costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi che avvengono a livello dei tessuti dell'organismo. HO° è in grado infatti di collidere e danneggiare tutte le macromolecole cellulari: proteine, acidi nucleici,

glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi poliinsaturi dei fosfolipidi di membrana (29).

Ossigeno singoletto $^1\text{O}_2$

Questa forma chimica dell'ossigeno non è un vero e proprio radicale libero, come si deduce dalla sua configurazione elettronica in cui tutti gli elettroni di valenza hanno spin opposti. Differisce dallo stato fondamentale (tripletto) dell'ossigeno molecolare nell'inversione di direzione dello spin di un elettrone nell'orbitale di valenza più esterno. Rappresenta lo stato eccitato di O_2 o si può formare per dismutazione spontanea del radicale superossido ($\text{O}_2^{\circ-}$) per interazione di questo con H_2O_2 (reazione di Haber Weiss) o con il radicale idrossile HO° .

Questa specie si rivela importante poiché da studi in vitro è emerso che $^1\text{O}_2$ può nuocere ai sistemi viventi ossidando diverse molecole organiche, quali lipidi di membrana, proteine, acidi nucleici, nucleotidi, carboidrati e tioli (29).

1.3.2 Gli effetti dei ROS sulle macromolecole

Paradossalmente, se da una parte l'ossigeno è essenziale per il normale metabolismo dell'organismo, dall'altra diventa pericoloso per lo stato di salute a causa delle numerose reazioni di ossidazione incontrollate (autossidazione) in presenza di ossigeno, o meglio, delle cosiddette specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono provocare dei danni a carico delle cellule tissutali.

I ROS sono perciò causa di modificazioni di molte macromolecole (fig.1.24) come:

I lipidi: vanno incontro a *lipoperossidazione* con formazione di composti tossici. Ne conseguono un danno alle membrane cellulari e la variazione della loro permeabilità.

Le proteine: vanno incontro a ossidazione dei loro gruppi $-\text{SH}$ liberi degli enzimi. L'ossidazione è dovuta alla capacità dei ROS di generare idroperossidi sulle catene polipeptidiche; questi ultimi, in presenza di peculiari ioni metallici di transizione, sono in grado di generare altri radicali, a loro volta responsabili di ulteriori reazioni a catena intra ed intermolecolari che generano numerosi sottoprodotti, tra cui aminoacidi ossidati, carbonili e prodotti di frammentazione. Inoltre, si assiste alla formazione di legami covalenti con altre macromolecole e alla distruzione di coenzimi.

I carboidrati: vanno incontro a ossidazione diretta e a depolimerizzazione.

Gli acidi nucleici: vanno incontro a idrossilazione delle loro basi con possibile comparsa di mutazioni (30; 31; 32).



Fig.1.24 Danno dei radicali liberi alle macromolecole

1.3.3 Perossidazione lipidica

Lo studio della perossidazione lipidica ha ricevuto un notevole interesse nel campo della medicina e della biologia, basato sull'evidenza che tale processo è coinvolto nello sviluppo di molte malattie croniche (33; 34; 35; 36; 37),

La perossidazione lipidica, un processo di deterioramento degli acidi grassi insaturi, è un fenomeno piuttosto complesso indotto dall'ossigeno in presenza di iniziatori come i radicali liberi o gli ioni metallici. I effetti specifici della perossidazione lipidica includono l'ossidazione delle lipoproteine a livello plasmatico, e il danneggiamento delle membrane biologiche, che è determinato da un'alterazione della fluidità dei lipidi di membrana e da una variazione della sua permeabilità (38).

La perossidazione lipidica come qualsiasi reazione radicalica si compone di tre fasi principali consequenziali che sono l'iniziazione, la propagazione e la terminazione (fig. 1.25).

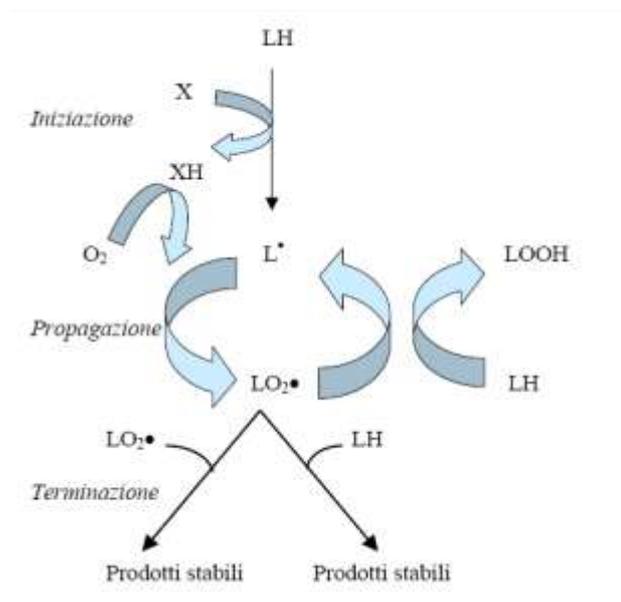
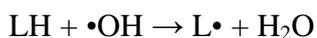
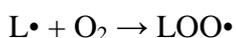


Fig.1.25 Schema generale delle reazioni di perossidazione lipidica

Il processo è iniziato dal radicale idrossile, che cattura un atomo di idrogeno da un carbonio metilenico nella catena polialchilica dell'acido grasso:



Il radicale così formatosi ($\text{L}\bullet$) tende a stabilizzare la sua struttura con la formazione di dieni coniugati. Questi, essendo uno dei primi prodotti della perossidazione lipidica, ne rappresentano pertanto un indice primario. In condizioni aerobiche un acido grasso con un elettrone spaiato subisce un riarrangiamento molecolare con O_2 per generare un radicale perossilipidico ($\text{LOO}\bullet$):



Questo prodotto è altamente reattivo e può dar luogo a due diverse reazioni (39):

1. il gruppo perossilico può ciclizzare e formare un lipoperossido ciclico, da substrati quali l'acido arachidonico ed eicosapentaenoico. Il prodotto ciclico così ottenuto può successivamente frammentarsi e dar luogo a catene alifatiche contenenti due gruppi carbonilici formando composti come la malonildialdeide (MDA), una dialdeide altamente reattiva (40).

Questa può reagire con gruppi amminici liberi di proteine, fosfolipidi o acidi nucleici (41) formando legami covalenti stabili tipo basi di Schiff che inducono alterazioni strutturali di tali molecole biologiche. I legami crociati proteina-

MDA–fosfolipide, proteina–MDA–proteina o fosfolipide–MDA–fosfolipide causano infatti diminuzione del grado di libertà e della possibilità di movimento delle molecole stesse, con perdita di fluidità della membrana come effetto ultimo (fig. 1.26).

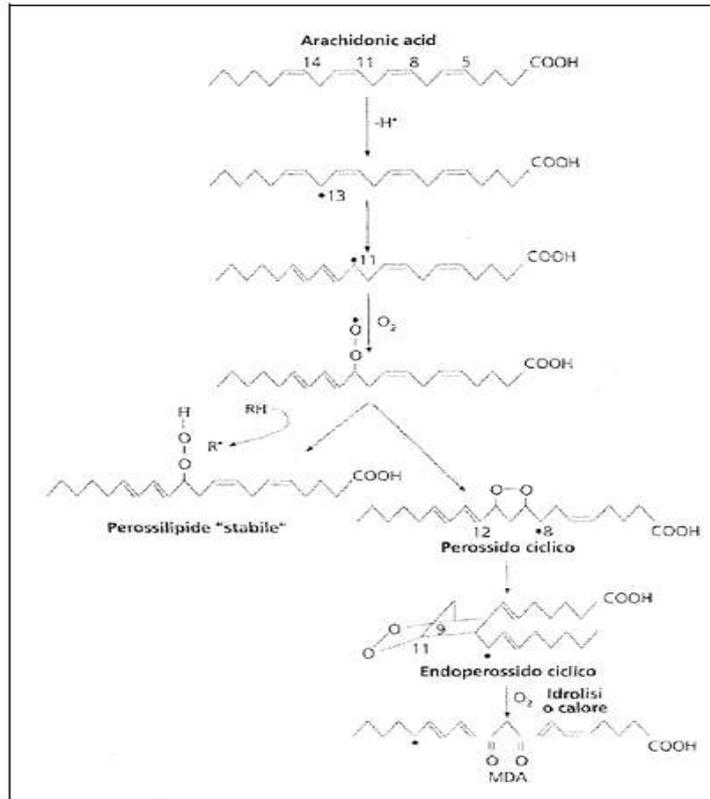
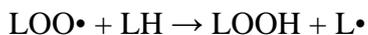


Fig.1.26 - Formazione di idroperossidi e perossidi ciclici dall'acido arachidonico.

2. i radicali possono anche catturare molecole di idrogeno dagli acidi grassi adiacenti per formare un lipide idroperossido, inducendo la propagazione della perossidazione lipidica:



Il radicale $L\bullet$ può propagare ulteriormente le reazioni di perossidazione: dopo la fase di iniziazione si hanno pertanto le fasi di propagazione dei processi di perossidazione. La frammentazione e le lesioni molecolari degli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi portano alla destrutturazione della membrana cellulare, alla diminuzione della sua fluidità, alla perdita delle normali interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine e alla formazione di regioni idrofile nel core idrofobo. Il gruppo perossilico così formatosi è molto più idrofilico di quello originario e tende a

portarsi nella regione superficiale del bilayer ripiegando ad U la catena acilica dell'acido grasso (42).

Questo nuovo assetto determina un aumento dell'ingombro, con conseguenti alterazioni strutturali e funzionali della membrana. Inoltre, la nuova configurazione del legame estereo, tra il glicerolo del fosfolipide e il carbossile del perossilipide, facilita l'attività della fosfolipasi A₂ di membrana che idrolizza il fosfolipide perossidato a lisofosfolipide e acido perossilipidico libero, comportando un ulteriore danno alla struttura e alla funzionalità della membrana (43).

Si possono avere inoltre fenomeni di alchilazione di gruppi funzionali critici di proteine (gruppi -SH) da parte di prodotti aldeidici derivanti dalla perossidazione, con rottura dei legami peptidici o formazione di ponti disolfuro (-S-S-) intramolecolari. In tal modo si possono inattivare enzimi, sistemi recettoriali, proteine essenziali per l'omeostasi cellulare e svariate altre, quali le proteine del citoscheletro (actina e tubulina) e i canali del calcio. La terza ed ultima fase del processo di perossidazione è la terminazione, in cui si ha la formazione di composti stabili a partire da più radicali o per opera di molecole aventi la funzione di interrompere la reazione a catena: tra esse il tocoferolo, il più importante nelle membrane cellulari (43).

1.4 Stress Ossidativo

Lo **stress ossidativo** è, per definizione, la conseguenza diretta dell'azione dannosa esercitata da quantità abnormemente elevate di radicali liberi sulle cellule e sui tessuti del nostro organismo.

Ciò è determinato da uno squilibrio, da parte del sistema di difesa, tra l'aumentata produzione di alcune scorie del metabolismo potenzialmente dannose e la ridotta eliminazione di esse (44) (fig. 1.27).



Fig.1.27 *Squilibrio tra ossidanti e antiossidanti*

Il perdurare del rischio ossidativo può determinare delle reazioni a carico delle strutture cellulari che innescano processi di invecchiamento di tutti i tessuti, non immediatamente visibili, ma che si manifestano nel corso del tempo. Proprio per questo motivo non è possibile individuare delle sintomatologie imputabili all'eccesso di radicali liberi secondo un classico schema di causa-effetto, con il rischio di sottovalutare l'intera problematica. Ormai è accertato che i danni provocati dai radicali liberi alle strutture vitali degli organismi viventi, sono coinvolti nel processo di invecchiamento e nello sviluppo di numerose patologie croniche e degenerative, incluse neoplasie, malattie cardiovascolari e perfino gravi malattie degenerative delle cellule nervose cerebrali, come il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer (45; 46; 47; 48; 49).

1.5 Antiossidanti

1.5.1 Generalità

I radicali liberi, costantemente prodotti durante il metabolismo, sono eliminati da un sistema di antiossidanti altamente specializzati (50). Gli antiossidanti, sono stati definiti come: *tutte quelle sostanze che ritardano o inibiscono un danno ossidativo delle molecole bersaglio* (51). Questo efficiente sistema di protezione, intracellulare ed extra cellulare, degli antiossidanti esiste per sopprimere i radicali liberi (52). Gli agenti antiossidanti riportano l'equilibrio chimico nei radicali liberi

grazie alla possibilità di fornire loro gli elettroni di cui sono privi (51). L'incremento nel plasma dello stato degli antiossidanti può contribuire anche alla prevenzione della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi degli eritrociti (53). Gli antiossidanti sono classificati in due grandi divisioni, a seconda che siano solubili in acqua (idrosolubili) o nei lipidi (liposolubili). In generale, gli antiossidanti idrosolubili reagiscono con gli ossidanti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre quelli liposolubili proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica. Questi composti riducenti possono inoltre essere sintetizzati dal corpo umano o ottenuti dalla dieta, per tanto si parla di antiossidanti endogeni (o enzimatici) ed esogeni (o non enzimatici) (Fig.1.28) (54).

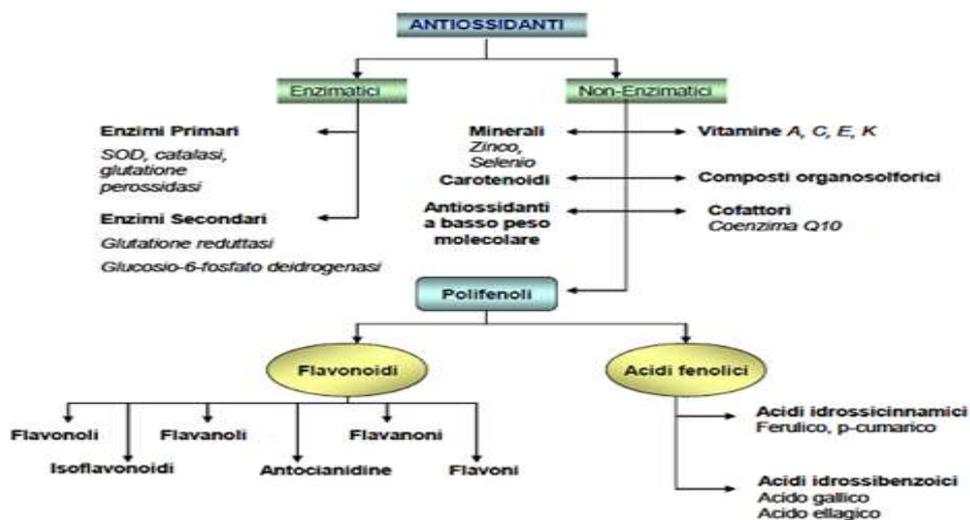


Fig. 1.28 Classificazione degli antiossidanti

1.5.2 Gli Antiossidanti endogeni o enzimatici

Gli antiossidanti enzimatici vengono sintetizzati all'interno delle cellule e comprendono :

- la Superossido Dismutasi
- le Catalasi
- il Glutazione
- la Glutazione Perossidasi
- la Glutazione Reduttasi

La **superossidodismutasi** è una metalloproteina contenente Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (55) (fig. 1.29).

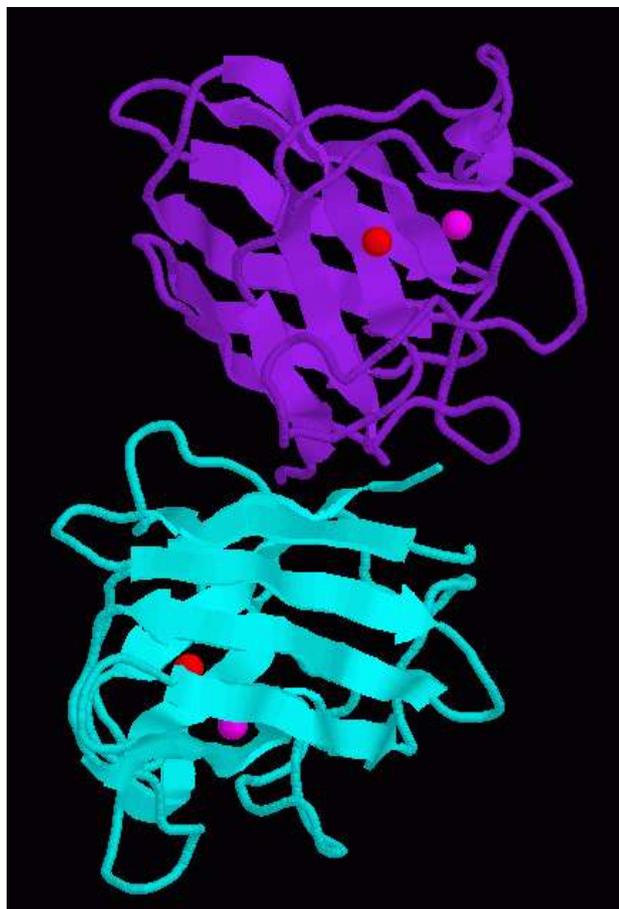
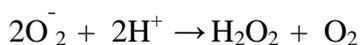


Fig.1.29 - Superossidodismutasi

Nelle cellule animali, la SOD-Cu/Zn è presente nel citosol e nei mitocondri, mentre la SOD-Mn è solamente presente nella matrice mitocondriale. La SOD catalizza la reazione di dismutazione di un solo elettrone dell'anione superossido in perossido d'idrogeno ed ossigeno:



L'enzima scavenger superossido (O_2^-) è un prodotto di riduzione degli elettroni dell'ossigeno, che agisce contro la tossicità dell'anione superossido. La superossido dismutasi è il primo enzima identificato che ha un radicale libero come substrato e costituisce una prima linea di difesa contro lo stress ossidativo. Esso è considerato sia un antiossidante intracellulare che extracellulare. Nell'attività antiossidante la SOD viene supportata da altri sistemi enzimatici,

quali la catalasi e la GSpx, e da sostanze ad attività antiossidante quali vitamina E, selenio e zinco . La SOD potrebbe agire come un “radicale libero finito” nei compartimenti cellulari dove la concentrazione del GSH è elevata, anche se questa situazione probabilmente si verifica in condizioni di basse concentrazione d’ascorbato (56; 57; 58).

La **catalasi** è una emoproteina contenente quattro gruppi eme ossidati (Fe^{2+}) (fig.1.30) (41) .

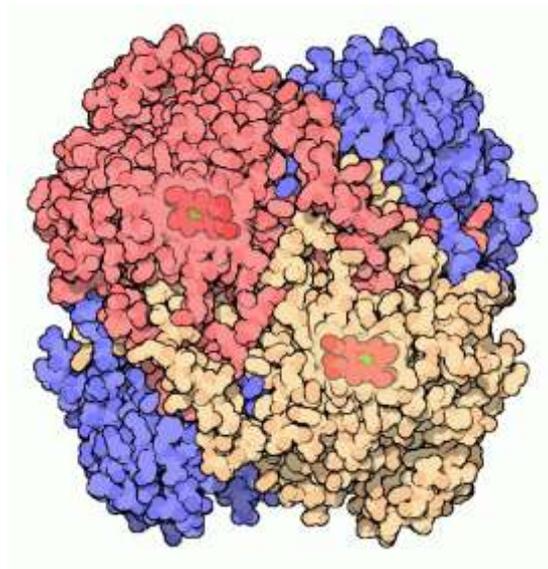
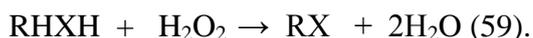


Fig.1.30 – La catalasi

Si tratta dunque di un enzima porfirinico di alto peso molecolare che distrugge il perossido d’idrogeno in alte concentrazioni, catalizzando la dismutazione dei suoi due elettroni in ossigeno ed acqua.



Alternativamente, la catalasi può agire con una perossidasi alle basse concentrazioni di perossido d’idrogeno, riducendo co-substrati come alcoli, ascorbato e fenoli:



Per mantenere l’attività catalitica, la catalasi necessita di ferro (Fe^{3+}), che si lega al sito attivo dell’enzima. Sebbene esiste qualche sovrapposizione tra le funzioni della catalasi e della glutatione perossidasi, i due enzimi differiscono nell’affinità per il perossido d’idrogeno come substrato. La catalasi è ampiamente distribuita

nelle cellule e si trova soprattutto nei perissosomi e nei mitocondri (41). Nei mammiferi, l' NADPH è legata alla catalasi, proteggendo in questo modo l'enzima dall'inattivazione da parte del perossido d'idrogeno (H_2O_2). Nelle cellule animali, la maggior parte dell'enzima è localizzato nei perossisomi dove la concentrazione stazionaria del perossido d'idrogeno è molto elevata. Anche negli eritrociti che hanno un elevato contenuto di catalasi non localizzato a livello dei perossisomi, il perossido d'idrogeno è essenzialmente degradato dalla glutatione perossidasi (60). Comunque quest'ultimo diffonde liberamente attraverso le membrane ed è concepibile che la catalasi non citosolica potrebbe proteggere le cellule durante l'esposizione a breve termine del compartimento citosolico, alle alte concentrazioni di H_2O_2 . La catalasi è anche presente in maniera significativa nella matrice mitocondriale, dove la sua funzione però è controversa. La glutatione (GSH) (fig.) è il principale tiolo antiossidante intracellulare, coinvolto in diverse funzioni antitossiche e difensive delle cellule (59).

Il **glutatione** è il tripeptide L- γ glutamil-L-cisteil-glicina (Gu- Cys- Gy), ovvero il principale tiolo a basso peso molecolare (61). La sua capacità ossidante è facilitata dai gruppi sulfidrilici della cisteina (62) (fig.1.31).

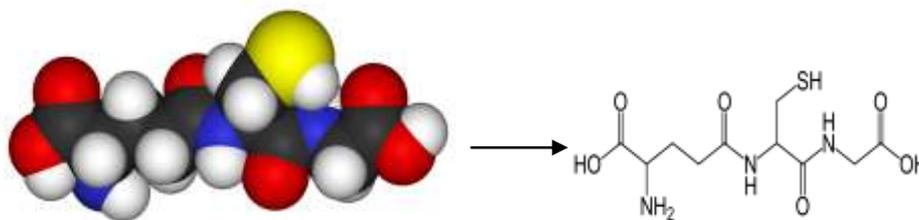
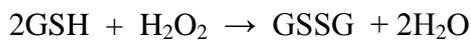


Fig. 1.31 Il glutatione

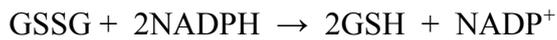
Il glutatione può funzionare come antiossidante in vari modi (63): riduce il perossido d'idrogeno e i perossidi organici attraverso la reazione catalizzata dalla glutatione perossidasi (GSH-Px) e dunque agisce come scavenger dell'ossigeno singoletto e dell' OH ; riduce i radicali tocoferolo, sia direttamente che indirettamente, e i radicali semideidroascorbato, prevenendo così la perossidazione lipidica. Il GSH può stabilizzare la struttura delle membrane attraverso al rimozione delle forme di perossidi formati in seguito alla reazione di

perossidazione lipidica. Il glutatione ridotto (GSH) è il substrato dell'enzima glutatione perossidasi che catalizza la seguente reazione:



Il glutatione ridotto, consumato in questa reazione, viene rigenerato ad opera della glutatione reduttasi (64).

Essa catalizza la riduzione del glutatione ossidato (GSSG) a spese dell'NADPH:



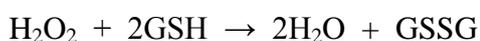
L'NADPH si riforma dalla riduzione di NADP^+ mediante la via del pentosiofosfato (64; 65).

Il glutatione ha inoltre una grande capacità disintossicante grazie alla capacità di chelare i metalli pesanti e tossici quali piombo, cadmio, mercurio ed alluminio e di eliminarli dall'organismo. E' più efficace della vitamina C nel migliorare l'utilizzo e la biodisponibilità del ferro, neutralizzando gli effetti tossici di alcuni agenti esogeni, come nitrati, nitriti, clorati, derivati del benzolo ecc. Questi elementi danneggiano l'organismo inducendo ossidazione del ferro, trasformandolo dallo stato di ione ferroso (Fe^{2+}) allo stato di ione ferrico (Fe^{3+}), rendendo così il sangue incapace di trasportare l'ossigeno, causando un aumento della metaemoglobina (64; 65).

La **glutatione perossidasi** è un selenio-enzima che catalizza la reazione di riduzione dell'idroperossido utilizzando come donatore di elettroni il GSH. In questo processo, il perossido d'idrogeno è ridotto ad acqua, mentre gli idroperossidi organici sono ridotti ad alcoli:



Oppure:



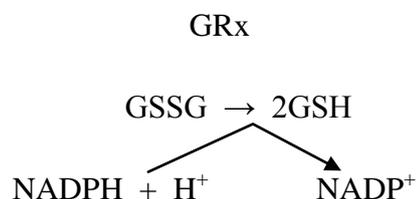
La GPx attiva siti contenenti selenio nella forma di residui di selenio-cisteina. Il perossido d'idrogeno ed altri idroperossidi idrofilici sono ridotti dalla Se-Gpx ad enzimi omotetramerici che sono generalmente abbondanti nei compartimenti citosolici e mitocondriali. In molte cellule animali, il perossido d'idrogeno è ridotto dal selenio-dipendente GPx, ma esistono isoforme della glutatione S-transferasi (GSTs), che mostrano un'attività non selenio dipendente GPx sui perossidi organici come quelli derivati dalle membrane lipidiche o dalle basi del

DNA. La cinetica di questi enzimi è molto più lenta rispetto a quelli selenio-dipendente GPx e probabilmente hanno un significato biologico nelle cellule o nei compartimenti cellulari dove la Se-GPx non è normalmente espressa, o nelle situazioni di deficienza da selenio (60). Tutte le forme di glutazione perossidasi riducono l'idrogeno perossido e gli idroperossidi alchilici a spese del glutatione. La loro specificità per il substrato idroperossido differisce in modo sensibile da una forma all'altra. Dunque, la cGPx riduce solo gli idroperossidi solubili, come H₂O₂, alcuni idroperossidi organici e gli idroperossidi degli acidi grassi come il t-butil idroperossido. Il GPx plasmatico, PHGPx, riduce anche idroperossidi di alcuni complessi lipidici come la fosfatidilcolina, gruppi idroperossidi come timine, lipoproteine ed esteri del colesterolo, ed è meno specifica nell'agire su idroperossidi integrati nelle membrane. Tutte le forme di glutazione perossidasi utilizzano glutatione come substrato e proteggono le cellule dal danno ossidativo dei ROS (66).

La **glutazione reduttasi (GSH-Rx)** è un enzima NADPH-dipendente, ovvero utilizza l'NADPH come riducente (67).

La sua distribuzione cellulare è simile a quella della glutazione perossidasi ma rispetto a quest'ultima possiede un'attività superiore, esplicita soprattutto a livello dei muscoli altamente ossidativi. Sebbene la GSH-Rx non è considerato un enzima antiossidante primario, è essenziale per la normale funzione antiossidante della glutazione perossidasi (68).

La GSH-Rx catalizza la trasformazione della forma ossidata del glutatione (GSSG) nella forma ridotta (GSH) ed è coinvolto nel mantenimento del normale rapporto GSH-GSSG (100:1) e perciò mantiene l'equilibrio redox nella cellula:



La trasformazione di GSSG in GSH, può anche essere condizionata da altri enzimi che utilizzano NADPH, come la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, l'enzima malico, l'isocitrato idrogenasi ecc. Questi enzimi contribuiscono a mantenere lo stato redox Intracellulari, e rendono possibile la funzione catalitica della GSH-Px. Essi

però mantengono la loro funzione ottimale solo quando la concentrazione intracellulare di NADPH è normale. L'attività della GSH-Rx è molto più bassa di quella della GSH-Px in diversi tessuti (69).

1.5.3 Gli Antiossidanti esogeni o non enzimatici

Gli antiossidanti esogeni sono presenti in gran parte degli alimenti di origine vegetale quindi vengono assunti con la dieta. Il potere antiossidante degli alimenti è misurato attraverso una scala, l'ORAC, secondo la quale a valori più alti (maggiori unità) corrispondono maggiori poteri antiossidanti. Tra gli antiossidanti endogeni più importanti possiamo ricordare:

- le Vitamine
- i Polifenoli

1.5.3.1 Le Vitamine

Le **vitamine** sono composti organici, eterogenei dal punto di vista della composizione chimica, indispensabili all'organismo per la crescita, per l'integrità strutturale delle cellule e perché i processi metabolici si svolgano in modo regolare. Esse presentano le seguenti caratteristiche:

- sono sostanze essenziali;
- non hanno valore energetico;
- presentano molecole di dimensioni ridotte;
- agiscono in dosi minime;
- hanno specificità di azione;

Molte vitamine oltre alle azioni specifiche ne svolgono anche di comuni:

- agiscono come fattori di crescita (A, D, gruppo B, C);
- rafforzano le strutture nervose (B₁, B₆, B₁₂, PP, C);
- aumentano la resistenza alle infezioni (A, B₆, C);
- prevenziono e curano le anemie (E, Acido folico, B₆, B₁₂, C);
- salvaguardano le cellule dall'ossidazione (E, C);
- rivestono un ruolo nella prevenzione dei tumori (A, E, C);
- proteggono pelle e mucose (A, B₂, B₁₂, Acido folico, PP).

Esse sono necessarie in piccole quantità ed una loro mancanza dà luogo a sindromi da carenza che si sviluppano più o meno rapidamente in relazione alla vitamina considerata. Molte vitamine funzionano come coenzimi (70), e devono essere introdotte dall'esterno perché non sintetizzabili dall'organismo, per cui la loro assunzione avviene con l'alimentazione (71).

Esse si trovano in quasi tutti gli alimenti naturali e regolano alcuni processi fondamentali per gli organismi animali e vegetali (permeabilità cellulare, ossidazione, accrescimento, riproduzione ecc.) (72). Un aumento del fabbisogno di vitamine si ha in particolari stati fisiologici quali la gravidanza, l'allattamento e la crescita. In questi casi è consigliabile un appropriato regime alimentare che aumenti l'apporto di vitamine con opportune scelte alimentari (71). Un consumo eccessivo di vitamine può provocare a lungo termine effetti tossici, soprattutto indotti dalle vitamine liposolubili che, al contrario delle idrosolubili, possono essere immagazzinate nel nostro organismo in eccesso. La mancanza di una vitamina nella dieta o la presenza di fattori che ne riducono la biodisponibilità è causa di malattie caratterizzate da sindromi carenziali specifiche che in genere regrediscono con la somministrazione della vitamina mancante o dell'alimento che la contiene (71). Non avendo una struttura chimica comune, l'unica classificazione possibile delle vitamine è quella basata sulla loro solubilità, dunque le vitamine si distinguono in idrosolubili e liposolubili. Le vitamine liposolubili sono le vitamine A, D, E, F e K, ovvero sostanze insolubili nei mezzi acquosi, trasportate nell'organismo in modo identico, o analogo, ai lipidi. Le vitamine idrosolubili sono la vitamina C e il complesso delle vitamine B (B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, acido pantotenico, acido folico, biotina) (73).

La vitamina C (acido ascorbico) è una vitamina idrosolubile che presenta per l'uomo caratteristiche di essenzialità, il che significa che deve essere obbligatoriamente fornita dall'esterno: infatti gli esseri umani, come anche poche altre specie, non sono capaci di sintetizzarla autonomamente, a causa della mancanza della L-gulono-gamma-lattone ossidasi, l'ultimo enzima della catena biosintetica che dal glucosio porta appunto all'acido ascorbico (74). La vitamina C, ha un ruolo ben conosciuto nella formazione del collagene, ed una carenza in acido ascorbico provocata generalmente da errate abitudini alimentari (diete

monotone o squilibrate) è stata invocata nel meccanismo patologico di molte dermatopatie. Sono ben note, ad esempio, certe conseguenze cutanee di una deficienza in vitamina C, quali alterazioni dei processi di cicatrizzazione, stomatiti aftose, ecc. (75; 76). L'acido ascorbico favorisce l'assorbimento del ferro e il suo trasferimento alla ferritina (75). In ogni caso, però, i dati a disposizione sembrano indicare che il ruolo più significativo dell'acido ascorbico possa essere quello che lo vede agire (unitamente ad altri agenti riducenti, quali altre vitamine come l'alfa-tocoferolo e il beta-carotene, enzimi come la catalasi e la superossidodismutasi e composti come il glutatione) nei processi di riduzione che minimizzano i danni legati ai fenomeni ossidativi (77; 78). Si ritiene infatti che il danno provocato dai radicali dell'ossigeno di produzione endogena sia fra i fattori che maggiormente contribuiscono all'invecchiamento dei tessuti e a molti processi degenerativi ad esso legati, compresi il cancro, le cardiovasculopatie e le disfunzioni cognitive (79; 80; 81) (fig.1.32).

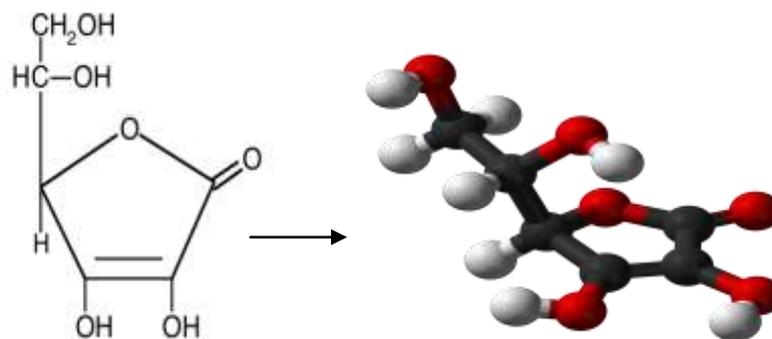
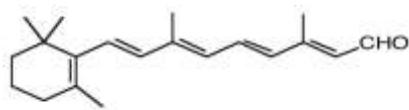
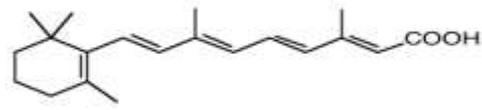


Fig. 1.32 Struttura dell'acido ascorbico

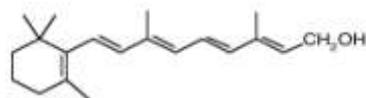
La vitamina A è la molecola organica rappresentante i retinoidi che possiedono l'attività biologica del retinolo. In natura la vitamina A è presente in tre forme: alcool (retinolo), aldeide (retinale), acido (retinico) (71) (fig.1. 33).



Retinaldeide



Acido retinico



Retinolo

Fig.1. 33 Le tre forme della vitamina A

Essa si forma nel tessuto animale a partire dai carotenoidi. I carotenoidi sono pigmenti di origine vegetale, quelli presenti in quantità apprezzabili nell'organismo sono il β -carotene, l' α -carotene, la luteina, la criptoxantina.

Il β -carotene, l' α -carotene e la criptoxantina possono essere convertiti nell'organismo in vitamina A, per questo motivo vengono definiti come provitamine (71). I carotenoidi sono caratterizzati dal colore giallo o arancio, diffusi nelle foglie, semi e frutti in varia misura. Dal punto di vista chimico si tratta di idrocarburi insaturi, forniti di una catena laterale di tipo isoprenico, recante ad ogni estremità un anello aromatico betaiononico (72). La vitamina A, allo stato puro, appare come un olio quasi incolore che cristallizza alla temperatura di 8°C. Essa è molto sensibile all'azione degli acidi e dei raggi ultravioletti e viene inattivata dagli ossidanti in particolare dai perossidi. L'inattivazione della vitamina A è indotta anche dalla presenza di alcuni microelementi come ferro, rame e manganese; al contrario gli antiossidanti (tocoferolo, vitamina C, acido citrico, lecitina ecc.) ne prevengono la distruzione (72). Le funzioni della vitamina A includono: la visione, la differenziazione cellulare, la morfogenesi e, limitatamente ai batteri, il trasporto attraverso le membrane. La retinaldeide è responsabile del processo visivo. E' noto come la

di α -tocoferolo dunque, è in grado di reagire con più radicali liberi (84). Il termine Vitamina E, è il nome generico usato per indicare una famiglia di sostanze antiossidanti, a carattere liposolubile, che comprende due classi di composti: i tocoferoli e tocotrienoli. I tocoferoli sono un gruppo di sostanze vegetali che hanno in comune l'anello del 6-cromanolo, pur differendo nei sostituenti e nella catena laterale. Il tocoferolo ha tre carboni asimmetrici (2,4' e 8') e l' α tocoferolo naturale possiede la configurazione 2R, 4'R, 8'R. L'azione della vitamina E è collegata a quella della glutatione perossidasi, per cui esibisce un'elevata affinità. È possibile che la vitamina E sia rigenerata per azione del glutatione e dell'acido ascorbico e ciò spiegherebbe la discordanza tra le piccole quantità di vitamina necessarie e le quantità relativamente notevoli di acidi grassi polinsaturi che vengono protetti. L'azione della vitamina E potrebbe esercitarsi anche sui gruppi sulfidrilici delle proteine ed essere utile in situazioni di stress ossidativo (70). La vitamina E è essenziale per il mantenimento dell'integrità strutturale delle membrane eritrocitarie, mitocondriali e nucleari. Le membrane eritrocitarie sono tra le prime a risentire di una carenza di vitamina E che è uno dei principali antiossidanti degli eritrociti. Gli eritrociti carenti di vitamina E sono molto più sensibili all'emolisi rispetto a quelli con contenuto normale (85). La vitamina E è insolubile in acqua, ma facilmente solubile in oli e grassi. È stabile al calore, agli alcali e agli acidi, purchè in assenza d'ossigeno. L'azione dell'ossigeno è favorita dalla presenza di sali di ferro e di rame, dalla luce e dagli alcali. Congelata in presenza di acidi grassi insaturi (come succede durante la conservazione dei cibi) perde lentamente attività. Gli esteri del tocoferolo sono più stabili verso l'ossigeno della vitamina libera, ma non possono agire come antiossidanti in questa forma (70). I tocotrienoli, rispetto ai tocoferoli, presentano come requisito strutturale discriminante, la tripla insaturazione nella catena laterale isoprenoide, che conferisce importanti ed addizionali proprietà biologiche. In base alla posizione dei gruppi metilici, presenti sull'anello cromanilico, si identificano isoforme differenti (alfa, beta, gamma, delta). L'attività antiossidante della vitamina E si esplica grazie alla proprietà lipofila della molecola, responsabile della localizzazione ed accumulo della vitamina a livello degli organelli e membrane cellulari. La vitamina E è un abile scavenger dei radicali lipoperossidici e viene

denominato antiossidante di tipo chainbreaking, per la capacità di interrompere la catena di reazioni di propagazione dei radicali perossidici (fig. 1.35). Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C o con il glutathione o con il coenzima Q10 per riformare l' α -tocoferolo. Poiché lo sviluppo della perossidazione lipidica può determinare profonde alterazioni delle membrane cellulari, si comprende il motivo per cui alla vitamina E è riconosciuto un ruolo importante nel mantenere tali strutture indenni. Ciò è verificato anche dal fatto che gli eritrociti, che sono particolarmente sottoposti a stress ossidativo, risentono abbastanza presto di stati carenziali di vitamina E divenendo più sensibili all'emolisi (86). Il riarrangiamento molecolare, specifico dei tocoferoli a livello del doppio strato fosfolipidico, è tuttora materia di indagine, ma è stato dimostrato che i tocotrienoli presentano un'affinità maggiore per le membrane cellulari, rispetto all' α -tocoferolo, grazie alla presenza delle insaturazioni sulla catena laterale, che permette una più rapida ed efficace interazione con i biocostituenti del doppio strato fosfolipidico di membrana. Per queste ragioni i tocotrienoli, rispetto ai tocoferoli, presentano una biodisponibilità maggiore ed un incremento dell'accumulo intracellulare (87). Inoltre, i tocotrienoli concorrono alla regolazione della funzione barriera cutanea, grazie all'attività inibitoria nella sintesi del colesterolo, che influenza la composizione lipidica dello strato corneo (88).

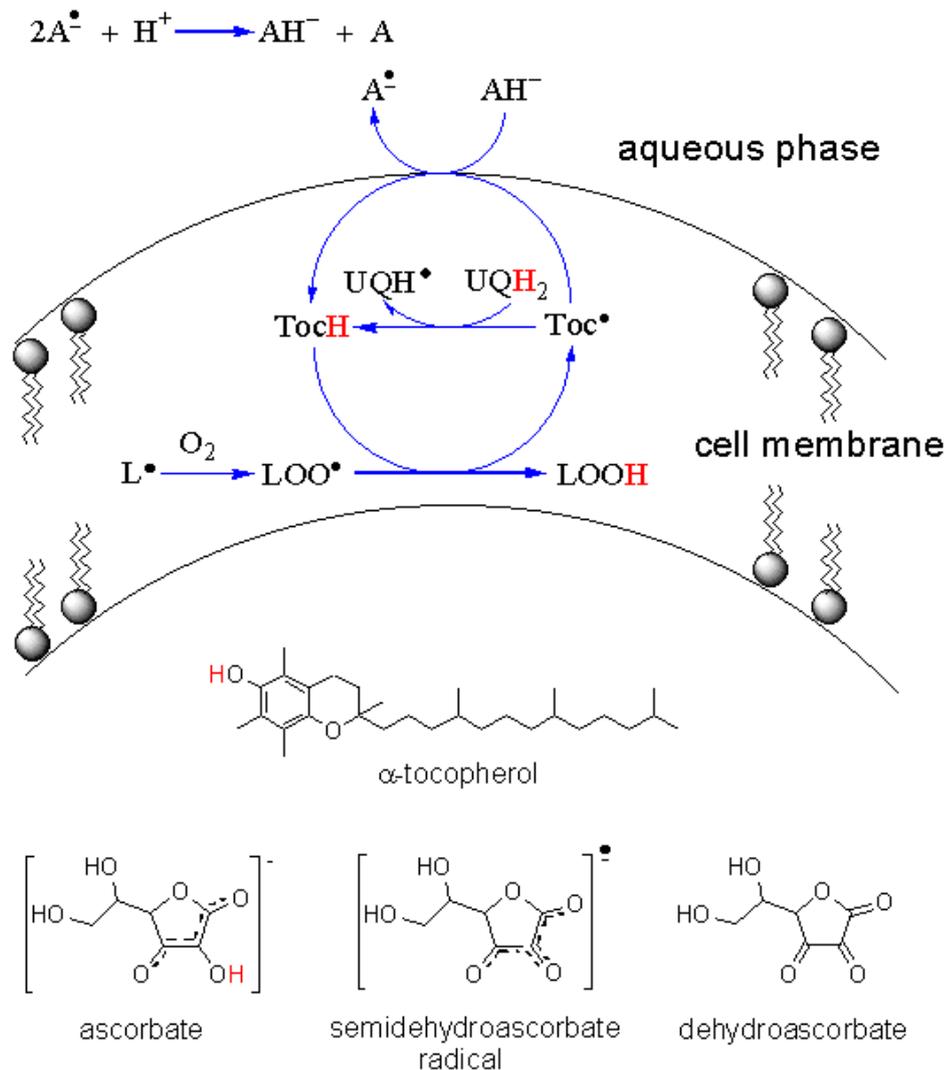


Fig. 1.35 Rigenerazione α -tocoferolo

1.5.3.2 I Polifenoli

I polifenoli vegetali, sono componenti essenziali della dieta umana e costituiscono il gruppo più abbondante di metaboliti secondari. Sono composti aromatici con numerosi gruppi ossidrilici legati agli anelli benzenici, grazie ai quali esplicano una forte funzione antiossidante. Attraverso la dieta, molti polifenoli vegetali entrano nell'organismo umano. Nella pianta la maggioranza dei polifenoli non è libera ma sono sotto forma di glucosidi o metossidi o sono legati a catene di acidi grassi. La glucosilazione, in particolare, li protegge dall'ossidazione enzimatica mantenendo la capacità antiossidante e le proprietà biologiche (89). Le forme coniugate sono di norma conservate negli alimenti e

giungono nell'intestino umano (90; 91). La deglucosilazione è, quindi, la prima fase dell'assorbimento dei polifenoli che, dopo essere entrati nelle cellule per diffusione passiva o con trasportatori, vengono coniugati con glucuronidi o solfati (90; 92), così come avviene per gli stilbeni. Alcuni polifenoli, ad esempio la rutina (il flavonoide più abbondante nel tè), non sono un substrato riconosciuto dalle β -glucosidasi intestinali, quindi proseguono lungo il tratto digerente fino al colon, dove sono processati dalla microflora ed assorbiti (90). L'assorbimento di questi composti dipende anche dalle variazioni individuali dell'attività degli enzimi coinvolti (90) e dalla interazione con gli altri alimenti assunti, ad esempio le proteine del latte ne riducono la biodisponibilità (93).

Come antiossidanti, i polifenoli possono proteggere le cellule dal danno ossidativo e, quindi, riducono il rischio di varie malattie degenerative associate allo stress ossidativo. Studi sperimentali, infatti, sostengono con forza un ruolo dei polifenoli nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, del cancro, dell'osteoporosi, del diabete mellito e delle malattie neurodegenerative (94; 95).

In particolare, è stato dimostrato che il consumo di polifenoli limita lo sviluppo di lesioni ateromatose, inibendo l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (96; 97), che è considerato un meccanismo chiave nelle lesioni endoteliali che si verificano nell'aterosclerosi. Gran parte delle proprietà benefiche dei polifenoli sono evidenziate da esperimenti in vitro, su colture cellulari o cavie da laboratorio, nel corso dei quali si somministrano concentrazioni di polifenolo nativo molto superiori a quelle presenti realmente in circolo in vivo dopo assunzione con la dieta. Nel circolo sanguigno si trovano, infatti, concentrazioni di polifenoli non superiori al micromolare, concentrazioni alle quali le loro capacità biomediche devono essere in parte ridimensionate (98).

Le numerose famiglie di composti fenolici possono essere divise in due importanti gruppi:

✓ **Non flavonoidi o fenoli semplici**

✓ **Flavonoidi**

Dei **non flavonoidi** fanno parte gli acidi fenolici ed i loro derivati. Essi sono:

1. **Acidi benzoici** (C6-C1). Sono noti sette tipi che differiscono per i tipi di sostituenti che portano sull'anello benzenico centrale. Nell'uva si trova solamente l'acido gallico prevalentemente 3 in forma di eterosidi o esteri (tannini

idrolizzabili). Nel vino si ritrovano prevalentemente le forme libere, derivate sia dalle idrolisi che dalle degradazione di molecole complesse (99).

2. **Acidi cinnamici** (C6-C3): si trovano come esteri derivati con l'acido tartarico e nella forma glicosilata. Le forme esterificate possono diventare substrati per PFO che, causano imbrunimento dei mosti dovuti ad enzimi ossidatici come laccasi e tirosinasi (98). Possono partecipare a reazioni di copigmentazione grazie alla formazione di complessi con gli antociani.

3. **Fenoli volatili**: derivano da riduzione e decarbossilazione degli acidi cinnamici (98). Essi possono aver origine dai lieviti oppure durante l'affinamento dei vini in legno, attraverso processi di degradazione delle lignina.

4. **Stilbeni**: sono caratterizzati dalla presenza di tre gruppi fenolici uniti da un ponte etilenico. Di particolare interesse il trans-resveratrolo, presente in concentrazioni variabili secondo la varietà • (sono pi. ricche le rosse), la maturazione, l'illuminazione (i raggi ultravioletti lo stimolano) e la presenza di attacchi fungini (100). Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene), rappresentato in figura 1.36, è un fitopolifenolo a basso peso molecolare (228 Da) appartenente alla famiglia degli stilbeni (100; 101; 102). Esiste nelle forme diastereoisomeriche *cis* e *trans*, entrambe presenti in molte piante, e l'isomerizzazione da *trans* a *cis* è favorita dall'esposizione alle radiazioni ultraviolette o da processi biologici (ad esempio nella vite la forma *cis* è maggiormente presente nel vino rispetto all'uva a causa di una isomerizzazione operata dai lieviti durante la fermentazione) (103).

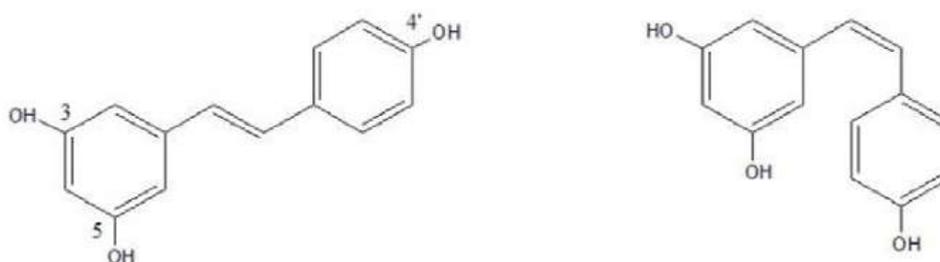


Fig. 1.36 Struttura del resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) nelle due forme diastereoisomeriche *cis* e *trans*.

Una delle fonti più ricche di resveratrolo, oltre che la prima in cui storicamente fu isolato, è la radice di *Polygonum capsidatum* (o Ko-jo-kon), molto usata nella

medicina popolare orientale, i cui effetti terapeutici su vasi sanguigni, cuore e fegato sono stati documentati decenni prima dell'identificazione del principio attivo (101; 104; 105). Sebbene sia presente in almeno 72 specie di piante (106), come eucalipto, abete rosso e giglio, e in altri cibi come arachidi e loro derivati (di grande rilevanza nella dieta nord-americana), le fonti di resveratrolo più rilevanti per la dieta umana sono gli acini di *Vitis vinifera*, gli stessi usati per fare il vino. Per questo motivo lo si studia soprattutto nella vite. Numerosi composti trovati nell'uva sono implicati in dati epidemiologici dimostranti una correlazione inversa fra il consumo di vino rosso e l'insorgenza di malattie cardiovascolari. L'interesse per il resveratrolo, infatti, è enormemente aumentato da quando fu indicato come la possibile spiegazione del "Paradosso francese", che è l'apparente efficacia del moderato consumo di vino rosso di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari (107). Il resveratrolo e gli altri stilbeni sono prodotti in diverse parti della vite (buccia dell'acino, foglie, fiori, tralci, radici, semi, raspi), ma la massima concentrazione è nella buccia degli acini e nelle foglie (104; 108; 103). Concentrazione e composizione degli stilbeni nella pianta dipendono anche dal processo di sviluppo, ad esempio nell'acino tendono a calare durante la maturazione, forse a causa di una competizione per i substrati che sono comuni alla biosintesi dei flavonoidi. Le bucce fresche contengono alcune decine di µg/g di stilbeni, con significative differenze fra i diversi composti e fra uva rossa e uva bianca (104). Nel vino sono presenti nell'ordine di grandezza dei mg/L ed il resveratrolo (*cis* e *trans*, in un rapporto di 0,3-0,95) è mediamente 10-100 volte maggiore nel vino rosso che nel bianco. Nel succo d'uva (bevanda non fermentata e nel cui processo di produzione le bucce sono rimosse immediatamente dopo la spremitura) se ne ritrova meno di 0,1 µg/L. Uno dei motivi per cui la concentrazione di resveratrolo è significativamente più alta nel vino rosso che nel bianco, è che bucce e vinacce sono rimosse prima nella vinificazione in bianco, diminuendone la quantità estratta. Le concentrazioni di resveratrolo e stilbeni presenti nel vino sono il risultato della combinazione di più variabili quali il processo di vinificazione (lieviti usati nella fermentazione, tempo di macerazione di bucce e semi, chiarificazione, ecc), la varietà dell'uva, l'area geografica ed il clima in cui è cresciuta la vite, le pratiche colturali, ecc. (101; 104; 109; 110; 108;

111). Ottimizzare i processi di campo e di cantina, per aumentare la presenza di stilbeni in uve e vini senza manipolare geneticamente la vite, porta ad un duplice vantaggio: piante con accresciuta resistenza alle malattie e prodotti alimentari con migliori proprietà nutraceutiche (108). Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta agli effetti biologici degli stilbeni, e del resveratrolo in particolare, sulla salute umana. Numerosi esperimenti che hanno dimostrato il potere benefico del resveratrolo sono stati condotti *in vitro*, *ex vivo* e su animali (101) e recentemente sono state avviate anche sperimentazioni cliniche sull'uomo. Questa molecola possiede proprietà antiossidanti tali da poter prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari, come l'arteriosclerosi, modulando il metabolismo dei lipidi, inibendo l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e l'aggregazione delle placche arteriosclerotiche (111;112; 104). Inoltre è stato dimostrato che il resveratrolo agisce come agente chemopreventivo nei confronti di diversi tipi di cancro già a basse concentrazioni (< 1 μM in animali), interferendo con le fasi di inizio, progressione e promozione del tumore, e sopprimendo gli eventi finali della carcinogenesi, come l'angiogenesi e la formazione di metastasi (101; 104; 113). Gli effetti sulla salute umana dipendono dalla biodisponibilità della molecola e dalla dose. Già dai primi anni '80 è stato dimostrato che il resveratrolo è assorbito a livello intestinale e quindi può essere somministrato per via orale tramite dieta o farmaci (104; 114). Negli ultimi anni si stanno chiarendo i meccanismi di questo processo: il resveratrolo può attraversare le membrane cellulari per diffusione passiva e quindi entra nelle cellule epiteliali dell'intestino in modo rapido e non direzionale, lì (o nel fegato) subisce immediatamente reazioni di glucuronazione o sulfonazione all'interno dei microsomi e poi entra nel sistema circolatorio (115; 116; 106). Le forme sulfonate sono inattive al punto che questo sembra essere il maggior fattore limitante alla biodisponibilità di resveratrolo (114). La coniugazione all'acido glucuronico sembra essere un modo per proteggere la molecola che, in questa forma, può raggiungere tutti gli organi e i tessuti ed essere riattivata dove serve da enzimi β -glucuronidasi (106; 116). Recentemente sono stati parzialmente chiariti i meccanismi molecolari d'azione del resveratrolo. Certamente la semplicità della sua struttura chimica gli permette di interagire con una grande quantità di recettori ed enzimi (104; 103), in modo

particolare coi recettori per gli estrogeni (106), così da modulare l'espressione genica. La funzione antiossidante, in generale, sembra essere esplicata attraverso la formazione di un radicale stabile grazie alla sua struttura di risonanza che può intrappolare i radicali liberi (106), oppure potrebbe direttamente inibire la loro generazione. Inoltre il resveratrolo attua meccanismi specifici: ad esempio è in grado di chelare il rame (catalizzatore di ossidazioni biologiche) riducendo l'ossidazione delle LDL (104).

Flavonoidi: sono una delle classi più rappresentative della frazione fenolica. Sono caratterizzati da una struttura composta da due anelli benzenici uniti da un eterociclo ossigenato (C6-C3-C6). Sono stati identificati più di 5000 flavonoidi, molti dei quali si trovano in alimenti vegetali quali frutta, verdura e bevande (tè verde, caffè, birra chiara, vino rosso e succhi di frutta) (91). Nelle piante e negli alimenti sono presenti quasi solo in forma β -glucosilata, ma nel sistema circolatorio umano li si ritrova glucuronizzati, sulfurilati o metilati, quindi subiscono un processamento a più fasi durante l'assorbimento (90; 91). La quantità di flavonoidi assunta tramite l'alimentazione è abbastanza elevata in confronto ad altri antiossidanti presenti nella dieta, come la vitamina C, la vitamina E, il selenio ed i carotenoidi, nonostante la loro biodisponibilità sia solo parziale (la quantità ingerita viene assorbita fra 0,2 e 20%) (91). Recentemente queste molecole hanno riscosso molto interesse per i loro potenziali effetti benefici sulla salute umana: hanno proprietà antivirali, antiallergiche, antiinfiammatorie ed antitumorali; sembrano prevenire malattie coronariche, ictus, tumori ed osteoporosi; proteggono le macromolecole cellulari (lipidi, DNA, proteine) dai danni ossidativi. Sono in grado di attuare tutti questi effetti agendo su espressione genica e trasduzione del segnale e grazie ad azioni antiossidanti dirette (90). Fra i principali flavonoidi ad azione antiossidante si può ricordare la quercetina(2-[3,4-diidrossifenil]-3,5,7-triidrossi-4H-1-benzopirano-4-one), probabilmente quello più abbondante nella dieta umana nonostante il suo tasso di assorbimento intestinale non sia ottimale. Si tratta di un flavonolo presente nel tè nero, nella verdura, nella buccia dei frutti e nella cipolla, avente un ampio spettro di attività antitumorali e su cui sono già in corso sperimentazioni cliniche sull'uomo (113). L'attività antiossidante dei flavonoidi dipende dalla loro struttura

molecolare, in particolare da numero e posizione dei gruppi idrossilici. Anche la presenza del gruppo prenilico ha un ruolo fondamentale, al punto che flavonoidi che ne sono privi agiscono da pro-ossidanti ma l'aggiunta di un prenilico è sufficiente a controbattere la loro attività pro-ossidante (ne è un esempio la naringenina degli agrumi). Le piante sintetizzano i flavonoidi non solo per contrastare lo stress ossidativo, ma anche perché sono composti colorati. In fiori e frutti determinano colori chiari (bianco/giallo/beige) o rosso/blu, secondo la loro struttura chimica. Oltre che nel visibile possono emettere nell'ultravioletto e quindi sono individuati dagli insetti impollinatori. Svolgono anche funzioni nelle segnalazioni fra pianta e microorganismi, nella fertilità maschile, nella difesa da microorganismi ed erbivori, nella protezione dalle radiazioni ultraviolette, nella formazione dei noduli radicali per la fissazione dell'azoto, nella vitalità del polline (117; 118; 91). La struttura di quattro flavonoidi ha suscitato un considerevole interesse per la ricerca (Fig. 1.37).

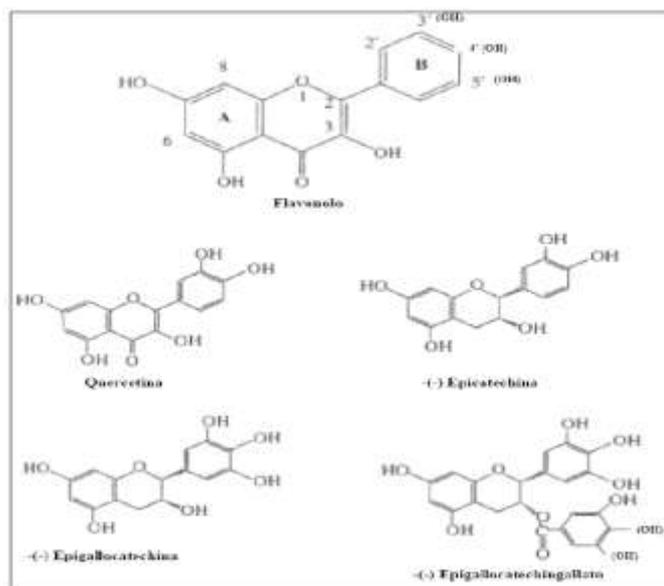


Fig. 1. 37 Struttura dei quattro flavonoidi

Gli studi segnalati fin qui si sono basati sull'analisi della concentrazione dei flavonoidi nell'urina e nel plasma dei loro metaboliti. L'idrolisi di flavonoidi in agliconi prima dell'assorbimento e della successiva coniugazione in glucuronide sotto forma di solfato si pensa che avvenga ad opera di batteri enterici. L'azione dell'enzima lattasi florizina idrolisi (90), localizzato sulla membrana apicale delle cellule piccole epiteliali dell'intestino, è importante nella formazione dell'aglicone

prima dell'assorbimento. Gli antociani dimostrano una deviazione importante da questa generalizzazione in quanto la dose assorbita dell'antocianidina e dell'aglicone non sono generalmente presenti nel plasma o nelle urine (119). Confrontati con i flavonoidi polifenolici, i monofenoli possono essere presenti in quantità considerevole sia in termini di concentrazione che di numero (120). All'interno del tratto gastrointestinale gli effetti biologici dei monofenoli possono essere uguali o più importanti di quelli dei polifenoli. I glucosidi delle antocianidine si è visto essere idrolizzati dalla microflora intestinale da 20 minuti a 2 h di incubazione secondo la varietà dello zucchero (121). A causa dell'alta instabilità delle aglicon-antocianidine liberate a pH neutro, i prodotti di degradazione fenolica primaria sono determinati in 20 minuti di incubazione. La formazione degli acidi fenolici, come prodotto stabile principale di degradazione, fornisce un suggerimento importante quanto al destino degli antociani in vivo (122). La metilazione è una via comune del metabolismo dei flavonoidi. I flavonoidi che hanno una struttura di catecolo nel nucleo fenolico B sono metabolizzati soprattutto in derivati 3'-O-metilici, ma alcuni derivati 4'-O-metilici possono formarsi in quantità più piccole. I flavonoidi che hanno una struttura di pirogallolo sono metabolizzati in derivati 4'-O-metilici. Gli antociani (glucoside 3-O-cianidina) sono metabolizzati in derivati 3'-O-metilici (glucoside -3-O-peonidina) e 4'-O-metilici (glucoside -3-O-isopeonidina), (123; 119; 124). I flavonoidi che contengono i diidrossi 3'-4'-orto-catecolo nel nucleo fenolico B sono trasferiti principalmente come glucuronidi, mentre i monoidrossimetilati trasformano i composti fenolici meno predisposti alla glucuronidazione. I flavonoidi con monoidrossimetilati sembrano essere meno suscettibili alla glucuronidazione nel piccolo intestino, ma possono essere glucuronidati nel fegato. Le antocianidine sono state indicate per coniugarsi con glucuronide (123; 119; 124). Glucuronide/solfato ed i coniugati metilati di quercetina sono comparsi nella linfa dei ratti dopo somministrazione della quercetina (125). La catechina ed epicatechina sono ampiamente O-metilate durante il trasferimento attraverso il fegato, in rapporto all'attività della catecolo-O-metil transferasi. Fino al 30% dei composti i 3-flavanoli della catechina e dell'epicatechina, trovati nel liquido sieroso, sono stati O-metilati e un 20 % dell'O-metilato è stata glucuronidato. Le

proantocianidine rappresentano altre classi di polifenoli che sono oligomeri o polimeri di 3- flavanoli e sono una parte importante presente nella dieta umana (126). Le procianidine sono presenti come monomeri (catechina ed epicatechina) e come oligomeri. Epicatechina e catechina vengono assorbite dal tratto intestinale e si coniugano al glucuronide e/o alla forma solfato (127; 128) hanno identificato (-) – epicatechina-3-O-glucuronide, come via metabolica principale nel plasma ed urina degli esseri umani. In esseri umani, (-)-epicatechina, così come la quercetina, può coniugarsi con l'acido glucuronico all'interno dell'intestino per via dell'enzima glucuronosil-transferasi UDP con conseguente metabolita 3 '-O-glucuronide. Le tracce delle procianidine e dei dimeri B1, B2, B3 e B4 e del trimero C2 sono state rilevate in urina (129). Gli oligomeri delle procianidine non sembrano essere depolimerizzati in 3-flavanoli monomerici in alcuna misura durante il passaggio attraverso lo stomaco e il tratto gastrointestinale (129; 130; 131).

La biosintesi dei flavonoidi avviene tramite la via dei fenilpropanoidi che parte dalla fenilalanina e conduce, dopo numerose ed articolate reazioni enzimatiche, alla produzione delle varie sottofamiglie di composti (fig. 1.38) (118; 132). Il primo enzima della via metabolica è la fenilalanina-ammonio liasi (PAL). Dopo pochi passaggi, dai quali partono altre diramazioni metaboliche per la sintesi, fra l'altro, di lignina e tannini, la via si biforca. Questo passaggio chiave è la condensazione di un acido cumarico e 3 malonil-CoA catalizzata da un lato dalla stilbene sintasi (STS), che sintetizza il resveratrolo da cui derivano gli, e dall'altro dalla calcione sintasi (CHS) che forma il calcione, il primo flavonoide. La calcione isomerasi (CHI) chiude un anello e genera la naringenina, un flavanone particolarmente abbondante negli agrumi. La via metabolica successiva è ricca di diramazioni interconnesse fra loro. Da un lato viene sintetizzato il kaemferolo (o miricetina). Da un'altra parte si passa per un altro composto chiave, la quercetina (un flavonolo), a cui segue la famiglia delle catechine. Da un terzo lato si ottiene la biosintesi di antocianine e antociani. Ma anche dalle catechine possono derivare altri antociani (e viceversa), a riprova del fatto che la struttura metabolica è estremamente complessa e dinamica. Dalla quercetina, per glucosilazione, deriva anche un altro flavonoide importante per l'uomo, la rutina (quercetina-3-

rutinoside) o vitamina P. Gli enzimi della biosintesi e del metabolismo dei flavonoidi e, più in generale, dei fenilpropanoidi sono stati ipotizzati formare complessi multienzimatici atti a facilitare il trasferimento degli intermedi (channeling): PAL, CHS ed altre proteine coinvolte sembrano essere colocalizzate in blanda associazione con la faccia citosolica del reticolo endoplasmatico rugoso. La biosintesi avviene, quindi, nel citoplasma, poi vi è un sistema di trasporto verso il vacuolo o la parete cellulare (118; 133).

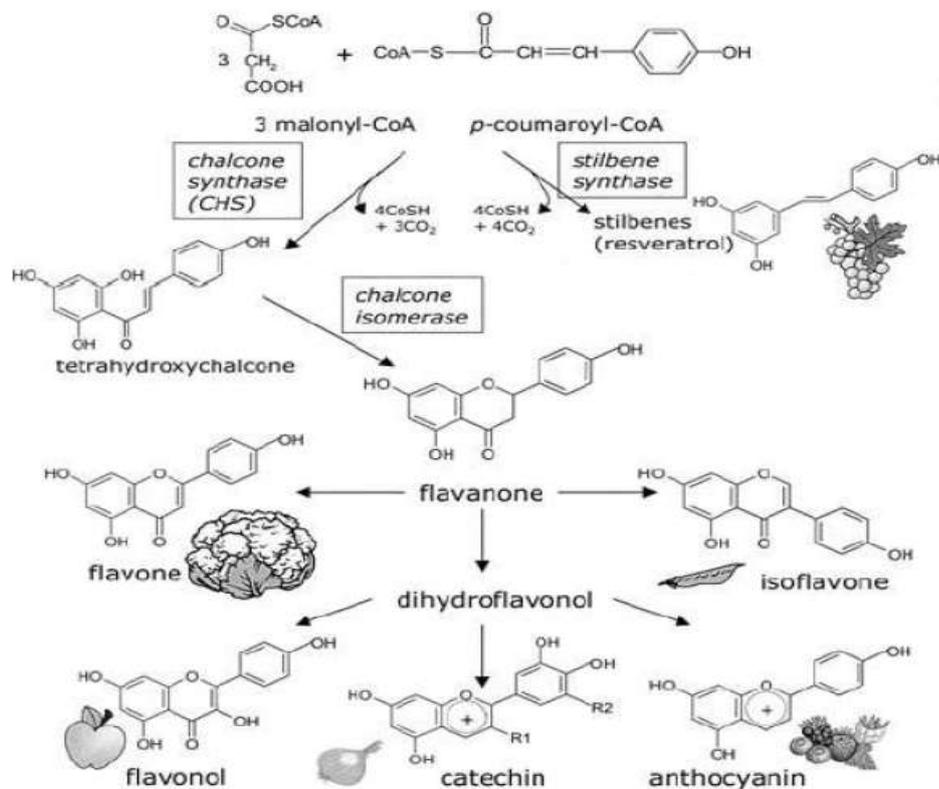


Fig. 1.38 via biosintetica delle principali famiglie di flavonoidi

I flavonoidi si possono suddividere in tre gruppi grazie alla variazione dell'anello eterociclico centrale (134).

Essi comprendono:

1. Antociani: Gli antociani sono i pigmenti rossi delle uve. Essi si trovano essenzialmente nella buccia, eccezionalmente nella polpa (varietà tintorie), ma sono anche presenti nelle foglie, in quantità tanto più importante quanto più la vite è alla fine del ciclo vegetativo. La molecola degli antociani è costituita da due

anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio, che deriva dal 2-fenilbenzopirilio. Nelle uve e nei vini si distinguono secondo la natura dell'anello laterale, cinque molecole fondamentali aventi due o tre sostituenti (OH e OCH₃) (fig. 1.39). Ci sono varietà dove prevalgono i disostituiti, "cianidina e peonidina" e varietà dove prevalgono i trisostituiti "malvidina, delfinidina e petunidina". Le differenze varietali riguardano, oltre che le diverse percentuali delle cinque antocianine suddette, anche quelle delle forme acilate (essenzialmente acetati e p-cumarati).

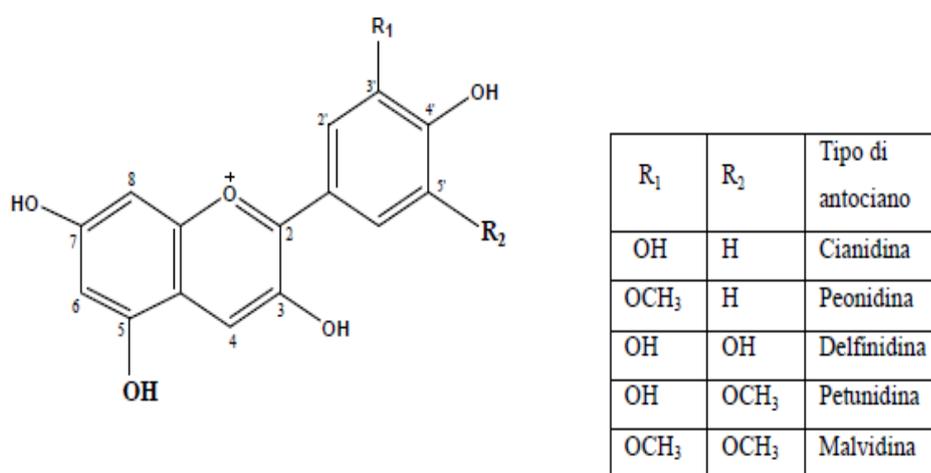


Fig. 1. 39 Struttura delle antocianidine

La loro sintesi avviene nell'acino dove dall'invasatura in poi si osserva un accumulo di zuccheri e di antociani, il cui contenuto varia da pochi mg/Kg fino ad oltre 2000 mg/Kg alla fine del processo di maturazione. La forma eterosidica, di queste molecole (antocianine o antociani) è più stabile dell'aglicone (antocianidine). Nelle uve della *Vitis vinifera* e nei vini da esse derivati sono state identificate solo le antocianidine monoglucosilate nella posizione 3 dell'anello eterociclico e i loro derivati acilati con gli acidi acetico, p-cumarico e caffeico (134; 135).

Il tempo gioca un ruolo importante sullo stato chimico-fisico degli antociani: nei vini giovani la frazione può importante degli antociani, rappresentata da quelli liberi, mentre in quelli vecchi essi scompaiono e vanno a formare complessi. La scomparsa degli antociani nelle forme monomere

poco polimerizzate e la polimerizzazione dei leucoantociani portano al cambiamento del colore, dal rosso vivo dei vini giovani passa al rosso tendente al mattone di quelli vecchi (136).

2. Flavoni o Flavonoli: Sono molecole di colore giallo che contengono al loro interno l'eterociclo ossigenato del γ -pirone. In natura sono presenti sia allo stato libero oppure legati al glucosio o ramnosio. Non presentano sensibili variazioni di colore con variazione del pH, in soluzione e presenza di solforosa. Dominanti sono i flavoni della quercetina, della miricetina e campferolo (137). Rispetto ad altre classi di flavonoidi non rivestono un ruolo importante in enologia.

3 Flavani o Flavanoli : presentano l'eterociclo ossigenato del pirano e sono presenti in natura sottoforma di agliconi (136). Sono dei polimeri o oligomeri alle base di molecole 5 polimerizzate molto importanti in enologia che vengono chiamati tannini. Possono venir distinti in due classi chimiche che si differenziano per la presenza di un gruppo ossidrilico.

3.1 Flavan-3-oli conosciuti come catechine

L'anello piranico presenta nelle catechine due carboni asimmetrici in posizione 2 e 3, rendendo possibile la presenza, per una molecola, di quattro isomeri ottici; per la catechina dell'uva, solo due di questi sono stati isolati: la (+)-catechina e la (-)-epicatechina. Questi composti possono esterificare con l'acido gallico per dare le catechine gallate (136).

Una sottofamiglia di flavonoidi particolarmente importante è quella delle catechine (o flavani o flavan-3-oli). Frutta e verdura ne sono ricche e sono largamente presenti anche nel vino rosso e nella cioccolata. Sono i polifenoli più abbondanti nel tè verde che viene considerato una "bevanda antitumorale" (113). Assumono colorazioni fra il giallo, il rosso e il marrone così, ad esempio sono responsabili del colore ambrato del vino. Essendo i precursori dei tannini complessi (93), nel vino devono essere stabilizzate per non aumentare eccessivamente la sensazione astringente. Le catechine sono antiossidanti, hanno proprietà benefiche per il cuore ed il sistema cardiocircolatorio, sono in grado di inibire la crescita tumorale e anche di prevenirne l'iniziazione (113; 93). Le catechine sono sintetizzate a valle della PAL e della CHS, a partire da

diidroquercetina ed in molti casi vengono esterificate con acido gallico (ad esempio epicatechina-gallata, epigallo catechina, epigallo catechina-gallata).

3.2 Flavan-3,4-dioli

Vengono chiamati proantocianidine oppure leucoantociani, perch. sono suscettibili di formare per catalisi acida a caldo le corrispondenti antocianidine (antociani in forma libera). Si ritrovano in vari gradi di polimerizzazione quali proantocianidine dimere, trimere, oligomere e polimere. Alla presenza di queste sostanze sono legate molte caratteristiche cromatiche e sensoriali dei vini rossi (136), come il color mattone dei vini invecchiati e le caratteristiche astringenti e amare. E' molto importante, per il gusto del vino, il grado di polimerizzazione di queste molecole.

4.Tannini: I tannini sono composti polifenolici (alcoli aromatici) con strutture molto complesse e pesi molecolari compresi fra 500 e 3000 Da. Sono comuni in frutti, corteccia, foglie e semi di molte piante (93) e sono particolarmente abbondanti associati ai tessuti legnosi delle angiosperme, come le cortecce di quercia, castagno, abete e acacia. Sono stati osservati anche in colture di cellule vegetali, ad esempio in sospensioni cellulari di vite (138). Chimicamente i tannini sono oligomeri e polimeri prodotti alla fine della via dei flavonoidi. Derivano da unità di catechina ed epicatechina (e in misura minore anche da altre catechine e forse persino dal resveratrolo (101) e se vengono scaldati in ambiente acido si idrolizzano in antociani e antocianine colorate. Le catechine sono sintetizzate nel citoplasma ma i tannini sono accumulati nel vacuolo: la polimerizzazione ed il trasporto sono tappe intermedie fondamentali tutt'ora oggetto di studio (93). Le caratteristiche dei vari tannini sono date dalla stereochimica dei legami che uniscono i monomeri (ad esempio *cis* o *trans*), dal grado di polimerizzazione, dallo schema di idrossilazione e dalla eventuale presenza di modificazioni (ad esempio esterificazioni) (93). In generale, comunque, si individuano 3 classi di tannini, distinte dal percorso biosintetico di formazione e dalla stereochimica: tannini idrolizzabili (che possono generare cataboliti tossici), tannini condensati (i più comuni negli alimenti, spesso con effetti benefici) e florotannini (identificati recentemente in molte specie di alghe brune, contengono alogeni). All'interno della cellula vegetale i tannini sono compartimentati nel vacuolo, ma quando

avviene una lesione (ad esempio in seguito al morso di un predatore) la reazione tanninica 41 può rendere meno assimilabile la pianta. Oltre che nei sistemi di difesa da patogeni, insetti ed erbivori, i tannini hanno un ruolo nella pianta in quanto composti colorati (93). L'uomo li utilizza da secoli per la concia delle pelli, sfruttando la loro capacità di combinarsi con le proteine della pelle animale in complessi insolubili e di prevenirne la putrefazione da parte degli enzimi proteolitici. Questa capacità di legarsi ai composti contenenti azoto (principalmente proteine ed alcaloidi) li porta a far precipitare le proteine della saliva, dando così la tipica sensazione di astringenza di molti vini rossi (101; 93). I tannini presenti nell'uva sono dei tannini condensati (o proantocianidine) e sono maggiormente presenti nelle bucce e nelle vinacce: pertanto si ritrovano nei vini rossi nell'ordine di grandezza dei mg/L e sono 20 volte più concentrati che nei bianchi (93). Con l'invecchiamento del vino si ossidano, preservando il vino, e passano dal colore giallo al rosso bruno. Una volta assunti dall'uomo con la dieta, i tannini si combinano in modo aspecifico con le proteine alimentari, formando complessi resistenti alle proteasi gastrointestinali, ed inibiscono gli enzimi digestivi. Inoltre, se assunti in dosi elevate, interferiscono con l'assorbimento del ferro e dello zinco (complessano i metalli) e anche di alcune vitamine. I tannini condensati sono fortemente antiossidanti, hanno un effetto antibatterico ed antifungino, sono antidiarroici, antiinfiammatori, immunomodulatori, vasocostrittori e sono usati nella rigenerazione dei tessuti affetti da piccole ferite e ustioni. Hanno azione positiva sul sistema cardiovascolare e nella prevenzione dell'arteriosclerosi e di alcuni tumori (93). Effetti analoghi sono stati osservati anche sui ruminanti, quindi è importante la dose di tannini presente nel foraggio perché influisce sul sapore e sulla digestione (ad esempio sono utili per ridurre la formazione di metano nel rumine e per aumentare l'assimilazione degli amminoacidi) (93). Alla base di molti tannini c'è l'acido gallico (acido 3,4,5-triidrossibenzoico) (fig. 1.40). Il suo nome ha origine dalle "galle", escrescenze che si formano sulle foglie o sui rami dei vegetali, dovute alla parassitosi di funghi, batteri, insetti o acari. L'acido gallico è prodotto dalla pianta per combattere la proliferazione cellulare. Oltre a trovarsi nelle foglie e nelle radici di alcune piante, si trova anche nei semi e nei frutti, ed è per questo uno dei

polifenoli contenuti nell'olio d'oliva, nel vino e nel tè verde. Nel vino, in particolare, è coresponsabile di colore e sapore. Spesso lo si trova coniugato alle catechine o ai tannini in forma di estere. Sull'uomo ha effetti antiossidanti, antiemorragici e antitumorali. Viene aggiunto a vari alimenti con la funzione di additivo antiossidante (113).

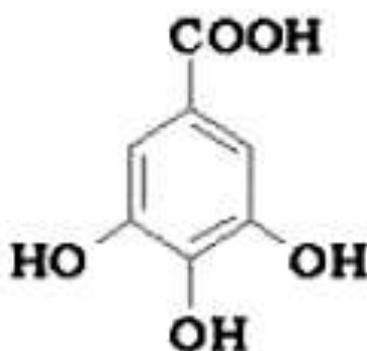


Fig. 1. 40 Struttura dell'acido gallico.

1.6 Vino rosso

Il vino se bevuto in giuste quantità, risulta benefico per la salute umana. L'effetto positivo è dovuto all'azione antiossidante di un numeroso gruppo di sostanze di natura fenolica che, oltre ad influenzare il colore e le qualità organolettiche del vino (139), svolgono un ruolo importante nella prevenzione di malattie di diversa origine (140). Esistono più di duecento tipi di polifenoli nel vino rosso (141; 142). I polifenoli sono una classe di composti che assumono un ruolo primario in enologia. Essi, sono i responsabili delle differenze fra i vini bianchi e rossi, in particolare del colore e del gusto, presentano proprietà battericide, antiossidanti e protettive nei riguardi delle malattie cardiovascolari. Vengono estratti dalle differenti parti dell'acino durante la vinificazione in rosso e subiscono delle variazioni di struttura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino, in quanto vanno incontro a reazioni di polimerizzazione, di ossidazione, di condensazione e di idrolisi (143).

L'uva terminata la fase di allegazione (processo di formazione degli acini a seguito dell'ingrossamento dell'ovario del fiore verso la metà di giugno) inizia una fase di accrescimento che per comodità viene suddivisa in tre fasi:

- fase erbacea;
- fase di invaiatura;
- fase di maturazione.

Può essere rappresentata graficamente (fig. 1. 41):

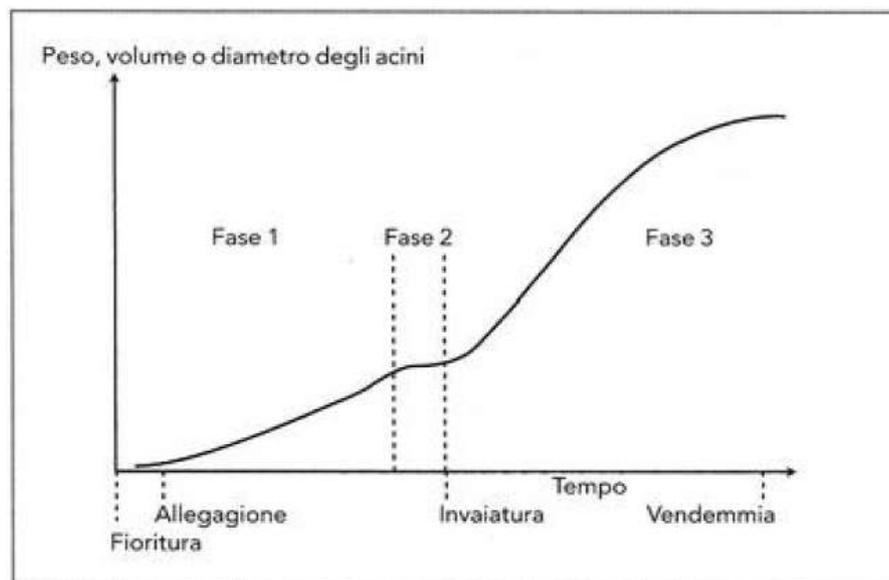


Fig. 1.41 Fasi dello sviluppo dell'uva.

Le tre fasi durano complessivamente da 50 a 120 giorni circa, a seconda della precocità o tardività del vitigno. Inoltre si può distinguere una quarta fase successiva alla maturazione detta di surmaturazione, durante la quale si assiste esclusivamente a fenomeni di trasformazione di ordine fisico: lenta evaporazione dell'acqua (appassimento), progressiva lignificazione del raspo e aumento del tenore relativo in zuccheri.

Fase erbacea

Durante questo periodo, che va dall'allegazione all'invaiatura e dura da 45-65 gg, la bacca aumenta notevolmente in peso e volume, l'accrescimento avviene per divisione cellulare. Essa possiede prevalentemente molecole di clorofilla che permettono l'attività fotosintetica. Inoltre è attiva un'intensa

attività respiratoria ed un accumulo di acidi organici, soprattutto tartarico e malico.

Fase di invaiatura

La seconda fase di accrescimento delle bacche coincide con il periodo di stasi della curva a doppia sigmoide e più precisamente, con il fenomeno della diminuzione di clorofilla e dell'assunzione di un aspetto traslucido della bacca per terminare con l'invaiatura. Dura un intervallo di 8-15 gg. In questa fase l'acino riduce o annulla la fotosintesi, inizia la sintesi degli aromi, dei polifenoli e di altri componenti. Questo poi, raggiungerà il suo massimo di intensità durante la fase di maturazione. Si arresta inoltre la crescita dimensionale della bacca.

Fase di maturazione

L'acino una volta invaiato riprende ad ingrossarsi, questa volta per distensione cellulare (l'aumento del contenuto in glucidi incrementa la pressione osmotica, con conseguente richiamo di acqua) e la sua composizione chimica subisce profonde modificazioni. Si ha un rapido arricchimento in zuccheri ed una diminuzione complessiva degli acidi; la bacca assume il sapore caratteristico di frutto maturo. L'intensità respiratoria diminuisce, durante il periodo che dura da 34-45 gg si assiste poi ad un rammollimento della stessa a causa della degradazione delle pectine parietali (142; 143).

1.6.1 Localizzazione ed evoluzione della componente fenolica nella bacca

Localizzazione

L'acino a maturità presenta una morfologia dei tessuti che si può rappresentare (fig. 1. 42):

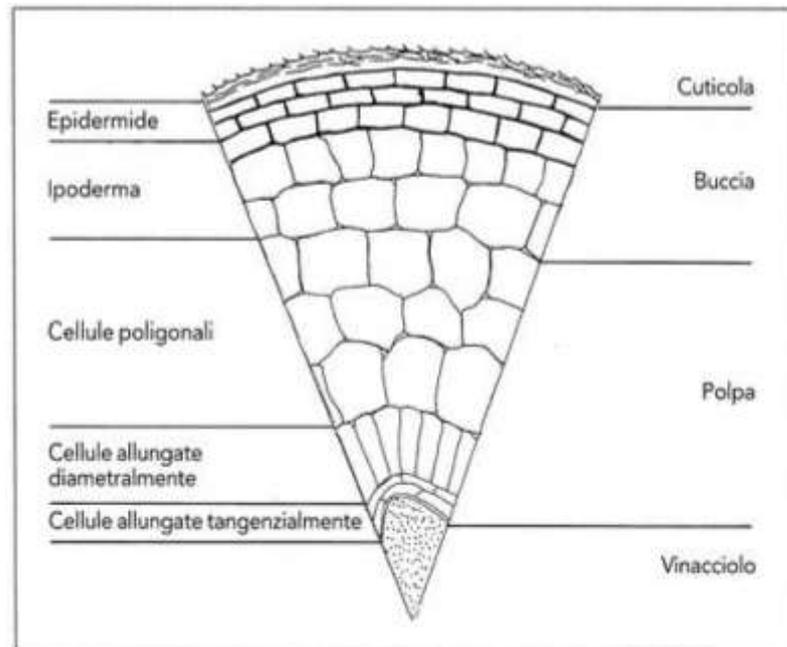


Fig. 1. 42 Sezione dell'acino

Gli antociani sono presenti nelle uve a bacca rossa dove sono localizzati nella buccia salvo alcuni casi in cui sono localizzati anche nella polpa (varietà comunemente dette tintoria). Nello specifico sono situati nei vacuoli delle cellule che formano lo strato pi. vicino alla regione della polpa. I tannini sono presenti sia nei semi dove esercitano la funzione di protezione dell'embrione che nella buccia, dove si identificano tre tipologie. La prima è quella dei tannini localizzati nei vacuoli delle cellule prossime all'epidermide, la seconda e quella dei tannini legati fortemente al tonoplasto e la terza dei tannini integrati nella parete cellulosopectica. Nei vacuoli delle cellule delle bucce sono anche presenti flavonoli e acidi fenolici che sono i composti fenolici essenziali delle cellule della polpa (143).

Evoluzione

Gli antociani compaiono durante la fase di invaiatura e si accumulano durante tutta la fase di maturazione arrivando ad un massimo in prossimità

della maturità tecnologica (definita dal rapporto zuccheri/acidità) per poi diminuire in seguito a degradazione nel corso della sovraturazione. Questo trend degli antociani è valido per tutte le cultivar mentre la quantità massima raggiungibile ed il momento di raggiungimento rispetto alla maturità tecnologica dipende dalle condizioni climatiche e dalle tecniche di coltivazione. Alla luce di questo il concetto di maturità deve essere ampliato considerando più parametri come definiti da Glories e Augustin (1993):

1. Maturità tecnologica definita dal rapporto zuccheri e acidità, ad essa si fa riferimento per determinare la data di vendemmia;
2. Maturità fenolica definita dal tenore di antociani nelle uve e dal loro accumulo nella buccia in maturazione;
3. Maturità cellulare definita dal grado di degradazione della parete cellulare delle bucce. Con la maturità si raggiunge una minor resistenza allo schiacciamento da parte della bacca, con la conseguente miglior diffusibilità nel liquido da parte delle sostanze coloranti.

I tannini al momento dell'invasatura sono già presenti nella bacca; quelli presenti nei vinaccioli diminuiscono nel corso della maturazione, all'invasatura presentano un grado di polimerizzazione poco elevato che aumenta in maniera lieve nel corso della maturazione. I tannini della buccia seguono un andamento simile a quello degli antociani, si presentano già come strutture complesse e durante il corso della maturazione non subiscono grosse variazioni strutturali. Diversamente da quelli dei vinaccioli presentano proprietà colloidale e con la maturità tendono a diminuire la reattività con le proteine (fig. 1.43) (143).

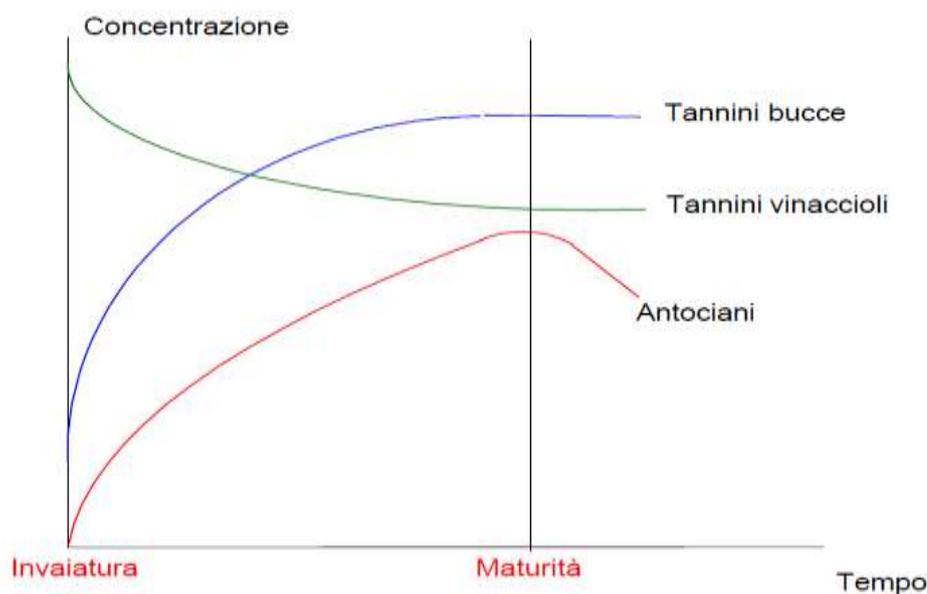


Fig. 1.43 Evoluzione della concentrazione in tannini e antociani nelle bucce e nei vinaccioli durante la maturazione.

1.6.2 L'importanza del raggiungimento della maturità fenolica

La maturità fenolica è lo stato fisiologico dell'uva caratterizzato da un particolare contenuto delle sostanze fenoliche nella buccia, nei semi e da una loro ben definita struttura; da queste due caratteristiche dipende la loro diffusione nel mosto durante la vinificazione. Il suo studio risulta sempre più importante per determinare la qualità e l'epoca di vendemmia, specie delle uve rosse (Glories Y., Augustin M., 1993). La conoscenza della maturità fenolica delle uve permette di ottimizzare le fasi di vinificazione in funzione di classi di qualità fenoliche. Non deve mancare una corretta gestione della macerazione che permette di valorizzare la qualità della materia prima associata ad un costante impegno del controllo dell'estrazione polifenolica durante la macerazione (144). Tendenzialmente all'aumentare del grado zuccherino aumenta anche la qualità del "colore". Ma, mentre il grado zuccherino fornisce sempre un grado alcolico potenziale indipendentemente dal tipo di vinificazione, il grado colore complessivo fornisce una potenzialità fenolica su pi. parametri e pu. portare a vini diversi in funzione della tecnica di vinificazione. La determinazione del contenuto in antociani e tannini dell'uva nel corso della maturazione, consente di seguire l'evoluzione di queste sostanze e di classificare il vigneto e le parcelle secondo un criterio che si basa

sulla ricchezza fenolica. Teoricamente, le uve più ricche in antociani dovrebbero condurre a vini pi. colorati, ma è necessario considerare anche il coefficiente di estrazione. La liberazione degli antociani nel succo di macerazione diventa sempre più facile con il progredire dello stato di maturazione; infatti se le uve sono ben mature è sufficiente indurre la rottura della membrana vacuolare per ottenere la liberazione degli antociani. La maturità fenolica è data dunque non solo dal contenuto totale in pigmenti delle uve, ma anche dalla loro estraibilità all'atto della vinificazione (136).

1.6.3 I composti fenolici e le proprietà salutistiche del vino.

I composti polifenolici presenti nell'uva e, di conseguenza, nei mosti e nei vini si differenziano in acidi fenolici o fenoli non flavonoidi, flavonoidi, antociani e tannini (143). La loro concentrazione finale nei vini rossi è conseguenza di fattori - area viticola, periodo di raccolta, reazioni di condensazione tra composti, attività dei lieviti, tempo di conservazione dei vini in bottiglia - che si aggiungono alla cultivar di uva ed alle tecniche di vinificazione. Rispetto alle altre bevande alcoliche, compreso il vino bianco, il vino rosso è un'importante fonte di questi composti (145) che svolgono un ruolo nel conferirgli qualità, concorrendo alle sue caratteristiche sensoriali, antiossidanti e farmacologiche. Infatti, i composti fenolici trasmettono al vino peculiari caratteristiche sensoriali, tra cui il colore ed il gusto (146; 147). Inoltre, essi posseggono la struttura chimica ideale per l'attività antiradicalica ed hanno dimostrato effetto antiossidante contribuendo alla prevenzione delle malattie coronariche (148; 149; 150). In particolare, è stato dimostrato che estratti di procianidine da mosto o vino influenzano il metabolismo degli adipociti mobilizzando le riserve di grassi. La loro azione benefica, che inibisce la sintesi dei triacil-gliceroli stimolandone invece l'idrolisi, è direttamente proporzionale al grado di polimerizzazione dei composti fenolici (151). Anche la capacità di proteggere le cellule dall'azione tossica dei radicali liberi è stata riscontrata in composti polifenolici ad elevato grado di polimerizzazione, come le proantocianidine estratte da semi di uva a bacca nera, mentre i tannini a basso peso molecolare dei vini rossi non hanno mostrato alcuna correlazione con tale attività (152). L'aumento del grado di polimerizzazione dei polifenoli, ed in

particolare delle procianidine, è direttamente proporzionale all'attività antiossidante che induce effetti antitumorali (153; 154). Il succo d'uva manifesta una potente azione inibitrice su cellule di carcinoma del colon; tale effetto sembra dovuto ai flavonoli, come la quercetina, contenuti soprattutto nelle bucce e nei semi (155). Catechine, epicatechine, quercetina e resveratrolo di origine enologica si sono dimostrati in grado di inibire la proliferazione di linee cellulari umane di cancro della mammella (156), della prostata (157; 158) e della pelle (159). È stata anche studiata l'attività antiossidante di singoli costituenti polifenolici del vino rosso, come le catechine (160), le proantocianidine (161), le antocianine (162) e la quercetina (163). Differenti metodi sono stati testati per valutare l'attività antiossidante dei vini in relazione alla loro composizione polifenolica (164). La moderata somministrazione di vino rosso a pazienti affetti da ipertensione, aterosclerosi ed altre malattie croniche del sistema cardio-circolatorio aumenta i livelli plasmatici delle lipoproteine ad alta densità e le difese antiossidanti dell'organismo; attraverso l'incremento della capacità antiossidante del plasma protegge le lipoproteine a bassa densità dall'ossidazione, riduce l'aggregazione delle piastrine ed i danni ossidativi al DNA, normalizza la funzione endoteliale ed abbassa la pressione del sangue (165; 166; 167; 168). L'assunzione dei polifenoli totali estratti dal vino rosso è utile nella terapia delle malattie coronariche e nella riduzione dei rischi d'infarto miocardico; tali composti si sono, infatti, mostrati in grado di proteggere gli acidi grassi poli-insaturi nel plasma e nelle membrane cellulari, contribuendo così a ridurre gli effetti deleteri di un'eccessiva assunzione di colesterolo con gli alimenti (169; 170; 171). È stata dimostrata attività antinfiammatoria dei polifenoli da vino rosso su cellule intestinali con atto processi infiammatori, in atto, indotti da carenza di zinco (172). Il resveratrolo di origine enologica ha mostrato avere effetti antinfiammatori, carcinostatici (173) ed antivirali (174). Malgrado questa notevole mole di risultati incoraggianti, alcuni autori, prudentemente, sollecitano indagini più approfondite al fine di validare i dati sin qui acquisiti (175; 176).

La catechina (140), presente nel vino rosso è stata indicata per essere assorbita, metabolizzata ed espulsa raggiungendo concentrazioni sufficienti in plasma umano per contribuire ad una certa protezione di LDL *in vivo* (177).

Quindi, in individui con fattori di rischio dell'arteriosclerosi, il consumo di catechina potrebbe avere una certa misura di protezione dei lipidi dalle reazioni deterioranti di ossidazione che sono legate all'arteriosclerosi. L'attività *in vivo* di composti fenolici come antiossidanti non è ancora ben capita. Lo sviluppo di biomarkers che possono essere collegati meglio con le malattie degenerative (178), presenta una delle sfide più difficili in questo campo. Studi diversi dimostrano che i flavonoidi ed i vari polifenoli potrebbero avere effetti antiossidanti e protettivi nel tratto gastrointestinale con l'assorbimento completo (179; 180).

Questa ipotesi è sostenuta dalle concentrazioni più elevate dei residui fenolici trovati nello stomaco e nel lumen intestinale piuttosto che nel plasma (181).

1.7 Magliocco e Nero D'avola

Il Magliocco (fig. 1.44) è un' antica varietà calabrese e viene soprattutto coltivato nelle province di Cosenza e Catanzaro. Alcune volte le uve di questo vitigno vengono usate per aggiungere corpo e struttura a vini locali. Il Magliocco è stato riportato in vita dalla società Librandi, che ha iniziato a ricercare e propagare antiche varietà indigene nel 1988.



Fig. 1.44 Vitigno Magliocco

Il termine autoctono è riservato a quel vitigno che è nato e si è sviluppato in un preciso luogo geografico adattandosi al territorio che lo ha ospitato fin quasi a fondersi con esso. Così come accade per i nobili casati, che vantano alberi

genealogici che affondano sicuri nei meandri del tempo, anche l'uva autoctona per essere tale deve risiedere nel luogo di origine da parecchi anni. Il Magliocco è un vitigno a bacca nera di antica coltivazione, appartiene alla famiglia dei Magliocchi, vitigni dal grappolo piccolo come un pugno o maglio (da cui il nome), dai quali differisce però per diversi caratteri. Si adatta bene ai climi caldi ed asciutti, specialmente in terreni sciolti e profondi che garantiscano un'adeguata riserva idrica, dove manifesta un elevato vigore vegetativo ed una media tolleranza alle principali malattie crittogamiche. A sud di Cosenza, da secoli il Magliocco Dolce viene coltivato e vinificato con cura, sia in uvaggio che in purezza.

Il **Nero d'Avola** è il vitigno rosso più rinomato della produzione vinicola siciliana (fig. 1.45). Il nome del vitigno Nero d'Avola nasce come Calaulisi, italianizzato erroneamente in Calabrese. Cala è la forma dialettale, di Calea, o Caleu sinonimi siciliani di Racina ovvero uva. Aulisi indica "Aula" cioè la città di Avola in dialetto. In definitiva Uva di Avola, ovvero Calea-Aulisi, ed infine Calaulisi. L'innesto del primo Nero d'Avola venne effettuato ad Avola. L'origine del nome nero d'avola è dunque da contestualizzare in tempi molto remoti. Sebbene gli esportatori di vini siciliani in Francia trovarono più facile venderli come vini "calabresi", che in quel tempo erano decisamente più famosi ed apprezzati, già nel 1800 i vini rossi provenienti da uve nero d'avola del territorio siracusano erano divenuti molto richiesti e ambiti dagli stessi commercianti Francesi e nord Europa, che li applicavano per dare colore e corposità ai loro vini. I vini prodotti da uve di Nero d'Avola sono esportati in tutto il mondo. Presentano una buona acidità che dà loro possibilità di lungo invecchiamento, se ben conservati e se provenienti da alcune zone, soprattutto quelle dette prima, meglio ancora se provenienti da uve allevate con il tradizionale sistema detto ad "alberello" portato in Sicilia dai Greci fra il VIII e il VII secolo a.C. Sono tipicamente vini di forte carattere, talvolta un po' spigolosi talvolta molto eleganti. Al naso presentano vari sentori: di spezie e viole alcuni, altri di frutta a bacca rossa più o meno matura, altri ancora caratteristici profumi eterei dovuti all'alcolicità. Il nero d'Avola è presente sul mercato sia in purezza sia assieme ad altre uve. Il più antico di questi uvaggi è il Cerasuolo di Vittoria DOCG (titolo alcolometrico 13%) ricavato da Nero d'Avola

e Frappato, che è prodotto sulla costa meridionale della Sicilia fra Ragusa e Gela. Ai nostri giorni, talvolta è utilizzato per il taglio di vini come il Merlot, il Cabernet Sauvignon e soprattutto con il Syrah, abbinamento che sta dando eccellenti risultati.



Fig. 1.45 Nero D'Avola

Il potenziale del Nero d'Avola ha attratto l'attenzione di produttori di altre regioni, che hanno cominciato ad investire nelle vigne siciliane, con l'intenzione di produrre vini gradevoli a basso e medio prezzo. C'è oggi la tendenza a pensare ai grandi vini in termini di potenza, imponenza, forza muscolare e pungente aggressività. È perciò un piacere genuino assaggiare un vino come questo, che riporta alla mente parole a lungo trascurate come razza, fascino e classe. È utile ricordare agli amanti del vino che la longevità e la struttura non devono essere appesantite da gravosi tannini e dalle sensazioni opprimenti della barrique. Oggi, molti produttori hanno scelto di fare vini morbidi, ma longevi con tutto il 100% di Nero D'Avola. Inoltre, i viticoltori di tutta la Regione stanno esplorando il modo in cui le differenze relative al sito, al terreno e ai metodi di allevamento possono incidere sullo sviluppo di questo vitigno, mentre i vinificatori stanno sperimentando varie possibilità di vinificazione e di invecchiamento. Questa varietà è la componente di una ventina di vini siciliani a doc. Questo vino rosso, oggi, può definirsi il principe dei vitigni siciliani. La sua coltivazione vanta una superficie vitata che supera i 12 mila ettari; è, dunque, il vitigno più diffuso nella regione. Ormai indubbia è la sua affermazione in tutto il mondo come vitigno a bacca rossa dalle grandi qualità, dal quale produrre vini pregiati, di grande stoffa e spessore. Il nero d'avola è coltivato principalmente ad alberello o a

spalliera e da sempre rende uve ad alta gradazione zuccherina che consentono al vino che ne viene prodotto di arrivare con facilità ad oltre 15 gradi alcolici.

Scopo del Lavoro

Gli eritrociti trasportatori dell'ossigeno, con un alto contenuto di acidi grassi polinsaturi ed emoglobina, sono particolarmente esposti al danneggiamento ossidativo. Lo stress ossidativo è una condizione fisiologica in cui si verificano elevate concentrazioni delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danno molecolare con conseguente insorgenze di patologie (95). In tali condizioni, l'emoglobina rilasciata dagli eritrociti, può reagire con H_2O_2 , dando origine alle forme ossidate, metaemoglobina e ferriemoglobina, i quali sono potenziali promotori dei processi ossidativi. Inoltre l'emoglobina libera esposta all' H_2O_2 , causa una degradazione dell'eme e rilascio di ioni ferro che hanno attività catalitica nei processi di iniziazione nella reazione di perossidazione lipidica (182). Alcuni autori (13) hanno dimostrato che i processi di perossidazione lipidica e il conseguente cambiamento conformazionale della banda 3 sono responsabili dei processi di emolisi indotti dal radicale perossilico idrosolubile 2,2 9-azobis-(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (13). La funzione di regolazione della banda 3 è collegata al quadro della membrana degli eritrociti, e la mancanza di organizzazione dei lipidi, in seguito all'incremento dei prodotti di degradazione lipidica, può influenzare in modo significativo la permeabilità (15). La recente comprensione di tali processi degenerativi ha messo in evidenza il ruolo degli antiossidanti nella protezione dei tessuti contro l'ossidazione. In particolare, negli ultimi anni, si è potuto dimostrare che il vino contiene diversi componenti ad azione di contrasto dai radicali liberi (95). Le ricerche scientifiche hanno evidenziato che l'assunzione di vino rosso, in moderata quantità, comporta una migliore stabilità del plasma, un decremento delle LDL (lipoproteine a bassa densità) e un corrispondente aumento delle HDL (lipoproteine ad alta densità). Questo rende possibile una riduzione dell'indice di rischio di patologie cardiovascolari, per aumento della concentrazione ematica delle lipoproteine ad alta densità. L'assunzione di vino rosso, comporta anche un'azione antiaggregante piastrinica che si traduce con l'inibizione della sintesi degli eicosanoidi infiammatori e la modulazione del metabolismo dell'acido arachidonico, contrastando così la formazione delle placche aterosclerotiche (140; 183; 184). L'attività antiossidante dei polifenoli è legata alla loro struttura e al

potenziale di riduzione. La capacità antiossidante dipende dal *pattern* d'idrossilazione, ovvero dal numero, dalla specifica posizione e dalla sostituzione di specifici gruppi idrossilici (185). Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto protettivo contro il danneggiamento ossidativo in eritrociti umani normali, conferito dai composti fenolici puri catechina, resveratrolo, quercetina, dagli estratti naturali provenienti dal vitigno Magliocco e nero d'avola (vino rosso) in concentrazioni fisiologiche che si sono dimostrate efficaci in vitro (1-5 μM) (186) inoltre è stato preso in esame l'attività antiossidante proveniente dagli estratti di mirtillo (*Vaccinium vitis-idaea*). Tale valutazione ha fornito indicazioni sul reale contributo dei composti fenolici presenti negli estratti naturali nella protezione dal danno ossidativo.

Le analisi che sono state condotte si basano sull'espressione dell'aumento dei processi di degradazione lipidica nella membrana eritrocitaria, monitorati mediante la misura dell'MDA (malondialdeide), inoltre è stato possibile evidenziare se la fragilità di membrana con relativa emolisi eritrocitaria è in relazione con l'aumentata produzione di ROS; di seguito sono stati effettuati saggi che ci hanno consentito di avere informazioni: sulla permeabilità anionica delle membrane, che dà indicazioni sulla efficienza della banda 3; sul dosaggio dell'enzima Glucosio-6-fosfato deidrogenasi; sul dosaggio della Metaemoglobina e sul monitoraggio del GSH sia nel plasma che su sangue intero. Al fine di confermare i dati ottenuti è stata effettuata l'analisi morfologica dei campioni in esame mediante tecniche di microscopia ottica (con conseguente elaborazione digitale mediante il programma imageJ) e elettronica a scansione (SEM).

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI

2.1 Soggetti Partecipanti Allo Studio

Per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati campioni di sangue di donatori dell'Associazione Volontari Italiani Sangue (AVIS) della sezione provinciale di Cosenza. I soggetti partecipanti allo studio, sono stati sottoposti ad un prelievo venoso rilasciando il loro consenso informato.

2.2 Metodo colorimetrico Folin-Ciocalteus determinazione dei polifenoli totali nel vino

La concentrazione dei polifenoli totali è stata misurata mediante il metodo di Folin-Ciocalteu. In ambiente basico, il reattivo di Folin-Ciocalteus ossida i gruppi ossidrilici dei composti polifenolici presenti nel campione. I prodotti di riduzione (ossidi metallici W8023/Mo8023) di colore blu presentano un massimo di assorbimento la cui intensità è proporzionale ai Polifenoli presenti nel campione. La concentrazione molare dei costituenti utilizzati nella preparazione dei reagenti, è stata ottimizzata per ottenere una risposta analitica il più possibile lineare in funzione del rapporto interno reattanti/Polifenoli totali. Per il dosaggio del Folin-Ciocalteus è stato eseguito il protocollo sperimentale secondo il Kit della Biogamma[®] s.r.l. (187)

2.3 Preparazione dei polifenoli

- Resveratrol R5010 Sigma®: 10µM, 1µM (C.F.) in RBC
- Catechin C0567 Sigma®: 10µM, 2,5µM (C.F.) in RBC
- Quercetin Q4951 Sigma® 10µM, 1µM (C.F.) in RBC
- Estratto da uve del “Vitigno Magliocco”(vino rosso): 22 µM come equivalenti di Acido Gallico, 5 µM (C.F.) in RBC
- Estratto da uve del “ Vitigno Nero d’avola” (vino rosso): 52 µM come equivalenti di Acido Gallico, 5 µM (C.F.) in RBC
- Estratto di mirtillo : 5µM (C.F.) in RBC

2.4 Preparazione dei campioni / estratti naturali da uve provenienti dal vitigno Magliocco e Nero d’Avola (vino rosso) e mirtillo

La concentrazione in mg/L di polifenoli proveniente dagli estratti naturali (vino rosso e mirtillo) corrisponde a:

POLIFENOLI	Magliocco		Nero D’Avola		Mirtillo	
	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
Catechina	479,024	1650	546,7	1883	502,95	1729
Miricetina	19,55	61.4	21,505	67,54	20,2	64.9
Epicatechina	195,52	673.5	215,072	740,85	205,3	707
Rutina	22,48	36.8	24,728	40,48	23,6	38,6
Acido gallico	234,624	1379	258,0864	1517	245	1443
Quercetina	19,06	63	20,966	69.08	20,58	67
Resveratrolo	4,4	19.2	4,84	21,12	4.6	20,07

Tab 2.1 Concentrazioni dei diversi polifenoli contenuti nel vino rosso del vitigno “Magliocco” e Nero D’avola e Mirtillo

L’azione protettiva degli estratti naturali (vino rosso) proveniente dal “vitigno Magliocco”, Nero d’Avola e mirtillo è stata monitorata mediante esposizione degli eritrociti ad una concentrazione di polifenoli totali, come equivalenti di Acido Gallico, pari a 5 µM (C.F.). Pari alla seguente concentrazione molare di polifenoli:

	<i>Magliocco</i>	<i>Nero D'Avola</i>	<i>Mirillo</i>
<i>POLIFENOLI</i>	μM	μM	μM
<i>Catechina</i>	2,45	2.69	2,55
<i>Miricetina</i>	0,1	0.12	0,11
<i>Epicatechina</i>	1	1.2	1,05
<i>Rutina</i>	0,115	0.14	0,12
<i>Acido gallico</i>	1,2	1.41	1,35
<i>Quercetina</i>	0,0975	1.1	1
<i>Resveratrolo</i>	0,0225	0.025	0,023

Tab 2.2 Esposizione degli eritrociti ad una concentrazione di polifenoli totali, come equivalenti di Acido Gallico, pari a 5 μM .

2.5 Reazione Perossidazione Lipidica

La perossidazione lipidica rappresenta un tipico marker dello stress ossidativo cellulare poiché in tale processo sono coinvolti i radicali liberi. (188)

Tra le conseguenze dei danni cellulari causati dalla lipoperossidazione riveste una particolare importanza il danno a carico della fluidità di membrana e la conseguente incapacità di quest'ultima di agire come barriera selettiva. (189)

Mediante il dosaggio della **malondialdeide (MDA)** è possibile valutare la perossidazione delle membrane eritrocitarie dei campioni presi in esame. (190)

Il metodo per il dosaggio dei prodotti di perossidazione lipidica è basato sulla reazione dell' MDA con il TBA con formazione del MDA-TBA che ha un picco di assorbanza a 532 nm.

2.5.1 Reagenti utilizzati nella reazione di perossidazione lipidica

➤ BUFFER FOSFATO:

- KH_2PO_4 1,46 M
- Na_2HPO_4 0,80 M

➤ PBS:

- NaCl 0,137M
- KCl 0,027 M

- 10 ml di Buffer fosfato.

Il tutto è stato portato a volume finale di 1000 ml di acqua distillata. L'intera soluzione deve avere un pH di 7.

- NaOH: 1M
- TCA: 100g/L
- TBA: 0,67%
- AAPH : 100mM

2.5.2 Preparazione del TCA (acido tricloroacetico), del TBA (acido tiobarbiturico) e dell' AAPH (2,2'-azo-bis 2-amidinopropano diidrocloreuro)

L' **acido tricloroacetico** (CCl_3COOH) è un acido carbossilico (Fig.2.1).

La sua struttura è assimilabile a quella di una molecola di acido acetico i cui tre atomi di idrogeno sono stati sostituiti da altrettanti atomi di cloro. A temperatura ambiente si presenta come un solido incolore dall'odore pungente ed è un composto corrosivo. Trova esteso impiego nella chimica biologica perché le sue soluzioni, dall' 1 al 5%, sono comunemente impiegate in laboratorio per precipitare le proteine in soluzione. Qualsiasi soluzione che contenga proteine (es. plasma, sonicati tissutali, ecc.) se addizionata con pari volume di acido tricloroacetico al 6% porta la concentrazione di acido al 3% e con un pH inferiore a 2. A tale valore di acidità tutte le proteine in soluzione si aggregano e precipitano, permettendo la loro separazione dal solvente. Per gli scopi sperimentali preposti, l'acido tricloroacetico (TCA) è stato utilizzato ad una concentrazione di 100 gr/L (10%) in acqua distillata.

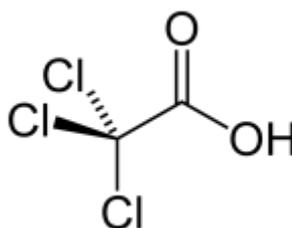
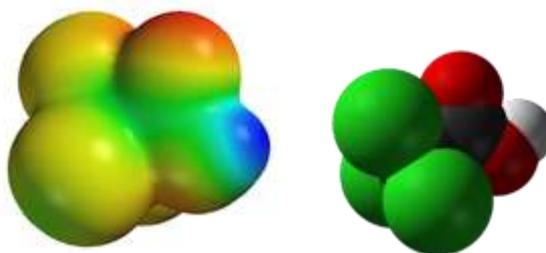


Fig. 2.1 Struttura del TCA

L'**acido tiobarbiturico** ($C_4H_4N_2O_2S$), invece, è una polvere cristallina scarsamente solubile in acqua (0,72% a 20 °C) e nei comuni solventi organici (Fig. 2.2). Si ottiene industrialmente per ossidazione catalitica a 180-190 °C del triclorotoluene con ossigeno o con ossidi di azoto. La soluzione di TBA è stata usata allo 0.67% in acqua distillata e in NaOH 0.050M . (191)

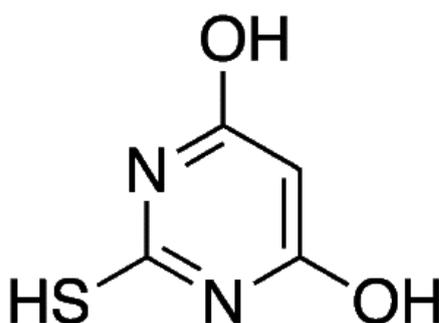


Fig. 2.2 Struttura del TBA

Il **2,2-azobis 2-amidinopropano diidrocloreuro** è un azo composto solubile in acqua ed è utilizzato come generatore di radicali liberi (192; 193; 194) (Fig. 2.3). L'AAPH scindendosi produce una molecola di idrogeno e 2 radicali carbonilici.

Tale radicale può combinarsi per produrre un composto stabile oppure reagisce con molecole di ossigeno dando origine ai radicali perossilici. L'emivita della molecola di AAPH è di circa 175 ore (37°C a pH neutro) e la produzione di radicali liberi avviene in soluzione durante le prime ore. La soluzione di AAPH è stata usata è preparata ad una concentrazione di 100 mM in PBS per arrivare poi ad una concentrazione finale di 50Mm negli RBC.

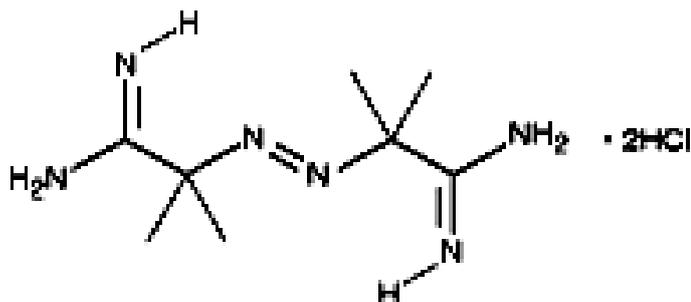


Fig. 2.3 Struttura dell' AAPH

2.5.3 Misura Della Perossidazione Lipidica

I TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance) sono prodotti dalla degradazione ossidativa degli acidi grassi poliinsaturi, in particolare tra questi ricordiamola la malondialdeide (MDA). Il metodo utilizzato per la misura della perossidazione lipidica prevede la reazione dei lipidi perossidati (come l'MDA) con il TBA che portano alla formazione di un pigmento di colore rosa che si rileva spettrofotometricamente a 532 nm. (195) (Fig.2.4)

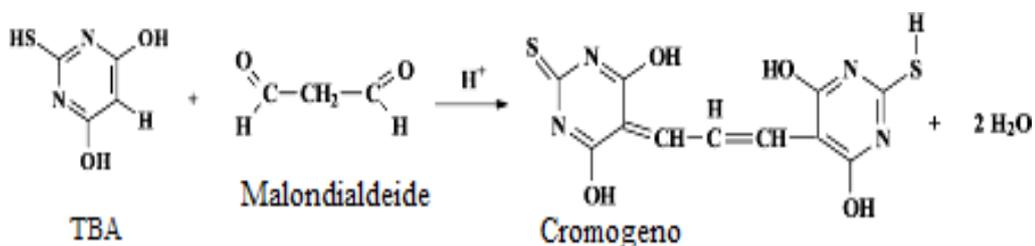


Fig. 2.4 Reazione tra MDA e TBA

2.5.4 Preparazione dei globuli rossi

- Partendo da un volume di sangue di 0,5 ml si è stata effettuata una centrifugazione a 1100g per 5 minuti al fine di separare il plasma dai globuli rossi.
- E' stato eliminato il sovrnatante e si proseguito effettuando tre lavaggi dei globuli rossi con PBS; per ogni lavaggio si centrifuga il campione per 5 minuti a 1100g.

2.5.5 Protocollo sperimentale per la determinazione dei prodotti di perossidazione lipidica

Per determinare i prodotti di perossidazione lipidica è stato effettuato il seguente protocollo sperimentale:

- 1) 125µl di eritrociti ottenuti dai precedenti lavaggi, sono stati sottoposti alla reazione, mediante aggiunta del radicale AAPH 50mM (C.F.) ed incubati per 5' a 37°C.
- 2) Un campione è stato utilizzato come controllo(senza AAPH).
- 3) I polifenoli resveratrolo, catechina, quercetina gli estratti di vino rosso proveniente dal "Vitigno Magliocco" e Nero d'Avola e mirtillo sono stati aggiunti separatamente ed incubati per 1 ora a 37°C.
- 4) Tutti i campioni sono stati sottoposti alla seguente reazione:
 - 625 µl di TCA 100 g/L sono stati aggiunti a tutti i campioni;
 - I campioni sono stati agitati e si incubati per 15 min a 100°C;
 - E' stata effettuata una centrifugata per 5 min a 1100g;
 - E' stato recuperato il sovrnatante (~ 500 µl);
 - Al sovrnatante è stato aggiunto 250 µl di TBA 0,67%;
 - Il tutto è stato incubato per 15 min a 100°C;
 - Al termine dell'incubazione la soluzione è stata fatta raffreddare;
 - E' stata eseguita la lettura del campione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 532 nm (190).

I valori dell' MDA sono stati ottenuti, moltiplicando l'assorbanza a 532 nm per il coefficiente di estinzione molare del complesso MDA-TBA che è pari a: $1.5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ ed è espressa in nmol/L.

2.6 Determinazione della permeabilità anionica degli eritrociti.

La determinazione della permeabilità anionica si basa sullo studio delle caratteristiche della membrana e della sua fluidità. L'architettura della membrana eritrocitaria e la sua permeabilità dipendono da una proteina caratteristica, la banda 3, che regola il trasporto dell'anione Cl^- attraverso la membrana.

La regolare funzione della banda 3 è legata alla struttura della membrana eritrocitaria, tanto che la mancanza di un'adeguata organizzazione lipidica può significativamente influenzare la permeabilità allo ione.

2.6.1 Reagenti utilizzati nella reazione di determinazione della permeabilità anionica

- NaNO_2 0,06 mol/L (0,69g in 10ml di PBS)
- TRITON X 100 al 2% (20 μl di triton X 100 100% in 1ml di PBS) (Fig. 2.5)

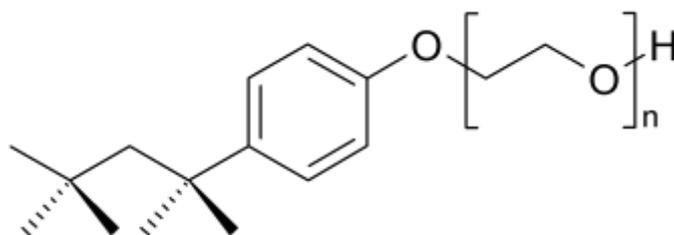


Fig. 2. 5 Struttura del Triton X 100

2.6.2 Protocollo sperimentale per la determinazione della permeabilità anionica

La misura della permeabilità anionica è stata condotta su campioni di 50 μl di sangue. I polifenoli (resveratrolo, catechina, quercetina e il vino rosso proveniente dal "Vitigno Magliocco" e Nero d'Avola e mirtillo) sono stati aggiunti separatamente ed incubati per 1 ora a 37°C. Un campione è stato utilizzato come controllo e non sono stati aggiunti agenti protettivi (controllo).

Tutti i campioni sono stati sottoposti alla seguente reazione:

- Sono stati aggiunti 50 µl di NaNO₂ 60 mM (C.F) + 400 µl di PBS;
- Il mix è stato lasciato a 0°C (ghiaccio) per 5';
- Sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS;
- E' stato misurato il volume;
- I campioni sono stati lisati con triton X100 (2%) in ugual volume per 2h a 4°C;
- Sono stati aggiunti trenta volumi di PBS;

Infine è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro. L'assorbimento (abs) specifico della metaemoglobina (MetHb) è letto a 590 nm e a 635 nm;

L'abs della MetHb (C_M) è stato calcolato secondo la formula:

$$C_M = (E_x - 0,04 E) / 1,07 E$$

Dove :

E_x = Abs a 635 nm; E = Abs a 590 nm

C_M = indicatore della permeabilità anionica delle membrane eritrocitarie (15).

2.7 Preparazione dei globuli rossi

1. Partendo da un volume di sangue di 0,25 ml si è stata effettuata una centrifugazione a 1100g per 5 minuti al fine di separare il plasma dai globuli rossi;
2. Il sovrinatante è stato eliminato e si è proseguito effettuando tre lavaggi dei globuli rossi con PBS come al punto 1.

2.8 Saggio di Emolisi

La valutazione del grado di emolisi delle membrane eritrocitarie è stata effettuata misurando la fragilità delle membrane indotto dall'agente radicalico AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride].

Protocollo sperimentale:

- Gli eritrociti sono stati ottenuti come al § 2.7;
- Il pellet ottenuto dalle precedenti centrifugazioni è stato risospeso fino a volume finale di 500 µl con PBS;
- Il 5% della sospensione eritrocitaria risospesi in 20 volumi di PBS è stata sottoposta a reazione di emolisi in presenza di polifenoli e vino rosso alle stesse concentrazioni utilizzate ai nel § 2.3;
- Tutti i campioni sono stati incubati a 37°C per 4 ore e monitorati spettrofotometricamente a 541 nm.

Il procedimento utilizzato ci ha consentito di valutare l'emolisi in condizioni isotoniche. Allo scopo di valutare anche l'emolisi in condizioni ipotoniche è stato utilizzato lo stesso procedimento mediante diluizione con 20 volumi di acqua distillata. La percentuale di emolisi è stata calcolata mediante il rapporto tra il valore di assorbanza ottenuto dall'emolisi in condizioni isotoniche ed in quelle ipotoniche (196):

$$\frac{\text{Abs dell'emolisi in condizioni isotoniche}}{\text{Abs dell'emolisi in condizioni ipotoniche}} \times 100$$

2.9 Dosaggio della Metaemoglobina

La metaemoglobina (Fig. 2.6) è il derivato dell'emoglobina in cui il ferro ferroso si è ossidato, passando dallo stato bivalente a quello trivalente, rendendo la molecola incapace di veicolare l'ossigeno. L'accumulo di metaemoglobina negli eritrociti può avvenire per cause acquisite o ereditarie. Frequenti sono i casi di metaemoglobinemia acquisita, conseguenti ad intossicazioni con sostanze che esercitano un'azione ossidante diretta, come nitriti e nitrati, o in seguito a trasformazioni metaboliche nell'organismo, come alcuni farmaci o derivati impiegati nell'industria. Il metodo di determinazione si basa sulla lettura dell'assorbanza a 630 nm. L'aggiunta di azide determina la sua scomparsa trasformandola quasi completamente in azide-metaemoglobina. La diminuzione di assorbanza a 630nm dopo aggiunta di azide è perciò proporzionale alla concentrazione della metaemoglobina. Per il dosaggio della Metaemoglobina è stato eseguito il protocollo sperimentale secondo il Kit della PKL[®] (Pokler Italia S.r.l). Il calcolo della % Metaemoglobina segue la formula :

$$[(D1-D2)/ (D3-D4)] \times 100 \text{ (197).}$$

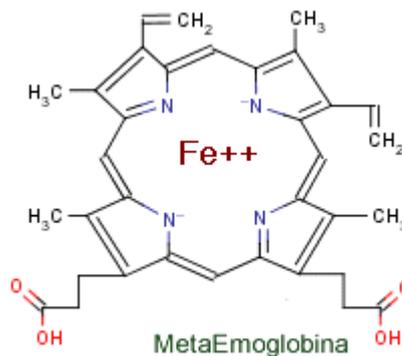
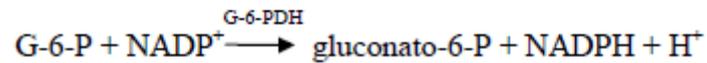


Fig.2.6 Metaemoglobina

2.10 Dosaggio della glucosio -6- P- deidrogenasi

La Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH) (Fig. 2.7) è un enzima prodotto principalmente degli eritrociti, dal tessuto adiposo dalla ghiandola mammaria e dal fegato. Utile nello screening dei deficit della GPDH. L'attività dell'enzima viene determinata con la misura della variazione di assorbanza a 340 nm, dovuta alla riduzione del NADP⁺



L'attività G-6-PDH è espressa come mU/10⁹ eritrociti o come mU/emoglobina. Per il calcolo dell'attività della G-6-PDH come mU/10⁹ eritrociti per la comparazione con i valori normali, si divide l'attività calcolato (mU/ eritrociti per ml di sangue) per la conta dei RBC per ml . Per il dosaggio della G-6-PDH è stato eseguito il protocollo sperimentale secondo il Kit della PKL[®] (Pokler Italia S.r.l) (198) .

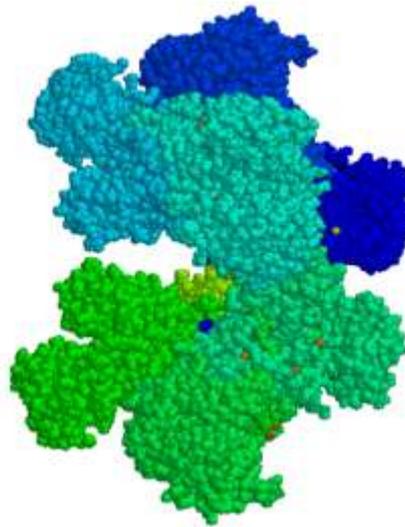


Fig. 2. 7 Glucosio 6 fosfato deidrogenasi

2.11 Determinazione del Glutathione

Il glutathione (GSH) (Fig. 2.8) non è direttamente misurabile ma è stato assimilato ai gruppi tiolici non-proteici dei quali rappresenta oltre il 90%. I gruppi tiolici non-proteici sono stati misurati in 200 μ l di plasma e sangue usando un'analisi spettrofotometrica a $\lambda=412$ nm basata sulla reazione dei gruppi tiolici con l'acido 2,2'-ditio-bisdinitrobenzoico (DTNB)(199). I risultati sono stati espressi in μ M di gruppi tiolici/ml di plasma e/o RBC, a tale scopo è stata eseguita una retta di taratura con concentrazioni diverse di GSH. La retta di taratura del GSH è stata eseguita utilizzando il GSH a 10 μ M (soluzione stock) in buffer borato a 0.05 M . Ai campioni contenenti GSH a diverse concentrazioni è stato aggiunto DTNB a 0.2 mM a pH 9 al fine di valutare la presenza di gruppi tiolici; dopo 3 minuti di incubazione a 37° C è stata effettuata la lettura a 412 nm .

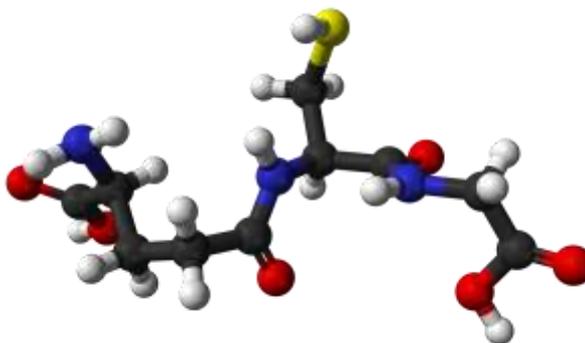


Fig.2.8 GSH

2.12 Stress ossidativo ed anomalie morfologiche degli eritrociti.

Al fine di evidenziare le eventuali alterazioni morfologiche a carico degli RBC in seguito all'esposizione di quest'ultimi all'agente radicalico AAPH, sono state impiegate tecniche di microscopia ottica in campo chiaro e di microscopia elettronica a scansione (SEM).

2.12.1 Preparazione del sangue per lo striscio

Prima di realizzare lo striscio, il sangue è stato opportunamente trattato; in particolare:

- 1) Sono stati allestiti campioni di sangue (50 μ l) in presenza e in assenza dello stressante AAPH e dei polifenoli.
- 2) I campioni sono stati incubati per 1h a 37°C.
- 3) Dopo l' incubazione il sangue è stato strisciato su un vetrino.

2.12.2 Protocollo sperimentale per la realizzazione dello striscio

Per realizzare lo striscio di sangue si procede come segue (Fig.2.9):

è stata posta una goccia di sangue ($\sim 5\mu$ l) a circa 1 cm di distanza da uno dei bordi più stretti di un portaoggetti ben pulito e sgrassato con alcol (fig. A). Rapidamente è stata posta davanti a questa goccia, un secondo vetrino, in posizione inclinata di $\sim 30^\circ$ rispetto al portaoggetti di supporto. Il vetrino inclinato è stato fatto scivolare delicatamente all'indietro fino a raggiungere la goccia, a questo punto il sangue si distende per tutta la lunghezza del lato corto del vetrino (fig. B); il vetrino inclinato è stato mosso in avanti ("si striscia"), uniformemente e rapidamente, per tutta la lunghezza del vetrino (Fig.C). Lo striscio ottenuto è stato fatto essiccare all'aria (Fig. D)

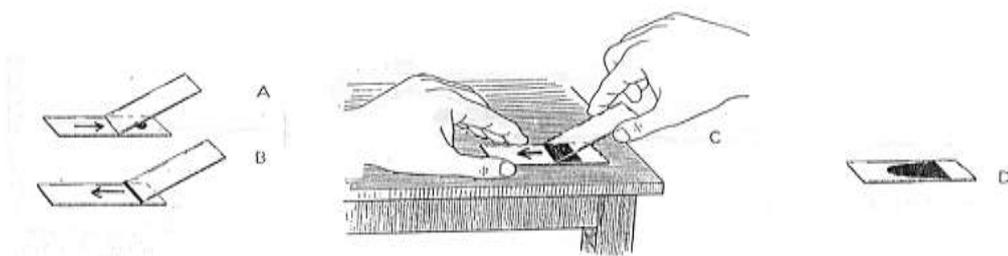


Fig.2.9 Striscio di sangue

Una volta eseguito lo striscio è stata effettuata la colorazione del vetrino
Eseguito lo striscio si prosegue con la colorazione del vetrino (200).

2.12.3 Protocollo sperimentale per la colorazione del vetrino

La metodica di colorazione utilizzata è nota come May Grünwald –Giemsa per i coloranti usati. E' un metodo che si basa sull'uso di due soluzioni coloranti neutre, che prendono il nome degli scienziati che ne hanno elaborato la composizione: una è la May-Grünwald (eosinato di blu di metilene), e l'altra la Giemsa. Entrambe le soluzioni si trovano già pronte in commercio.

Procedimento:

- il vetrino è stato immerso nel colorante May Grünwald per 3' poi sono stati effettuati dei lavaggi per rimuovere l'eccesso di colorante ed è stato immerso nel colorante, il tutto è stato eseguito per 3 volte.
- Alla fine del terzo lavaggio, i vetrini sono stati immersi per l'ultima volta nel Giemsa (per 15') al termine del quale è stata effettuato un ultimo abbondante lavaggio con acqua distillata al fine di rimuovere eventuali residui salini .
- Infine i vetrini sono stati lasciati asciugare sotto cappa.

Realizzata la colorazione si può procedere con l'osservazione del vetrino al microscopio (200).

2.12.4 Tecniche di microscopia in campo chiaro

Il microscopio ottico è uno strumento che permette di ottenere ingrandimenti fino a 1500x senza immersione e fino a 2500x con immersione. Nella microscopia ottica si utilizza la luce visibile o in alcuni casi la luce ultravioletta: nel primo caso il risultato dell'osservazione appare in un oculare o in uno schermo televisivo, nel secondo caso è necessario utilizzare una pellicola sensibile di ultravioletti.

L' esame al microscopio di certi materiali può essere compiuto utilizzando luce riflessa piuttosto che trasmessa, in quanto la luce riflessa offre l'unica possibilità di conoscere la struttura e la morfologia con un'accurata indagine superficiale. La luce viene riflessa all'interno del sistema di lenti del microscopio permettendo di osservare i vari componenti della superficie del campione in modo diverso e caratteristico del componente stesso. Il fascio di luce emesso da un filamento di tungsteno viene riflesso da uno specchio, da un prisma oppure da un cristallo polarizzante posizionato in modo da riflettere la luce verso il campione posto in

basso. L'illuminazione può essere in campo chiaro o in campo scuro. Nella microscopia in campo chiaro a luce riflessa, la luce colpisce i particolari piatti nel campione (perpendicolari all'asse ottico) e viene riflessa nell'obbiettivo dove appare chiara nell'immagine. Il contrasto è ottenuto in presenza di variazioni significative di assorbimento e riflessione della superficie piatta. La luce che colpisce zone non piatte della superficie viene deviata e appare scura nell'immagine (201).

2.12.5 Elaborazione delle immagini

Le immagini dopo essere state fotografate vengono elaborate digitalmente con ImageJ. ImageJ è un programma informatico, rilasciato nel pubblico dominio, che è basato su Sun-Java. Sviluppato dal National Institutes of Health degli Stati Uniti (202), ImageJ è stato progettato con un'architettura che prevede la possibilità di avere estensioni tramite piccoli sottoprogrammi "plugin Java" e molte macro registrabili. Sono disponibili dei plugin "ad hoc" per l'acquisizione, l'analisi ed il processamento delle immagini. ImageJ possiede un editor di plugin incorporato ed un compilatore Java. Molti plugin scritti dagli utenti conferiscono la possibilità di risolvere molti problemi di processamento delle immagini e di analisi, dalla visualizzazione di cellule viventi tridimensionali (203) all' image processing in radiologia (202), il confronto tra i dati di molteplici sistemi di imaging (203) fino a sistemi automatizzati per l'ematologia. L'architettura a plugin di imageJ e l'ambiente di sviluppo in esso incorporato lo hanno reso una piattaforma molto popolare per l'insegnamento del processamento delle immagini. ImageJ può essere fatto girare come un applet online, come un'applicazione scaricabile dalla rete, oppure su qualsiasi computer (Mac, Linux, Windows) che abbia installato la macchina virtuale Java 1.4 o versioni posteriori. Le versioni scaricabili dalla rete sono disponibili per Microsoft Windows, Mac OS, Mac OS X, Linux, e per il computer palmare Sharp Zaurus. Il codice sorgente per ImageJ si trova nella pagina-web che è liberamente scaricabile. ImageJ può visualizzare, editare, analizzare (con analyze), processare, salvare e stampare immagini a 8 bit, a 16 bit e anche a 32-bit. Può leggere molti formati di immagine inclusi TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, così come anche i formati "raw". ImageJ supporta le

immagini stacks, una serie di immagini sovrapposte (sia spazialmente come "fette" di un corpo tridimensionale, sia temporalmente come una sequenza di immagini bi o tri-dimensionali). ImageJ può calcolare l'area e le statistiche del valore del pixel di selezioni definite dall'utente e di oggetti in base a soglie di intensità. Può anche misurare distanze e angoli. Può creare istogrammi di densità e tracciare delle linee profilo (tra punti definiti). Supporta le funzioni di elaborazione standard delle immagini come operazioni di tipo logico e aritmetico tra immagini (per confrontarle), regolazione del contrasto, convoluzione, analisi di Fourier, incremento della nitidezza, lo smoothing (smerigliatura informatica), rilevamento dei bordi e filtraggio della mediana. Esegue anche trasformazioni geometriche come lo scaling, la rotazione ed i flips. Il programma può aprire qualsiasi numero di immagini simultaneamente, limitato soltanto dai chip di memoria RAM disponibili nel computer (203).

Le analisi che sono state applicate ai nostri eritrociti riguardano perimetro, area, circolarità e rotondità; la circolarità è calcolata con $4\pi \cdot \text{area} / \text{perimetro}^2$, se il valore è circa 1 indica una forma sferica perfetta, se si allontana da 1 la circolarità diminuisce e ciò si traduce in una forma più allungata o appiattita o deformata, nel nostro caso dell'eritrocita sotto esame. Anche la rotondità è indice dell'andamento circolare dell'oggetto in esame; essa si calcola $4 \cdot \text{area} / (\pi \cdot \text{major_axis}^2)$.

2.12.6 Microscopia a scansione

Il **microscopio elettronico a scansione** (fig. 2.10 **SEM**) è uno strumento elettro-ottico che permette, in seguito all'emissione di un fascio di elettroni, di analizzare i vari segnali prodotti dall'interazione degli elettroni del fascio con il campione in esame. L'elaborazione di questi segnali consente di ottenere un'ampia gamma di informazioni non solo morfologiche, ma anche compositive e strutturali relative alle varie parti di cui è costituito il campione. Il SEM, infatti, pur essendo nato con una vocazione di microscopio ad elevata risoluzione e tridimensionalità, negli ultimi anni si è rivelato assai efficace anche nell'analisi della composizione chimica e dell'orientazione cristallografica di un campione, permettendo analisi puntuali e areali, sia qualitative che quantitative. L'estrema versatilità di questo

strumento è inoltre garantita dalla varietà tipologica dei campioni che possono essere analizzati, sia per quanto riguarda la loro natura (solo materiali contenenti fluidi non sono analizzabili) che la loro forma e dimensioni (di qualunque forma, fino a circa un decimetro cubo), nonché per la facile preparazione dei campioni stessi, che, qualora non siano naturalmente conduttivi (metalli), devono solo essere ricoperti da un sottilissimo strato di un elemento conduttore (grafite o oro).

Il SEM è schematicamente costituito dai seguenti elementi :

- 1) una **colonna elettronica**, dove viene creato il fascio di elettroni;
- 2) una **camera da vuoto**, ove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- 3) vari **tipi di rivelatori**, che acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- 4) **uno schermo**, in cui si ricostruisce l'immagine del segnale.

La sorgente elettronica in cima alla colonna genera il fascio elettronico, mediante un filamento (comunemente di tungsteno) che, portato ad elevata temperatura, produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni vengono quindi fatti accelerare ad energia variabile tra alcune centinaia ed alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV) grazie ad un **anodo** posto sotto il filamento.

Il fascio che emerge dalla sorgente è divergente, ma viene fatto riconvergere ed è focalizzato da una serie di **lenti elettromagnetiche** e di **fenditure** all'interno della colonna. All'estremità inferiore della colonna, una **serie di bobine di scansione** deflette il fascio fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, in modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a ricoprirne un'area predefinita. Il fascio, infine, focalizzato dalla **lente finale**, esce dalla colonna e va a colpire il campione all'interno della camera da vuoto. Come gli elettroni del fascio penetrano all'interno del campione, essi perdono energia, che viene riemessa dal campione sotto varie forme (204).



Fig. 2.10 Microscopio elettronico a scansione.

2.13 Analisi statistica

Per la determinazione dei prodotti di perossidazione lipidica, di emolisi e di permeabilità anionica degli eritrociti è stato applicato il test *ANOVA*, che prende in considerazione le differenze delle medie di più di due gruppi a confronto. E' una tecnica statistica nata nell'ambito della ricerca sperimentale per valutare l'effetto di determinati fattori, variabili indipendenti di tipo continuo o categoriale, sulla variabile dipendente di tipo continuo. L'analisi della varianza assume nomi diversi a seconda di quante sono le variabili dipendenti e indipendenti.

- Anova ad una via (*ONE -WAY*) quando si ha una sola variabile dipendente e una sola variabile indipendente.
- Anova fattoriale quando si ha una sola variabile dipendente, ma più variabili indipendenti
- Manova (*MULTIVARIATE ANALYSIS OF VARIANCE*) quando c'è più di una variabile dipendente e più di una variabile indipendente.

Tutti i valori sperimentali sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0.05$
($n = 20$)

Il rapporto tra varianza between e varianza within è il test F di Fisher.

$$F = \text{VAR}_B / \text{VAR}_W$$

Questo test ha una distribuzione campionaria F di Snedecor, per un valore P prefissato, solitamente $P=0.05$, questo test ci dice quando l'ipotesi nulla è accettata ($P < 0.05$) e quando viene rifiutata ($P > 0.05$). Il test F è la principale diagnostica dell'ANOVA, ci dice se almeno due medie sono statisticamente diverse.

Se si vuole sapere quali delle medie sono diverse usiamo delle correzioni per i confronti multipli, ovvero facciamo dei test t tra le coppie delle medie. Vengono applicate delle correzioni sul livello di significatività per il fatto che sono fatti + confronti sugli stessi dati.

Confronti multipli di Bonferroni $\alpha^* = \alpha/p$

CAPITOLO III

RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 Metodo colorimetrico Folin-Ciocalteus per la determinazione dei polifenoli totali nell' estratto di vino

La metodica da noi utilizzata è quella più comune e storicamente importante, proposta da Folin e Denis (1912) e successivamente modificato da Folin e Ciocalteu (1927); esso si basa sull'aggiunta di un reattivo in grado di assumere una colorazione blu di intensità proporzionale al numero di residui fenolici.

Sono state preparate soluzioni di acido gallico a concentrazioni diverse (μM) in una miscela al 50% di dimetilsolfossido (DMSO) e acqua. Applicando la metodica descritta di Folin-Ciocalteu sono state rivelate spettrofotometricamente le quantità di fenoli totali. Correlando le assorbanze ottenute con le concentrazioni di acido gallico si è elaborata una regressione lineare che rappresenta la retta di taratura utilizzata

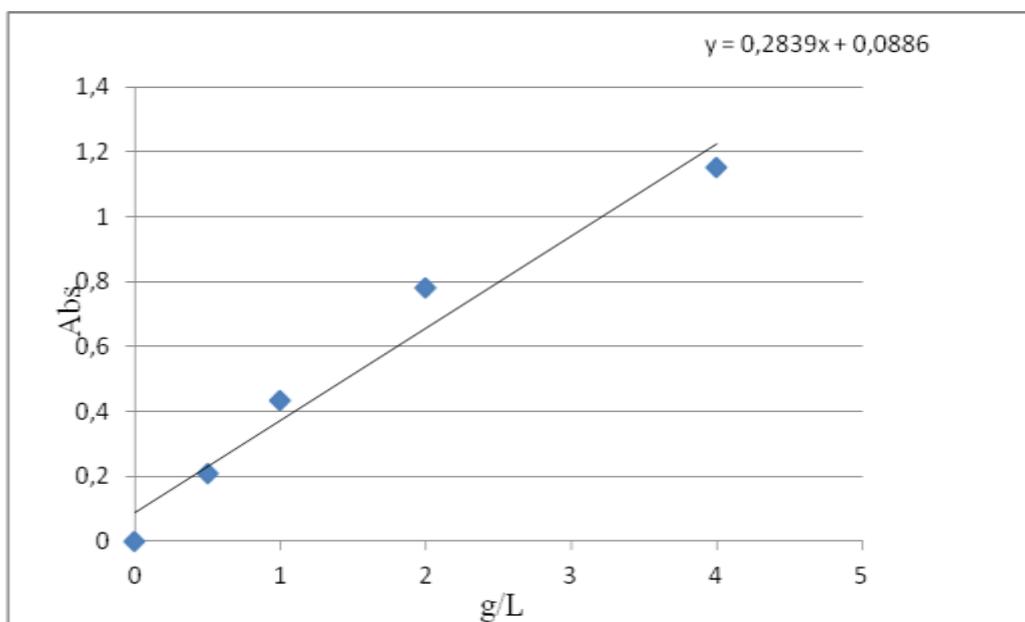


Fig 3.1 Retta di taratura ottenute con diverse concentrazioni di acido gallico

Gli estratti in esame sono stati analizzati attraverso la stessa procedura di Folin-Ciocalteu. Si sono ricavati dei nuovi valori di assorbanza che sono stati interpolati nella retta di taratura. Abbiamo così ricavato quale concentrazione dovrebbe avere una soluzione di ac. gallico per dare la stessa assorbanza. Confrontando questo

dato con la concentrazione iniziale di estratto utilizzata nel test abbiamo ricavato i g equivalenti di acido gallico presenti in un grammo di estratto, riportati in Tabella 3.1.

Polifenolo	equivalenti di acido gallico per g/ L
Magliocco	1.63
Nero D'Avola	3.87
Estratti di Mirtillo	2.5

Tabella 3.1. equivalenti di acido gallico per g/L

3.2 Reazione Perossidazione Lipidica

Il processo di perossidazione diminuisce la fluidità di membrana e compromette una delle più importanti funzioni delle membrane cellulari: la capacità di agire come barriera (205; 206). Il metodo utilizzato prevede la reazione dei lipidi perossidati con il TBA, formando un pigmento di colore rosa che si rileva spettrofotometricamente a 532 nm. La tecnica della misura dei prodotti di perossidazione lipidica è presa in esame per monitorare il decremento degli stessi in seguito all'esposizione del nostro modello di studio ai polifenoli catechina quercetina e resveratrolo e vino rosso del vitigno "magliocco" e "nero d'avola" e estratti di mirtillo (196).

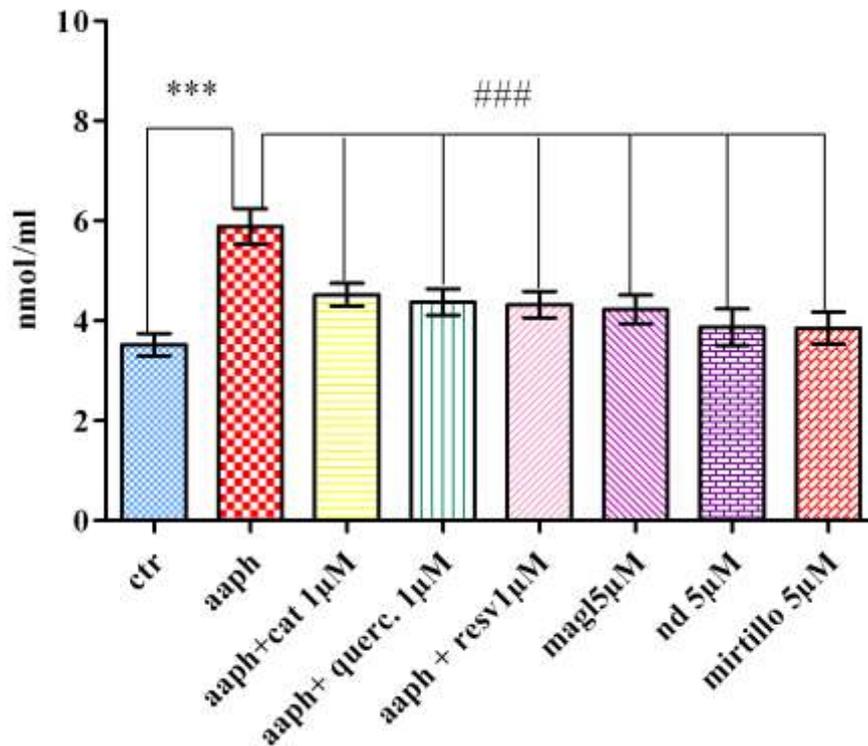


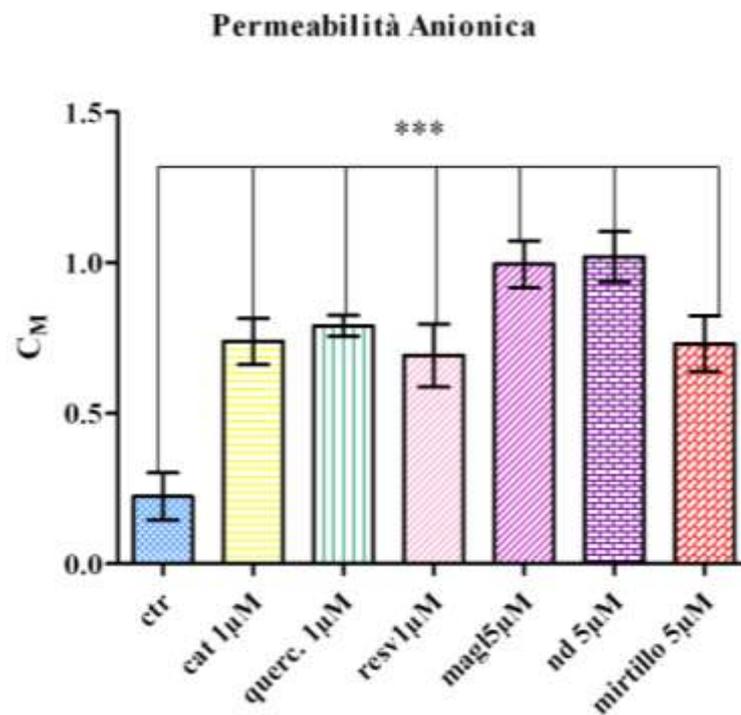
Fig. 3. 2 Prodotti di MDA negli RBC trattati con AAPH. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm SEM * $p < 0.05$ ($n=20$). Polifenoli (catechina e resveratrolo e quercetina $1\mu\text{M}$), vino rosso (magliocco e nero d'avola $5\mu\text{M}$) e mirtillo ($5\mu\text{M}$). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni

Dal grafico sopra riportato si evince come nei campioni eritrocitari trattati con l'agente radicalico AAPH vi sia una degradazione del profilo lipidico delle membrane. In presenza dei polifenoli, si evidenzia l'effetto protettivo conferito

dalla frazione fenolica, evidenziabile dalla minore degradazione del profilo lipidico di membrana.

3.3 Determinazione della permeabilità anionica degli eritrociti.

La determinazione della permeabilità anionica si basa sullo studio delle caratteristiche della membrana e della sua fluidità. L'architettura della membrana eritrocitaria e la sua permeabilità dipendono da una proteina caratteristica, la banda 3, che regola il trasporto dell'anione Cl^- attraverso la membrana. La regolare funzione della banda 3 è legata alla struttura della membrana eritrocitaria, tanto che la mancanza di un'adeguata organizzazione lipidica può significativamente influenzare la permeabilità allo ione (207).



*Fig. 3.3 Rappresentazione grafica dei valori di permeabilità anionica in eritrociti umani. I valori rappresentati si riferiscono a campioni provenienti da eritrociti umani in situazioni di controllo, con l'aggiunta di vino rosso 5µM, catechina, resveratrolo quercetina 1µM e estratti di mirtillo. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0.05$ ($n = 20$). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni*

La buona deformabilità degli eritrociti è una condizione favorevole per l'attraversamento del letto capillare. La deformabilità è influenzata dalle proprietà meccaniche della membrana, le quali sono determinate dalle proprietà e dalle

funzioni delle proteine di membrana (208; 209; 210 211). Tali parametri sono in relazione con la permeabilità della membrana eritrocitaria che dipende dalla proteina scambiatrice anioni—cloruro (banda 3). Dall'analisi della permeabilità anionica dei campioni eritrocitari è risultato come anche in tal caso il danno alla membrana è ridotto in presenza dei polifenoli. Infatti, mediante l'utilizzo degli agenti protettivi si ha un miglioramento della permeabilità della membrana eritrocitaria e quindi dell'attività della banda 3.

3.4 Saggio di Emolisi

Il saggio di emolisi è condotto come descritto nel capitolo II, § 2.8. Allo scopo di monitorare l'emolisi dopo l'aggiunta dell'agente radicalico AAPH, sono state effettuate misure spettrofotometriche da 400 a 700 nm al tempo 180'.

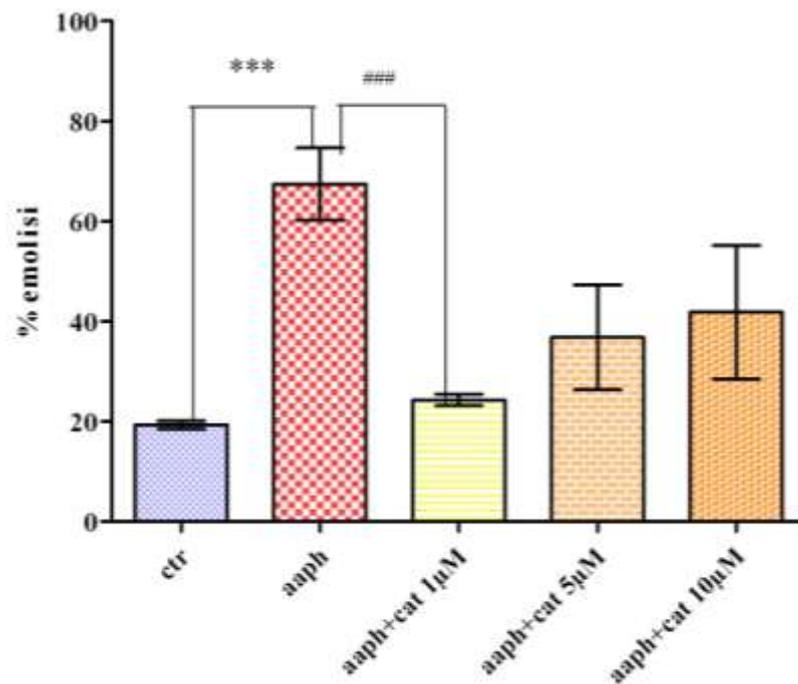


Fig.3.4 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di catechina a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Lo stress emolitico risulta maggiormente evidente in seguito all'aggiunta dell'agente radicalico AAPH. In seguito all'esposizione degli RBC con il polifenolo catechina a diverse concentrazioni, si osserva una migliore risposta di protezione allo stress emolitico che risulta più evidente con l'aggiunta della catechina a una concentrazione di 1 μ M.

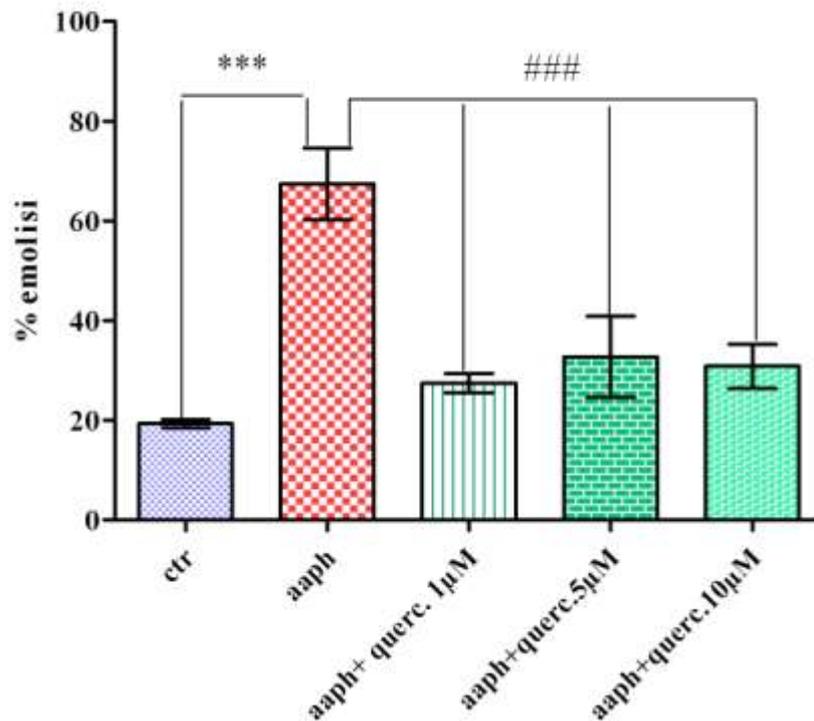


Fig. 3.5 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con AAPH (50 mM C.F.) in presenza di quercetina a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

La stessa serie di esperimenti sono stati condotti con il polifenolo quercetina. L'esposizione degli RBC al polifenolo quercetina a diverse concentrazioni, mostrato un'azione protettiva dal danno emolitico simile a tutte le concentrazioni con una maggiore significatività verso la quercetina 1 μ M.

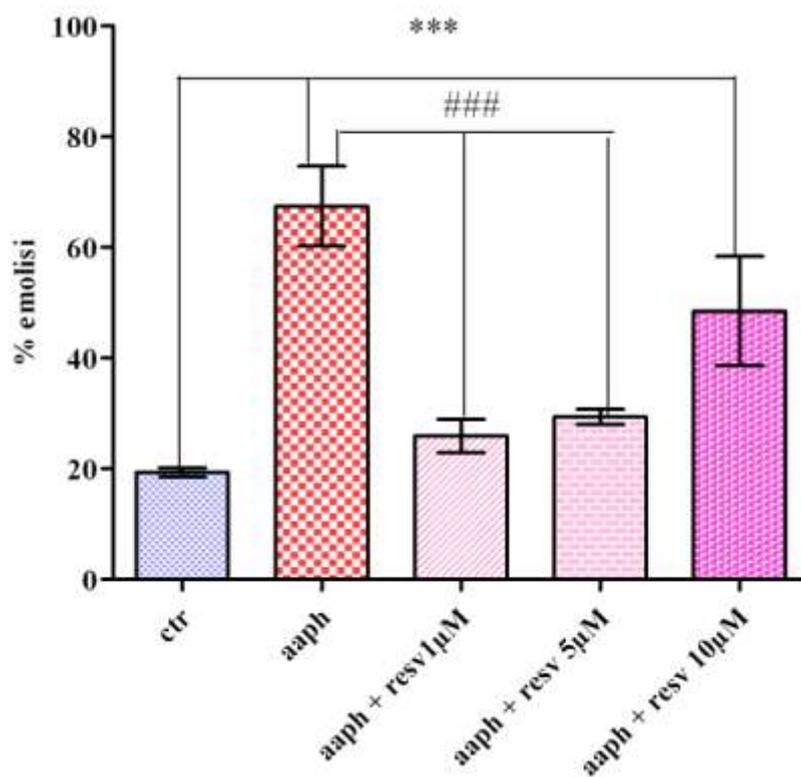


Fig.3.6 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di resveratrolo a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Gli RBC trattati con il polifenolo resveratrolo alle stesse concentrazioni degli altri (da 1- 10 μ M) ha rilevato una diminuzione dello stress ossidativo che risulta maggiore a concentrazioni più basse.

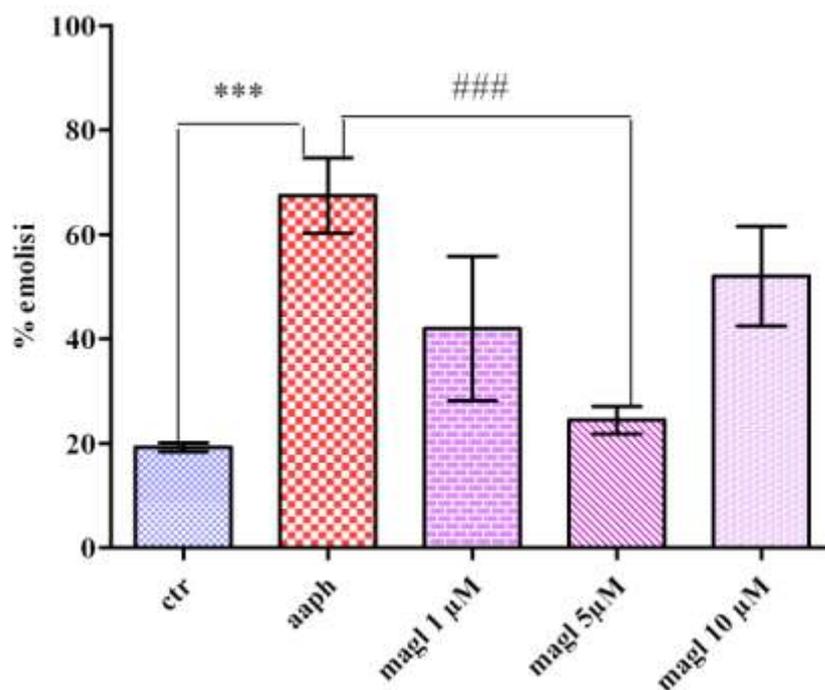


Fig.3.7 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di estratti naturali (magliocco) a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Con l'utilizzo degli estratti provenienti dal vitigno "Magliocco" è stato osservato, a differenza di quelli finora illustrati, una minore protezione dal danno emolitico utilizzando basse concentrazioni di estratti (C.F. 1µM), un miglioramento nel danno emolitico si ottiene soltanto con la C.F. 5µM in quanto riporta una percentuale di emolisi vicina ai valori di controllo.

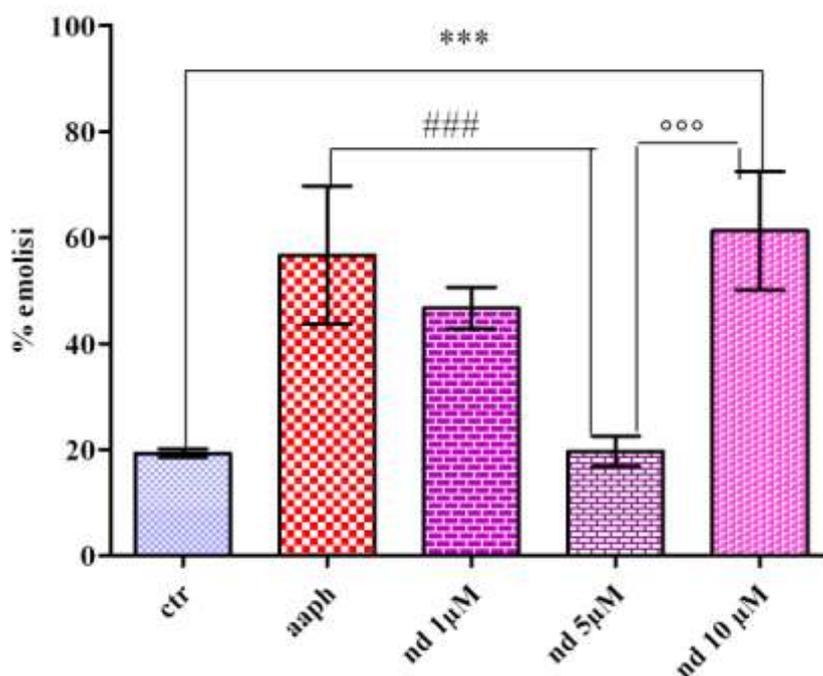


Fig.3.8 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di estratti naturali (nero d'avola) a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Simili effetti sono stati rilevati utilizzando gli estratti provenienti dal vitigno Nero d'Avola, anche qui l'azione di protezione dal danno emolitico è esercitata quando si espongono gli RBC alla concentrazione di estratti pari a C.F 5µM. Concentrazioni maggiori alla C.F 5µM risultano essere pro ossidanti.

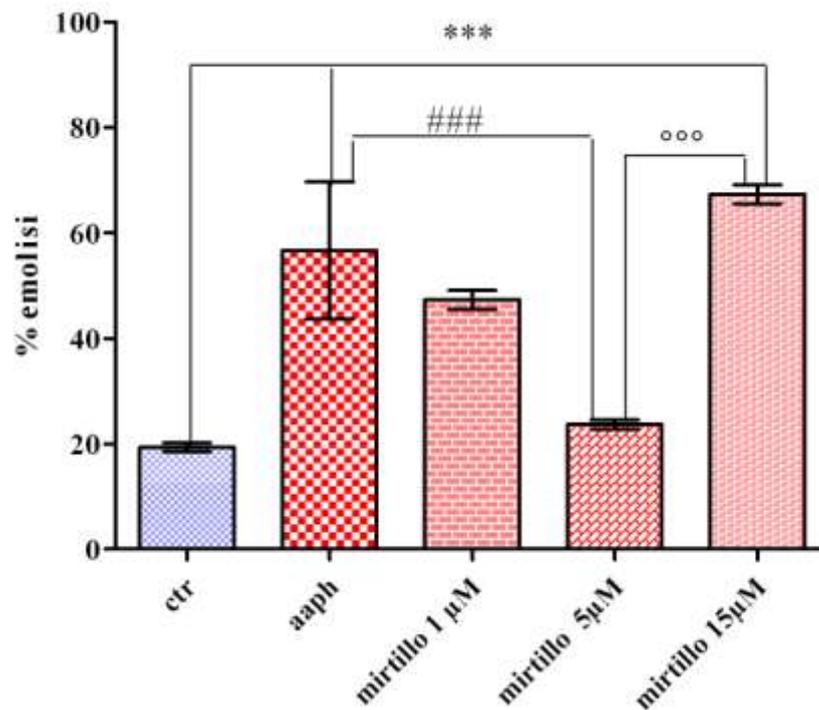


Fig.3.9 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di estratti naturali (mirtillo) a diverse concentrazioni. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

L'esposizione degli RBC agli estratti di "mirtillo" hanno mostrato una minore protezione dal danno emolitico quando vengono utilizzate basse concentrazioni (C.F 1 μ M). La concentrazioni più alta (15 μ M) presenta azione pro ossidante; soltanto la C.F 5 μ M ha riporta una percentuale di emolisi bassa e molto vicina ai valori di controllo.

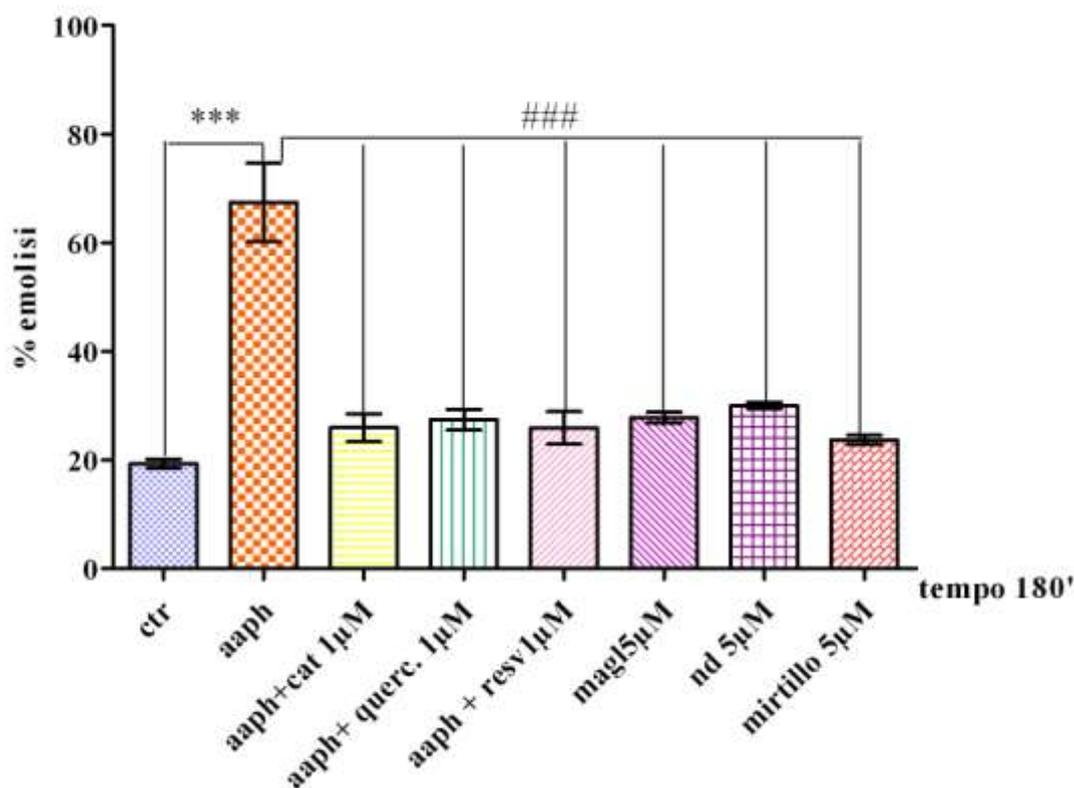


Fig.3.10 Valutazione del processo di emolisi su sospensioni eritrocitarie trattate con l'induttore radicalico idrosolubile AAPH (50 mM C.F.) in presenza di estratti naturali e polifenoli alle concentrazioni che si sono dimostrate essere le più efficaci nella protezione da danno emolitico. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (n=20 per gruppo). Ai dati è stata applicata analisi della varianza a una-via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

L'istogramma sopra riportato ha lo scopo di comparare l'azione protettiva dei vari polifenoli e gli estratti naturali alle concentrazioni che in precedenza si sono dimostrati più efficaci nel contrastare il danno emolitico. In seguito all'esposizione degli RBC ai polifenoli (catechina, resveratrolo e quercetina) si osserva una migliore risposta di protezione allo stress emolitico, paragonabile a quello raggiunto con l'esposizione degli stessi agli estratti naturali, provenienti dal vino rosso (vitigno "Magliocco" e "Nero D'Avola") e al mirtillo.

3.5 Dosaggio della Metaemoglobina

L'aumento dello stress ossidativo, può essere ricondotto a tre diversi fattori: un aumento della velocità con cui vengono prodotti metaboliti reattivi dell'ossigeno, un declino dei sistemi antiossidanti di difesa e una diminuita efficienza nel degradare e riparare molecole danneggiate. L'azione degli ossidanti sull'emoglobina si esplica a due livelli, sul ferro del gruppo eme, provocando la formazione di metaemoglobina, e sui gruppi -SH della globina che possono formare disolfuri misti con il glutatione libero citoplasmatico o ponti disolfuri altre molecole proteiche. Una causa degli aumentati livelli di Met-Hb, è dovuta alla disponibilità di ferro libero rilasciato dai cluster ferro-zolfo, in seguito al rilascio di cataboliti acidi, con abbassamento del pH.

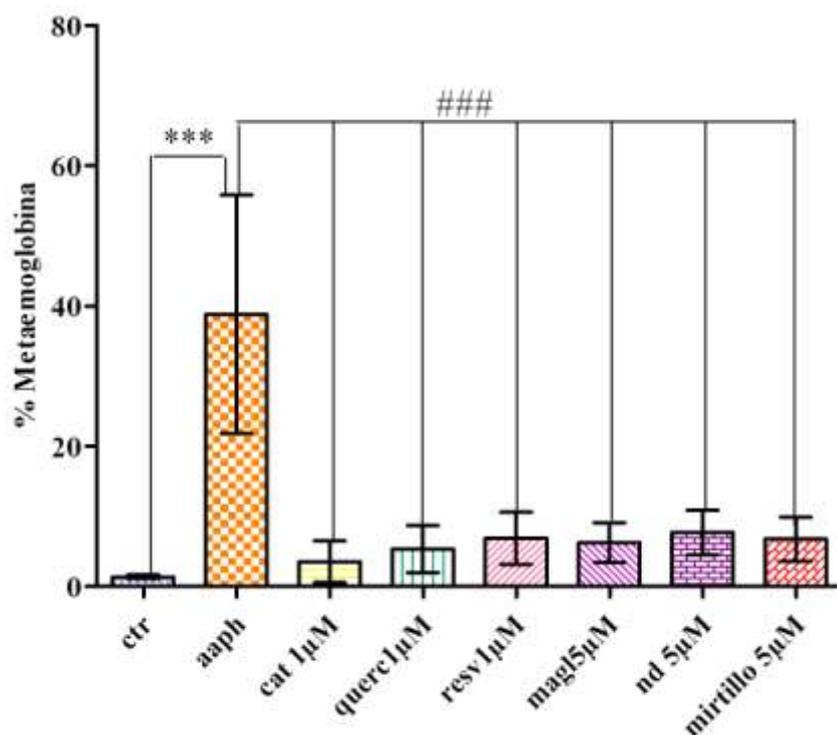
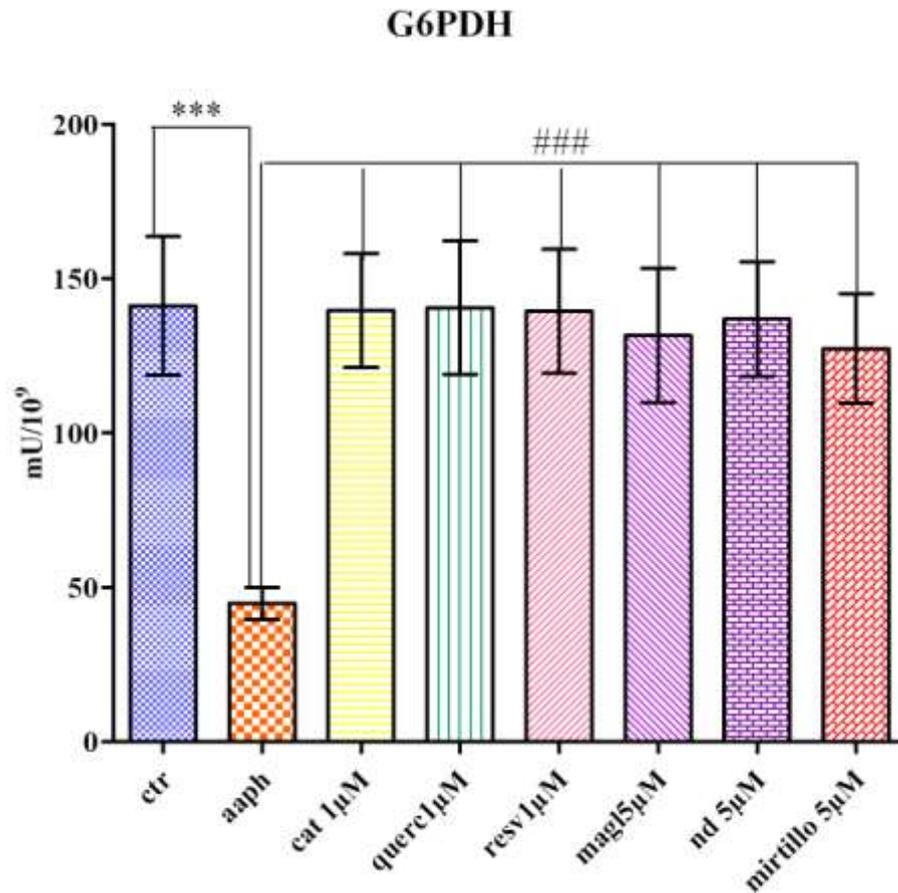


Fig. 3.11 Rappresentazione grafica dei valori di metaemoglobina provenienti da eritrociti umani in situazioni di controllo, con l'aggiunta di aaph, catechina 1µM, quercetina 1µM, resveratrolo 1µM, vino rosso e mirtillo 5µM. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0.05$ (n= 20). I valori seguono l'analisi della varianza a una via (ANOVA).

I dati sperimentali ottenuti, evidenziano una marcata produzione di metaemoglobina in seguito allo stress indotto dall'agente radicalico AAPH . Quando i campioni sono esposti agli agenti protettivi se ne osserva una riduzione rispetto a quella riscontrata nei campioni con la presenza del solo stressante. Tale riduzione è significativa per tutti i campioni, la percentuale più bassa di metaemoglobina si ottiene somministrando la catechina 1 μ M.

3.6 Dosaggio della glucosio -6- P- deidrogenasi

Il dosaggio della Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PD), nei campioni eritrocitari è stato effettuato mediante la metodica descritta nel capitolo II, § 2.10. L'attività enzimatica viene determinata misurando la variazione di assorbanza a 340 nm, dovuta alla riduzione del NADP⁺.



*Fig.3.12 Rappresentazione grafica dei valori della attività enzimatica della G6PD provenienti da eritrociti umani in situazioni di controllo, con l'aggiunta di aaph, catechina 1µM, quercetina 1µM, resesveratrolo 1µM, vino rosso e mirtillo 5 µM. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media ± S.D. * $p < 0.05$ (n= 20). I valori seguono l'analisi della varianza a due vie (ANOVA).*

I dati sperimentali ottenuti mostrano come nei campioni trattati con l'agente radicalico AAPH (C.F 50mM), i valori di assorbanza siano ridotti di circa il 70% rispetto a quelli di riferimento (controllo non stressato). Tale dato è in accordo con i livelli di attività enzimatica osservabili in situazioni paragonabili ad anemia emolitica da stress radicalico e alla degradazione delle proteine di membrana

eritrocitaria. In seguito all'esposizione degli eritrociti con gli agenti protettivi, si osserva un ripristino dell'attività enzimatica in tutti i campioni fino a raggiungere valori prossimi al controllo. L'aggiunta di Quercetina Resveratrolo Catechina alle C.F 1 μ M e di estratti naturali alle C.F 5 μ M sono in grado di assicurare una migliore risposta al danno ossidativo grazie all'aumento dell'attività enzimatica.

3.7 Determinazione del Glutatione

Il protocollo sperimentale per la determinazione del GSH e della retta di taratura è stato condotto come riportato nel cap. II § 2.11.

Il protocollo sperimentale è stato eseguito sia sul plasma sia su sangue intero.

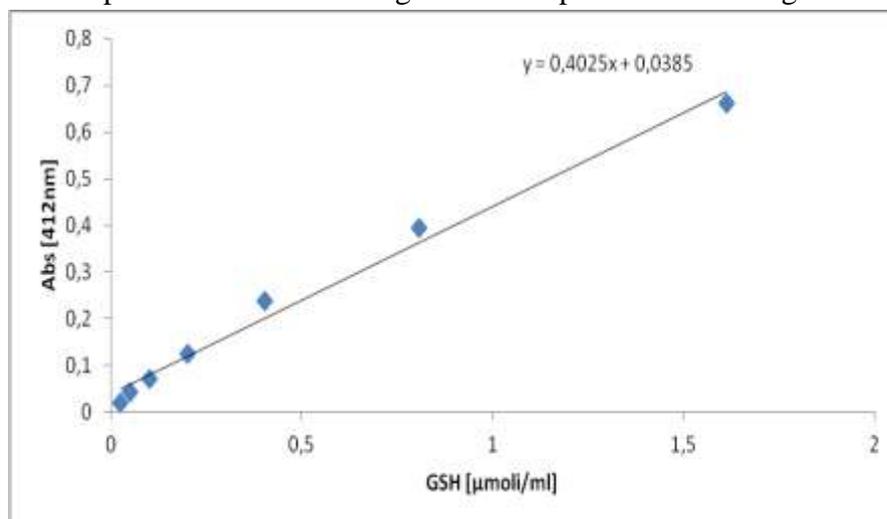
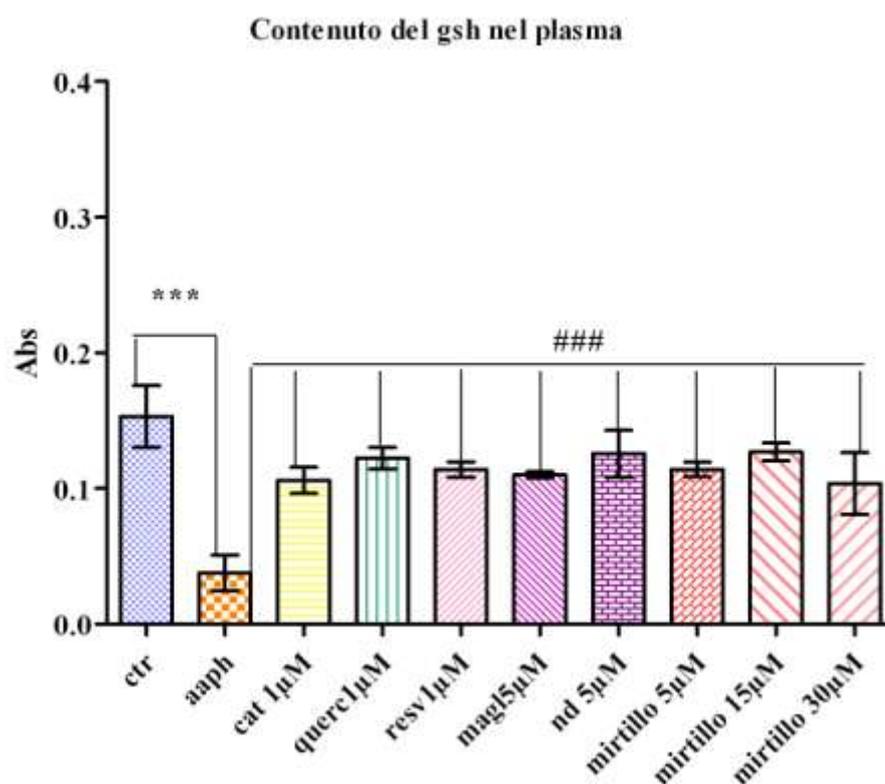


Fig.3.13 Retta di taratura

GSH [μmol/mL]	0,0252	0,0504	0,1008	0,2016	0,4032	0,8064	1,612
Abs	0,021	0,044	0,071	0,126	0,238	0,394	0,663

Tab. 3.2. Valori ottenuti dalla retta di taratura

Sono state preparate soluzioni di GSH a diverse concentrazioni. Applicando la metodica descritta è stato rivelato spettrofotometricamente la quantità di GSH. Correlando le assorbanze si è elaborata una regressione lineare che rappresenta la retta di taratura utilizzata



*Fig. 3.14 Rappresentazione grafica dei valori dell'attività enzimatica del GSH nel plasma in situazioni di controllo, con l'aggiunta di aaph, catechina 1µM, quercetina 1µM, resesveratrolo 1µM, vino rosso e mirtillo da 5 µM a 15µM. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media ± S.D. * $p < 0.05$ (n= 20). I valori seguono l'analisi della varianza a due vie (ANOVA).*

I valori di Abs ottenuti eseguendo il protocollo sperimentale sul plasma sono stati di circa 0.2; valori che rispondono alle condizioni fisiologiche e che rispecchiano i risultati ottenuti sulla retta di taratura. I polifenoli alle concentrazioni 1µM fanno registrare valori prossimi al controllo, quindi un numero maggiore di gruppi tiolici rispetto ai campioni contenenti il solo AAPH. Gli estratti di Magliocco e di Nero d'Avola portano a un aumento dei gruppi tiolici, risultati simili risultati sono stati ottenuti utilizzando gli estratti di Mirtillo fino a C.F 30µM.

Contenuto del gsh negli eritrociti

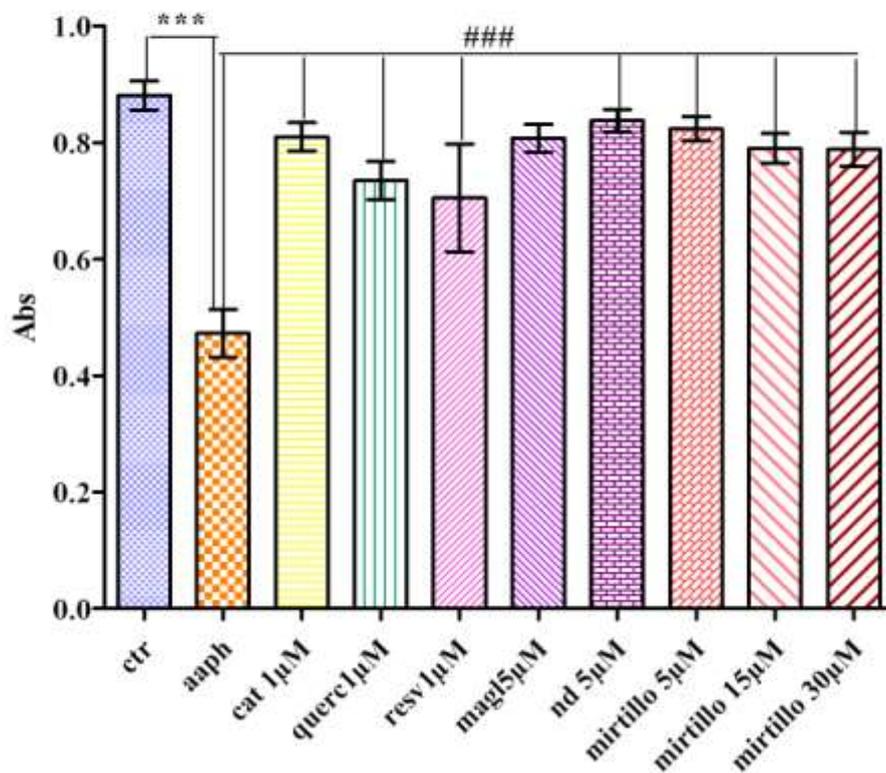


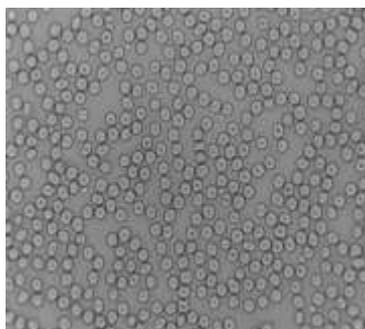
Fig. 3.15 Rappresentazione grafica dei valori dell'attività enzimatica del GSH negli eritrociti in situazioni di controllo, con l'aggiunta di aaph, catechina 1µM, quercetina 1µM, resveratrolo 1µM, vino rosso in concentrazioni di 5 µM e mirtillo da 5 µM a 15µM. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media ± S.D. * $p < 0.05$ (n= 20). I valori seguono l'analisi della varianza a due vie (ANOVA).

Il grafico sopra riportato mostra il contenuto del GSH negli eritrociti. Essendo il 90% dei gruppi tiolici contenuti negli RBC, i valori di Abs nei campioni di controllo sono stati di circa 0.9, in questo caso, rispettando sempre la retta di taratura le concentrazioni ottenute sono state di circa 2µM, concentrazioni variate di circa 0.1µM se all'AAPH vengono aggiunti i Polifenoli o gli estratti naturali.

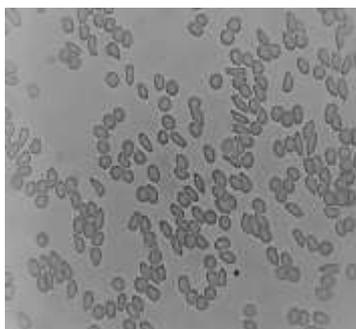
3.8 Stress ossidativo ed anomalie morfologiche degli eritrociti.

3.8.1 Tecniche di microscopia in campo chiaro e elaborazione d'immagine

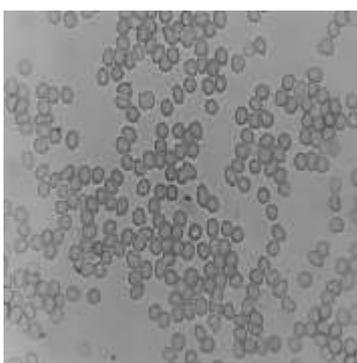
Le variazioni morfologiche osservabili negli eritrociti sono da attribuire all'agente radicalico AAPH, previsto dal nostro modello sperimentale.



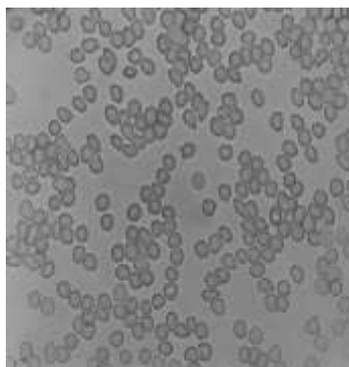
Ctr



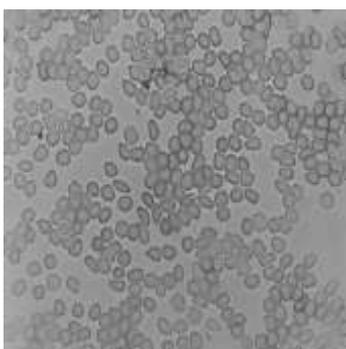
AAPH(50mM C.F)



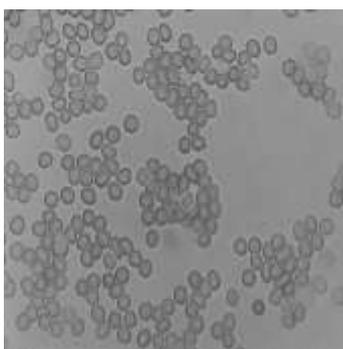
Catechina + AAPH(50mM C.F)



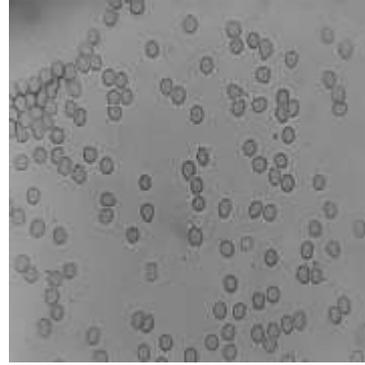
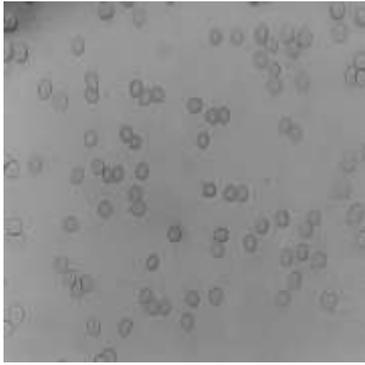
Resveratrolo+ AAPH(50mM C.F)



Quercetina +AAPH(50mM)C.F



Magliocco+AAPH(50mM)C.F



Nero D'Avola+AAPH(50mM)C.F

Mirtillo+AAPH(50mM)C.F

Fig. 3.16 Indagine microscopica in campo chiaro eseguita su strisci di sangue umano in presenza di AAPH e in presenza dei polifenoli e degli estratti di vino rosso e mirtillo. (Microscopia ottica 400x).

Dall'osservazione microscopica dei campioni è emerso come i campioni trattati con AAPH, presentano alterazioni morfologiche, in modo particolare sono rilevabili aumenti di volume, acantocitosi (presenza di spigolature) e leptocitosi (forma allungata). Tali alterazioni però si riducono se vengono aggiunti i polifenoli e gli estratti di vino rosso e mirtillo.

	<i>AREA (pixel)</i>	<i>PERIMETRO (pixel)</i>	<i>CIRCULARITY (pixel)</i>	<i>ROUNDNESS (pixel)</i>
<i>CTR</i>	<i>254</i>	<i>58,7</i>	<i>0,92</i>	<i>0,89</i>
<i>AAPH</i>	<i>365</i>	<i>86,4</i>	<i>0,65</i>	<i>0,56</i>
<i>AAPH CAT</i>	<i>226</i>	<i>58,6</i>	<i>0,74</i>	<i>0,76</i>
<i>AAPH RESV</i>	<i>245</i>	<i>61,1</i>	<i>0,82</i>	<i>0,79</i>
<i>AAPH QUE</i>	<i>273</i>	<i>61,6</i>	<i>0,78</i>	<i>0,80</i>
<i>AAPH Magliocco</i>	<i>248</i>	<i>8,6</i>	<i>0,86</i>	<i>0,83</i>
<i>AAPH Nero D'Avola</i>	<i>245</i>	<i>58,6</i>	<i>0,85</i>	<i>0,83</i>
<i>AAPH MIR</i>	<i>240</i>	<i>57</i>	<i>0,91</i>	<i>0,87</i>

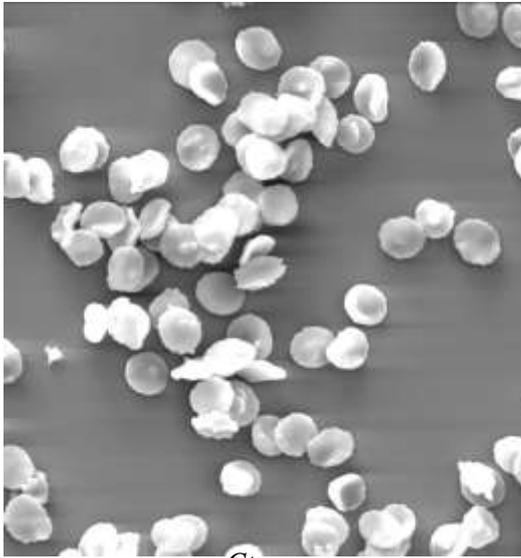
Tab .3.3 Misura dei valori di area, perimetro, circolarità e rotondità ottenuti con il programma Image J

L'analisi realizzata con il programma Image J conferma quanto è rilevabile da una semplice osservazione microscopica dei nostri campioni (Tab.3.3).

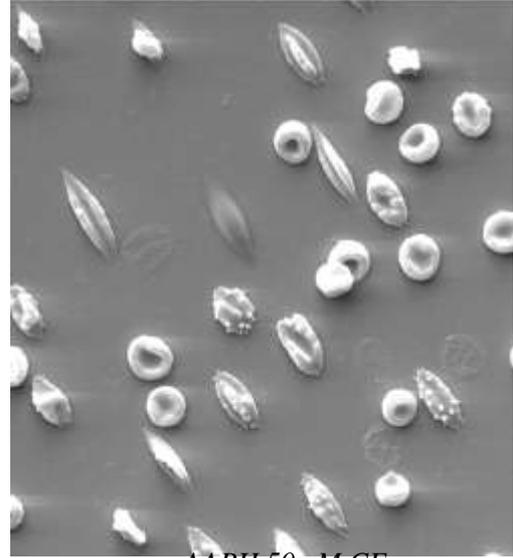
Infatti in presenza dell'AAPH c'è un aumento delle dimensioni dell'eritrocita ma anche la presenza di una forma meno sferica e poco circolare data da valori di roundness e circularity più bassi rispetto ai campioni protetti con i polifenoli estratti di vino rosso e mirtillo, dove la morfologia degli eritrociti viene preservata dal danno ossidativo. La formula utilizzata dal programma per calcolare la circolarità è $4\pi * \text{area} / \text{perimetro}^2$. Un valore che si avvicina a 1.0 indica un cerchio perfetto, mentre un valore che si avvicina a 0.0 indica un contorno irregolare. La formula per calcolare la rotondità è data, invece, dal rapporto tra asse minore/asse maggiore. Un valore che si avvicina a 1.0 indica una forma sferica perfetta, un valore che si avvicina a 0.0 indica una forma sempre più allungata.

3.8.2 Microscopia a scansione

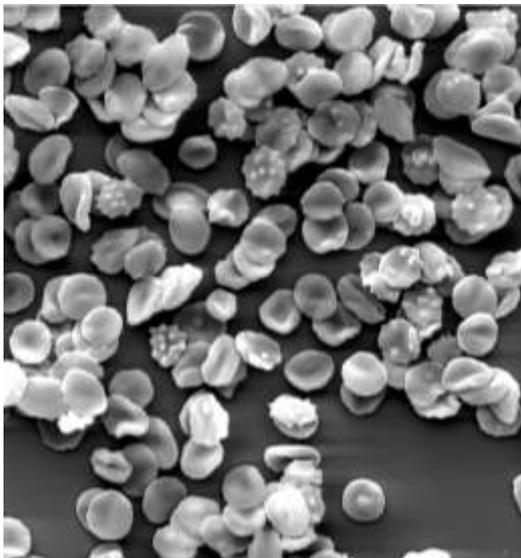
Le variazioni morfologiche degli eritrociti sono attribuibili all'agente radicalico AAPH.



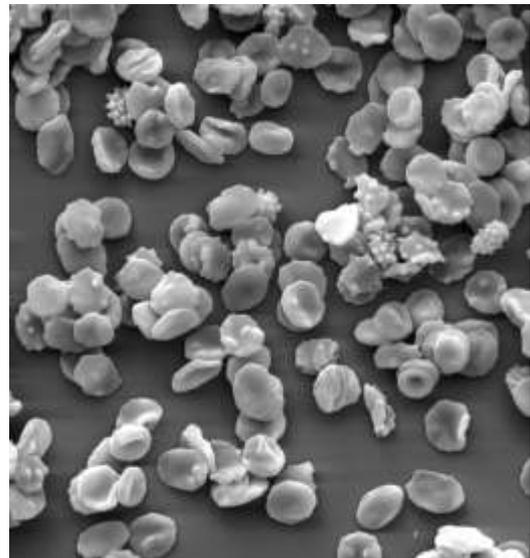
Ctr



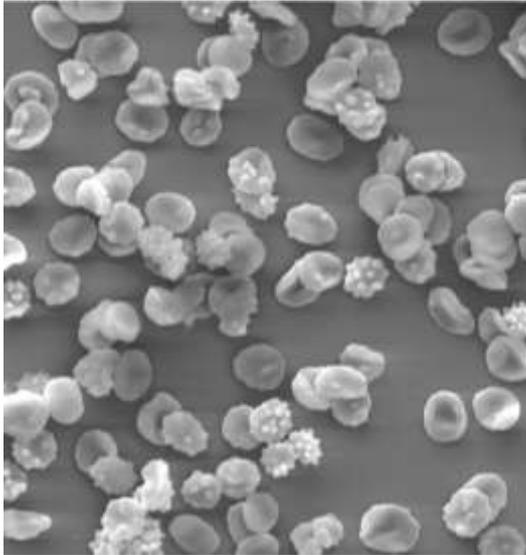
AAPH 50mM CF



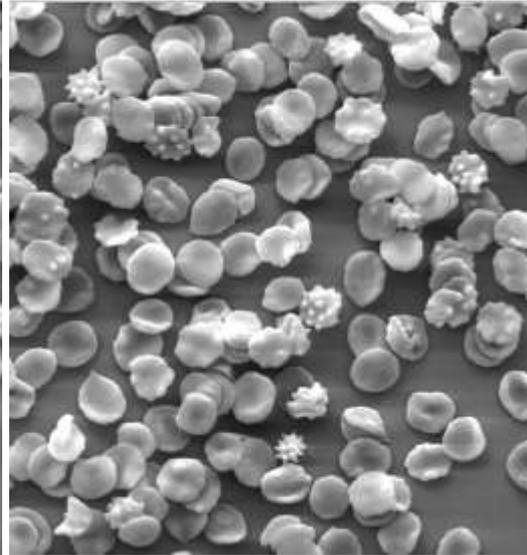
Catechina+ AAPH(50mM C.F)



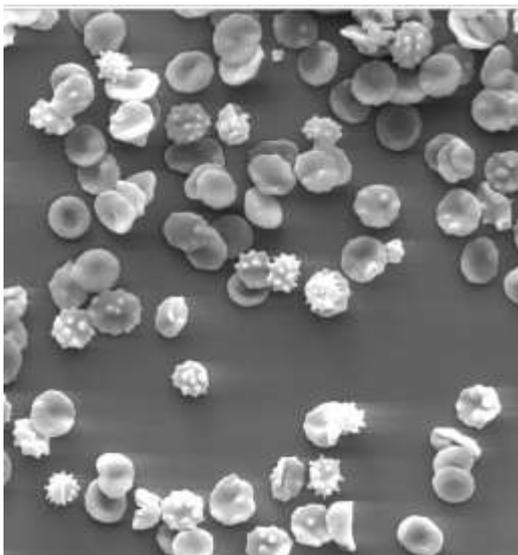
Resveratrolo+ AAPH(50mM C.F)



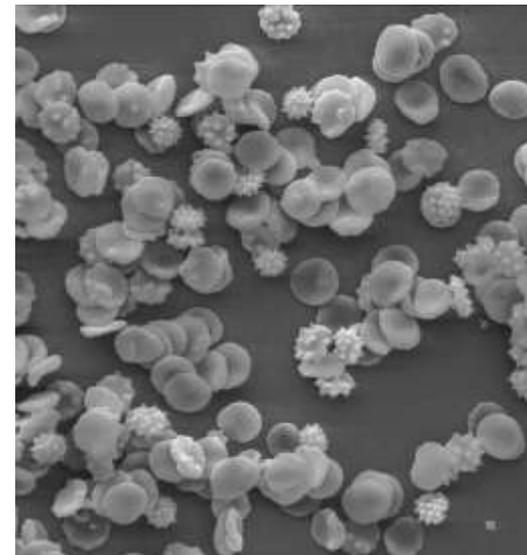
Quercetina+AAPH(50mM C.F)



Magliocco+ AAPH(50mM C.F)



Nero D'Avola + AAPH(50mM C.F)



Mirtillo++ AAPH(50mM C.F)

Fig.3.17 Indagine SEM eseguita su strisci di sangue umano in presenza/assenza di AAPH e in presenza/assenza dei polifenoli, vino rosso e mirtillo (SEM 1000x).

L'osservazione mediante microscopia a scansione ha confermato quanto rilevato dalla microscopia ottica. La forma degli eritrociti risulta alterata dopo l'aggiunta dell'AAPH. Tali alterazioni però si riducono se vengono aggiunti i polifenoli e il vino rosso.

Conclusioni

La membrana eritrocitaria, in presenza di agenti ossidativi, va incontro ad un processo di denaturazione progressiva con danni funzionali e strutturali delle principali componenti proteiche. In una prima fase si osservano alterazioni della struttura sopramolecolare della spettina, che è la componente principale dello scheletro proteico della membrana, nonché delle sue interazioni con altre proteine (212; 213). Successivamente si verificano fenomeni di denaturazione spinta della spettina stessa e di altre proteine sia scheletriche che transmembranarie con accumulo di prodotti di degradazione proteolitica e di polimeri ad alto peso molecolare dovuti alla formazione dei legami crociati fra proteine denaturate.

Le metodiche utilizzate e i risultati ottenuti ci hanno consentito di valutare l'effetto protettivo conferito dai polifenoli catechina, resveratrolo e quercetina a confronto con gli estratti naturali provenienti dal vino rosso (vitigno "Magliocco" e "Nero D'avola") e dal mirtillo negli eritrociti umani, dal danneggiamento ossidativo indotto dall'agente radicalico AAPH. Sulla base dei dati descritti è possibile evidenziare una netta protezione dallo stress ossidativo come:

Riduzione dei prodotti di degradazione lipidica espressi come equivalenti nM di MDA; infatti si può rilevare come la produzione di MDA, a partire dagli acidi grassi polinsaturi delle membrane eritrocitarie, mostra una diminuzione che è più consistente nelle membrane eritrocitarie provenienti da eritrociti esposti ad una concentrazione 1 μ M (C.F.) dei polifenoli quercetina, resveratrolo e catechina e nei campioni esposti al vino rosso e mirtillo, rispetto al controllo non trattato. Si ipotizza pertanto, un parziale ripristino del profilo lipidico del doppio strato, in particolare quello degli acidi grassi polinsaturi, che può inficiare l'efficienza dei sistemi di trasporto degli steroli, con variazione della fluidità e perdite delle proprietà di barriera.

Miglioramento dell'architettura della membrana cellulare esaminata con il parametro della permeabilità anionica; architettura che risulta maggiormente conservata quando la stessa è esposta agli estratti provenienti dal vino rosso.

Riduzione della suscettibilità emolitica nello stress indotto dall'AAPH. Dal confronto dei risultati degli spettri di assorbimento al tempo 180', i campioni

provenienti da eritrociti esposti a concentrazione 1 μM (C.F.) dei polifenoli ed in particolare del mirtillo e quelli esposti al vino rosso, rispetto al controllo non trattato, evidenziano una riduzione della suscettibilità emolitica eritrocitaria, poiché l'agente ossidante impiega più tempo ad indurre emolisi.

Riduzione della concentrazione di metaemoglobina. Le alterazioni ossidative provocate dallo stress radicalico producono un aumento della metaemoglobina. Quando i campioni sono esposti agli agenti protettivi si osserva una riduzione della medesima. Tale riduzione è significativa per tutti i campioni testati ed in particolare per i campioni trattati con la catechina 1 μM .

Un ripristino dell'attività enzimatica della G6PD. In seguito all'esposizione degli eritrociti agli agenti polifenolici e agli estratti provenienti dal vitigno Magliocco Nero D'Avola e mirtillo, si osserva un aumento dell'attività enzimatica in tutti i campioni fino a raggiungere valori prossimi al controllo non trattato. Infatti, a causa dell'esposizione all'agente ossidante esogeno AAPH si verificano: deplezione di G6PD, accompagnata da altri processi di denaturazione ossidativa. Tuttavia, in seguito all'aggiunta degli agenti protettivi, i globuli rossi sono in grado di rispondere adeguatamente allo stress ossidativo rigenerando i livelli normale di NADPH e GSH e ripristino fino ai valori dei controlli non trattati

Determinazione del GSH nel plasma e negli eritrociti. L'eritrocita per difendersi dall'ossidazione cerca di neutralizzare i radicali liberi mediante l'azione antiossidante del GSH i cui livelli si riducono rapidamente all'interno della cellula. I gruppi tiolici, presenti nel GSH e nelle proteine contenenti cisteina, hanno un ruolo fondamentale nel sistema di difesa antiossidante, per cui la protezione svolta dagli agenti polifenolici e dagli estratti provenienti dal vino rosso e mirtillo preserverebbe le difese antiossidanti endogene, grazie alla loro protezione antiossidante, preserverebbero i globuli rossi dalla deplezione di glutatione.

Riduzione delle alterazioni morfologiche . Dall'osservazione microscopica dei campioni e dall'analisi d'immagine è apparso evidente come i campioni trattati con l'agente radicalico AAPH, presentano alterazioni morfologiche, in modo particolare sono rilevabili aumenti di volume, acantocitosi (presenza di spigolature) e leptocitosi (forma allungata), alterazioni che risultano ridotte in

presenza di polifenoli. Tale dato viene confermato dall'analisi condotta mediante microscopia SEM.

L'effetto protettivo della componente fenolica del vino utilizzato nel nostro approccio sperimentale si riferisce alla concentrazione di utilizzo che è pari a 5 μM come equivalenti di acido gallico, dove la catechina presente negli estratti è 2,45-2.7 μM , mentre il resveratrolo è pari a 0,0225-0.025 μM . I dati sperimentali ottenuti non sono compatibili con gli effetti protettivi conferiti dalla frazione fenolica del vino in esame. La quota fenolica biodisponibile come equivalente di catechina in seguito all'apporto nutrizionale di 120 ml di vino, dopo un'ora è pari a $\sim 0,15 \mu\text{M}$, mentre la quota fenolica biodisponibile come equivalente di resveratrolo è pari a $\sim 0,12 \mu\text{M}$ (176) cioè ~ 10 volte inferiore di quella necessaria per conferire protezione dal danno ossidativo.

Lo stesso vale per il mirtillo dove la quota biodisponibile in seguito all'apporto nutrizionale del mirtillo come equivalenti di catechina dopo un'ora è pari a $\sim 0,12 \mu\text{M}$ mentre la quota fenolica biodisponibile come equivalente di resveratrolo è pari a $0,11 \mu\text{M}$. Tali concentrazioni non sono compatibili con un'adeguata protezione conferibile dalla quota fenolica, se non con l'assunzione pari a circa 1000 ml di vino a pasto e di ~ 3 kg di mirtillo. Tuttavia attraverso un moderato consumo di vino rosso, scelto tra quelli ad elevato contenuto di polifenoli ed opportuna integrazione dietetica con cibi ad elevata concentrazione di questa classe di composti, si può raggiungere una sufficiente protezione dal danno ossidativo.

Bibliografia

- 1) Rosati P.: Citologia ed Istologia. Edi - Ermes (Milano), cap. 21 pp. 701-718, 1992.
- 2) Casella C., Taglietti V.: Principi di Fisiologia Edizione rivenduta e corretta. La goliardica Pavese, cap. 3, pp. 135-156, pp. 329-330, 1996.
- 3) Silverthorn Dee U - "Fisiologia. Un approccio integrato." Ed. CEA
- 4) Lauralee Sherwood - " Fisiologia degli animali. Dai geni agli organismi" - Zanichelli ed., 2007
- 5) G. Aguggini, V. Beghelli, L.F. Giulio - "Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia"- Milano-UTET- 1998
- 6) Monesi V. et al. - "Istologia" - PICCIN (1998)
- 7) B. Lewin, L. Cassimeris, V.R. Lingappa, G. Plopper - "Cellule" - ed. Zanichelli
- 8) Groves J.D., Tanner J.A. Topology studies with biosynthetic fragments identify interacting transmembrane regions of the human red cell anion exchanger. *Biochem. J.* 344: 687-697, 1999.
- 9) Vince J.W., Carlsson U., Reithmeier R.A.F. Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anidrase II. *Biochemistry* 39: 13344-13349, 2000.
- 10) Hideo K., Keito Y., Fumio S. Dyacylglycerol kinase: a key modulator of signal trasduction. *TIBS* 15: 47-50, 1990.
- 11) Brockman J.L., Anderson R.A. Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5- biphosphate in native membranes. *J. Biol. Chem.* 266: 2508-2512, 1991.
- 12) Anderson R.A., Marchesi V.T. Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide. *Nature* 318: 295-298, 1985
- 13) Nakashima H., Nakagawa Y., Makino S. : Detection of the associated state of the membrane proteins by polyacrilamide gradient gel electrophoresis with non-denaturing detergents. Application to band 3 protein from erythrocytes membranes. *Biochim. Biophys. Acta*643: 509-518, 1981.

- 14) Low P.S., Rathinavelu P., Harrison M.L. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein band 3. *J. Biol. Chem.* 268: 14627-14631, 1993.
- 15) Chen H.; Yunpeng W.; Shaoxi C.; Mian LA.(1996) Research on theological properties of erythrocyte of lung cancer patients. *Clin Hemorheol.*,Vol.16,No 2, pp135-141
- 16) Muzyamba M. C.; Speake P. F. ; Gibson J. S. (2000). Oxidants and regulation of K⁺-Cl⁻-cotransportin equine red blood cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C981–C989
- 17) Maruzzi P., Maruzzi M “Le resistenze globulari osmotiche e metodiche alternativerapide” Editoria Pandora
- 18) Harman D. (1956); Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11(3): 298-300
- 19) Iris F.F. Benzie (2000); Evolution of antioxidant defence mechanism. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61. SPECIAL ISSUE
- 20) Chevion S., Moren DS., Heled Y. et al (2003); Plasma antioxidant status and cell injury after seven physical exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(9): 5119-5123
- 21) Robbins - “Le basi patologiche delle malattie” - 6° ediz. -Piccin – 2000
- 22) Coline JH., Kristal AR., Stanford JL. (2000); Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 61-68
- 23) Yang T., Devaraj S., Jiala I. (2001); Stress ossidativo e aterosclerosi. *Journal of Clinical Ligand Assay (Ed. Italiana)* 24: 13-24
- 24) Vassalle C., Petrozzi L., Botto N., Andreass M.G. et Zucchelli G.C.; Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *Journal of Internal Medicine* 20004; 256: 308-315
- 25) Linert W., Jameson GN., (2000); Redox reaction of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson’s Disease. *Journal of Inorg. Biochem.* 79(1-4): 319-326
- 26) Sudhak K., Rao A., Rao S., Rao A., (2003); Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson’s disease. *Neurol. India* 52(1): 60-62

- 27) JM. McCord.: The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108 (8): 652-59, Elsevier 2000.
- 28) Cestaro B.: *Per una vita inossidabile*, Etaslibri-RCS Medicina, cap. 1, pp. 1-15, 1994;
- 29) Halliwell B. et al, *Free radicals in biology and medicine*; O Halliwell B., *Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence*; *Lancet* 344 (1994). Oxford Clarendon Press, (1999)
- 30) Dean et al, *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*; *Biochem. J.*, 324 (1997).
- 31) Cornelli U., Cornelli M.: *Importanza dello stress ossidativo come rischio per la morbilità*. *La Medicina Biologica* 1: 13-18, 2000
- 32) Urso M. L., Clarkson P. M.: *Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation*. *Tossicology* 189: 41-54, 2003
- 33) Wood LG; Gibson PG; Garg ML. *Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma*. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 177-186.
- 34) Hitchon CA; El-Gabalawy HS. *Oxidation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res. Ther.* 2004, 6, 265-278
- 35) Markesbery WR; Kryscio RJ; Lovell MA; Morrow JD. *Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment*. *Ann. Neurol.* 2005, 58, 730-735
- 36) Sayre LM; Moreira PI; Smith MA; Perry G. *Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease*. *Ann. Ist. Super Sanità* 2005, 41, 143-164.
- 37) Spiteller G. *The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases*. *Mol. Biotechnol.* 2007, 37, 5-12.
- 38) Jira W; Spiteller G; Carson W; Schramm A. *Strong increase in hydroxy fatty acids derived from linoleic acid in human low density lipoproteins of atherosclerotic patients*. *Chem. Phys. Lipids* 1998, 91, 1-11.
- 39) Whitehead T. P., et al.: *Anal Chim Acta*, 266: 265-277, 1992
- 40) Straight R. et al.: *Photosensitized oxidation of biomolecules*. CRC Press, 91-143, 1985.

- 41) Foote C. S.: Quenching of singlet oxygen. Academic Press, New York, 139-173, 1979
- 42) Aruoma O Ii, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M -“Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates” - J. Biol. Chem. - 1989 - Vol. 264 - N° 34: 20509 – 20512
- 43) Cervato G, Viani P, Cestaro B - “Studies on peroxidation processes of model membranes: role of pyrophosphate” - Chem. Phys. Lipids - 1990 - 56: 91 - 99.
- 44) Betteridge D.J., What is oxidative stress?; Metabolism. 49 (2000).
- 45) Ames B. N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science, 221: 1256-64, 1983.
- 46) Floyd R. A.: Role of oxygen free-radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASE B Journal, 4: 2587, 1990.
- 47) Fraga C. G. et al.: Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine in rat organ Dna and urine. Proc Natl Acad Sci USA, 87 (12): 4533-4537,1990 Jun.
- 48) Dandona P. et al.: Oxidative damage to DNA in diabete mellitus. Lancet, (347):444-5,1996 Feb.
- 49) Parthiban A., Selvamani V., Shanmugasundaram K. R. and Mohan R.: Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. Cell Biology International, Vol 19, No 12, 1995
- 50) Greenwald R. A.: Therapeutic usage of oxygen radical scavengers in humane diseases: myths and realites. Free radical research communications XII-XIII: 531-538, 1991.
- 51) Gutteridge J. M. C., Halliwell B.: Antioxidants in nutrition, health and disease. 1st ed. New York. Oxford University Press, 1994.
- 52) White A., Estrada M., Walzer K., Wisnia P., Filgueira G., Valdés F., Araneda O., Behn C., Martínez R.: Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thotoughbred race horses. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 128: 99-104, 2001.

- 53) Cazzola R., Russo- Volpe S., Cervato G., Cestaro B.: Biochemical assessment of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidità and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European Journal of Clinical Investigation* 33: 924-930, 2003.
- 54) Sies, *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*; Academic Press, London (1991).
- 55) Van B., Dai G., Liu X., Huang S. and Wang Z.: Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant & Soil*, 179: 261-268, 1996.
- 56) Fridovich I., "Superoxide radical and superoxide dismutases". *Ann. Rev Biochem* 64: 97–112, 1995.
- 57) Sandalio L.M., Lòpez-Huertas E., Bueno P., Del Rìo L.A., "Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from water-melon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons". *Free Radic Res* 26: 187–94, 1997.
- 58) Teixeira H.D., Schumacher R.I., Meneghini R., "Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase". *Proc Natl Acad Sci* 95: 7872–5, 1998.
- 59) Paolicchi A., Dominici S., Pieri L., Maellaro E., Pompella A.: Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1027-1035, 2002
- 60) Chaudière J. and Ferrari-Iliou R.: Intracellular Antioxidants: form Chemical Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949-962, 1999
- 61) Helmut S.: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine* vol. 27, No. 9/10, pp. 916-921, 1999
- 62) Rennenberg H.: Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem*, 21: 2771-2781, 1982.
- 63) Price A., Lucas P. W. and Lea P. J.: Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: a leaf section approach. *J. Exptl. Bot.*, 41: 1039-1317, 1990
- 64) Deneke, Susan M. and Barry L. Fanburg: Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, 257: L163-L173, 1989.

- 65) Blmen S., Aksu T. A., Gümüslü S., Kipmen Korgun D., Canatan D.: Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* ,303, pp. 83-86, 2001
- 66) Imai H. and Nakagawa Y.: Serial Review: Biological significances of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4)in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 34, No. 2, pp. 145-169, 2003
- 67) May M.J., Vernoux T., Leaver C., VanMontagu M., Inze D.: Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. *J.Exp. Bot.* 49(321):649-667, 1998
- 68) Powers S. K., Ph. D., Ed. D., Hamilton K., MS: Antioxidants and exercise. *Clinical in Sports Medicine*, 1999
- 69) Vesovic D., Borjanovic, Markovic S., Vidakovic A.: Strenuos exercise and action of antioxidants enzyme. *Med Lav.*, 93,6: pp. 540-550, 2002.
- 70) Patrizia Cappelli, Vanna Vannucchi: *Principi di scienza dell'alimentazione*. Seconda edizione Zanichelli editore, cap. 9, p. 84, 1999
- 71) Costantini A. M., Cannella C., Tommasi G.: *Fondamenti di nutrizione umana*. Il pensiero scientifico editore (Roma), cap. 9 pp. 223,245, cap. 11 pp. 277, cap. 12 pp. 316, 320, 1999.
- 72) Arienti G.: *Le basi molecolari della nutrizione*. Piccin, pp: 385- 489, 1996.
- 73) Masoero P., Giulio L., Ferrara B.: *Fisiologia della nutrizione*. Utet, 1980
- 74) Sanberlich He.: *Pharmacology of vitamin C*. *Ann. Rev. Nutr.*, 14: 371-392, 1994
- 75) Chaterjee I. B.: *Ascorbic acid metabolism*. *World Rev. Nutr. Diet.*, 30, 69-87, 1978.
- 76) Tolbert B. M.: *Metabolism and function of ascorbic acid and its metabolites*. *Int. 1. vitam. Nutr. Res.*, 27,122-138,1985
- 77) Berger T. M., Polidori M. C., Dabbagh A., Evans P. J., Halliwell B., et al.: *Antioxidants activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, No. 25, pp. 1565-15660, 1997.
- 78) Burns J. l., Rivers l. M. e Machlin L. l. editor : *Third Conference and vitamin C*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 498, 1-538, 1987.

- 79) Combs G. F. Jr.: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. San Diego CA Accademy Press, 151-178, 1992.
- 80) Niki E., Saito T., Kawakani A., Kaniya Y.: Inhibition of oxidation of methyl linoleate insolution by vitamin E and vitamin C. *J. Biolo. Chem.*, 259, 4177-4182, 1984.
- 81) Leung H. W., Vang M. I., Mavis R.D.: The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 664,266-272, 1981.
- 82) Chan AC.: Partners in defense. Vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol*, 71: 725-31, 1993.
- 83) Wang X., Quinn PJ.: Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*, 38 309, 1999.
- 84) Theriault A., et al.: Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clin Biochem*, 32 309, 1999.
- 85) Suzuki Y.J., Tsuchiya M., Wassal S.R., Choo Y.M., Govil G., Kagan V.E., Packer L.: Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and β -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* 32 10692, 1993.
- 86) Aldo Mariani Costantini, Carlo Cannella, Giovanni Tomassi - "Fondamenti di Nutrizione Umana" - Il Pensiero Scientifico Editore, 2006
- 87) Qureshi A.A. et al.: Response of hypercholesterolemic subject to administration of tocotrienols. *Lipids*, 30 1171, 1995.
- 88) Podda M., Weber C., Traber M.G., Packer L.: Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *J Lip Res*, 37 893, 1996.
- 89) Regev-Shoshani G, Shiseyov O, Bilkis I, Kerem Z (2003) Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J* 374: 157-163.
- 90) Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42: 29-42.

- 91) Iriti M, Rabotti G, De Ascensao A, Faoro F (2003) Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *J Agric Food Chem* 51: 4308-4314.
- 92) Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, Mérillon JM, Krisa S (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr* 45: 376-382.
- 93) Dixon RA, Xie dY, Sharma SB (2005) Proanthocyaninidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 165: 9-28.
- 94) Arts IC and Hollman PC - "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies" - *American Journal Clinical Nutrition* - 2005 - 81(1 Suppl): 317S - 325S.
- 95) Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L - "Dietary polyphenols and the prevention of diseases" - *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* - 2005 - 45: 287 – 306
- 96) Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, De La Torre R, Farre M - "Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial" - *Eur. J. Nutr.* - 2004 - 3: 140 - 147.
- 97) Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, De La Torre R, Mursu J, Baumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fito M, Virtanen J, Marrugat J, Group ES - "The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial" - *Ann. Intern. Med.* - 2006 - 145: 333 - 341.
- 98) Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L - "Polyphenols: dietary sources and bioavailability" - *American Journal of Clinical Nutrition* - 2004 - Vol. 79 - N° 5 - pp. 727 - 747.
- 99) Galvin C., 1993. Etude de certaines reactions de degradation des anthocyanes et de leur condensation. Th.se de Doctorat, Universit. de Bordeaux II.
- 100) Langcake P, Pryce RJ (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 9: 77-86.
- 101) Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30: 91-113.

- 102) Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem* 50: 2731-2741
- 103) Orallo F (2006) Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem* 13: 87-98.
- 104) Frémont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66: 663-673.
- 105) Pervaiz S (2003) Resveratrol: from grapevine to mammalian biology. *FASEB J* 17: 1975- 1985.
- 106) King RE, Bomser JA, Min DB (2006) Bioactivity of resveratrol. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 5: 65-70.
- 107) Kopp P (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 138: 619-620
- 108) Bavaresco L, Goncalves MI, Vezzulli S (2006) Ruolo dei fattori viticoli sugli stilbeni in uva e vino. *L'informatore Agrario* 35: 67-70.
- 109) Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL (2001) Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem* 49: 3341-3348
- 110) Gambuti A, Strollo D, Ugliano M, Lecce L, Moio L (2004) trans-Resveratrol, quercetin,(+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J Agric Food Chem* 52: 5747- 5751.
- 111) Musiani F, Bagni N, Mordenti GL, Franceschetti M, Tassoni A (2006) Analisi del contenuto di resveratrolo in uve e vini romagnoli. *VQ* 5: 51-58.
- 112) Lin JK, Tsai SH (1999) Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China* 23: 99-106
- 113) Soleas GJ, Grass L, Josephy D, Goldberg DM, Diamandis EP (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* 35: 119-124.

- 114) Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle K (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Disp* 32:1377-1382.
- 115) Aumont V, Larronde F, Richard T, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Krisa S, Mérillon JM (2004) Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotech* 109: 287-294.
- 116) Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, Mérillon JM, Krisa S (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr* 45: 376-382.
- 117) Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Mol Biol* 24: 743-755.
- 118) Winkel-Shirley B (2001a) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126: 485-493.
- 119) Wu X., Pittman H.E., Prior R.L. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J Nutr* 134: 2603-2610 (2004).
- 120) Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 38: 763-772 (2005).
- 121) Keppler K., Humpf H.U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 13: 5195-5205 (2005).
- 122) Fleschhut I., Kratzer F., Rechkemmer G., Kulling S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 45: 7-18 (2006).
- 123) Wu X., Pittman H.E., McKay S., Prior R.L. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism following berry consumption in the weanling pig. *J Nutr* 135: 2417-2424 (2005).
- 124) Kay C.D., Mazza G.J., Holub B.J. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 135: 2582-2588 (2005)

- 125) Murota K., Terao J. Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett* 579: 5343-5346 (2005).
- 126) Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. et al., Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 134: 613-617 (2004).
- 127) Piskula M.K., Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 128: 1172-1178 (1998).
- 128) Natsume M., Osakabe N., Oyama M., Sasaki M., Baba S., Nakamura Y. et al., Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* 34: 840-849 (2003).
- 129) Tsang C., Auger C., Mullen W., Bornet A., Rouanet JM., Crozier A. et al., The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 94: 170-181 (2005).
- 130) Rios L.Y., Bennett R.N., Lazarus S.A., Remesy C., Scalbert A., Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 76: 1106-1110 (2002).
- 131) Donovan J.L., Kasim-Karakas S., German J.B., Waterhouse A.L. Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *Br J Nutr* 87: 31-37 (2002).
- 132) Iriti M, Faoro F (2004) Plant defence & human nutrition: phenylpropanoids on the menu. *Curr Top Nutr Res* 2: 47-65.
- 133) Winkel-Shirley B (2001b) It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid biosynthesis. *Plant Physiol* 127: 1399-1404.
- 134) Ribreau-Gayon P., Doubourdieu D., Donche B., Lonvaud A., 2003. *Trattato di enologia. Chimica del vino, Stabilizzazione, Trattamenti*, p 141-199. Vol II. Edagricole, Bologna.

- 135) Roggero J. P., Ragonnet B., Coen S., 1984. Analyse fine des anthocyanes des vins et des pellicules de raisin par la technique H.P.L.C., etude de quelques cepages meridionaux Vignes et Vins, Paris, 327, 38-42.
- 136) Ferraretto P., 2008. Caso studio per la lavorazione e preservazione di vecchie variet • di uva a bacca rossa del Friuli Venezia Giulia: Il Vin di Uch.. Tesi di laurea, p 38-48, 56-70. Universit • degli Studi di Udine.
- 137) Fregoni M. *Viticultura di qualit*. Edizioni l'Informatore Agrario, Verona, 1999.
- 138) Decendit A, Ramawat KG, Waffo Teguo P, Deffieux G, Badoc A, M \acute{e} rillon JM (1996) Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnol Lett* 18: 659-662.
- 139) Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2001). Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during vinification. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5797-5808.
- 140) Frankel E. N., Kanner, J. B., German, E., Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454-457.
- 141) Southon S., 1996. Ruolo delle sostanze antiossidanti nella dieta nel mantenimento della salute. Traduzione a cura di Peri C.
- 142) Fregoni M., Fregoni C., Ferrarini R., Spagnoli F., 2004. *Chimica viticologico-enologica*. Edizioni Reda, Torino.
- 143) Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2003) *Trattato di enologia Vol. I Edagricole*, Bologna.
- 144) Celotti E., Carcerieri De Prati G., 2000. La qualit • fenolica delle uve rosse: valutazione oggettiva mediante misura del colore. *Industrie delle Bevande* 29, 168, 378-384.
- 145) Havsteen B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141-1148
- 146) Somers T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigment. *Phytochemistry* 10, 2175-2186
- 147) Arnold R.A., Noble A.C., Singleton V.L. (1980). Bitterness and astringency of phenolics fraction in wine. *J. Agric. Food Chem.* 28, 675-678

- 148) Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissendré P. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agr. Food Chem.* 43, 890-894
- 149) Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Reviews. Trends Plant Sci.* 2, 152-159
- 150) Dell'Agli M., Buscialà A., Bosisio E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.* 63, 593-602
- 151) Ardevol A., Blade C., Salvado M.J., Arola L. (2000). Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Relat. Metab. Disord.* 24(3), 319-324
- 152) Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovsek U., Mattivi F. (2000). Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.* 48(6), 1996-2002
- 153) Gali H.U., Perchellet E.M., Gao X.M., Karchesy J.J., Perchellet J.P. (1994). Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric, and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vivo. *Planta Med.* 60(3), 235-239
- 154) Zhao J., Wang J., Chen Y., Agarwal R. (1999). Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20(9), 1737-1745
- 155) Tamura H., e Matsui M. (2000). Inhibitory effects of green tea and grape juice on the phenol sulfotransferase activity of mouse intestines and human colon carcinoma cell line, Caco-2. *Biol. Pharm. Bull.* 23(6), 695-699
- 156) Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.M., Castanas E. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. CellBiochem.* 78(3), 429-441
- 157) Kampa M., Hatzoglou A., Notas G., Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.M., Castanas E. (2000). Wine antioxidant

polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 37(2), 223-233

158) Agarwal C., Sharma Y., Agarwal R. (2000). Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol. Carcinog.* 28(3), 129-138

159) Bomser J., Singletary K., Meline B. (2000). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse skin ornithine decarboxylase and protein kinase C by polyphenolics from grapes. *Chem. Biol. Interact.* 127(1), 45-59

160) Lotito S.B. e Fraga C.G. (1999). (+)-Catechin as antioxidant: mechanisms preventing human plasma oxidation and activity in red wines. *Biofactors* 10(2/3), 125-130

161) Bors W., Michel C., Stettmaier K. (2000). Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 374(2), 347-355

162) Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 46(2), 361-367

163) Chopra M., Fitzsimons P.E., Strain J.J., Thurnham D.I., Howard A.N. (2000). Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.* 46, 1162-1170

164) Fernández-Pachón M.S., Villaño D., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta* 513, 113-118

165) Feng A.N., Chen Y.L., Chen Y.T., Ding Y.Z., Lin S.J. (1999). Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 100(22), 2254-2259

166) Leighton F., Cuevas A., Guasch V., Perez D.D., Strobel P., San Martin A., Urzua U., Diez M.S., Foncea R., Castillo O., Mizon C., Espinoza M.A., Urquiaga

- I., Rozowski J., Maiz A., Germain A. (1999). Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25(2/3), 133-141
- 167) Moline J., Bukharovich I.F., Wolff M.S., Phillips R. (2000). Dietary flavonoids and hypertension: is there a link? *Med. Hypotheses* 55(4), 306-309
- 168) Serafini M., Laranjinha J.A., Almeida L.M., Maiani G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J. Nutr. Biochem.* 11(11/12), 585-590
- 169) Frémont L., Gozzelino M.T., Linard A. (2000). Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets. *Lipids* 35(9), 991-999
- 170) Iijima K., Yoshizumi M., Hashimoto M., Kim S., Eto M., Ako J., Liang Y.Q., Sudoh N., Hosoda K., Nakahara K., Toba K., Ouchi Y. (2000). Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 101(7), 805-811
- 171) Sato M., Ray P.S., Maulik G., Maulik N., Engelman R.M., Bertelli A.A., Bertelli A., Das D.K. (2000). Myocardial protection with red wine extract. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35(2), 263-268
- 172) Canali R., Vignolini F., Nobili F., Mengheri E. (2000). Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. *Free Radical. Biol. Med.* 28(11), 1661-1670
- 173) Bertelli A.A., Ferrara F., Diana G., Fulgenzi A., Corsi M., Ponti W., Ferrero M.E., Bertelli A. (1999). Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int. J. Tissue React.* 21(4), 93-104
- 174) Heredia A., Davis C., Redfield R. (2000). Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 25(3), 246-255

- 175) Morton L.W., Abu-Amsha Caccetta R., Puddey I.B., Croft K.D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27(3), 152-159
- 176) Claudine Manach, Gary Williamson, Christine Morand, Augustin Scalbert and Christian Rémésy – “*Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*” - *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 81, No. 1, 230S-242S, January, 2005
- 177) Donovan J.L., Bell J.R., Kasim-Karakas S., German J.B., Walzem R.L., Hansen R.J., et al., Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129: 1662-1668 (1999).
- 178) Astley S.B. Dietary antioxidants: past, present and future? *Trends Food Sci Technol* 14:93-98 (2003).
- 179) Temple N.J. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr Res* 20: 449- 459 (2000).
- 180) Azzi A., Davies K.J.A., Kelly F. Free radical biology: terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 558: 3-6 (2004).
- 181) Lau F.C., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. Beneficial effects of berry fruit polyphenols on neuronal and behavioral aging. *J Sci Food Agric* 86: 2251-2255 (2006).
- 182) Idolo Tedesco, Maria Russo, Paola Russo, Giuseppe Iacomino, Gian Luigi Russo, Antonio Carraturo, Clementina Faruolo, Luigi Moio, and Rosanna Palumbo: Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* 11:114 –119, 2000
- 183) Gorelik S.; Ligumsky M.; Kohen Ron.; Kanner J.(2008). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products *The FASEB Journal* ,Vol. 22 January pp 41-46
- 184) Gaziano JM.; Buring JE.; Breslow JL.; Goldhaber SZ.; Rosner B.; van den Burgh M.; Willet W.; Hennekens CH. (1993). Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N. Eng .J. Med.*, 329: 1829-34

- 185) Sadeghipour M., Terreux R., Phipps J., Flavonoids and tyrosine nitration: structure-activity relationship correlation with enthalpy of formation. *Toxicol in Vitro* 2005; 19:155-6
- 186) Buettner G.R., The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, [alpha]-Tocopherol and Ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300:535-43,
- 187) V.L. Singleton and J.A. Rossi, Jr. *Am. J. Eol. Vitic.* 16, 144-158 (1965) 2-O. Folin and W. Denis, *J. Biol. Chem.* 12, 239-243 (1912)
- 188) Sevanian A, Ursini F - "Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences" - *Free radical Biology and Medicine* - 2000 - 29: 306 - 311.
- 189) Cheeseman KH - "Machanisms and effects of lipid peroxdation" - *Molec. Aspects Med.* - 1993 - 14: 191 - 197.
- 190) Armutcu F, Coskun O, Sahin S, Kanter M, Cihan A, Numanoglu KV and Altinyazar C - "Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells" - *Cell Biology and Toxicology* - 2005 - 21: 53 - 60.
- 191) Sushil K. Jain and Steven N. Levine – "Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetics rats" - *Free radical Biology and Medicine*, vol.18, 1995
- 192) Noguchi, N., Takahashi M., Tsuchiya, J., et al.: Action of 21-"Aminosteroid U74006F as an antioxidant against lipid peroxidation" - *BiochemPharmacol*, 55 785-791, 1998.
- 193) Liu Z., Yu W., Liu Z. – "Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein" - *ChemPhys Lipids*, 103 125-135, 1999.
- 194) Liégeois C., Lermusieau G., Collin S.- "Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid" - *J Agric Food Chem*, 48 1129-1134, 2000.
- 195) Draper HH, HadleyM - "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation" - *Methods Enzymol.* - 1990 - 186: 421 - 431.

- 196) Feng N. Ko, George Hsiao, Yueh H. Kuo.: Protection of oxidative hemolysis by demethylisoeugenol in normal and β -thalassemic red blood cells. *Free radical Biology and Medicine*, 22: 215-222, 1997
- 197) Szebeni J, Winterbourn CC, Carrell RW. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. *Biochemical Journal* 1984; 220: 685–692.
- 198) Kornberg, A. et al., *Methods in Enzymology* 1, Academic Press, New York, 1955; p.323.
- 199) Hu M.L. (1994) In: Packer L., Ed. *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. 233, pp 380-385.
- 200) Giemsa G. (1922-1923) Das Wasen der Giemsa-Farbung, *Zentralb f Bakt.* 89: 99-106
- 201) *Istologia*", P. Rosati, R. Colombo, N. Maraldi, Edi-ermes.
- 202) Paletti R, Poli A, et al. "*Campagna educativa sul rapporto tra dosi moderate di Alcool e malattie cardiovascolari*".
- 203) Meade TW, Mellows S. Brozovic M, et al. – "*Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study*" - *Lancet* 1986; 2:533-7.
- 204) Flavia Pinzari, *Microscopia elettronica a scansione e microanalisi*, Roma, Gangemi, 2008.
- 205) Esterbauer H.; Schaur R. J.; Zoller R. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malonaldehyde and related aldehydes. In "*Free radical biology and medicine*", 11: pp. 82-128.
- 206) Halliwell B.; Gutteridge J. M. C. (1989): *Free radical in biology and medicine*. Oxford
- 207) Horning R, Lutz HU. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-Band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* 2000; 35: 1025-44.
- 208) Raffaella Coccia, Cristiano Spadaccio, Cesira Foppoli, Marzia Perluigi: The Effect of Simvastatin on Erythrocyte Membrane Fluidity During Oxidative Stress Induced by Cardiopulmonary Bypass: A Randomized Controlled Study, *Clinical Therapeutics/Volume 29, Number 8, 2007*

- 209) Chien S. and Sung, L.A. Molecular Basis Of Red Cell Membrane Rheology. *Biorehology* 27, 327- 338, 1990
- 210) Mohandas N., Chasis J.A. and Shohet S.B., The Influence Of Membrane Skeleton On Red Cell Deformability: Membrane Materia Properties, And Shape. *Semin.Hematol.* 20, 225-242, 1983.
- 211) Sheetz M.P. Membrane Skeletal Dynamics: Role In Modulation Of Red Cell Deformability, Mobility Of Transmembrane Proteins, And Shape. *Semin.Hematol.* 20, 175-188, 1983
- 212) Caprari P., Bozzi A., Malorni W., Bottini A. Iosi F., Santini M.T., Salvati A.M. 1995 Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chem. Biol. Interact.* **94**:243-258.
- 213) Caprari P., Tarzia A., Maffi D., Pasquino M.T., Caforio M.P., Salvati A.M. 1996. Oxidative spectrin denaturation in hereditary spherocytosis and G6PD deficiency. *Second meeting of European haematology association. Working Group on Red Cell Membrane. (Paris, June 28-29) Abstract book Institut Pasteur, Lyon.*