

Radicali liberi e fumo di sigaretta

Free radicals and cigarette smoke

Vincenzo Zagà*, Enrico Gattavecchia**

* *Presidio di Pneumotisiologia - Azienda USL Città di Bologna, Società Italiana di Tabaccologia-SITAB*

** *Unità Complessa di Istituti di Scienze Chimiche, Radiochimiche e Metallurgiche dell'Università degli Studi di Bologna.*

RIASSUNTO

Introduzione. I radicali liberi e gli ossidanti, fra le oltre 4.000 sostanze contenute nel fumo di sigaretta, ricoprono un ruolo di primo piano nella genesi di alcune patologie fumo-correlate (enfisema e tumore polmonare). Nel fumo di sigaretta esistono due differenti gruppi di radicali liberi: a lunga vita presenti nella fase corpuscolata (tar) e a vita breve nella fase gassosa.

Obiettivi, materiali e metodi. Oggetto di questo lavoro sperimentale è stato lo studio quali-quantitativo dei radicali liberi e ossidanti presenti nella fase gassosa del fumo di tabacco, con e senza l'utilizzo di filtri contenenti sostanze in grado di abbattere radicali liberi e ossidanti. L'indagine è stata eseguita su sigarette Marlboro con filtro con due metodiche diverse: la chemiluminescenza e la spettrometria elettronica di spin.

Risultati. Grazie all'aggiunta di uno scintillante è stato possibile evidenziare, oltre al 1° picco rapido di radicali liberi presenti nella primissima fase della combustione della sigaretta, anche un 2° picco, a comparsa più tardiva ma più imponente e dannoso in quanto totalmente assorbito dall'apparato roncopolmonare, e non evidenziabile con la semplice chemiluminescenza (reazione "buia"). È stato inoltre dimostrato il ruolo determinante dell'ossigeno nell'insorgenza di questo 2° picco di radicali liberi. Degli scavengers di radicali e ossidanti introdotti nel filtro di sigaretta, solo alcuni (selenio, vit.A, C) si sono rivelati efficaci nell'abbattere il 2° picco di luminescenza e quindi nel contrastare la formazione di una quota supplementare di radicali liberi.

Conclusioni. Questo studio mostra che:

- Il carico ossidativo da fumo di sigaretta è molto più pesante di quello fino ad ora conosciuto (1°+2° picco).
- Potrebbero essere studiati dei filtri protesi o delle sigarette con filtro contenente sostanze antiossidanti per entrambi i picchi, cercando di mantenere inalterate le caratteristiche organolettiche del fumo sigaretta: un compromesso che potrebbe ridurre sensibilmente nel tempo l'incidenza di malattie cronico-degenerative broncopolmonari e l'insorgenza di neoplasie.

Parole chiave: Radicali liberi, fumo di sigaretta, filtri.

SUMMARY

Introduction. Among over 4,000 substances contained in the cigarette smoke, the free radicals and the oxidants have an important part in the origin of some smoke correlated pathologies (emphysema and pulmonary neoplasm). In the cigarette smoke there are two different groups of free radicals: the long-life ones which are in the corpuscular phase (tar) and the short-life ones in the gaseous phase.

Objects, materials and methods. The object of this experimental work has been the qualitative-quantitative study of the free radicals and oxidants which are in the gaseous phase of tobacco smoke, with and without the use of filters containing substances which can demolish free radicals and oxidants. The study has been carried out on Marlboro cigarettes with filter through two different methods: the chemiluminescence and the spin electronic spectrometry.

Results. The addition of a scintillant has allowed to point out a first peak of free radicals being in the first phase of the cigarette combustion and a second peak which was later but more imposing and dangerous as it was completely absorbed by the bronchopulmonary system and not evident through the simple chemiluminescence (“dark” reaction). Moreover it has been shown the very important part the oxygen has got in the origin of this second peak of free radicals. Among the scavengers of radicals and oxidants put in the cigarette filter, only some of them (selenium, vitamin A, C) have been able to knock down the second peak of luminescence and to hinder the forming of any additional portion of free radicals.

Conclusions. This study shows that:

- a) The oxidative charge by cigarette smoke is much stronger than the one known until now (first and second peak).
- b) Filters prosthesis or cigarettes with a filter containing antioxidant substances for both peaks could be studied, trying to keep the organoleptic characteristics of the cigarette smoke unchanged: it would be a compromise which could considerably reduce, during the time, the manifestation of chronic growing bronchopulmonary diseases and the origin of tumors.

Key words: Free radicals, cigarette smoke, cigarette filter.

INTRODUZIONE

CHE COSA E' UN RADICALE LIBERO. Un radicale libero è una specie chimica che contiene uno o più elettroni spaiati, cioè un elettrone che occupa da solo un orbitale molecolare o atomico. Questa disposizione rende l'atomo o la molecola molto instabili, per cui la reattività chimica dei radicali è generalmente molto elevata.

A temperature intorno a 37 °C la maggior parte dei radicali è notevolmente reattiva così che la loro concentrazione diventa bassissima, valutabile in $10^{-9} \div 10^{-4}$ M in soluzione, corrispondente a $10^{10} \div 10^{13}$ radicali liberi per cm^3 di fase gassosa. Se si considera che una boccata standard di fumo equivale a circa 35 cm^3 e che una sigaretta viene consumata in circa 10 aspirate, la quantità di radicali introdotta è in un range stimato di $10^{13} \div 10^{18}$ radicali/sigaretta fumata.

REAZIONI DEI RADICALI LIBERI. Un radicale può cedere il suo elettrone spaiato ad un non radicale oppure può ricevere un elettrone da un'altra molecola in modo da formare una coppia di elettroni. Qualunque reazione si verifichi, la specie non radicale si trasforma in un radicale libero capace di estendere e propagare il danno, in una reazione a catena in grado di automantenersi ed amplificarsi. La reazione termina in una fase in cui i radicali liberi vengono consumati attraverso una ricombinazione in prodotti stabili, detto processo di arresto della reazione a catena (1).

I processi quantitativamente più importanti nell'innesco e mantenimento di queste reazioni sono la riduzione monoelettronica dell'ossigeno e la perossidazione lipidica.

Dalla riduzione monoelettronica dell' O_2 si producono le seguenti specie:

- ANIONE SUPEROSSIDO ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
- PEROSSIDO DI IDROGENO (H_2O_2)
- RADICALE IDROSSILE (OH^{\cdot})
- OSSIGENO SINGOLETTO ($^1\text{O}_2$)

Fra queste specie, i principali responsabili di danni alle cellule aerobie sono il radicale idrossilico e l'ossigeno singoletto. Altri ossidanti sono il monossido (NO) ed il biossido di azoto (NO_2) che sono fra i maggiori inquinanti atmosferici, presenti nello smog fotochimico: la loro concentrazione media nelle città è di circa 0,15 ppm per l'NO, e di 0,05 ppm per l' NO_2 . Nella fase aeriforme del fumo di sigarette l' NO_2 è presente a livelli elevati, dell'ordine di 250 ppm. Questa concentrazione è linearmente correlata alla quantità di nitrati presenti nel tabacco (1).

RUOLO DEI RADICALI NELLA PATOLOGIA UMANA. La vita dei radicali liberi è molto breve e si svolge nelle immediate vicinanze della sede di produzione. Tuttavia, se non sono subito neutralizzati da un accettore fisiologico, i radicali attaccano i diversi costituenti endocellulari entro un raggio d'azione variabile a seconda del tipo di radicale stesso (2). I radicali liberi esplicano la loro attività tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in una quantità tale da non poter essere inattivati dai sistemi di difesa della cellula. In tal caso sono in grado di reagire con tutti i costituenti della cellula e della matrice cellulare, determinando un condizione chiamata “stress ossidativo”. Tutte le classi di molecole biologiche sono potenziali “targets” per l'attacco dei radicali liberi. Particolarmente dannosa è l'azione sul DNA che va incontro a scissione delle catene polinucleotidiche con eventuale formazione di ponti che possono provocare fenomeni di mutazione, carcinogenesi o morte cellulare (3, 17, 21, 23, 26, 27, 29).

La flogosi da stress ossidativo del tratto respiratorio basso può essere causa di molte differenti patologie polmonari l'alveolite fibrosante, la sindrome da distress respiratorio dell'adulto o la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (19, 20). Altra importante azione di ossidoriduzione i radicali liberi la esercitano nella genesi dell'enfisema polmonare nell'ambito della BPCO. Infatti l'esposizione a sostanze ossidoriducibili, come quelle presenti nel fumo di sigaretta, determina una ossidazione del sito 358-metionina della molecola dell'alfa-1 antitripsina che viene inattivata, con conseguente squilibrio del sistema di difesa antielastasi polmonare (4, 18, 21, 22).

Anche il sistema vascolare arteriosoviene compromesso dal carico ossidativo fumo-correlato in termini di elasticità inizialmente e di canalizzazione poi (28).

La detossificazione dei composti reattivi dell'ossigeno è uno dei prerequisiti della vita in condizioni aerobiche e si realizza attraverso un importante sistema di difesa antiossidante di prevenzione, intercettazione e riparazione, che comprende agenti non enzimatici, noti come antiossidanti (tocoferoli, antiproteasi, β -carotene, acido ascorbico, ubiquinolo, bilirubina, acido urico, etc.) ed enzimatici (superossido-dismutasi, glutatione perossidasi e catalasi) (5, 29). L'alfa-1 antitripsina è il principale rappresentante di un sistema di difesa antiproteasico soprattutto a livello dell'apparato respiratorio. L'acido urico invece è il più importante antiossidante non enzimatico di tutto il potenziale antiossidante presente nella saliva umana. Si tratta di un potente antiossidante di derivazione plasmatica le cui concentrazioni vengono mantenute costanti nei fumatori e non fumatori (25).

RADICALI LIBERI E FUMO DI SIGARETTA. Il fumo di sigaretta contiene due differenti gruppi di radicali liberi: radicali a lunga vita nella fase corpuscolata (fase tar), e radicali a vita breve, nella fase aeriforme (fase gas).

Il principale radicale della "fase tar" è costituito dal complesso chinone-idrochinone, un sistema redox molto attivo e in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido e quindi a perossido di idrogeno e a radicale idrossilico.

La "fase gas" del fumo di sigaretta contiene invece piccoli radicali alchilici e alcossilici dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase corpuscolata. I radicali della "fase gas", contrariamente a quelli della "fase tar", non possono essere osservati direttamente usando la spettroscopia EPR perché hanno un tempo di vita di frazioni di secondo. L'indagine diventa però possibile utilizzando tecniche di "spin trapping" e misurazione della chemiluminescenza.

Parte sperimentale

OBIETTIVI

Oggetto di questo lavoro sperimentale è la fase gassosa del fumo di sigaretta. Si è cercato di indagare la presenza di radicali liberi ed altre molecole ossidanti della fase gas, di individuarne la natura e di verificare se ci siano sostanze che, poste nel filtro della sigaretta, intrappolino una parte di tali molecole nocive.

L'indagine è stata eseguita con due metodiche diverse: la chemiluminescenza e la spettrometria elettronica di spin. La prima tecnica permette essenzialmente di studiare la velocità di formazione e scomparsa di specie che producono luminescenza, mentre la seconda consente di identificare chimicamente le specie radicaliche coinvolte.

Materiali e metodi per l'indagine mediante chemiluminescenza

La ricerca è stata condotta su sigarette di marchio Marlboro, con filtro, per la loro elevata diffusione nel mercato italiano. Le sigarette venivano fumate aspirando il fumo per mezzo di una siringa di plastica da 50 ml; il volume prelevato era quello che viene considerato, in tutti gli studi sul fumo, come il più vicino alla quantità mediamente aspirata, per ogni boccata, da un fumatore medio: 35 ml per la durata di due secondi.

Il fumo veniva poi posto in un "vial" (contenitore in polietilene) da 20 ml con circa 5 ml di liquido scintillante e agitato per qualche secondo; si eseguiva poi il conteggio per scintillazione liquida.

Per queste misure si è utilizzato un contatore a scintillazione liquida modello LSC1 della New England Nuclear e liquido scintillante Ready SolvTM CP della Beckman. La misurazione veniva attuata ogni 30 secondi, con un tempo di conteggio di 10 secondi.

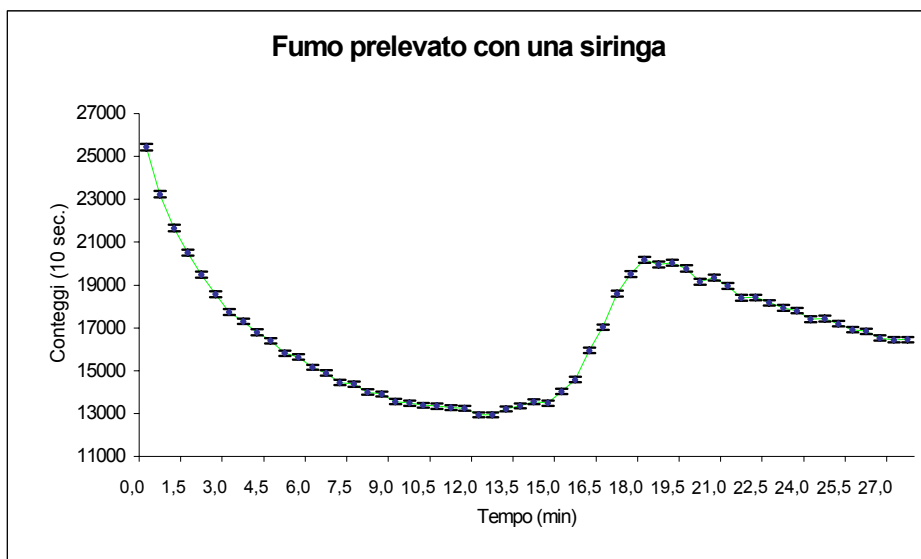
E' importante notare che in questo tipo di misurazione, più che i valori assoluti, interessa l'andamento della curva risultante. Infatti intervengono alcune variabili che modificano anche in maniera sensibile il valore di luminescenza:

- distanza fra il punto di combustione e il filtro,
- ampiezza della brace
- coesione dei frammenti di tabacco all'interno della sigaretta.

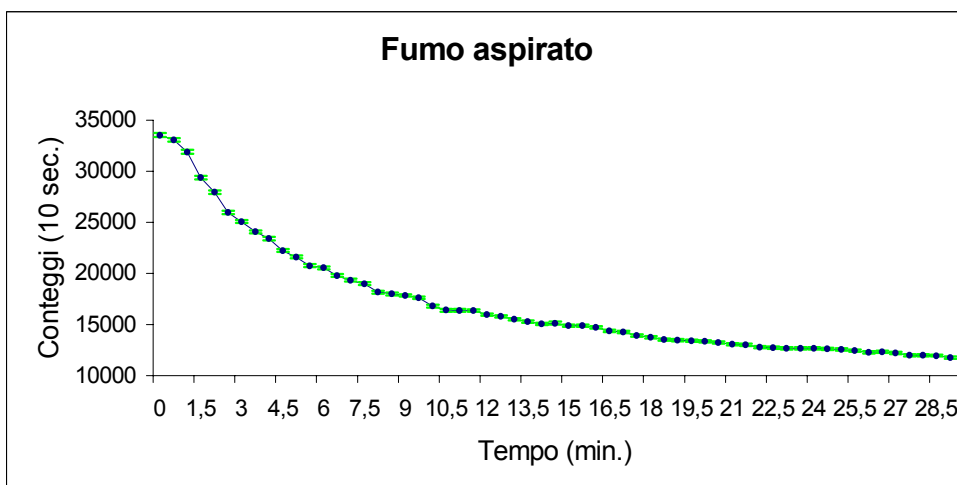
RISULTATI

E' noto che la chemiluminescenza accompagna in molti casi reazioni ossidative e radicaliche (16). Secondo Howen e Steele l'energia luminosa emessa come luminescenza può innescare direttamente o indirettamente un evento mutageno.(6).

Riportiamo di seguito il grafico risultante dalla misurazione della chemiluminescenza della fase gas del fumo di sigaretta prelevato per mezzo della siringa. Si può notare che i valori decrescono per circa 12-14 minuti dopo di che cominciano a risalire, fino a raggiungere un secondo picco e scendere di nuovo e , questa volta, definitivamente.



Abbiamo poi misurato l'emissione di luminescenza di una boccata di fumo aspirata, cioè passata attraverso i polmoni. In questo caso non si osserva il secondo picco di risalita della luminescenza; l'andamento è sempre decrescente. Abbiamo pensato che questo diverso comportamento fosse dovuto ad una reazione lenta che conducesse alla formazione di nuove sostanze radicaliche o di sostanze fortemente ossidanti, in grado di produrre nuova luminescenza.



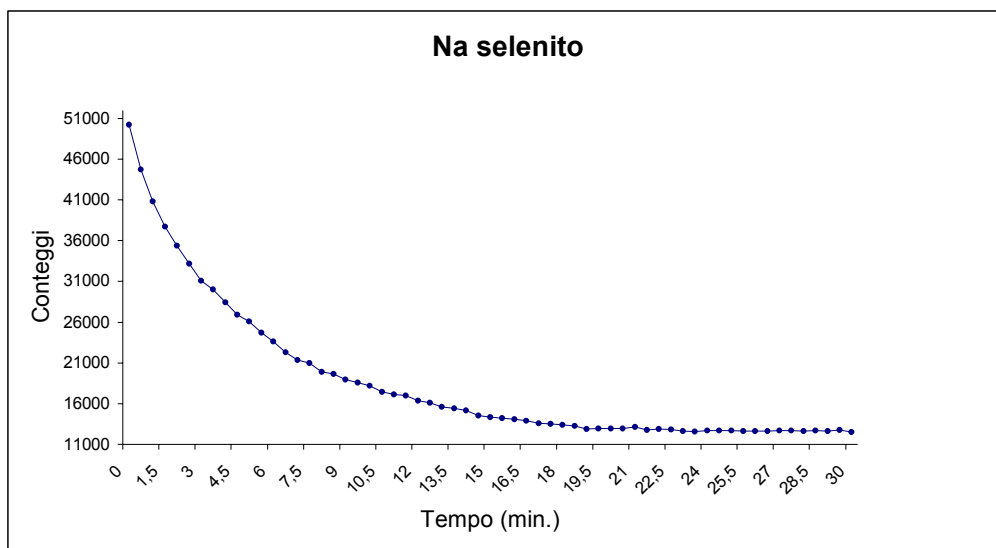
I reagenti coinvolti in questo evento sarebbero stati intrappolati nell'albero respiratorio dal momento che il fumo aspirato ed emesso non è in grado di dare il secondo picco di luminescenza. Questo comporta che il polmone, che sembra trattenere il materiale responsabile del secondo picco di luminescenza del fumo (come si può arguire da un confronto fra il segnale dato dal fumo passato dal polmone, contro quello dato dal fumo che invece non è stato aspirato), sarà esposto anche al danno di queste sostanze

Abbiamo cercato di osservare il ruolo di sostanze antiossidanti aggiunte al filtro della sigaretta. Tali sostanze sono state aggiunte, imbevendo il filtro di una soluzione concentrata della sostanza in esame, utilizzando come solvente o alcool o acqua a seconda delle caratteristiche della molecola da portare in soluzione. Elenchiamo di seguito le sostanze utilizzate e i risultati ottenuti.

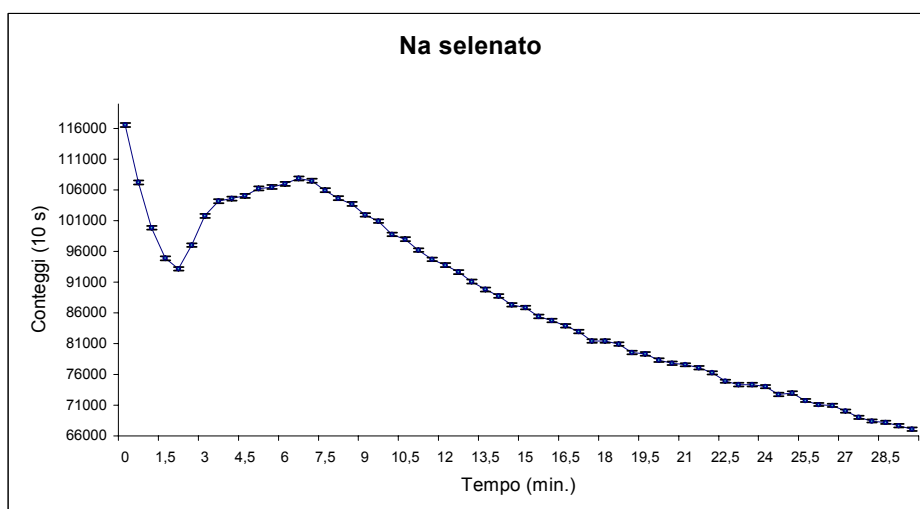
Sodio selenito. Uno studio del 1984 condotto sul fumo e sui rischi di cancro con esso correlati aveva messo in luce l'efficacia del selenio nella protezione contro il cancro (7). In tale studio si riferiva che un rapporto sull'analisi di tabacco, proveniente da Stati con alta e bassa incidenza di tumore, aveva evidenziato che quello che conteneva una tripla quantità di selenio rispetto agli altri proveniva da paesi in cui il tumore al polmone aveva incidenza più bassa (Messico e Colombia). Del resto in questi diversi tipi di tabacco, il contenuto di nicotina e di Po-210 era uguale a quello del tabacco proveniente da paesi con alta incidenza di tumore al polmone.

Si è verificato cosa comportasse un'aggiunta di selenito alla sigaretta nell'emissione della chemiluminescenza. Poiché aggiungere selenio al tabacco non garantisce che tutto passi nella fase gassosa, dal momento che presumibilmente una parte rimane nella cenere, abbiamo pensato di inserirlo in soluzione, direttamente nel filtro.

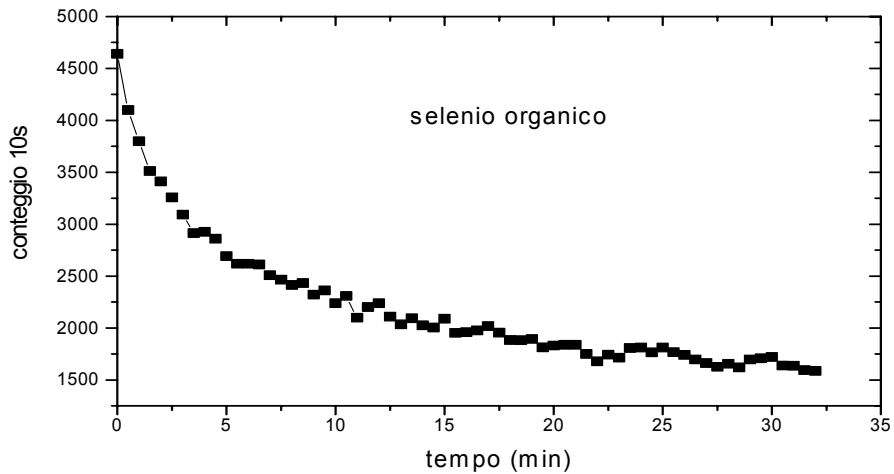
Di seguito mostriamo il grafico risultante. Come si può notare, il secondo picco di luminescenza è completamente sparito.



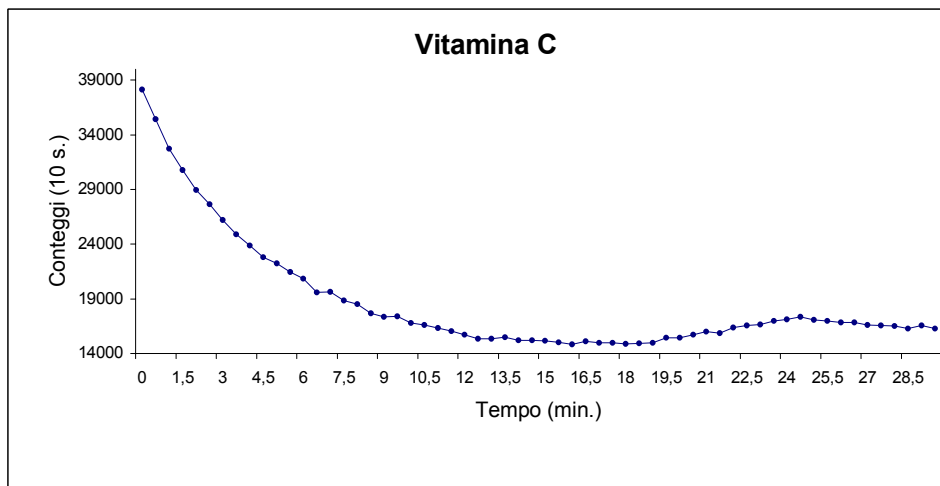
Sodio selenato. La stessa prova è stata fatta anche col selenato. Questo non solo non è in grado di abbattere il secondo picco, ma ne anticipa la comparsa. Una spiegazione di questo comportamento pensiamo sia da attribuire al fatto che, nel selenato, il selenio si trova nel suo massimo stato di ossidazione e che quindi non sia più in grado di svolgere attività antiossidante.



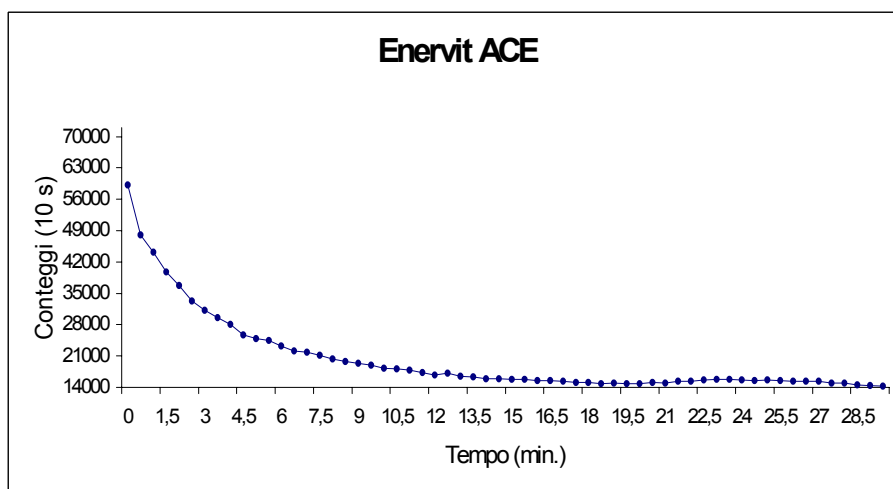
Abbiamo provato anche l'efficacia di composti organici del selenio. La selenio metionina in particolare ha abbattuto il secondo picco di luminescenza. Questo risulta essere in accordo con la riconosciuta attività di catturatore di radicali attribuita alla selenio-metionina.



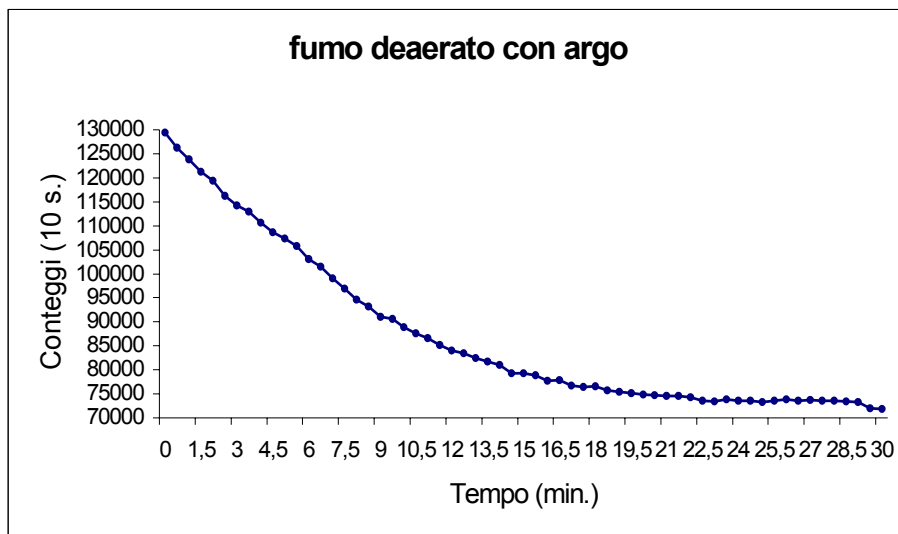
Vitamina C: La vitamina C è un potente antiossidante in quanto possiede la capacità di ossidarsi e ridursi reversibilmente da acido ascorbico a deidroascorbato e viceversa. Posta con la solita metodica nel filtro della sigaretta



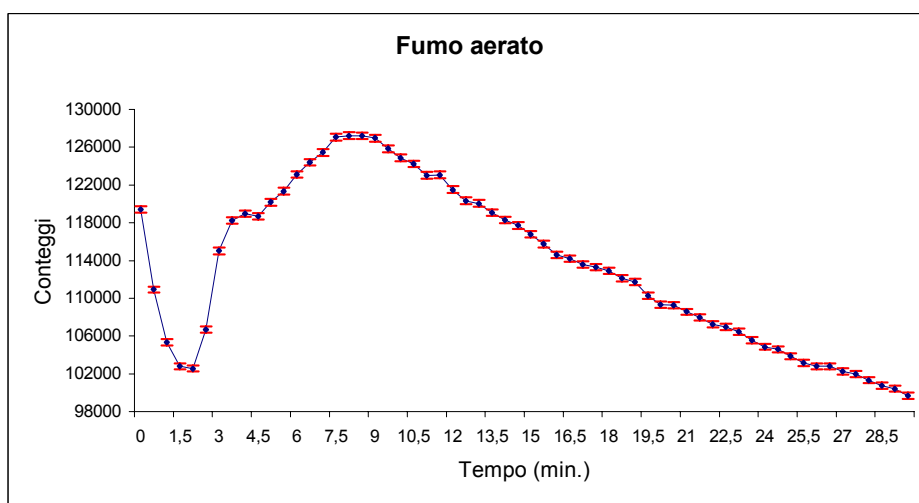
determina l'andamento di chemiluminescenza sotto mostrato. Poiché esistono in commercio numerosi composti contenenti selenio addizionato di vitamine A, C, ed E, è stata eseguita una prova anche con uno di questi prodotti prevedendo un comportamento analogo a quello dato da selenito e da vitamina C. I risultati sono stati, infatti, quelli attesi.



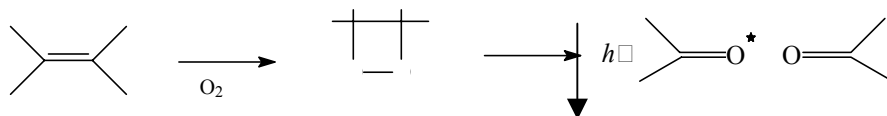
Per verificare l'ipotesi del coinvolgimento dell'ossigeno nella reazione che porta alla formazione dei composti che determinano il secondo picco di luminescenza, abbiamo deaerato la soluzione di fumo in liquido scintillante con argo. Il secondo picco non compariva più.



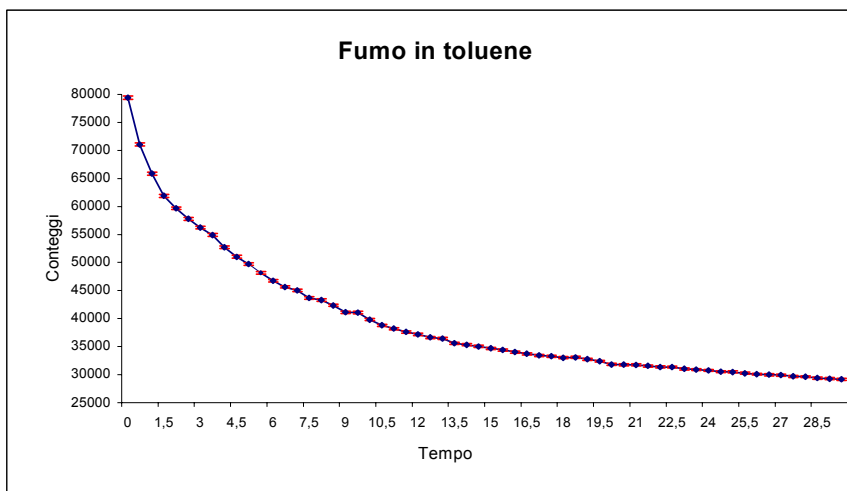
Questo sembrava confermare il coinvolgimento dell'ossigeno. Come controprova abbiamo aerato la soluzione di fumo con ossigeno. Abbiamo notato che il secondo picco di luminescenza si verificava più precocemente cioè dopo soli 2 minuti la curva riprendeva a salire per raggiungere il massimo dopo circa 9 minuti.



Sembra dunque che il ruolo dell'ossigeno sia determinante nella formazione di questa seconda emissione di luminescenza. Questo dato potrebbe suggerire l'ipotesi di un coinvolgimento dell'ossigeno singoletto in questa emissione di luce. Infatti da Pryor (1) apprendiamo che l'emissione di luminescenza può essere associata con l'ossigeno singoletto. Questo reagisce, con alta efficienza, coi doppi legami per dare 1,2-diossetani, i quali andranno incontro a rottura della molecola per dare frammenti contenenti un carbonile. Una parte di questi frammenti, circa il 15%, si trova in uno stato eccitato, e questa energia di eccitazione può essere emessa direttamente o trasferita a dei composti fluorescenti.



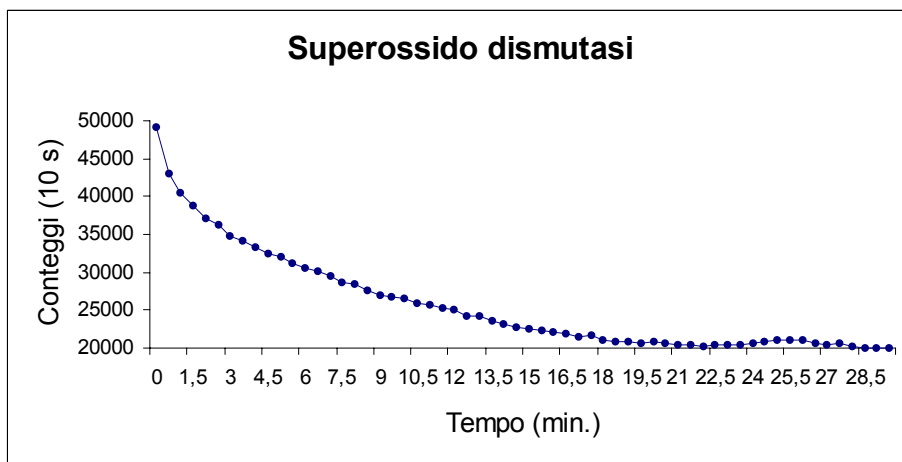
La miscela scintillante da noi utilizzata contiene una certa quantità di sostanze fluorescenti in un solvente organico tipo



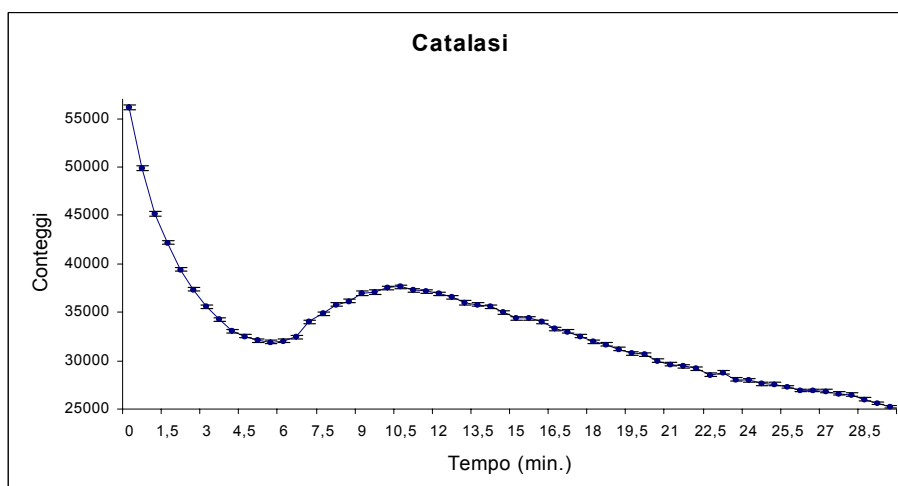
toluene o pseudocumene. Abbiamo così pensato di ripetere l'analisi del fumo utilizzando però il toluene al posto della miscela scintillante usata fino a questo momento. La mancata comparsa della seconda emissione di luminescenza sembrerebbe confermare questa ipotesi.

Quanto al diene, nel fumo è presente, a livelli piuttosto elevati, l'isoprene, un diene piuttosto reattivo. L'ossigeno singoletto si forma per dismutazione spontanea dell'anione superossido o per interazione di quest'ultimo con il radicale idrossile o con il perossido di idrogeno. Ora, queste specie radicaliche sono tutte presenti nel fumo poiché si formano dalla reazione fra il sistema redox Q/QH₂ (chinone/idrochinone) e l'ossigeno molecolare (8). Abbiamo dunque pensato di far passare il fumo attraverso la superossido dismutasi, una metalloproteina che catalizza la dismutazione dell'anione superossido e che costituisce uno dei principali sistemi enzimatici utilizzati per proteggere le cellule da questa specie reattiva dell'ossigeno.

Ci aspettavamo che la mancanza di anione superossido o la sua diminuita concentrazione modificasse la curva di emissione della luminescenza. L'analisi ha confermato la nostra ipotesi poiché il picco secondario non compare affatto.

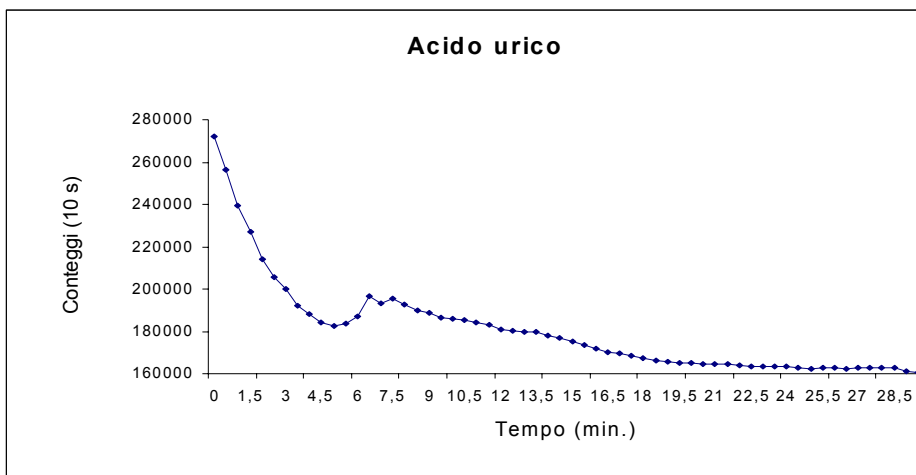
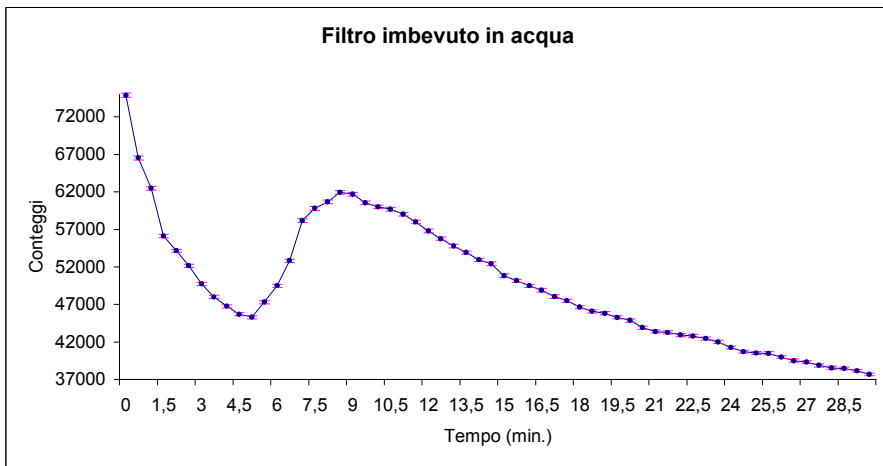


La catalasi invece non modifica in maniera significativa il grafico lasciando supporre che l'acqua ossigenata non abbia alcun ruolo nell'emissione della luminescenza del fumo di tabacco.

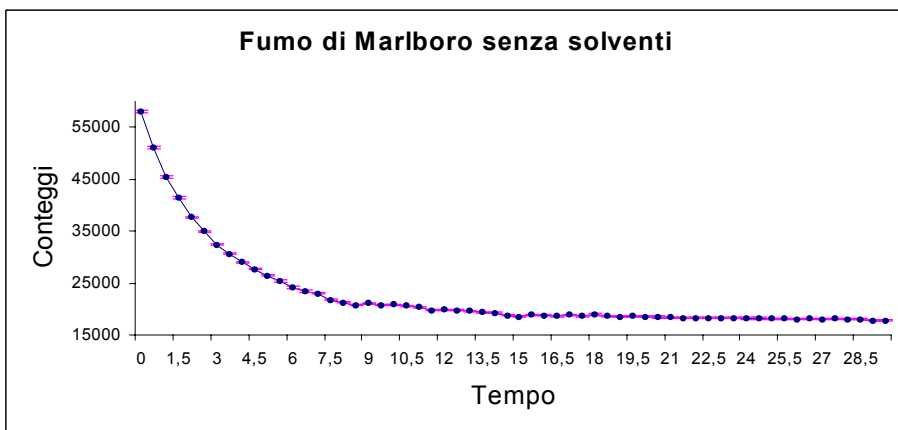


L'acido urico è uno scavenger e quencher di NO_2 , O_3 e ossigeno singoletto in vitro. Nel tratto respiratorio più alto, e in particolare nella saliva (25), il livello di urati risulta essere molto più elevato rispetto a quello di glutatione e di ascorbato che sono invece presenti in maggior misura nel polmone. Poiché il fumo che è passato attraverso il polmone, e dunque anche attraverso il tratto respiratorio alto, non presenta il secondo picco di luminescenza, abbiamo pensato che questo quenching potesse essere attribuibile anche all'azione degli urati.

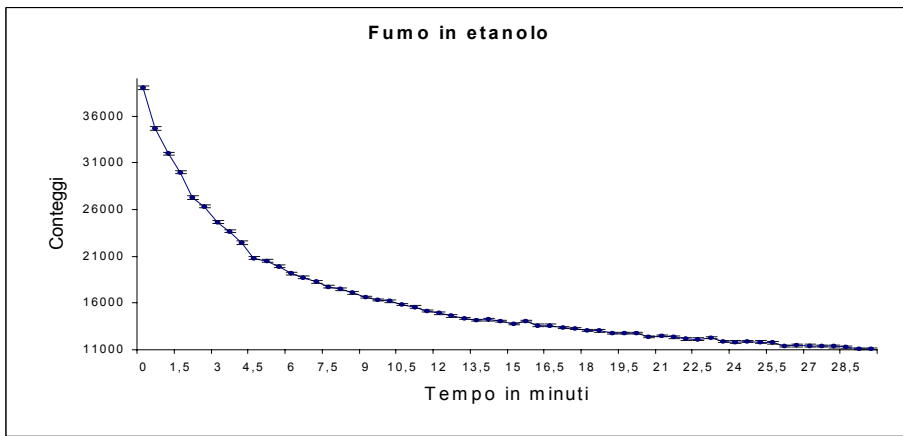
Dal grafico relativo alla prova con filtro imbevuto con acido urico si può notare un debole spegnimento, anche se meno significativo di quello atteso.



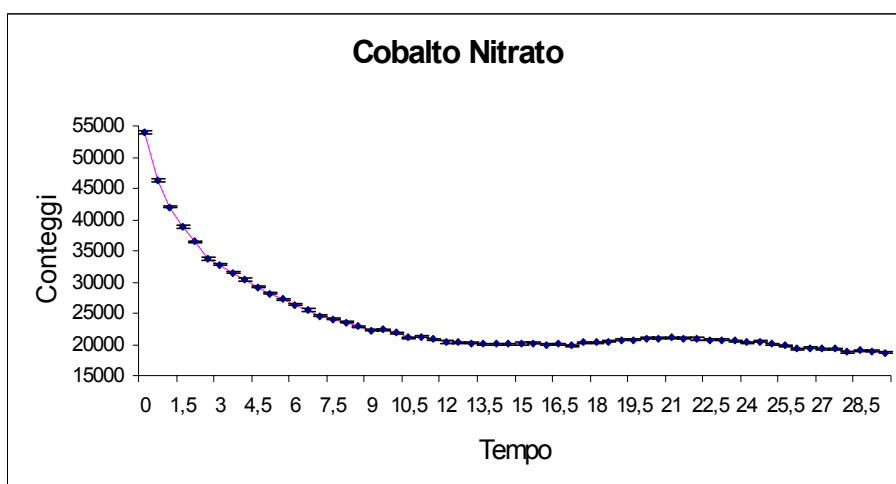
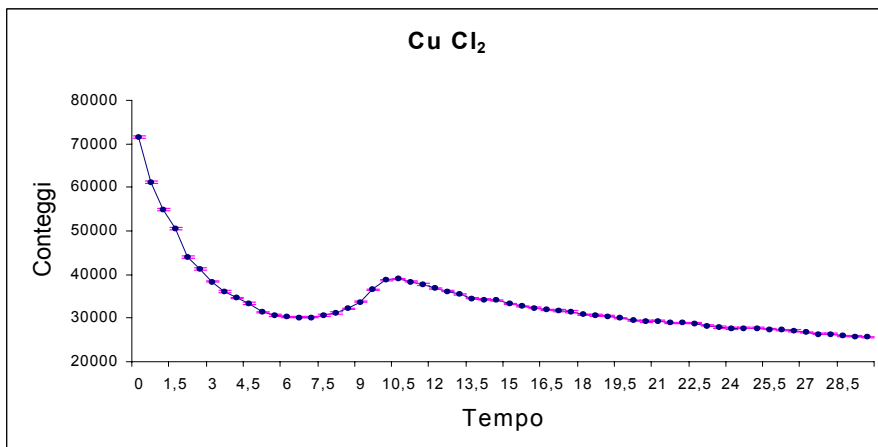
Abbiamo provato a sostituire ancora il solvente, utilizzando etanolo; poi a eliminare la presenza di un solvente mettendo il fumo da solo in un vial.

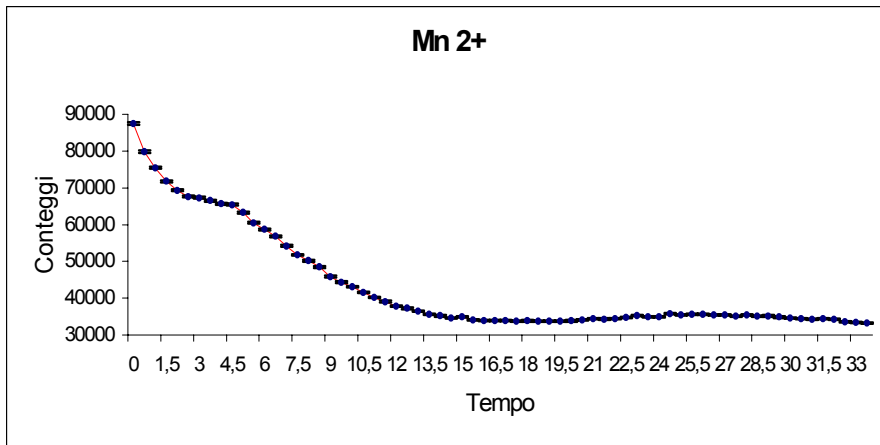


In entrambi i casi non si osserva il secondo picco di luminescenza

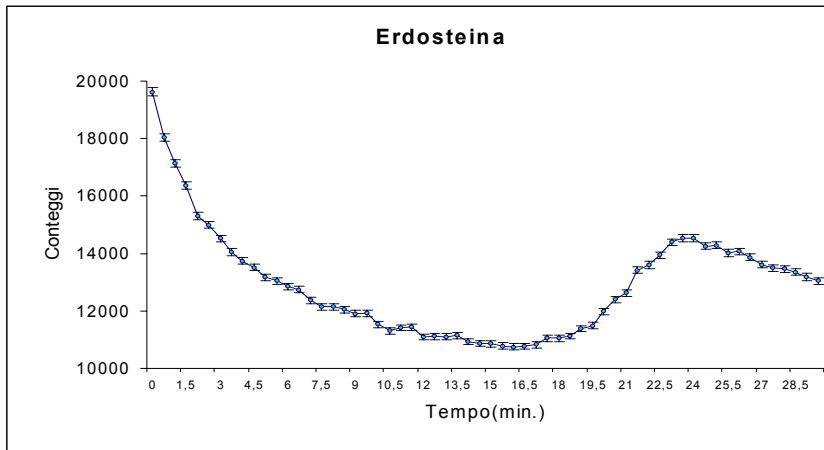


Uno dei meccanismi di propagazione nelle reazioni radicaliche è il trasferimento di elettroni. Gli ioni paramagnetici di metalli di transizione possono trasferire un elettrone ai perossidi. Abbiamo verificato quale fosse l'emissione di luminescenza del fumo di una sigaretta il cui filtro fosse stato imbevuto in una soluzione acquosa di alcuni ioni paramagnetici. Le sostanze provate sono state il cobalto nitrato, il cloruro rameico e il manganese allo stato di ossidazione più basso.

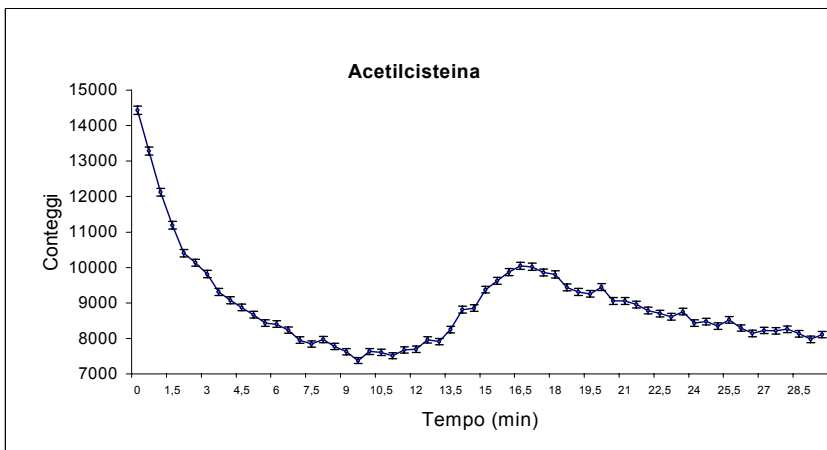


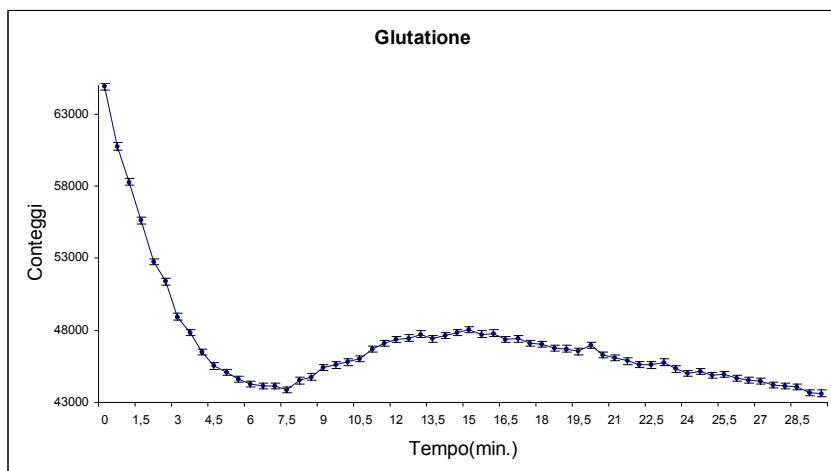


L'**acetilcisteina** e l'**erdosteina**, derivati tiolici che si sono dimostrati efficaci in molte affezioni bronchiali e polmonari causate dal fumo, non hanno eliminato la seconda emissione di luminescenza. Tuttavia questi composti sono stati efficacemente utilizzati in terapia come antiossidanti, per bloccare l'ossidazione degli inibitori delle proteasi e prevenire il danno tissutale (9,10).



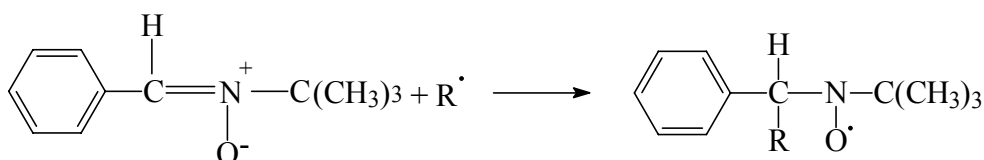
Una spiegazione di ciò può essere che l'efficacia di queste sostanze si attua solo in vivo in quanto sopperiscono alla deplezione di glutatione causata dall'esposizione al fumo di tabacco. Infatti quando assunta oralmente, l'acetilcisteina viene rapidamente assorbita, deacetilata, e incorporata nelle riserve intra ed extracellulari di glutatione, uno dei sistemi enzimatici più importanti nella detossificazione dei composti reattivi dell'ossigeno. Abbiamo dunque provato l'attività del **glutatione** che ha dimostrato avere l'effetto di accelerare la scomparsa del segnale, dal momento che la curva scende più rapidamente, ma si dimostra meno efficace nel far scomparire il secondo picco. Questo infatti è ancora presente, se pure meno pronunciato.





Spettroscopia EPR della fase aeriforme del fumo di sigaretta

I radicali della fase aeriforme del fumo di sigaretta possono essere studiati o dopo condensazione del fumo a temperature molto basse oppure, a temperatura ambiente, utilizzando la tecnica di spin trapping. Questa tecnica consiste nell'intrappolare radicali instabili con composti che diano radicali più stabili e duraturi nel tempo e che pertanto possano essere rilevati attraverso l'EPR.



Per questa analisi abbiamo utilizzato una soluzione 0,10 M di α -fenil -*N-tert*-butil nitrono (PBN) della Aldrich Chem nel liquido scintillante Ready SolvTM CP della Beckman. Il fumo di un'intera sigaretta, aspirato da una siringa di plastica da 50 ml, veniva fatto passare attraverso due ml della soluzione di nitrono con un sistema a flusso continuo. La soluzione era poi trasferita in un capillare cilindrico di quarzo, deossigenata per mezzo di un flusso di azoto per un minuto e quindi posta nello spettrometro EPR per l'analisi.

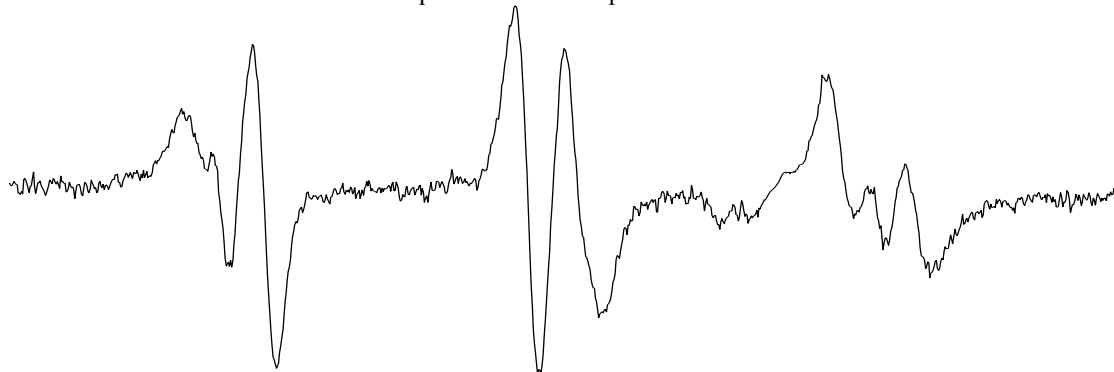
Gli spettri sono stati registrati con uno spettrometro Bruker ESP 300.

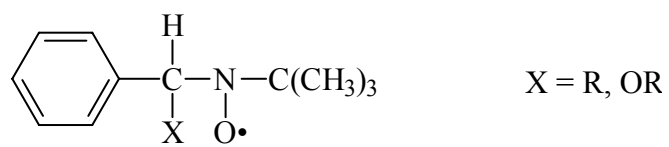
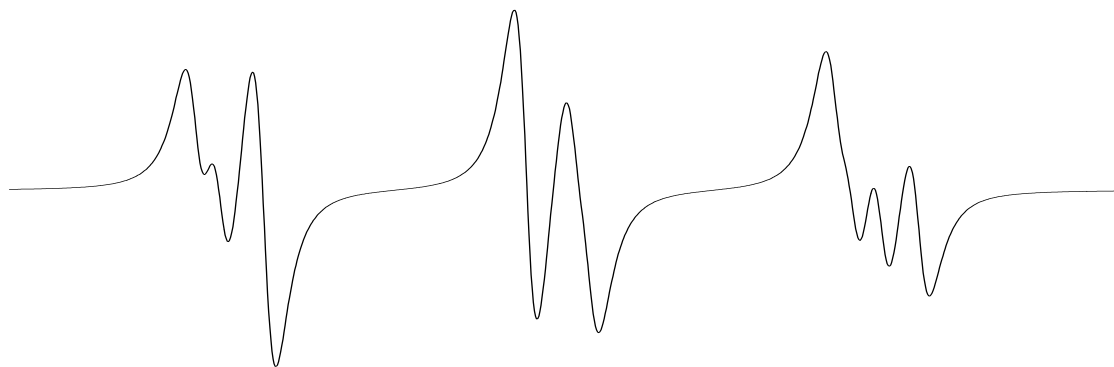
Risultati

Lo spettro EPR ottenuto mostra una costante di accoppiamento caratteristica dell'addotto paramagnetico che si ottiene per addizione di un radicale alchilico o alcossilico al PBN e resta pressoché costante per 1000 secondi, poi, a 1200 secondi, scompare l'alcossile e rimane solamente il radicale alchilico.

Sappiamo che la vita di questi radicali è inferiore a un secondo, quindi più breve del tempo che il fumo impiega a passare attraverso la sigaretta e da questa allo spin trap. Tuttavia la concentrazione di questi radicali risulta piuttosto alta nella fase gas del fumo di sigaretta.

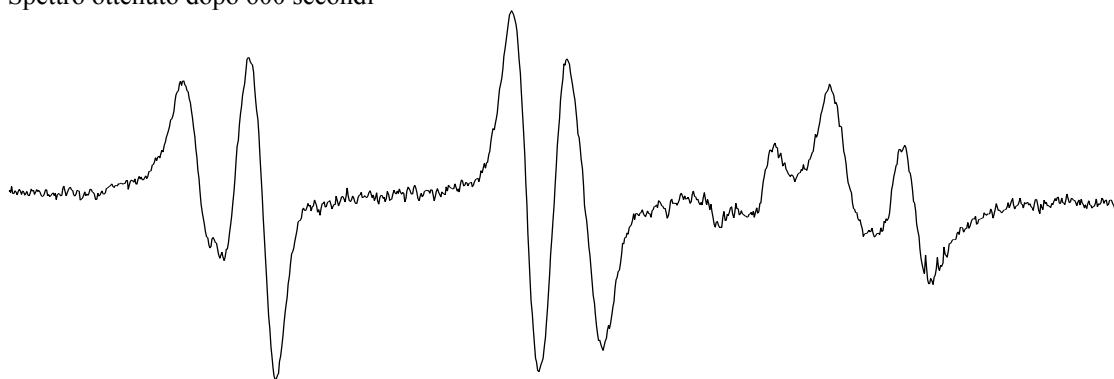
Spettro ottenuto dopo 100 secondi



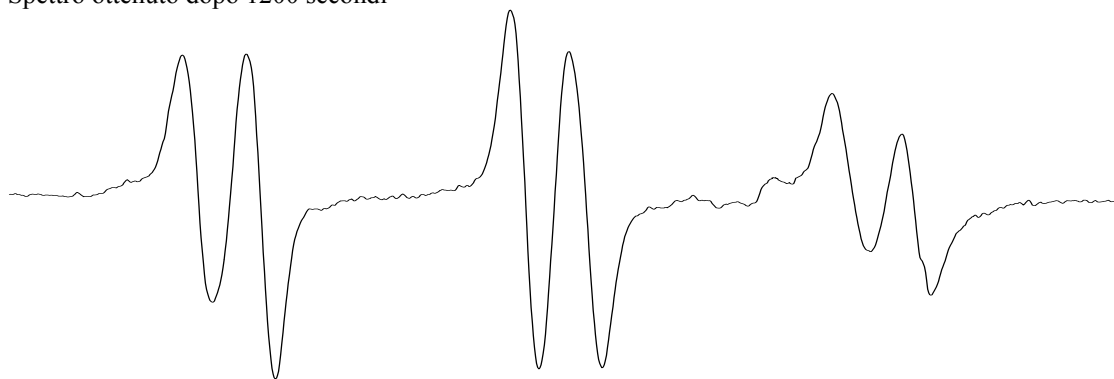


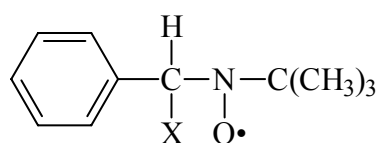
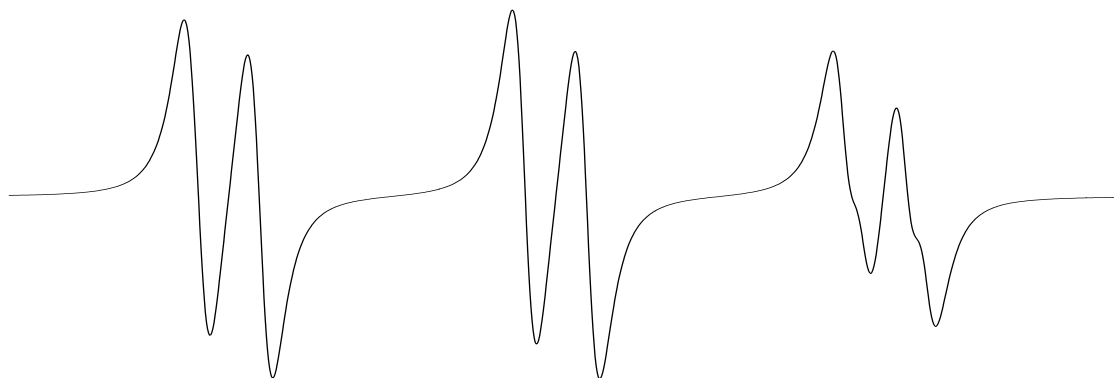
$a(\text{N}) = 14.64$ Gauss, $a(\text{H}) = 2.91$ Gauss, X=R
 $a(\text{N}) = 13.68$ Gauss, $a(\text{H}) = 2.05$ Gauss, X=OR

Spettro ottenuto dopo 600 secondi



Spettro ottenuto dopo 1200 secondi





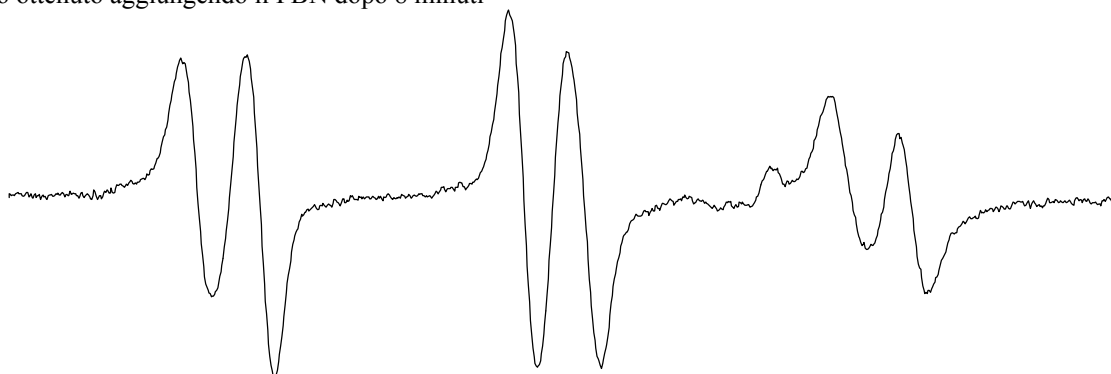
X = R, OR

$a(N) = 14.64$ Gauss, $a(H) = 2.91$ Gauss, X=R

$a(N) = 14.29$ Gauss, $a(H) = 2.76$ Gauss, X=R

Abbiamo provato a far invecchiare il fumo per cinque, sei minuti prima di intrappolarlo.

Spettro ottenuto aggiungendo il PBN dopo 8 minuti

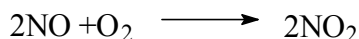


Non solo i radicali sono ancora presenti, ma la resa dell'addotto paramagnetico risulta essere più alta. Questi tempi lunghi non possono certo corrispondere a quelli di radicali ossigeno o carbonio che abbiamo prima ipotizzato, poiché questi radicali dovrebbero avere un tempo di vita di meno di un secondo nel fumo. Quindi una conclusione è che i radicali organici che abbiamo intrappolato nella fase gas del fumo, non possono essere quelli che si erano formati durante il processo di combustione. I radicali che si formano dalla combustione del tabacco sono a breve vita e devono aver terminato le loro reazioni mentre fluiscono attraverso la lunghezza della sigaretta, mentre cioè attraversano il tabacco; non possono perciò raggiungere la soluzione intrappolatrice né i polmoni dei fumatori.

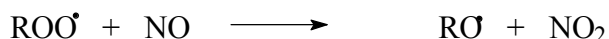
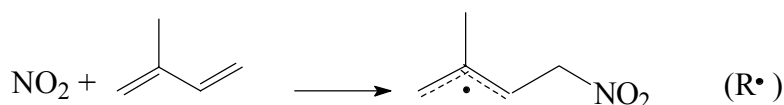
Per dare una risposta all'apparente contraddizione fra la brevità della vita dei radicali che abbiamo intrappolato e i tempi più lunghi di vita mostrati, Pryor e Stone (11) hanno proposto un'ipotesi di stato-stazionario per la formazione dei radicali nel fumo di sigaretta.

Uno dei meccanismi attraverso cui i radicali potrebbero essere continuamente formati nel fumo implica reazioni degli ossidi di azoto con altri componenti del fumo. Si è visto che la concentrazione di NO₂ nel fumo un po' invecchiato segue un andamento nel tempo notevolmente simile a quello della formazione di radicali organici misurati attraverso la comparsa di addotti paramagnetici.

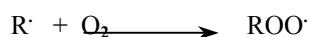
Dunque i radicali da noi intrappolati possono derivare dal biossido di azoto presente nel fumo, in questo modo: il fumo fresco contiene poco o nulla NO₂, piuttosto contiene NO come principale ossido di azoto. Il valore di NO nel fumo è estremamente alto rispetto al suo valore nello smog, essendo dell'ordine di 300-500 ppm. L'ossido di azoto (NO) è relativamente inerte (non reattivo) con la maggior parte delle sostanze organiche, ma subisce una lenta ossidazione in aria a biossido di azoto (NO₂) molto più reattivo.



Il biossido di azoto può facilmente reagire con la maggior parte delle specie chimiche presenti nel fumo. L'isoprene, ad esempio, è un diene reattivo presente a livelli elevati nel fumo. La reazione che secondo Pryor potrebbe verificarsi nel fumo, in stato stazionario, fra NO e isoprene è questa :



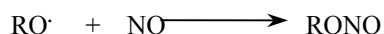
Il biossido di azoto si lega rapidamente ai dieni quali isoprene per generare radicali alchilici. Questi dovrebbero poi essere rapidamente intrappolati dall'ossigeno presente nel fumo per dare radicali perossidici.



Alla fine i radicali perossidi sono rapidamente deossigenati ad alcossili dall'ossido di azoto

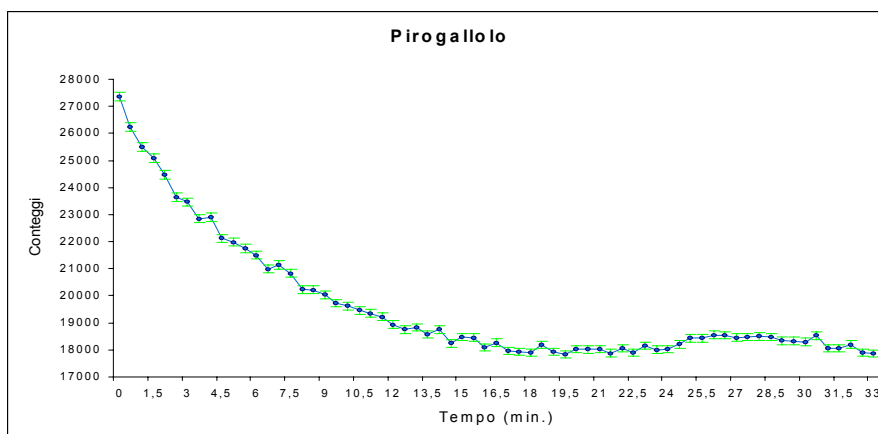


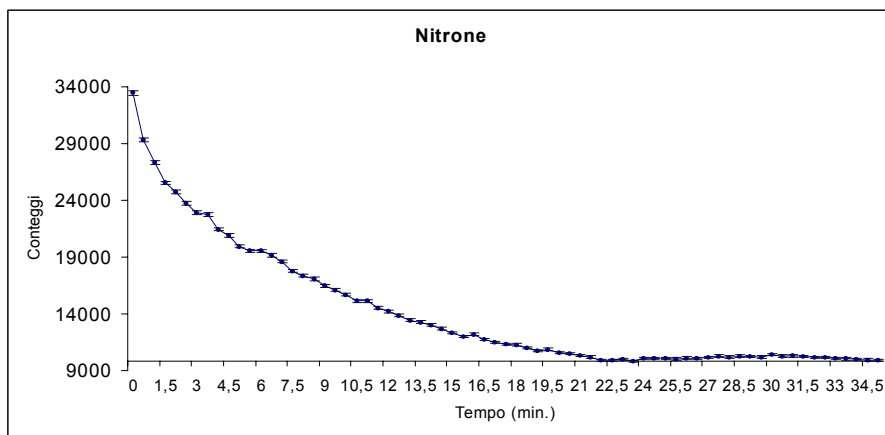
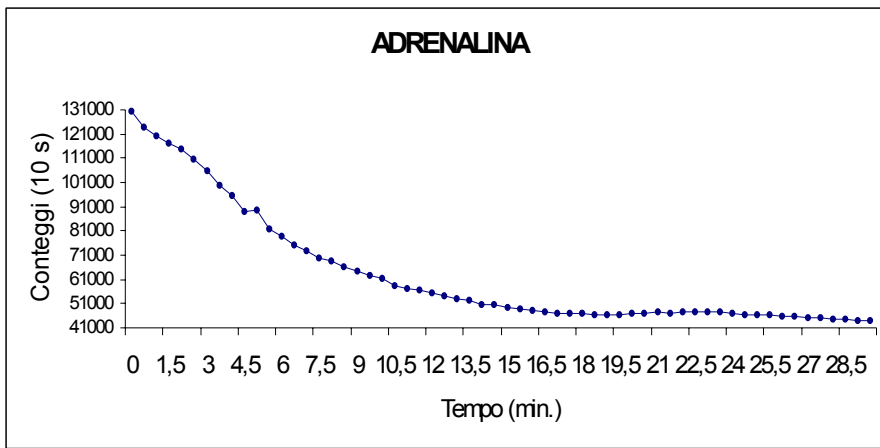
Questa reazione può produrre quei radicali alchilici ed alcossilici che noi intrappoliamo. Tuttavia noi non osserviamo addotti di radicali perossidati, probabilmente perché la loro rapida deossigenazione operata da NO mantiene la loro concentrazione bassa. Una possibile conclusione di queste reazioni è la seguente:



Alcuni di questi prodotti finali potrebbero avere importanza tossicologica. Che gli ossidi di azoto reagiscano prontamente con altri costituenti della fase gas del fumo di sigaretta è stato già confermato dalle misure, effettuate da Klimisch, della concentrazione di questi ossidi nel fumo fresco e in quello invecchiato di qualche minuto: il fumo, già dopo 3-4 minuti contiene una quantità enormemente più bassa di ossidi di azoto (12). Ma il modello proposto è solo uno dei possibili meccanismi di formazione dei radicali nel fumo. Il fumo di sigarette è una tale complessa miscela di specie diverse che ci sono quasi certamente altri percorsi di reazione che possono essere responsabili della produzione di radicali. L'indagine mediante spettroscopia EPR non ha evidenziato nessun cambiamento nella composizione del fumo, nel tempo di 20 minuti. L'analisi mediante chemiluminescenza aveva invece mostrato una seconda emissione dopo circa 10 minuti. Da ciò si potrebbe evincere che il secondo picco di luminescenza sia da attribuire a composti non radicalici e ciò potrebbe convalidare l'ipotesi del coinvolgimento dell'ossigeno singoletto, esposta precedentemente.

A questo punto abbiamo voluto analizzare mediante chemiluminescenza un campione di fumo in miscela scintillante a cui fosse stato aggiunto il nitrone: il secondo picco non compare. Lo stesso si verifica quando si aggiungono pirogallolo e adrenalina, due composti catecolici, che cedendo l'idrogeno fenolico ad alchili ed alcossili, li stabilizzano formando il radicale fenossilico che è piuttosto stabile e non dà luogo a reazioni a catena.

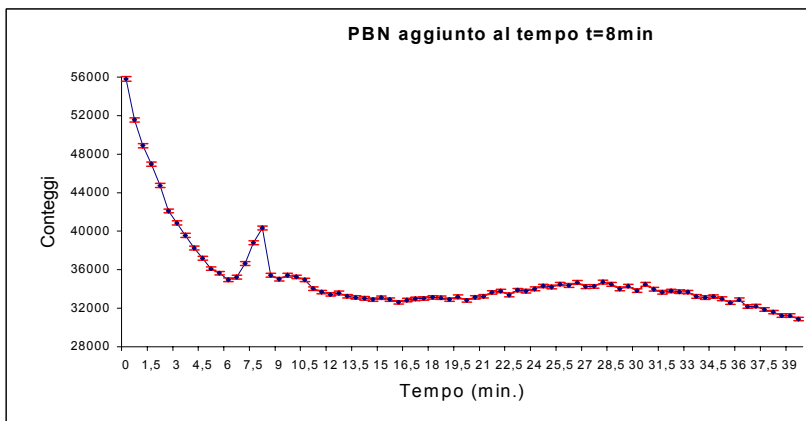




Questa prova sperimentale porterebbe a pensare che la presenza dei radicali giochi comunque un ruolo fondamentale nella seconda emissione di luminescenza. Diminuendone la concentrazione, non compare più quel secondo picco che si verificava dopo circa 10 minuti dalla fumata.

Abbiamo voluto vedere che cosa accadesse aggiungendo il PBN al tempo in cui la curva di luminescenza stava risalendo. Abbiamo quindi messo il fumo nello scintillatore, cominciato i conteggi e, quando abbiamo rilevato che i valori stavano crescendo, abbiamo interrotto i conteggi e aggiunto al vial 2 ml di soluzione 0,1 M di PBN in miscela scintillante; dopo questa operazione abbiamo ricominciato il conteggio.

Il grafico mostra che i valori si abbassano improvvisamente: il secondo picco non si forma più. Sembra che le sostanze responsabili di questa seconda emissione di luminescenza siano state intrappolate dal nitrone.



DISCUSSIONE DEI DATI E CONCLUSIONI

L'indagine condotta ci ha permesso di individuare quasi casualmente, nel corso di una ricerca sperimentale sulla radioattività alfa del fumo di tabacco, la presenza di una reazione ritardata determinata dagli ossidanti e radicali liberi presenti nelle oltre 4.000 sostanze presenti nel fumo di sigaretta e che determina la formazione del secondo picco di luminescenza riscontrato

Sebbene altri studi fossero stati condotti sul fumo di sigaretta mediante la chemiluminescenza, mai era stata individuata, per quanto abbiamo potuto verificare dalla letteratura, questa seconda emissione. La ragione di ciò è da attribuirsi al fatto che nelle precedenti sperimentazioni erano stati usati solventi quali il toluene, l'etanolo, l'acqua e altri ancora, ma mai una miscela scintillante che potesse far uscire allo scoperto la 2° emissione di radicali liberi rappresentata dal 2° picco del grafico. Come abbiamo mostrato, il fumo in questi diversi solventi non dà il secondo picco di luminescenza, cosa che accade invece solo quando viene usato lo scintillante. Le miscele da noi utilizzate consistono in un solvente, che può essere toluene, xilene o pseudocumene, in un soluto principale che è il 2,5-difenilossazolo (PPO) e in un soluto secondario presente in quantità minori. Questo significa che la presenza dello scintillante è determinante per l'emissione del secondo picco di luminescenza. Ciò ci ha portato a concludere che la reazione responsabile di questa seconda emissione sia in realtà una reazione "buia", cioè che i composti che si formano non emettano luce, ma trasferiscano energia allo scintillante.

Mentre l'energia dalla prima reazione (quella che determina la prima emissione di luminescenza) può essere sufficiente a eccitare i diversi solventi utilizzati, l'energia liberata nella reazione del secondo picco è inferiore e può eccitare solo il soluto della miscela scintillante. Pensiamo che questa reazione coinvolga delle specie radicaliche in quanto viene immediatamente interrotta dall'aggiunta di uno spin trapping: l' α -fenil-N-tert-butil nitrono (PBN).

Abbiamo inoltre dimostrato il ruolo determinante dell'ossigeno perché deaerando la soluzione il secondo picco non compare e ossigenando compare invece molto più precocemente e con una maggiore intensità.

Gli scavengers di radicali e gli antiossidanti che abbiamo introdotto nel filtro di sigaretta si sono, in molti casi (selenio, vitamina A, C), rivelati efficaci nell'abbattere il secondo picco di luminescenza e quindi nel contrastare la formazione di una quota supplementare di radicali. Da notare che i reagenti coinvolti nella reazione che determina la seconda emissione di luminescenza in vivo vengono intrappolati e assorbiti o inattivati nell'apparato respiratorio, visto che il fumo aspirato ed emesso non è in grado di dare questo secondo picco di luminescenza. Del selenio, vitamina A, C, E, già conosciuti come antiossidanti e scavengers di specie radicaliche, assunti oralmente, solo una piccola parte raggiunge per via generale l'apparato respiratorio, dove appunto sarebbero più necessarie al soggetto fumatore. E' stato infatti dimostrato che diete più o meno ricche di selenio, vitamina A, vitamina C ed E sebbene non alterino significativamente la risposta infiammatoria nei criceti esposti al fumo di sigaretta (13), tuttavia sembrano proteggere i fumatori dai danni ossidativi sul DNA con riduzione del rischio di cancro (26, 27) e di altre patologie da radicali liberi fumo-correlate come l'arteriosclerosi (28).

Comunque l'efficacia di queste sostanze sarebbe senza dubbio maggiore se portate direttamente al polmone. Nell'impossibilità pertanto di compartimentalizzare a livello broncopolmonare queste sostanze antiossidanti il poterle porre nel filtro, consentirebbe il blocco di questi importanti agenti infiammatori per il fumatore.

Due quindi le possibili ricadute:

- a) una di tipo culturale: il carico ossidativo da fumo di sigaretta è molto più pesante di quello fino ad oggi conosciuto (1° + 2° picco) in un range stimato di 10^{13} - 10^{18} radicali/sigaretta fumata.
- b) Una di tipo pratico: potrebbero essere studiati dei filtri-protesi oppure delle sigarette con filtro trattato con sostanze antiossidanti per entrambi i picchi, cercando ovviamente di mantenere inalterate le caratteristiche organolettiche della sigaretta: un compromesso che potrebbe ridurre sensibilmente nel tempo l'incidenza di enfisemi polmonari e tumori.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Pryor W.A.: Free radicals in biology. Vol. 1, 3. Academic press, New York, 1976.
- 2) Bielski B.H.J.: Reactivity of H₂O/O₂ radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 14:1041-1100, 1985.
- 3) Muggli R.: Free radicals tissue damage: the prospective role of antioxidant nutrients. In: Free radicals and antioxidants in nutrition; 189-201. London: Richelieu Press, 1993.
- 4) Rampoldi C.: Antiossidanti: dalla terapia alla pratica clinica. *GIMT1*: 15-19, 1998.
- 5) Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, 1989.
- 6) Howes R.M., Steele R.H. Chemiluminescence of cigarette smoke. *Physiol. Chem. & Physic.*, 8:417-428, 1976.
- 7) Chortyk O.T., Schlotzhaner M.S.: Increasing selenium in cigarettes and smoke: transfer to smoke. *Archives of Environmental Health*, 39(6):419-424, 1984.
- 8) Pryor W.A., Prier D.G., Church D.F.: Electron spin resonance of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ. Health Persp.*, 47:345-355, 1983.
- 9) Dechant K.L., Noble S.: Erdosteine. *Drugs*, 52(6):875-881.
- 10) Van Zand Wijk N.N.: N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest*, 107(5):1437-1441, 1995.
- 11) Pryor W.A., Stone K.: Oxidant in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Annals New York Academy of Science*:12-27, 1993.
- 12) Klimisch H.J., Kircheim E.: Quantitative determination of nitrogen oxide in cigarette smoke by means of chemiluminescence. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163(1):48-52, 1977.
- 13) Niewoehner D.E., Peterson F.J., Hoidal J.R.: Selenium and vitamin E deficiencies do not enhance lung inflammation from cigarette smoke in the hamster. *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 127:227-230, 1983.
- 14) Church D.F., Pryor W.A.: Free radicals chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 64:111-126, 1985.
- 15) Pryor W.A., Hales B.J., Pnemovic P.I., Church D.F.: The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science*, 220:425-427, 1983.
- 16) Richards G.A., Theron A.J., Van Der Nerwe C.A., Anderson R.: Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence responses of activated blood phagocytes. *Ann. Rev. Resp. Dis.*, 139:181-187, 1989.
- 17) Fenner M.L., Braven J.: The mechanism of carcinogenesis by tobacco smoke: further experimental evidence and a prediction from the thio-defence hypothesis. *Br. J. Cancer*, 22:474-479.
- 18) Janoff A., Carp H., Lee D.K.: Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*, 206:1313-1314, 1979.
- 19) Behr J.: Inflammation and oxidative stress in lung fibrosis.
- 20) Cantin A.M., North S.L., Fells G.A., Hubbard R.C., Crystal R.G.: Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin Invest* 1987; 79:1665-1673.
- 21) Asami S., Manabe H., Miyake J et al.: Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997; 18:1763-1766.
- 22) Repine J.E., Lnakhorst I.L.M., Bast A., and the oxidative stress group: Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. J. Respiratory Crit. Care Med.* 1997; 156:341-357.
- 23) Leanderson P., Tagesson C.: Cigarette smoke potentiates the DNA-damaging effect of manmade mineral fibers. *Ann. J. Ind. Med.* 1989; 16:697-706.
- 24) Banerjee K.K., Marimuthu P., Sakar A., Chaudhuri B. N.: Influence of cigarette smoking on Vitamin C, glutathione and lipid peroxidation status. *Indian J. Public Health.* 1998 Jan-Mar; 42(1):20-23.
- 25) Kondakova I., Lissi E.A., Pizarro M.: Total reactive antioxidant potential in human saliva of smokers and non-smokers. *Biochem Mol. Biol. Int.* 1999 Jun; 47(6):911-920.
- 26) Hecht S.S.: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Nat. Cancer Inst* 1999 Jul 21; 91(14):1194-1210.
- 27) Lee B.M., Lee S.K., Kim H.S.: Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 1988 Oct 23; 132(1-2):219-227.
- 28) Mays B.W., Freischlag J.A., Eginton M.T., Cambria R.A., Seabrook G.R., Towne J.B.: Ascorbic acid prevents cigarette smoke injury to endothelium-dependent arterial relaxation. *J. Surg. Res.* 1999 Jun. 1;84(1):35-39.
- 29) Del Donno M., Verduri A.: I radicali liberi e i meccanismi ossido-riduttivi. *Eur Resp News* 1999; 3:238-343.