

Danno cellulare

In questa sezione, analizzeremo il danno cellulare, ovvero quella condizione che insorge se la cellula non riesce ad adattarsi allo stimolo nocivo o se tale stimolo è tanto intenso da non consentire l'adattamento.

Vedremo prima i meccanismi biochimici che sono alla base del danno, per poi analizzare alcuni esempi comuni nel nostro organismo.

Meccanismi biochimici

Deplezione di ATP

La perdita di scorte di ATP da parte della cellula esita inevitabilmente nel blocco di vari processi cellulari, e quindi nel danno.

Le cause di deplezione di ATP più comuni sono:

- Ipossia. In assenza di O_2 , la cellula non può svolgere la fosforilazione ossidativa e la produzione di ATP, di conseguenza, si blocca. L'ipossia, a sua volta, può essere dovuta a varie situazioni: ischemia (ovvero occlusione di un vaso), insufficiente ossigenazione del sangue (per ridotta capacità di trasporto dell' O_2 o perdita di sangue o collasso cardiorespiratorio)
- Danno chimico tossico. Alcune sostanze, come il cianuro, possono bloccare direttamente la fosforilazione ossidativa

Le conseguenze di una deplezione di ATP tra il 5 e il 10% sono diverse:

- Riduzione della sintesi proteica. Questo porta ad un aumento di proteine mal ripiegate, e, di conseguenza, ad un aumento delle chaperonine.
- Perdita dell'attività della pompa Na^+/K^+ (ATP-dipendente). Questo esita in un maggiore ingresso di Na^+ (e quindi H_2O) in cellula, con conseguente rigonfiamento cellulare e del reticolo endoplasmatico nonché perdita dei microvilli e di altre estroflessioni
- Alterazioni del metabolismo cellulare. Questo perché, a causa della cessazione della fosforilazione ossidativa, si ha un aumento dell'AMP intracellulare.

Questo funge da stimolo per un aumento della glicolisi e della glicogenolisi. Ricordiamo che, in condizioni di ipossia, il prodotto finale della glicolisi (il piruvato) viene convertito in acido lattico. Avremo, quindi, un considerevole aumento di acido lattico, che esita in un calo del pH cellulare.

In risposta al minore pH, si assiste ad una condensazione della cromatina nucleare e ad una riduzione dell'attività enzimatica

- Perdita attività pompa Ca^{2+} e ingresso di Ca^{2+} in cellula
- Distacco dei ribosomi e dissociazione dei polisomi. Il calo di ATP, infatti, porta ad un calo di GTP per riequilibrare le concentrazioni intracellulari. Il GTP è necessario per i ribosomi sia per produrre i primi 70 amminoacidi sia per aderire al RER.

Di conseguenza, avremo una minor sintesi proteica, un aumento di lipidi nel citosol (perché mancano le apoproteine necessarie per legarli) e minor sintesi di fosfolipidi (con conseguente danno di membrana)

Danno mitocondriale

I mitocondri possono essere danneggiati sia per cause dirette (ipossia o tossine, come detto in precedenza) che indirettamente (per stress ossidativo, aumento del Ca^{2+} , degradazione dei fosfolipidi,...).

Uno degli eventi fondamentali nella genesi del danno mitocondriale è l'apertura del PTPC (Permeability Transition Pore Complex), localizzato nei punti di contatto tra le due membrane.

A seguito di tale apertura, si assiste a:

- Perdita di potenziale di membrana, e quindi cessazione della fosforilazione ed esaurimento dell'ATP
- Azione della ciclofillina D. Si tratta di una proteina strutturale del poro che degrada la membrana mitocondriale esterna e apre il poro sulla membrana interna. In questo modo si assiste a:
 - Dissipazione potenziale protonico, quindi calo dell'ATP e necrosi
 - Fuoriuscita del citocromo C e di altre proteine proapoptotiche

Per ostacolare quest'azione, è utile la ciclosporina, che impedisce l'apertura poro

E' stato osservato che le cellule di topi knock-out per la ciclofillina D non vanno in apoptosi indotta da aumento di Ca^{2+} . Non è chiaro, tuttavia, se la ciclofillina sia una componente strutturale del poro o l'unico elemento effettore che ne induce l'apertura

Perdita omeostasi del Ca^{2+}

In condizioni fisiologiche, la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è di 0,1 μM , mentre quella extracellulare è di 1,3 mM.

L'ingresso nel citosol di Ca^{2+} si ha prima dal reticolo endoplasmatico liscio, quindi dall'esterno. Ciò avviene in vari modi:

- Pompa ATP – dipendente
- Trasportatore mitocondriale $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$: solitamente estrude ioni H^+ e fa entrare Ca^{2+} , ma essendo dissipato il gradiente protonico, non riesce a farlo e, anzi, può iniziare a lavorare al contrario.
- Il pH acido diminuisce l'affinità delle proteine che sequestrano Ca^{2+} e altera la permeabilità della membrana
- Rottura della membrana per altre cause

Le conseguenze di questo aumento di Ca^{2+} sono diverse:

- Attivazione di vari enzimi, tra cui:
 - Fosfolipasi e proteasi, che portano a danno di membrana
 - Endonucleasi, con conseguente danno nucleare
 - ATPasi, e quindi deplezione di ATP
- Apertura del PTPC
- Attivazione delle caspasi (vedi necrosi)

Difetti di permeabilità di membrana

Il meccanismo biochimico che porta ad alterazione della permeabilità della membrana è correlato a vari aspetti, in parte già analizzati:

- Perossidazione dei lipidi da ROS
- Difetti della funzione mitocondriale e ipossia, che portano ad una diminuzione della sintesi dei fosfolipidi
- Incremento della degradazione dei fosfolipidi. Infatti, l'aumento Ca^{2+} intracellulare in seguito a danno porta all'attivazione della fosfolipasi, con accumulo di lipidi che hanno a loro volta un effetto detergente sulle membrane, essendo in grado di penetrare e sostituirle.
- Danni al citoscheletro, in quanto l'aumento del Ca^{2+} porta all'attivazione di proteasi che determinano il distacco della membrana dal citoscheletro

Le conseguenze variano a seconda della membrana che analizziamo:

- Membrana mitocondriale. A questo livello, si ha un'apertura del PTPC con ridotta produzione ATP, e liberazione delle proteine proapoptotiche
- Plasmalemma. Un'alterazione di permeabilità della membrana che separa compartimento intracellulare da extracellulare porterà inevitabilmente a perdita dell'equilibrio osmotico e alla fuoriuscita di componenti dall'interno della cellula
- Membrana lisosomiale. Dai lisosomi, ci sarà una perdita enzimi e l'attivazione di questi nel citosol. Occorre ricordare che il pH del citosol è più basso del normale per il danno, consentendo quindi l'attivazione degli enzimi lisosomiali.

Danno ossidativo: ROS (Reactive Oxygen Species) e RNS (Reactive Nitrogen Species)

Si tratta di molecole radicaliche (con un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno), derivati da reazioni che coinvolgono l'ossigeno (più comunemente) o l'azoto.

I più importanti sono:

- Anione superossido (O_2^-). Questo può derivare da una riduzione incompleta durante il processo di fosforilazione ossidativa, così come dall'ossidasi dei leucociti e anche, in alcune condizioni, dall'azione della xantina ossidasi.
- Perossido di idrogeno (H_2O_2). Viene prodotto in vari modi:
 - Dall'anione superossido, tramite l'azione della SOD (SuperOxide Dismutase)
 - Grazie all'ossidasi dei perossisomi
 - Tramite la xantina ossidasi
- Ione ossidrile ($\cdot OH$), che deriva o dall' H_2O (attraverso radiazioni che inducano idrolisi) o dall' H_2O_2 , attraverso la reazione di Haber-Weiss.

Si tratta di una reazione complessiva frutto di due reazioni parziali:

1. $Fe^{3+} + O_2^{-*} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2$
2. $Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + ^-OH$

Avremo, quindi, riscrivendo la reazione in funzione dell'anione superossido e del perossido di idrogeno che $O_2^{-*} + H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + \cdot OH + ^-OH$.

Essendo catalizzata dallo ione ferroso (che si rigenera automaticamente al termine della reazione), è evidente che l'apporto di ulteriore ferro crea altro danno.

- Perossinitrito ($ONOO^-$), che deriva da ossido nitrico (NO) e anione superossido. Occorre ricordare che NO è un mediatore vasoattivo prodotto da diversi citotipi

La rimozione di ROS e RNS avviene in vari modi. Il meccanismo principale è il decadimento spontaneo, ma ci sono altri meccanismi:

- Fattori antiossidanti. Esistono sia antiossidanti comuni (che impediscono direttamente la formazione di ROS e RNS) che scavenger (che inattivano radicali già formati).

Esempi di molecole antiossidanti sono:

- Glutathione. Si tratta di un tripeptide costituito da cisteina, glicina e glutammato. Esso può esistere in due forme:
 - Forma ossidata (GSSG), in cui due glutationi si uniscono assieme grazie ad un legame disolfuro tra le loro cisteine (si ricordi che la cisteina ha un gruppo -SH come estremità della catena laterale)
 - Forma ridotta (GSH), in cui le cisteine dei due glutationi si riducono, sequestrando così elettroni da specie ossidanti.

Il passaggio da GSSG a GSH è catalizzato di solito dalla glutatione reduttasi, che usa come cofattore il NADPH.

- Vitamine C ed E. Queste due vitamine donano un elettrone ai radicali, stabilizzandoli e “inattivandoli”.

Nel farlo, non diventano esse stesse radicali, in quanto possiedono una struttura ad anelli benzenici che permette all’elettrone spaiato di andare in risonanza ed essere più stabile.

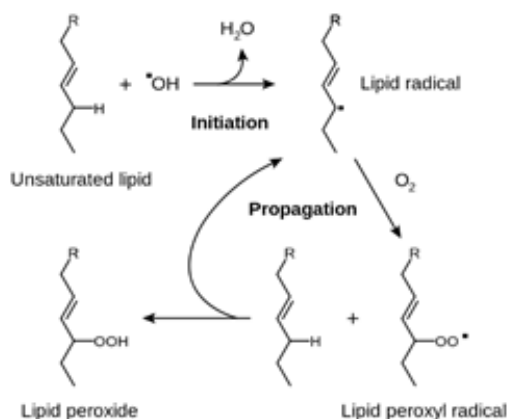
Esse vengono poi ripristinate da GSH, ubiquinone o altre molecole.

Una carenza di queste vitamine conduce a vari effetti, tra cui l’emolisi, dovuta ad una membrana eritrocitaria più suscettibile ad insulti esterni

- Proteine che legano metalli di transizione. In questo modo, i metalli sono sequestrati e non possono partecipare a reazioni di produzione di specie ossidanti.
 - Enzimi. Esiste una vasta gamma di enzimi (alcuni dei quali già presentati) che possono neutralizzare i radicali liberi. Tra questi:
 - Catalasi. Tipicamente contenuta nei perossisomi, consente di neutralizzare il perossido di idrogeno secondo la seguente reazione: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
 - SOD. Permette di convertire l’anione superossido in perossido di idrogeno, substrato poi della catalasi: $2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.
- La SOD contiene al suo interno metalli per eseguire la reazione di ossidoriduzione. In base al tipo di metallo distinguiamo la Mn-SOD, contenente manganese e localizzata nei mitocondri, e la Cu-Zn-SOD, contenente rame e zinco e localizzata nel citosol.
- Glutazione perossidasi. Sfruttando il glutatione, tale enzima può catalizzare due tipi di reazioni:
 - $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
 - $2\text{OH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Questo enzima è cruciale nel bilancio ossidativo cellulare, tanto che il rapporto GSSG/GSH riflette fedelmente lo stato ossidativo della cellula

Dopo aver analizzato i principali meccanismi di produzione e rimozione di ROS e RNS, possiamo ora in rassegna quali sono gli effetti patologici che tali specie reattive hanno sulla morfologia e la fisiologia cellulare.



Il primo meccanismo è la *perossidazione lipidica* delle membrane cellulari. Il meccanismo biochimico di tale danno è riassunto nella figura seguente:

Semplificando, accade che i *PUFA* (PolyUnsaturated Fatty Acids) interagiscono con i ROS con produzione di un radicale lipidico.

Questo radicale interagisce con una molecola di ossigeno e diventa un radicale perossile che sequestrando un protone ad un altro PUFA si stabilizza diventando un perossido lipidico.

In questo modo però, il secondo PUFA è diventato esso stesso un radicale e, unendosi a sua volta ad una molecola di ossigeno, potrà propagare l'evento iniziale fino a quando non entrerà in gioco un meccanismo antiossidante a bloccarlo (es. la vitamina E che dona un elettrone al radicale perossilipidico, stabilizzandolo).

La perossidazione lipidica è un meccanismo importante nei traumi del SNC, in quanto qui abbiamo guaine mieliniche ricche di fosfolipidi. Solitamente a questo livello il danno si instaura a seguito di emorragie, anche se è stato ipotizzato un eventuale ruolo della perossidazione lipidica nella patogenesi dell'Alzheimer.

Un secondo meccanismo in cui le specie ossidanti generano un danno è l'*alterazione ossidativa delle proteine*. Possiamo avere, infatti, un'ossidazione delle catene R degli amminoacidi, la formazione di legami crociati tra proteina e proteina o l'ossidazione della struttura di base di una proteina.

I ROS e gli RNS possono provocare anche un *danno al DNA*. Questo può manifestarsi in vari modi:

- Rottura del filamento DNA e/o della doppia elica
- Cross-linking tra i filamenti di DNA, con formazione di addotti

Va considerato, infine, che un danno al DNA è implicato anche nell'invecchiamento cellulare e nella trasformazione neoplastica.

Quanto detto fino ad ora sui ROS non deve far pensare che siano delle molecole assolutamente dannose per le nostre cellule. Si è visto, infatti, che una certa quota di ROS è importante per alcuni pathway di signaling cellulare

Esistono, infine, delle malattie legate intimamente ai ROS. Tra queste, occorre ricordare la *protoporfiria eritropoietica*, un difetto congenito del metabolismo delle porfirine, una classe di molecole a cui appartiene anche il gruppo eme dell'emoglobina, responsabile del legame dell'ossigeno.

A seguito di tale difetto, si assiste a:

- Accumulo di protoporfirine (precursori dell'eme) in tessuti e sangue
- Produzione di radicali liberi a seguito dell'esposizione a raggi solari, in quanto le protoporfirine accumulate sono sensibili ai raggi UV

I pazienti con questa patologia sono solitamente trattati con beta-carotene.

Esempi specifici

Danno ischemico e ipossico

Si tratta di un tipo di danno determinato da due eventi diversi, ma collegati: *ischemia* e *ipossia*.

L'ipossia è il minor apporto di O_2 in un tessuto, al quale normalmente i nostri tessuti rispondono accelerando il pathway glicolitico.

L'ischemia è, invece, una condizione in cui sia un'ostruzione arteriosa e/o un minor drenaggio venoso. Questo porta non solo ad un minor apporto di O_2 , ma anche di nutrienti per la glicolisi.

La sequenza di eventi che portano all'instaurarsi di un danno in un tessuto ipossico è la seguente:

1. Calando la quantità di O_2 , viene rallentata la fosforilazione ossidativa, con conseguente deplezione di ATP

2. La deplezione di ATP porta ad un minor funzionamento delle pompe ATPasiche, e quindi ad afflusso di Na^+ , H_2O e Ca^{2+} in cellula. Inoltre, si assiste anche ad una diminuzione del glicogeno e della sintesi proteica, con utilizzo dei substrati per mantenere quanto più ATP possibile
3. Se l'ipossia persiste, abbiamo un aggravamento della deplezione ATP, nonché la scomparsa di citoscheletro, specializzazioni ed estroflessioni. Inoltre, le membrane iniziano a degenerare formando delle strutture intracellulari chiamate *figure mieliniche*
4. Il danno è irreversibile nel giro di 30-40 minuti. A questo punto avremo un grave rigonfiamento mitocondriale, con comparsa flocculi proteici nella matrice mitocondriale. Nella cellula ci sarà un massiccio ingresso di Ca^{2+} ; inoltre, una serie di enzimi normalmente intracellulari saranno ritrovati nel sangue, permettendo di diagnosticare la sede del danno (come nel caso della creatin-chinasi e della troponina per il cuore). Ci sarà inoltre un quadro di necrosi via via più massivo.
5. Le figure mieliniche sostituiscono gradualmente le cellule morte e possono o essere fagocitate da leucociti o andare incontro a degradazione ad acidi grassi, formando nel tempo delle aree di calcificazione.

Danno da ischemia-riperfusione

Si tratta di un danno che si viene ad instaurare quando un tessuto ischemico viene riperfuso. Le cause alla base di tale danno sono diverse:

- Aumento di ROS e RNS. Questo succede perchè la cellula ischemica ha subito dei danni ai mitocondri. Questi, quindi, al momento della riperfusione, non riusciranno a ridurre completamente l' O_2 , generando specie ossidanti. Inoltre, con il sangue arrivano i leucociti, che con le loro ossidasi complicano la situazione. Il tutto, ricordiamo, in un contesto in cui i sistemi antiossidanti sono compromessi.
- Ingresso Ca^{2+} (membrana plasmatica e RE) a apertura poro di permeabilità
- Infiammazione. Il reclutamento dei neutrofili a cui si assiste durante la riperfusione porta alla formazione di acido ipocloroso da H_2O_2 per azione della mieloperossidasi, con conseguente perossidazione lipidica. Inoltre, le cellule ipossiche aumentano l'espressione di molecole di adesione e le cellule immunitarie residenti producono una gran varietà di citochine pro-infiammatorie (come TNF-alfa e IL-1).
- Attivazione complemento. Le IgM si accumulano nei tessuti ischemici. Nel momento in cui viene ripristinato il flusso, i fattori del complemento si legano alle IgM, attivandosi ed esacerbando il danno e l'infiammazione
- In condizioni di ipossia, si assiste sia al calo di ATP che all'aumento di AMP. Con l'arrivo di O_2 , l'AMP viene convertito in ipoxantina dalla xantina ossidasi porta a formazione di $\text{O}_2^{\cdot -}$

Danno chimico

Il danno chimico può essere di due tipi:

- Diretto. In questo caso, le molecole creano danno nella forma in cui vengono assunte, senza subire alcun metabolismo.
Un esempio è il danno da cloruro di mercurio (HgCl_2). Esso si lega ai gruppi “-SH” di proteine di membrana, determinando un aumento della permeabilità della cellula e un'inibizione del trasporto ionico. Questo tipo di danno si esplica soprattutto a livello delle cellule gastrointestinali e del rene (che hanno il ruolo di assorbire e concentrare sostanze). Una malattia determinata da cloruro di mercurio è la Malattia di Minamata, che si manifesta con una sindrome neurologica (causata da intossicazione acuta di Hg).

I sintomi di questa patologia compaiono in maniera graduale (atassia → parestesie → coma e morte) ed esiste una forma congenita trasmissibile al feto con la gravidanza.

Altri esempi di danno diretto sono il cianuro (che blocca la citocromo ossidasi mitocondriale) e una serie di agenti chemioterapici (sia antineoplastici che antibiotici)

- Indiretto. Si tratta di un danno determinato da sostanze inerti, convertite a metaboliti tossici reattivi all'interno dell'organismo. Più precisamente, questi composti sono generalmente attivati dalle citocromo ossidasi P-450 a funzione mista del reticolo endoplasmatico epatico. Gli esempi più importanti sono:

- Tetracloruro di carbonio (CCl_4). Questo viene convertito in $^*\text{CCl}_3$ da citocromo P-450, un radicale che porta a perossidazione lipidica, distacco dei ribosomi dal RE (e quindi mancata sintesi di apoproteine e steatosi).
- Paracetamolo (acetaminofene, la comune tachipirina). Questa molecola subisce un duplice metabolismo:
 - Per il 95%, viene metabolizzato dalle ossidasi di fase II, con formazione di composti glucuronati ed espulsione con le urine
 - Il 5% diventa substrato di CYP-2E1, con formazione di N-acetil-paramino-benzochinone (NAPQI). Si tratta di un radicale che determina danno epatico anche così grave da determinare un'insufficienza epatica fulminante.
Il NAPQI consuma tutto il glutathione ridotto, determinando quindi un importante stress ossidativo, rimediabile solo con la somministrazione di glutathione