

MeB – Pagine Elettroniche

Volume XI

Gennaio 2008

numero 1

IL PUNTO SU

Gli antiossidanti nello stress ossidativo della talassemia e dell'anemia falciforme.

Antonella Savelli, Lisa Pecorari, Maria Marsella, Caterina Borgna-Pignatti

Clinica Pediatrica, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Ferrara

Abstract

Under normal conditions the organism is equipped with antioxidant systems capable of neutralizing endogenous free radicals. When the production of reactive species exceeds the defense mechanisms, a condition called oxidative stress occurs. Thalassemia and sickle cell disease are two hereditary disorders with high potential for oxidative damage due to both physiopathological mechanisms of the diseases and iron overload. We described main antioxidant agents used both in healthy individuals and iron overloaded patients in order to prevent and limit oxidative damage.

Indirizzo per corrispondenza: bre@unife.it

SUMMARY

RIASSUNTO

In condizioni fisiologiche nell'organismo vi è uno stato di equilibrio tra la produzione endogena di radicali liberi e la capacità di neutralizzarli da parte dei sistemi antiossidanti.

Quando la produzione di specie reattive incrementa a tal punto da superare i meccanismi di difesa endogeni, si instaura una condizione definita comunemente "stress ossidativo".

Questo fenomeno è particolarmente spiccato in alcune anemie ereditarie quali la talassemia e l'anemia falciforme, ed è dovuto sia ai meccanismi fisiopatologici propri della malattia sia al sovraccarico di ferro (Fe).

In questo articolo abbiamo preso in considerazione i principali agenti antiossidanti noti, alcuni dei quali vengono utilizzati, somministrati a soggetti sani e a individui esposti a sovraccarico di Fe, nel tentativo di prevenire o quantomeno limitare, i danni da radicali liberi.

I radicali liberi sono specie chimiche che hanno un singolo elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. L'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata durante la reazione con molecole organiche ed inorganiche (proteine, lipidi, carboidrati), in particolare con molecole chiave nelle membrane e con gli acidi nucleici¹. La continua esposizione a radicali liberi derivanti sia da fonti esogene (luce solare, radiazioni, inquinamento) sia endogene, dà il via ad una cascata di processi dannosi per l'organismo².

Essendo implicati nella patogenesi dell'invecchiamento e di molte malattie, tra cui l'aterosclerosi, il diabete e il cancro, l'importanza delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) ha assunto sempre maggiore rilievo nel corso degli ultimi anni.

In condizioni fisiologiche vi è uno stato di equilibrio tra la produzione endogena di radicali liberi e la loro neutralizzazione da parte dei meccanismi antiossidanti di difesa (Figura 1). Quando la produzione delle specie radicaliche eccede la capacità del nostro organismo di eliminarle si determina una condizione definita stress ossidativo.

Gli antiossidanti endogeni interagiscono con i radicali liberi e, donando loro un elettrone, li neutralizzano. Le sostanze antiossidanti assunte con la dieta agiscono invece da "spazzino" o scavenger, per usare il termine inglese, aiutando così a prevenire il danno cellulare e tissutale².

Lo stress ossidativo determina un aumento dei livelli plasmatici dei prodotti di perossidazione lipidica quali la malondialdeide (MDA), l'esanale e il 4-idrossinonenale³.

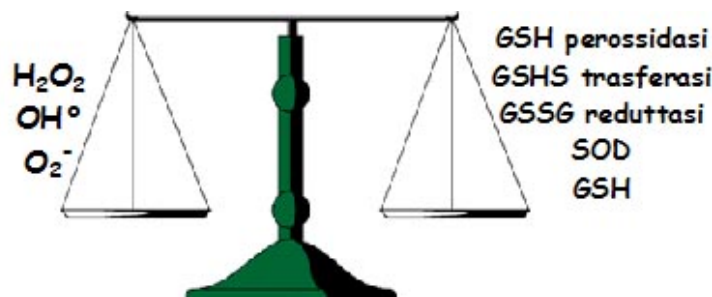


Figura 1. Equilibrio fisiologico tra produzione di ROS e loro eliminazione attraverso gli enzimi antiossidanti endogeni

Anche le proteine possono subire modificazioni covalenti indotte dai ROS o prodotti intermedi dello stress ossidativo. In particolare, tra tutti gli aminoacidi, la cisteina e la metionina, risultano essere quelli più suscettibili all'ossidazione.

In alcune anemie ereditarie, quali la talassemia e l'anemia falciforme, è presente un notevole stress ossidativo in parte legato alla fisiopatologia della malattia stessa, in parte secondario al sovraccarico di Fe trasfusionale. Nella beta-talassemia, le catene alfa-globiniche non appaiate tendono a precipitare nella cellula causando eritropoiesi inefficace e contribuendo anche ad aumentare la formazione di sostanze ossidanti⁴.

Reazione di Fenton



Reazione di Haber-Weiss

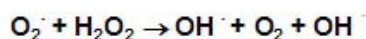


Figura 2. Reazione di Fenton e Haber-Weiss

Lo stress ossidativo produce una marcata elevazione dei livelli di lipidi e proteine perossidati. L'aumento delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate è, nell'individuo normale, un importante fattore nell'insorgenza e nella progressione di lesioni aterosclerotiche⁶. Come accennato, alti livelli di MDA sono una conferma della presenza di ROS.

Nei soggetti talassemici questo prodotto di perossidazione lipidica è correlato con i livelli di Fe sierico e del Fe non legato alla transferrina. Uno studio del 2006, condotto su cinquanta bambini talassemici trasfusione-dipendenti, ha rilevato alti livelli sia dei markers di danno ossidativo sia di tutti gli enzimi antiossidanti ad eccezione della glutationperossidasi, a conferma del tentativo da parte dei sistemi antiossidanti endogeni di compensare il danno ossidativo indotto dal sovraccarico di Fe⁷.

A completamento del quadro, è stato evidenziato che le ROS nei pazienti talassemici, ossidando le piastrine, determinano un'attivazione delle stesse favorendo pertanto l'insorgenza di fenomeni tromboembolici⁸. Allo stesso modo, anche i granulociti neutrofili, risentendo dello stress ossidativo cronico, finiscono con il vedere ridotta la loro funzione antibatterica e la loro risposta al burst respiratorio⁹.

Nell'anemia falciforme l'emoglobina S si lega alla membrana dei globuli rossi innescando la reazione di Fenton con produzione di radicali liberi¹⁰. L'aumento di sostanze ossidanti e l'emolisi intravascolare causano inoltre consumo dell'ossido nitrico e riduzione della attività antiossidante¹¹. Il danno da riperfusione a livello del microcircolo determina a sua volta la liberazione di citochine infiammatorie che stimolano l'accumulo di Fe nel sistema reticoloendoteliale¹². Quando la produzione di ROS è eccessiva, gli antiossidanti endogeni non riescono a contrastarne gli effetti. Pertanto, da tempo si

Il Fe che si accumula per effetto delle trasfusioni e dell'aumentato assorbimento intestinale, in particolare la frazione di Fe non legata alla transferrina (NTBI), dà il via ad una serie di reazioni redox autoamplificanti (Haber-Weiss, Fenton reaction) che determinano la produzione di ROS, quali il radicale idrossilico ($\text{OH}^\bullet$), l'anione superossido (O_2^-) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2) (Figura 2). Queste inibiscono il potenziale riducente delle cellule, tra cui ad esempio la glutathione, provocano l'ossidazione dell'emoglobina ed accelerano la distruzione degli eritrociti ossidando le componenti proteiche e lipidiche delle loro membrane⁵.

ipotizza l'utilità di un trattamento con antiossidanti esogeni, da soli o in combinazione.

PRINCIPALI SOSTANZE ANTIOSSIDANTI

L'elenco delle sostanze antiossidanti potenzialmente utilizzabili in terapia è assai lungo (Tabella 1).

Il primo antiossidante proposto per il trattamento dei fenomeni ossidativi da sovraccarico di Fe è stato l'alfa-tocoferolo o vitamina E. Tale vitamina sembra giocare un ruolo importante nel determinare la resistenza delle LDL all'ossidazione. Infatti, uno studio condotto su 30 pazienti affetti da talassemia intermedia ha messo in evidenza livelli di alfa tocoferolo nel plasma e nelle LDL significativamente più bassi che nei controlli e una maggiore suscettibilità delle LDL stesse all'ossidazione. La resistenza delle LDL all'ossidazione è strettamente correlata con i livelli plasmatici di vitamina E¹³. Dosi di 600 mg/die di alfa-tocoferolo per 9 mesi sembrano avere un effetto positivo sull'equilibrio ossidativo nel plasma, nelle LDL e sui globuli rossi talassemici, ma sono necessarie ulteriori conferme per l'esiguità della casistica¹⁴. Bassi livelli di alfa tocoferolo, legati non tanto ad una scarsa assunzione, quanto al suo consumo come "radical scavenger", sono stati registrati anche nei pazienti con anemia falciforme, in particolare nelle forme più gravi¹⁵, con conseguente maggiore suscettibilità degli eritrociti alla perossidazione lipidica. Anche Rachmilewitz ha riscontrato che la somministrazione di vitamina E può ridurre lo stress ossidativo nei globuli rossi e in altri tessuti nei pazienti con talassemia e anemia falciforme^{16,17}. Pertanto, la somministrazione di vitamina E, da sola o in associazione con la vitamina C, viene spesso utilizzata anche in assenza di prove di efficacia¹⁵.

Sostanza antiossidante	Azione svolta
Alfa-tocoferolo o vitamina E	Resistenza LDL a ossidazione Protezione della membrana degli eritrociti dalla perossidazione lipidica
N-acetilcisteina	Antiossidante proteico crescono livelli di glutatione in eritrociti ossidati scende produzione NO scende in vitro stress ossidativi piastrinico e ipercoagulabilità
Resveratrolo	Effetti benefici, protettivi su apparato cardiovascolare rischio trombotico down regulation della risposta antinfiammatoria azione antiteratogena
Polifenoli del the	Protezione eritrociti da danno ossidativi scende assorbimento del Fe a livello intestinale e concentrazione NTBI scendono markers aterosclerosi e perossidazione lipidica (LDL-ossidate, MDA in vitro e su animali)
Cacao	Effetto positivo sul sistema cardiovascolare scende suscettibilità di LDL a ossidazione cresce HDL migliora capacità antiossidativa sierica totale inibisce attivazione e aggregazione delle piastrine, induzione NO-sintetasi endoteliale
Flavonoide semisintetico 7-monoidrossietilrutoside.	scende danno ossidativo su eritrociti di topi affetti da talassemia intermedia
AGE (<i>Aged Garlic Extract</i>)	Inibizione disidratazione dei globuli rossi falciformi scende stress ossidativo, formazione di corpi di Heinz e , glutatione ridotto migliora deformabilità globuli rossi normali
Taurina	nei topi con sovraccarico di ferro: scende stress ossidativo miocardio preservazione funzionalità cardiocircolatoria cresce sopravvivenza. previene diminuzione glutatione ridotto (GSH) e aumenta glutatione ossidato (GSSG)
Chelanti del Ferro	scende perossidazione lipidica di epatociti, cardiomiociti e macrofagi scende formazione di MDA, rilascio di lattato deidrogenasi protezione nei confronti del danno da ipossia-riossigenazione

Il **glutathione** è un tripeptide formato da cisteina, glicina e acido glutammico che si trova sostanzialmente in tutte le cellule del corpo umano. E' deputato alla protezione del danno indotto dalle radiazioni o dall'ossidazione, alla detossificazione di metaboliti xenobiotici reattivi e alla rigenerazione delle vitamine antiossidanti¹⁸. Esso gioca un ruolo cruciale nel normale bilancio tra lo stato ossidato e quello ridotto della cellula. Permette così l'adeguata regolazione di molte funzioni vitali come la sintesi e la riparazione del DNA, la sintesi delle proteine, l'attivazione e la regolazione degli enzimi. Ha anche un importante ruolo nel proteggere il globulo rosso dai fenomeni ossidativi che ne causerebbero l'emolisi. Sebbene, è già stato introdotto in commercio sotto forma di glutathione ridotto (sale sodico) iniettabile per via endovenosa o intramuscolare. Al momento, non vi sono in letteratura evidenze che ne giustifichino l'uso.

L'**ubichinone** (coenzima Q10-CoQ10) è il maggiore antiossidante endogeno. Agisce sulla catena di trasporto degli elettroni all'interno dei mitocondri. Insieme al tocoferolo, rappresenta uno dei più importanti antiossidanti membrana-associati¹⁸. Studi recenti hanno riscontrato che il CoQ10 è molto basso nei pazienti talassemici. La valutazione dello stress ossidativo e dei livelli di antiossidanti in questi soggetti prima e dopo la somministrazione di 100 mg/die di CoQ10

per 6 mesi ha dimostrato oltre a un significativo aumento di CoQ10 plasmatico, una riduzione dello stress ossidativo testimoniato dalla riduzione dei livelli di MDA. L'assunzione di questa molecola organica conduce ad un miglioramento dei livelli sierici degli enzimi antiossidanti¹⁹.

L'**N-acetilcisteina** è un antiossidante proteico, che riduce i livelli dei radicali liberi e migliora i livelli di glutathione negli eritrociti ossidati²⁰. E' in grado di ridurre la sintesi di ossido nitrico, di sopprimere l'espressione e il rilascio di citochine e di inibire l'espressione di molecole di adesione e del fattore nucleare κB ²¹. Quest'ultimo è un fattore di trascrizione che controlla l'attività di numerosi geni che generano citochine, fattori di crescita, chemochine, molecole di adesione e proteine della fase acuta. Il trattamento in vitro delle piastrine di pazienti talassemici con N-acetilcisteina ha ridotto lo stress ossidativo riducendo anche lo stato di ipercoagulabilità⁸.

Il cosiddetto "paradosso francese", ossia la supposta minore incidenza di malattie cardiache in Francia, nonostante la dieta ricca di grassi saturi, fu descritto per la prima volta dal fisico irlandese Samuel Black nel 1819. Con grande soddisfazione di produttori di vino e buongustai, questo fenomeno è stato a lungo attribuito al resveratrolo, un fenolo non flavonoide presente nella buccia dell'acino d'uva e quindi nel vino, in particolare rosso, nelle noci e nelle bacche. A conferma di questa

ipotesi, studi recenti ne hanno documentato gli effetti benefici e protettivi sull'apparato cardiovascolare (diminuzione del rischio trombotico) e un'azione antitaterogena. Anche se non è del tutto chiaro il meccanismo d'azione, si ipotizza un effetto di down regulation della risposta antinfiammatoria²².

Sfortunatamente, le ricerche disponibili ad oggi non hanno dimostrato in modo conclusivo un rapporto di causa-effetto tra il consumo di vino (un bicchiere)²³ e la prevenzione di malattie cardiovascolari. Resta pertanto da stabilire la validità di questa arma facilmente reperibile e gradevole contro gli effetti nefasti dei radicali liberi.

Si ritiene da tempo che anche i **polifenoli del the** (*Camellia sinensis*), componenti del the verde e del the nero, svolgano un'azione protettiva nei confronti dell'ossidazione degli eritrociti²⁴. Il the ha, inoltre, la capacità di ridurre l'assorbimento del Fe a livello intestinale²⁵. Estratti del the verde,

ricco in catechine antinfiammatorie e antiossidanti, in special modo l'epigallocatechingallato (EGCG), diminuiscono in maniera dose e tempo-dipendente la concentrazione dell'NTBI e contrastano l'aumento dello stress ossidativo nel plasma umano e negli eritrociti²⁶. Riduzione dei markers di aterosclerosi e di perossidazione lipidica, in particolare della concentrazione di LDL-ossidate e della MDA, è stata dimostrata in numerosi studi in vitro e su animali²⁶. Altri effetti protettivi comprendono la riduzione del rischio trombotico, la promozione di una normale funzione endoteliale e la riduzione dell'espressione di molecole d'adesione cellulare. Studi epidemiologici suggeriscono che l'assunzione abituale di bevande a base di the verde riduca l'incidenza di eventi cardiovascolari. Sembrerebbe che l'assunzione giornaliera da 1 a 3,5 tazze di the possa determinare effetti benefici a breve e lungo termine²⁷ (Figura 3).



Figura 3. "E' meglio stare tre giorni senza cibo che uno senza the" recita un antico proverbio cinese. In effetti sembra che l'assunzione giornaliera da 1 a 3,5 tazze di the determini effetti benefici sull'organismo.

Anche il **cacao** rappresenta una fonte ricca di flavonoidi, in particolare della sottoclasse di flavonoidi oligomerici, noti come procianidine. La polvere di cacao e il cioccolato fondente sembrano avere un effetto positivo sul sistema cardiovascolare, riducendo la suscettibilità delle LDL all'ossidazione, aumentando la concentrazione di colesterolo HDL e migliorando la capacità antiossidativa sierica totale²⁸. Il cacao, inoltre, inibisce l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine^{29,30,31} e, attraverso l'induzione dell'ossido nitrico-sintetasi endoteliale, migliora la funzione degli endoteli favorendone la vasodilatazione³². Recenti studi hanno messo in evidenza una

riduzione del rapporto leucotrieni/prostaciline nel plasma umano e nelle cellule endoteliali aortiche. Nei soggetti più giovani, che in genere preferiscono il cioccolato al the, e nei paesi in cui il the è poco consumato, il cioccolato potrebbe rappresentare pertanto un'importante fonte di catechine e procianidine. Il contenuto di flavonoidi è estremamente variabile da 0,09 a 4 mg/g di procianidine. Approssimativamente, per avere un effetto antiossidante in acuto e a lungo termine sarebbe necessario introdurre rispettivamente 38 e 125 g al giorno di cioccolato ad alto contenuto di flavonoidi²⁷ (Figura 4).



Figura 4. Il cacao e la cioccolata rappresentano una fonte ricca di flavonoidi. La loro assunzione determina un miglioramento della funzionalità cardiaco-vascolare e migliora la capacità antiossidante sierica.

De Franceschi³³ ha messo in evidenza una riduzione significativa del danno ossidativo su eritrociti di topi affetti da talassemia intermedia trattati con il flavonoide semisintetico **7-monoidrossietilrutoside**.

Di recente è stata evidenziata un'attività antiossidante anche dell'aglio (*Allium sativum*) e in particolare dell'AGE (*Aged Garlic Extract*)³⁴. Quest'ultimo, in vitro, inibisce la disidratazione dei globuli rossi falciformi bloccando probabilmente il trasporto anionico negli eritrociti³⁵. Uno studio condotto su un piccolo gruppo di pazienti affetti da anemia falciforme sottoposti ad assunzione per 4 settimane di AGE alla dose di 5 ml/die, ma non di altri estratti, ha messo in evidenza una riduzione dello stress ossidativo con diminuzione della formazione di corpi di Heinz e aumento del glutathione ridotto. La capacità dell'AGE di migliorare la deformabilità dei globuli rossi normali è stata dimostrata³⁴; sono necessari invece ulteriori studi per dimostrarne l'efficacia nelle emazie falciformi³⁶.

Secondo alcuni Autori, la somministrazione giornaliera combinata di 6 grammi di AGE, 4-6 grammi di vitamina C e 800-1200 IU di vitamina E potrebbe avere effetti benefici nei pazienti con anemia falciforme³⁷.

La taurina o acido 2-amminoetanossulfonico è una sostanza chimica acida abbondante in molti tessuti di diversi animali. Essa si trova anche nelle piante, nei funghi, e in qualche specie batterica, ma in quantità più modeste. Oudit ha dimostrato che il trattamento con taurina, nei topi con sovraccarico di Fe, riduce lo stress ossidativo miocardico, preserva la funzionalità cardiocircolatoria, e aumenta la sopravvivenza.

Inoltre previene la riduzione di glutathione ridotto (GSH) e l'aumento di glutathione ossidato (GSSG), normalizzando l'equilibrio GSH-GSSG e provvedendo alla parziale protezione dello stato redox cellulare³⁸.

La supplementazione della dieta con indicaxantina determina, in maniera dose-dipendente, la resistenza all'emolisi degli eritrociti beta talassemici esposti in vitro all'emolisi ossidativa; previene l'ossidazione dei lipidi e dell'emoglobina, e previene la riduzione di vitamina E e glutathione³⁹.

La **curcumina** si ottiene per estrazione con solvente dal rizoma della pianta di *Curcuma longa* (Curcuma domestica valeton) seguita da purificazione per cristallizzazione. E' un colorante alimentare usato per impartire alle preparazioni un colore giallo simile a quello dello zafferano. A temperatura ambiente si presenta come una polvere cristallina di colore giallo-arancione intenso. L'assorbimento orale è relativamente scarso. La curcumina vanterebbe attività antiossidante, coleretica e colagoga, antinfiammatoria, antitumorale, pancreoprotettiva e Fe-chelante.

Uno studio recente in vitro ha cercato di dimostrarne l'attività NTBI-chelante in plasma di pazienti talassemici e la potenziale capacità di aumentarne la rimozione se somministrata con altri chelanti, quali desferoxamina (DFO) e/o deferiprone (DFP). La curcumina cattura il Fe³⁺ e forma il complesso curcumina-Fe³⁺, il cui legame è dose e tempo-dipendente ed è più specifico per il Fe³⁺, rispetto al Fe²⁺. A dosi equivalenti, DFO, DFP e curcumina riducono l'NTBI plasmatico. Nell'ordine, il DFP è più efficace del DFO, a sua volta più

efficace della curcumina. Nessuno di questi chelanti elimina completamente l'NTBI, ma la combinazione curcumina più DFP sembrerebbe essere più efficace⁴⁰. Un ruolo determinante nel proteggere le cellule dagli effetti deleteri dell'NTBI e quindi dei ROS è naturalmente quello dei chelanti del Fe. In particolare, si ritiene che gli effetti benefici che i chelanti esercitano a livello cardiaco, siano per la maggiore parte da attribuirsi al loro effetto protettivo nei confronti del Fe libero e del Fe labile plasmatico e cellulare e quindi dei ROS.

Il DFP ha determinato, in studi condotti in vitro, una riduzione della perossidazione lipidica di epatociti e macrofagi^{41,42}, della formazione di MDA⁴³ e del rilascio di lattato deidrogenasi^{42,43}. Esso aumenta la protezione nei confronti del danno da ipossia-riossigenazione⁴⁴ e induce la normalizzazione dei parametri di danno alcolico epatico⁴⁵. Inoltre il deferiprone protegge i miociti dei ratti neonati dalla citotossicità doxorubicina-indotta⁴⁶. Il trattamento a lungo termine dei pazienti talassemici con DFP o DFO porta alla riduzione dei livelli plasmatici di aldeide citotossica e il ripristino dell'attività della glutathione perossidasi nei globuli rossi⁴⁷.

A concentrazioni terapeutiche, la DFO riduce la produzione dei ROS solo dopo lunga esposizione. Al contrario, il DFP e il nuovo chelante orale deferasiroxi (ICL670) riducono la produzione di ROS mitocondriali dopo breve e lunga esposizione. Anche se questi risultati indicano che i due chelanti orali riducono il pool di Fe labile cellulare, non è ancora possibile estendere al setting clinico le conclusioni e le implicazioni fisiologiche dei dati di estrazione del Fe radiomarcato, dato che la farmacocinetica è influenzata dal legame dei farmaci con le proteine plasmatiche, non valutabile in vitro⁴⁸.

E' stato ipotizzato che l'uso combinato di antiossidanti lipidici (vitamina E) e proteici (N-acetilcisteina) associati ai chelanti del Fe sia più efficace di ciascuna sostanza da sola 20.

Controverso è il discorso riguardo la vitamina C. Infatti, se è vero che nei pazienti trasfusi l'acido ascorbico, espandendo il pool chelabile di Fe, ne incrementa l'escrezione ottenibile con DFO⁴⁹, è altrettanto vero che a basse concentrazioni accelera la perossidazione lipidica Fe-indotta e altera la funzione delle cellule miocardiche di ratto in coltura. Non ne è quindi raccomandata la supplementazione nei pazienti con emosiderosi, se non in presenza di dimostrato deficit, e sempre durante terapia chelante con DFO. Al contrario, la vitamina C non è efficace nell'aumentare l'escrezione di Fe indotta da DFP o da deferasiroxi.

CONCLUSIONI

La supplementazione con sostanze antiossidanti potrebbe limitare o almeno ritardare i danni dovuti allo stress ossidativo in persone sane o affette da sovraccarico di Fe, quando i meccanismi fisiologici rappresentati dagli scavenger endogeni non sono più sufficienti.

Nonostante queste sostanze abbiano mostrato degli effetti positivi in studi in vitro sugli eritrociti, il loro utilizzo in pazienti talassemici non ha determinato un miglioramento dei livelli di emoglobina. Una eccezione è naturalmente rappresentata

dalla terapia chelante che è in grado di ridurre il sovraccarico di ferro e di limitare la produzione di ROS. Il miglioramento della sopravvivenza dei pazienti verificatosi in anni recenti è una evidenza indiretta della sua efficacia.

Per le restanti sostanze i dati che abbiamo a nostra disposizione sono ancora incompleti e ottenuti su casistiche limitate. Pertanto la prescrizione non è opportuna e l'automedicazione, assai diffusa tra i pazienti anche per effetto delle informazioni diffuse in interne, non va incoraggiata. Ulteriori studi sarebbero necessari, ma un end point clinico non è facilmente identificabile.

Bibliografia

- Robbins F. Le basi patologiche delle malattie. Piccin 2000; VI edizione. Vol I:14-5.
- Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2007;53(1):1-2.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
- Scott MD, van der Berg JJ, Repka T, et al. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *Journal of Clinical investigation* 1993;91:1706-12.
- Scott MD, Eaton JW. Thalassemic erythrocytes: cellular suicide arising from iron and glutathione-dependent oxidation reactions? *Br J Haematol* 1995;91(4):811-9.
- Araujo JA, Romano EL, Brito BE, et al. Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(8):1172-80.
- Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J, Verma P, Narayan S. Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46(7):780-5.
- Amer J, Fibach E. Oxidative status of platelets in normal and thalassemic blood. *Thromb Haemost.* 2004; 92 (5): 1052-9
- Amer J, Fibach E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. *Br J Haematol* 2005;129 (3):435-41.
- Repka T, Hebbel RP. "Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents" *Blood* 1991;15;78(10):2753-8.
- Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Wacławski MA, Panza JA, Cannon RO "Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease" *Circulation* 2003;107(2):271-8.
- Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells *Blood* 2003;101(10):4148-54.
- Tesoriere L, D'Arpa D, Maggio A, Giaccone V, Pedone E, Livrea MA. Oxidation resistance of LDL is correlated with vitamin E status in beta-thalassemia intermedia. *Atherosclerosis* 1998;137(2):429-35.
- Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, et al. Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in beta-thalassemia intermedia patients *Free Radic Res* 2001;34(5):529-40.
- Ray D, Deshmukh P, Goswami K, Garg N. Antioxidant vitamin levels in sickle cell disorders. *Natl Med J India* 2007;20(1):11-3.
- Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol* 2006;132 (1):108-13.
- Rachmilewitz EA, Kornberg A, Acker M. Vitamin E deficiency due to increased consumption in beta-thalassemia and in Gaucher's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1982;393:336-47.
- Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):274-82.
- Kalpravidh RW, Wichit A, Siritanaratkul N, Fucharoen S. Effect of coenzyme Q10 as an antioxidant in beta-thalassemia/Hb E patients. *Biofactors* 2005;25(1-4):225-34.
- Pace BS, Shartava A, Pack-Mabien A, Mulekar M, Ardia A, Goodman SR. Effects of N-acetylcysteine on dense cell formation in sickle cell disease. *American Journal of Haematology* 2003;73:26-32.
- Caglikulekci M, Dirlik M, Pata C, Plasse M, Tamer L, Ogetman Z, Ercan B. Effect of N-acetylcysteine on blood and tissue lipid peroxidation in lipopolysaccharide induced obstructive jaundice. *Journal of Investigative Surgery* 2006;19:175-84.
- Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007;6(3):168-73.
- Spaak J, Merlocco AC, Soleas GJ, et al. Dose-related effects of red wine and alcohol on hemodynamics, sympathetic nerve activity and arterial diameter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007.
- Srichairatanakool S, Ounjaijean S, Thephinlap C, Khansuwan U, Phisalpong C, Fucharoen S. Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload. *Hemoglobin* 2006;30(2):311-27.
- de Alarcon PA, Donovan ME, Forbes GB, Landaw SA, Stockman JA Iron absorption in the thalassemia syndromes and its inhibition by tea. *N Engl J Med* 1979;300(1):5-8.
- Basu A, Lucas EA. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutr Rev* 2007;65(8 Pt 1):361-75.
- Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(1):41-9.
- Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2001;74(5):596-602.
- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, et al. Dark Chocolate Improves Coronary Vasomotion and Reduces Platelet

- Reactivity. *Circulation* 2007.
- Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2120S-6S.
 - Rein D, Paglieroni TG, Wun T, et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000;72(1):30-5.
 - Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2105S-8S.
 - de Franceschi L, Turrini F, Honczarenko M, et al. In vivo reduction of erythrocyte oxidant stress in a murine model of beta-thalassemia. *Haematologica* 2004;89(11):1287-98.
 - Moriguchi T, Takasugi N, Itakura Y. The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J Nutr* 2001;131(3s):1016S-9S.
 - Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola GB. Green tea extract and aged garlic extract inhibit anion transport and sickle cell dehydration in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(1):148-57.
 - Takasu J, Uykimfang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y. Aged garlic extract is a potential therapy for sickle-cell anemia. *J Nutr* 2006;136(3 Suppl):803S-805S.
 - Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola GB. Sickle cell anemia: a potential nutritional approach for a molecular disease. *Nutrition* 2000;16(5):330-8.
 - Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, et al. Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* 2004;109(15):1877-85.
 - Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Gentile C, Livrea MA. Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic Res* 2006;40(7):753-61.
 - Srichairatanakool S, Thephinlap C, Phisalaphong C, Porter JB, Fucharoen S. Curcumin contributes to in vitro removal of non-transferrin bound iron by deferiprone and desferrioxamine in thalassemic plasma. *Med Chem* 2007;3(5):469-74.
 - Mostert LJ, van Dorst JA, Koster JF, van Eijk HG, Kontoghiorghes GJ. Free radical and cytotoxic effects of chelators and their iron complexes in the hepatocyte. *Free Radic Res Commun* 1987;3:379-388.
 - Morel I, Sergent O, Cogrel P, et al. EPR study of antioxidant activity of the iron chelators pyoverdine and hydroxypyrid-4-1 in iron-loaded hepatocyte culture: comparison with that of desferrioxamine. *Free Radic Biol Med* 1995;18:303-310.
 - Morel I, Cillard J, Lescoat G, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of the iron chelators pyoverdine and hydroxypyrid-4-1 in ironloaded hepatocyte culture: comparison of their mechanism of protection with that of desferrioxamine. *Free Radic Biol Med* 1992;13:499-508.
 - Moridani MJ, O'Brien PJ. Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1579-85.
 - Tsukamoto H, Lin M, Ohata M, Giulivi C, French SW, Brittenham G. Iron primes hepatic macrophages for NF-kappaB activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol* 1999;277:G1240-G1250.
 - Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2002;33:266-75.
 - Bartfay WJ, Lehotay DC, Sher GD, et al. Erythropoiesis: comparison of cytotoxic aldehyde generation in beta-thalassemia patients chelated with deferoxamine or deferiprone (L1) versus NO chelation. *Hematology* 1999;4:67-76.
 - Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, Cabantchik ZI. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* 2006;108(9):3195-203.
 - Murray JA. Survival and desferrioxamine in thalassaemia major. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284(6326):1401.