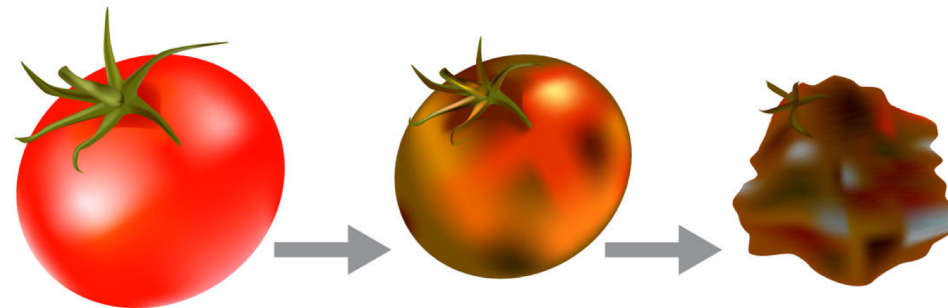
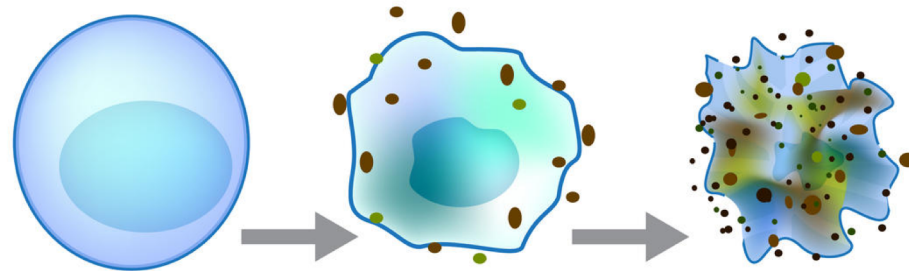


Stress ossidativo

DANNO CELLULARE e meccanismi omeostatici



STRESS OSSIDATIVO

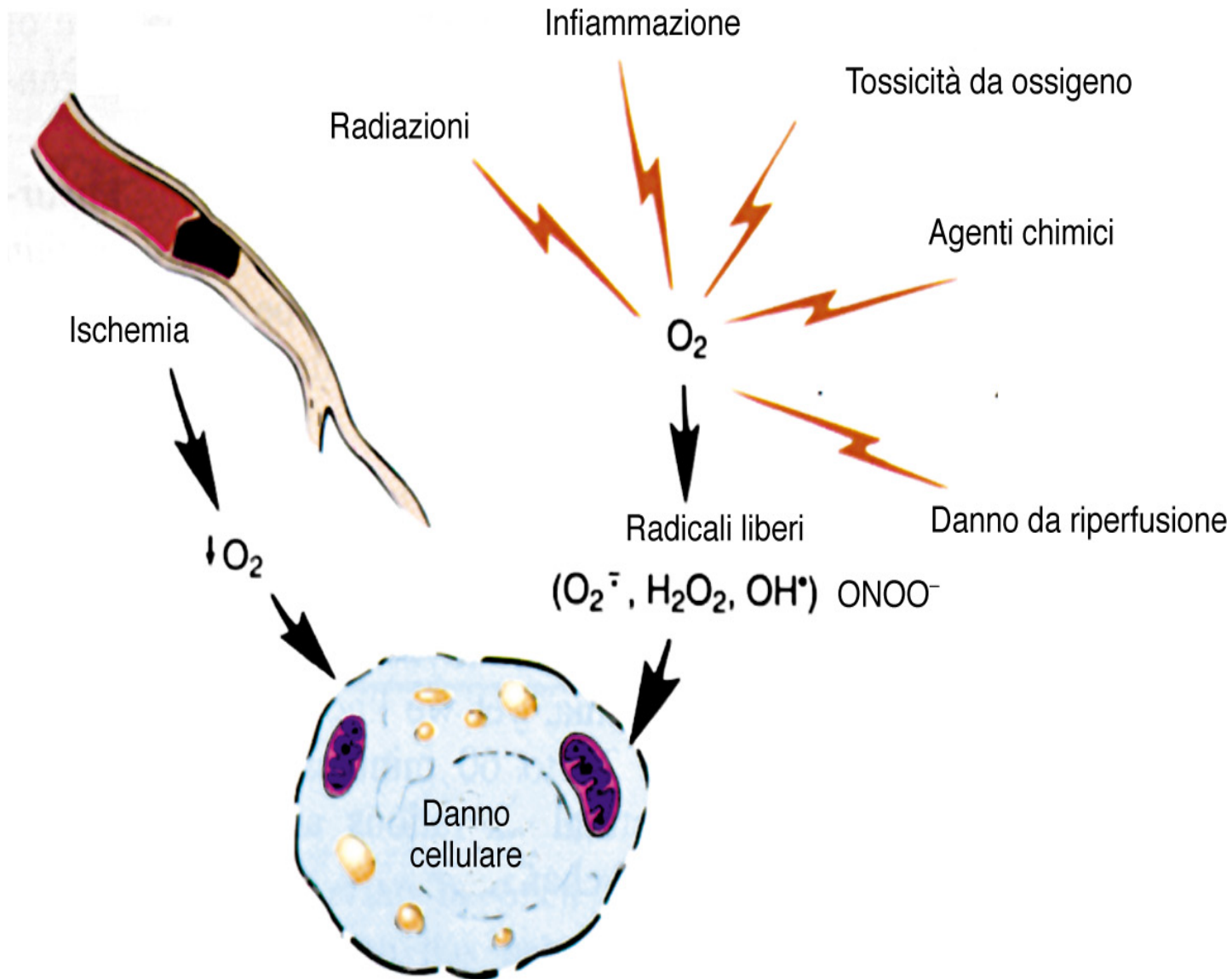


Cellula Normale

**Cellula Attaccata
da Radicali Liberi**

**Cellula con
Stress Ossidativo**

Le due principali vie di danno cellulare: ischemia e formazione di radicali liberi (stress ossidativo)



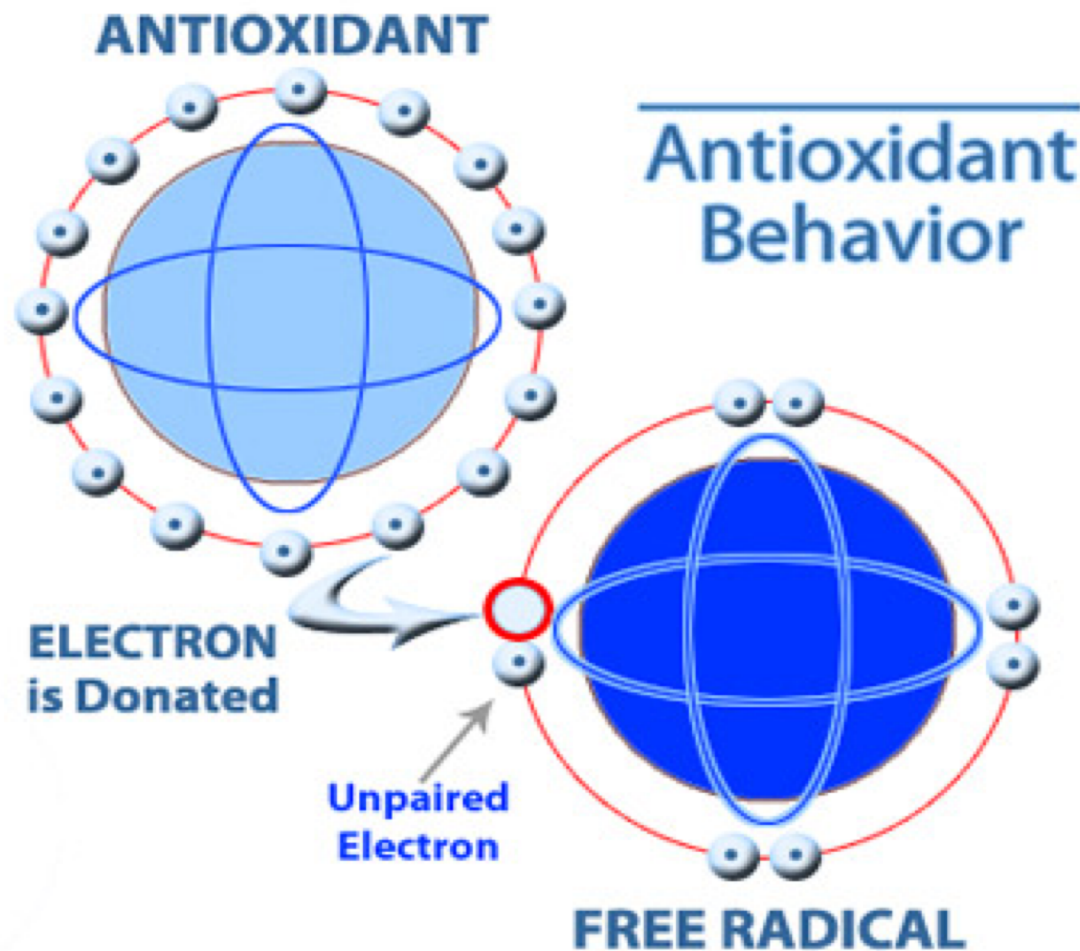
Radicali liberi

Le strutture cellulari sono continuamente danneggiate dai **RADICALI LIBERI** prodotti durante i normali processi metabolici ed eliminati da "sistemi di difesa antiossidante". Se si accumulano in quantità eccessiva, soprattutto per effetto di processi infiammatori, esposizione a radiazioni, esposizione ad agenti chimici, danno da ri-perfusione generano **stress ossidativo**.

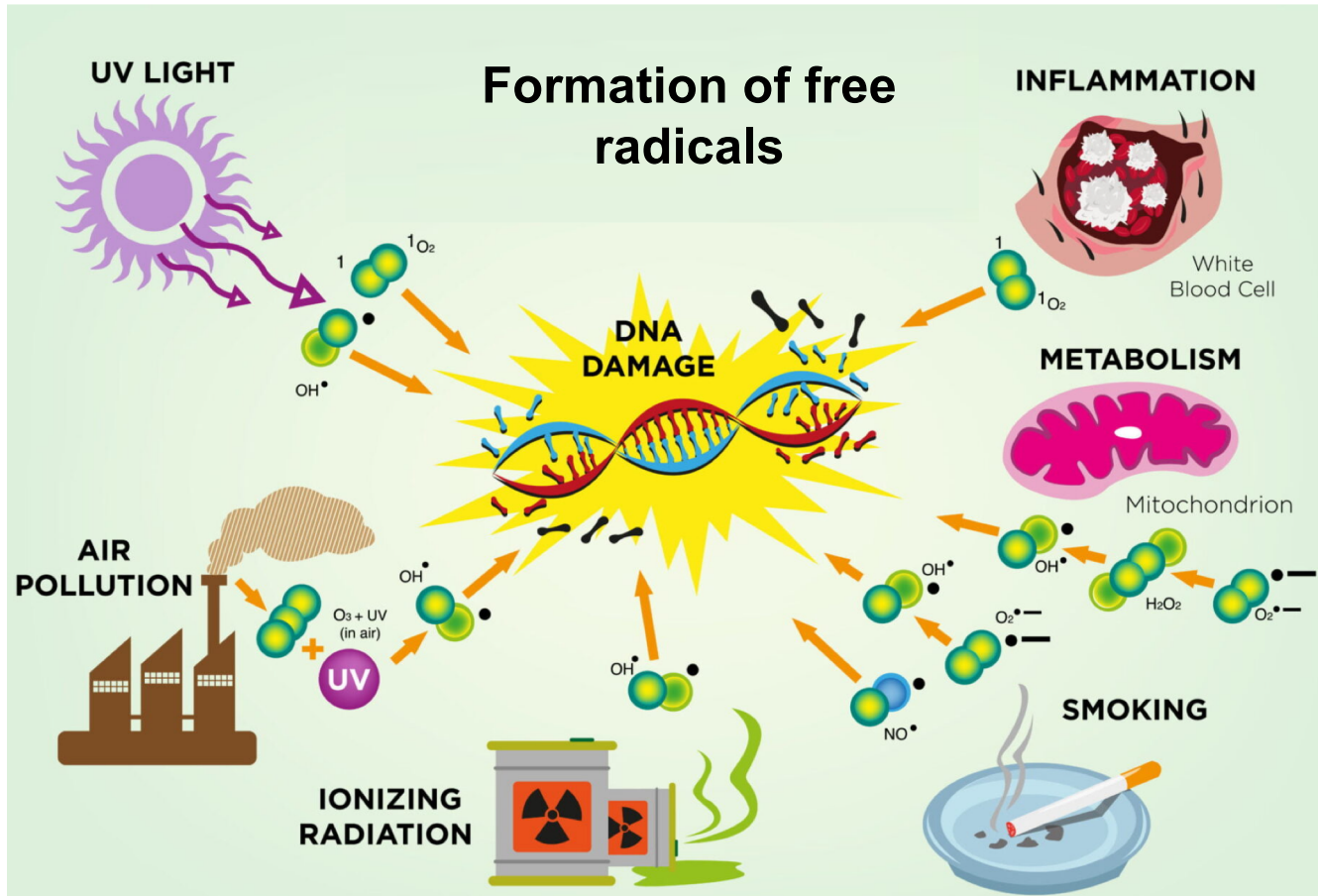
I radicali liberi sono specie chimiche con un singolo elettrone spaiato nell'orbitale esterno.

Questa configurazione è altamente energetica ed instabile.

Pertanto sono estremamente **reattivi** con molecole adiacenti tra cui **proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici** e ne provocano modifiche strutturali e funzionali.



Come vengono prodotti i radicali liberi?



Stress ossidativo → Invecchiamento

- Respirazione cellulare
- Processi infiammatori
- Esposizione ad agenti chimici
- Esposizione al sole
- Radiazioni ionizzanti
- Farmaci
- Infezioni virali e batteriche
- Parassiti
- Grassi nella dieta
- Stress

Patologie legate alla produzione di radicali liberi

- Infiammazione
- Tumori
- Malattie neurodegenerative
- Malattie autoimmuni
- Aterosclerosi
- Malattie renali e del fegato
- Riduzione delle difese immunitarie
- Diminuzione della vista e udito
- Malattie della pelle

Fonti intracellulari di radicali liberi



- Normali reazioni di ossidazione (respirazione mitocondriale)
- Radiazioni ionizzanti (UV, raggi X) idrolizzano H_2O originando radicali liberi: radicale idrossilico privo di carica ($OH\cdot$) e atomo di idrogeno (H)
- Metabolismo di sostanze come il CCl_4 può generare radicali liberi
- Reazioni fisiologiche antimicrobiche

Danno ossidativo da radicali liberi

Se non adeguatamente neutralizzati, i radicali liberi causano danno cellulare:

- Alle **membrane** per perossidazione lipidica
- Modificazione di **proteine** con aumento della degradazione e perdita di attività (es. enzimatica).
- Al **DNA nucleare e mitocondriale** con introduzione di mutazioni e frammentazione

Tra i più importanti radicali liberi negli organismi viventi vi sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS):

- Anione superossido $O_2^{\cdot-}$
- Radicale idrossilico $OH\cdot$
- Perossido di idrogeno H_2O_2

L'ossido nitrico (NO) e i suoi radicali liberi

- Anione perossinitrico (o perossinitrito) $ONOO^-$

Le **ROS** e le specie reattive dell'azoto sono composti ad elevata attività ossidante, che hanno forte tendenza a sottrarre elettroni (generando danno ossidativo) ad altre molecole come:

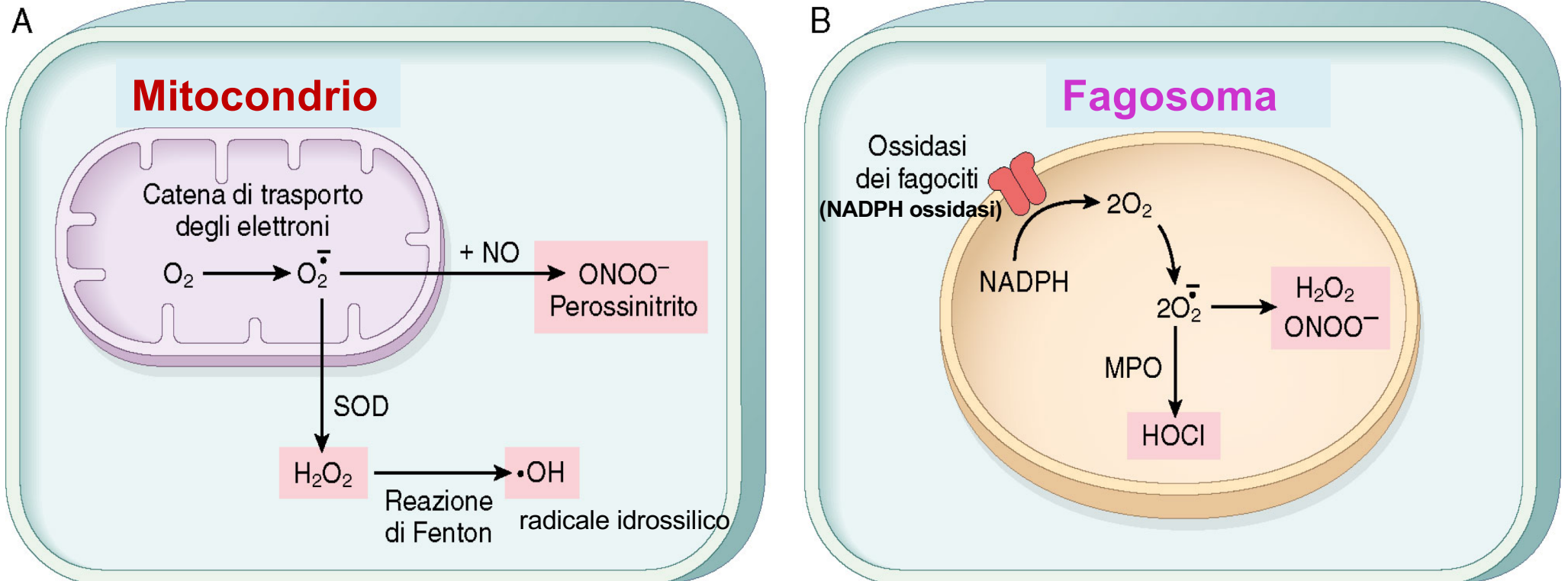
Lipidi (perossidazione degli acidi grassi polinsaturi di membrana)

Proteine (cross-linking sulfidrilico → degradazione; frammentazione)

Acidi nucleici (rottura o modificazione delle basi)

Carboidrati (radicalizzazione) e **Polisaccaridi** (frammentazione/ depolimerizzazione es. acido ialuronico)

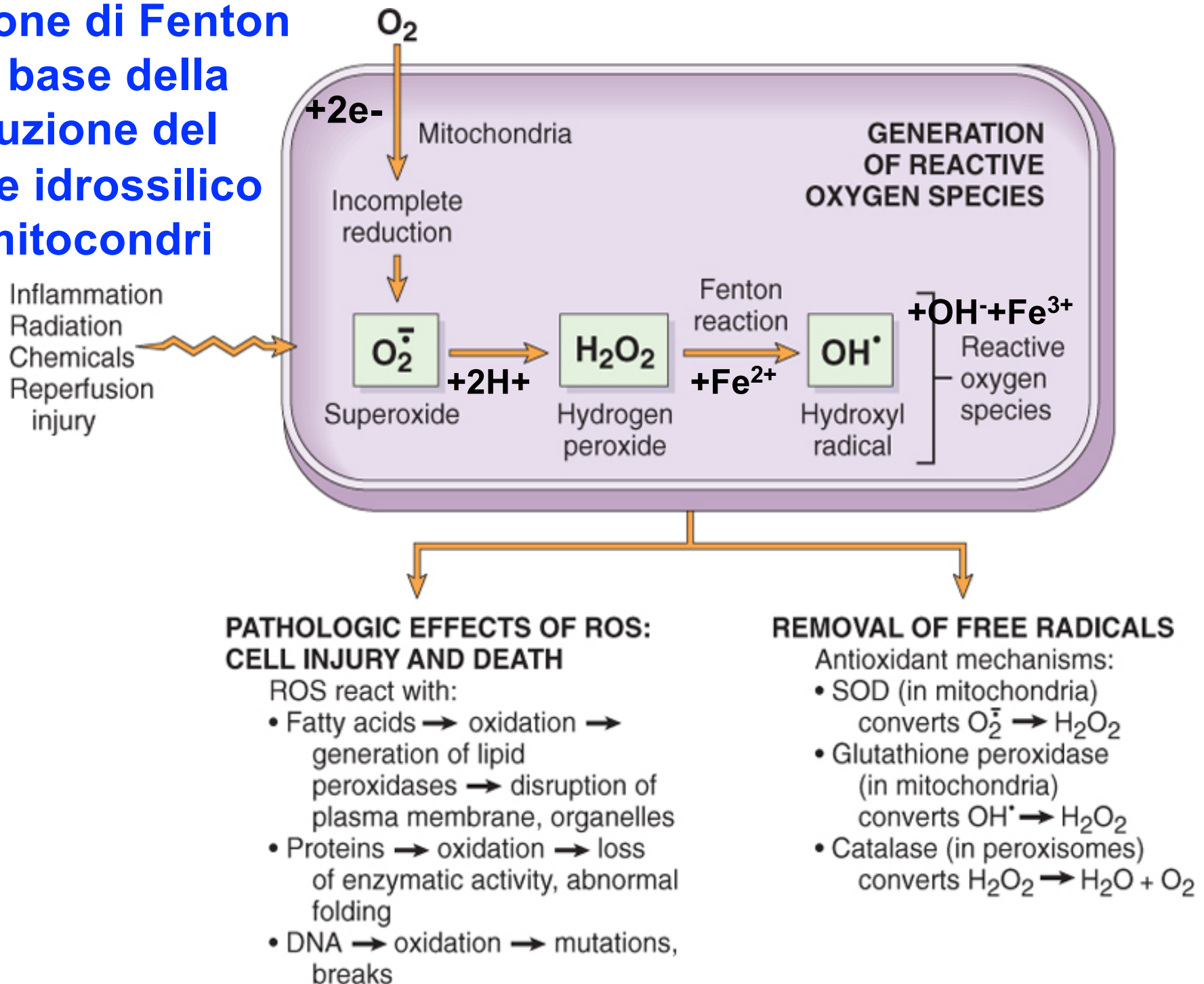
Formazione di radicali liberi



I radicali liberi si formano in seguito al normale metabolismo cellulare: nei **mitocondri** come conseguenza della catena di trasporto degli elettroni;

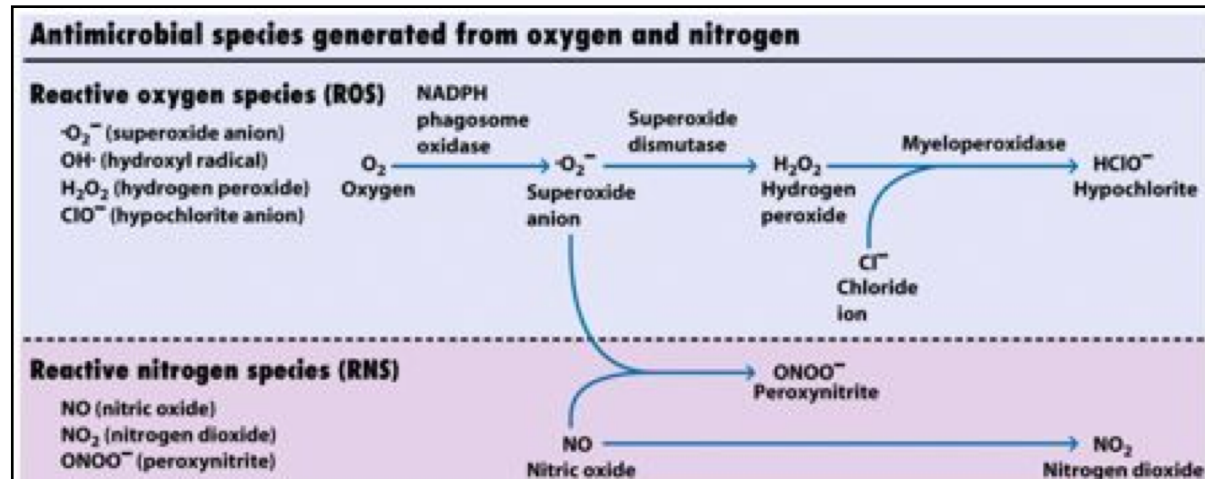
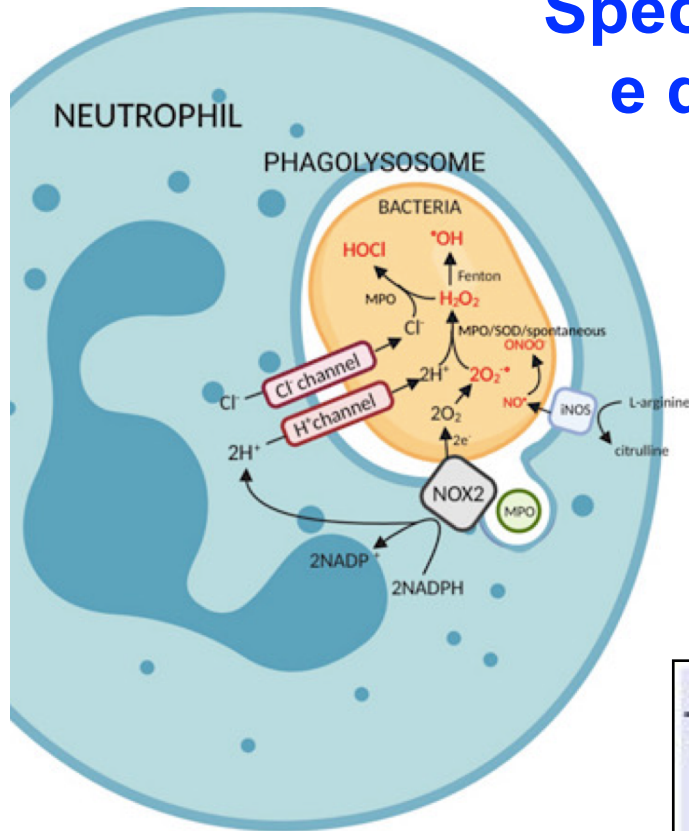
nei **fagosomi** (presenti nei **macrofagi** e **neutrofili**) come risultato dell'attività della NADPH ossidasi di membrana, funzionale all'uccisione dei patogeni fagocitati (attività microbicide).

La reazione di Fenton è alla base della produzione del radicale idrossilico nei mitocondri



Specie antimicrobiche generate dall'ossigeno e dall'azoto in cellule ad azione fagocitica

Esplosione respiratoria o ossidativa

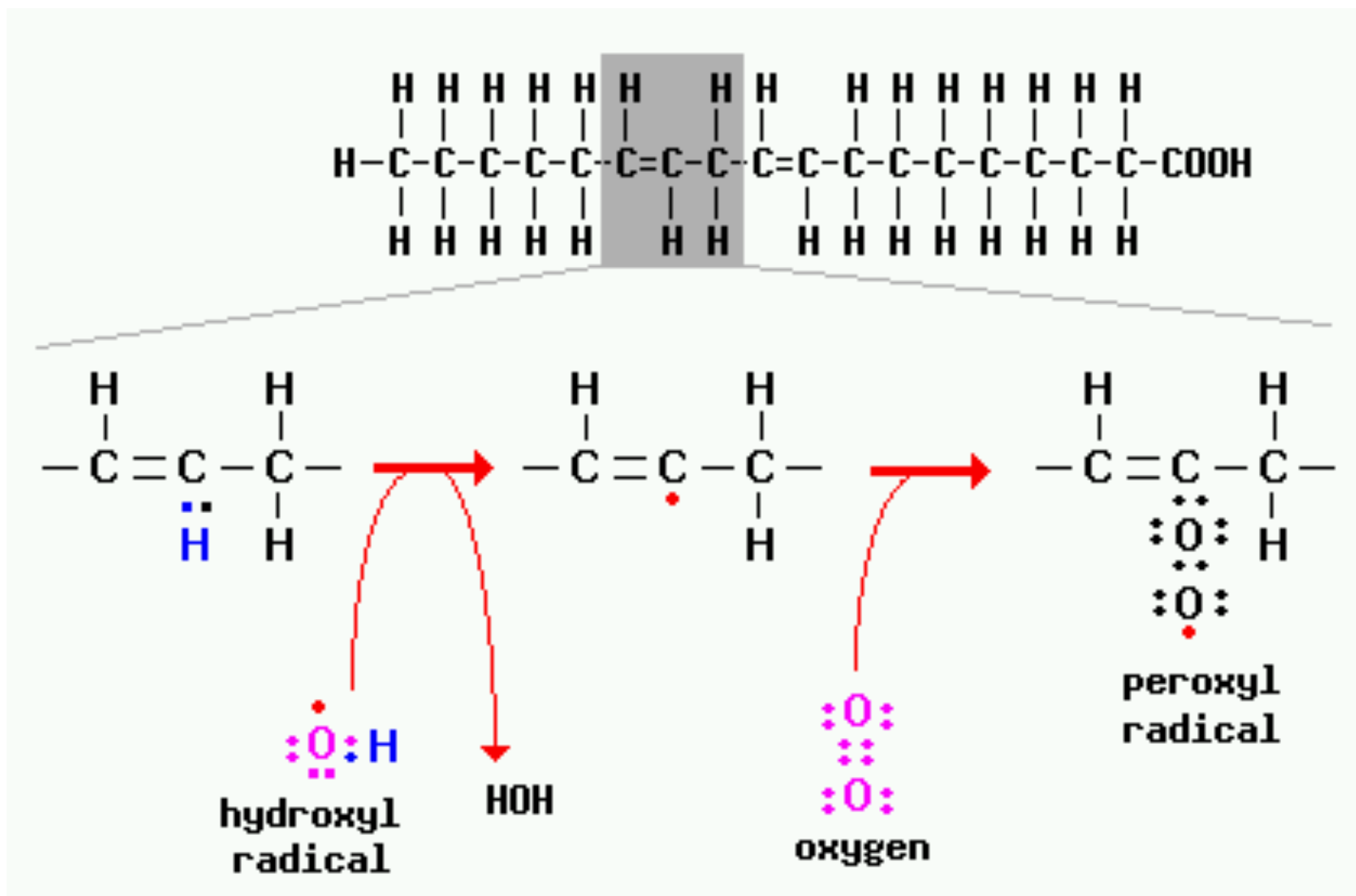


iNOS (sintasi inducibile dell'ossido nitrico) converte **arginina** in **citrullina** producendo **NO**



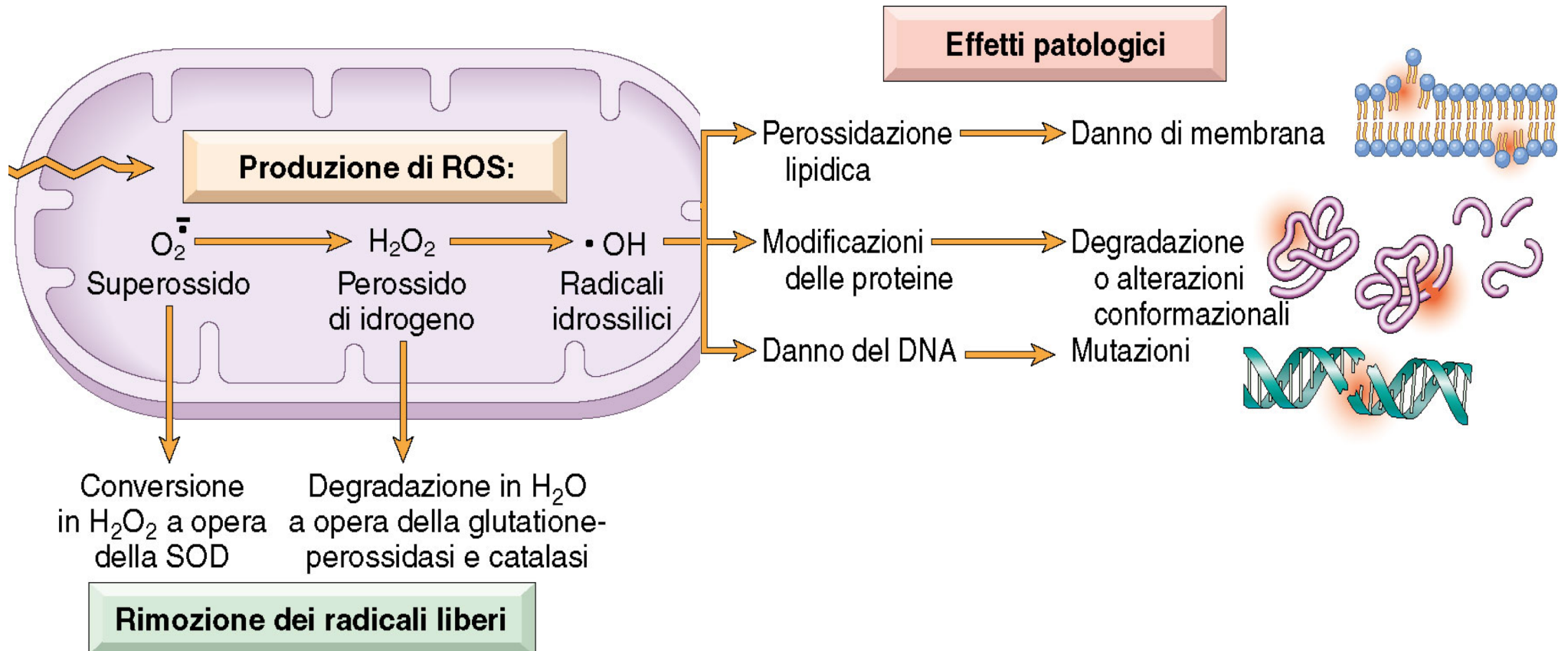
L'esplosione respiratoria si ha soprattutto nei neutrofili attivati e in minor misura nei macrofagi

I radicali liberi iniziano reazioni autocatalitiche generando nuovi radicali liberi



Processo autocatalitico di **perossidazione lipidica** che si propaga con una reazione a catena

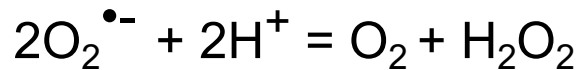
La formazione di radicali liberi è controbilanciata da meccanismi di rimozione



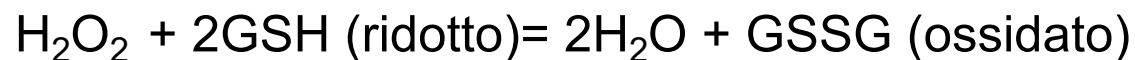
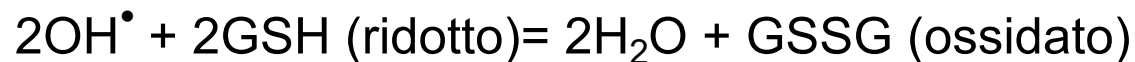
L'eccesso di radicali liberi o l'inefficienza dei sistemi di smaltimento causano stress ossidativo

Neutralizzazione dei radicali liberi

Superossido dismutasi (SOD)



Glutazione perossidasi (citosol)



Catalasi (nei perossisomi)



La **SOD** è l'antiossidante enzimatico con la più alta velocità di reazione con il proprio substrato ovvero l'anione superossido, che viene prontamente dismutato in perossido di idrogeno, sostanza molto meno reattiva. Successivamente, altri enzimi (glutazione perossidasi e catalasi) convertiranno il perossido di idrogeno in ossigeno molecolare e acqua.

Il **glutazione** è una sostanza prodotta dal fegato presente anche in alcuni cibi (frutta, verdura e carni). Si tratta di un **tripeptide** formato da glutammato, cisteina e glicina.

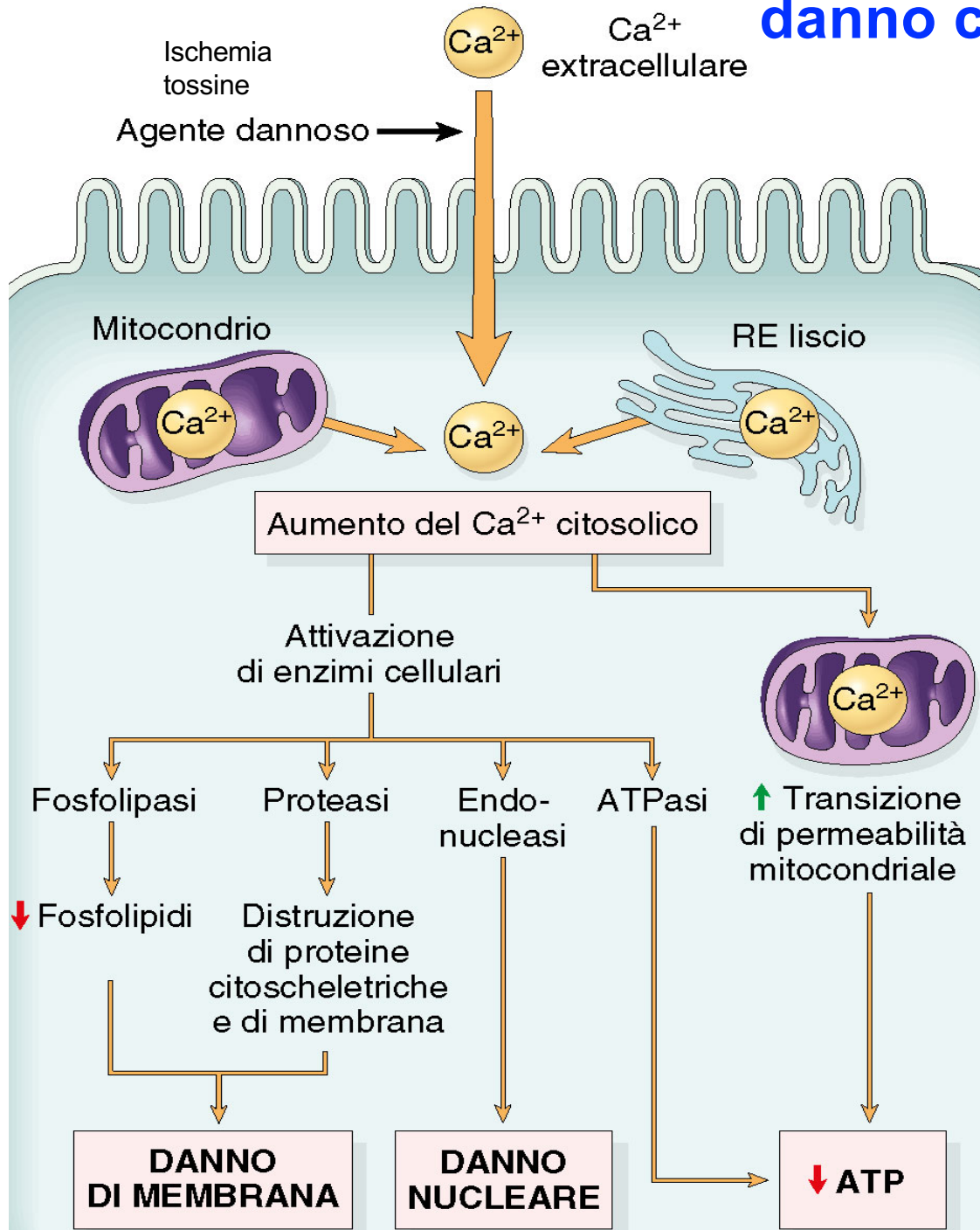
Alcune vitamine hanno un forte potere antiossidante.



Antiossidanti:

- Vitamine A, C, E
- β -carotene
- oligoelementi (selenio, zinco)
- polifenoli

Perdita dell'omeostasi del calcio come meccanismo di danno cellulare



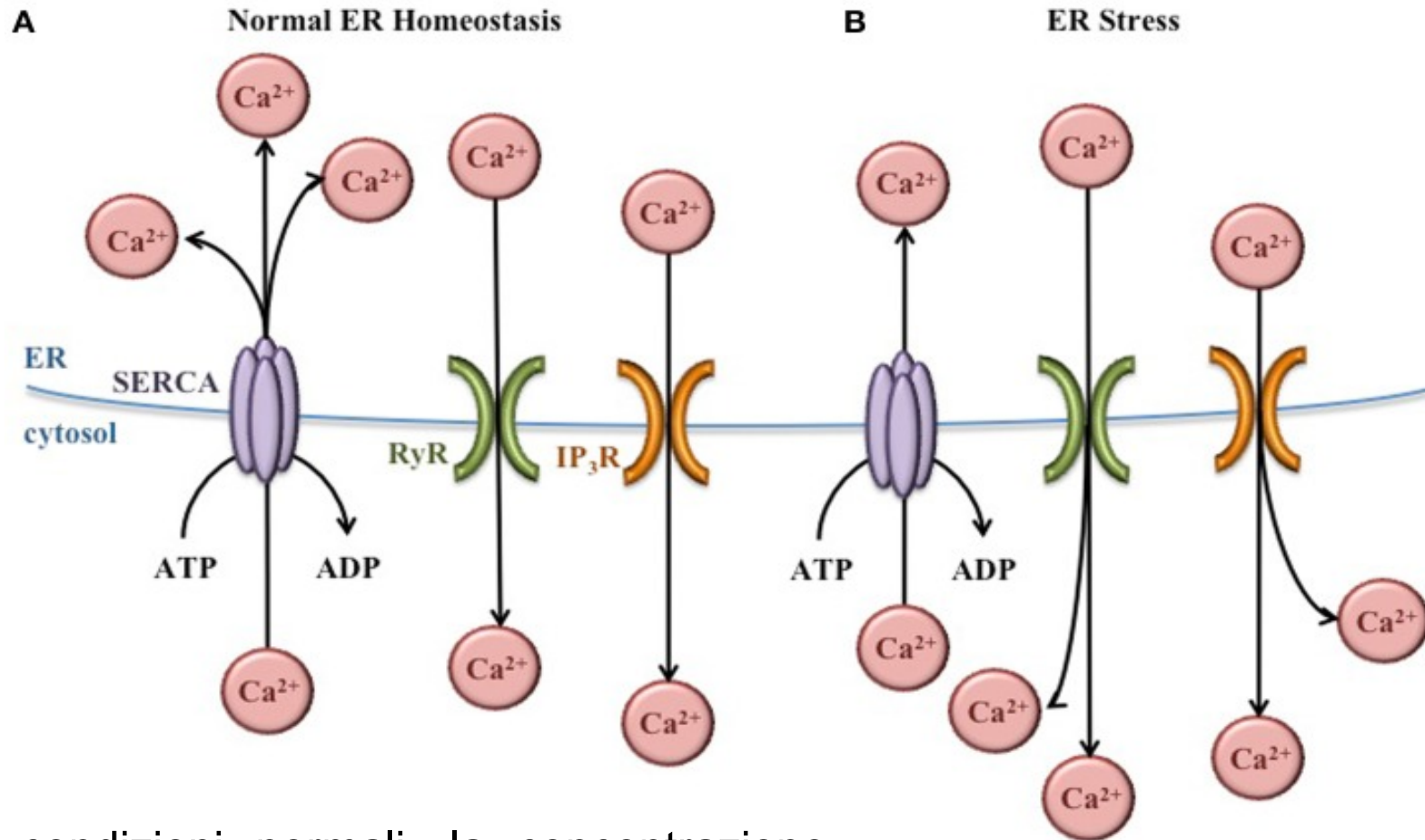
Aumento del Ca^{2+} citosolico per ingresso dall'esterno della cellula, per rilascio dai mitocondri o dal reticolo endoplasmatico.

Consequente attivazione di:

- **Fosfolipasi** (danno alle membrane)
- **Proteasi** (danno a membrana e citoscheletro)
- **ATPasi** (ulteriore deplezione di ATP)
- **Endonucleasi** (degradazione del DNA)

La concentrazione degli ioni Ca^{++} nel citoplasma è mantenuta fino a 10000 volte inferiore a quella del RE e nel mitocondrio

Reticolo endoplasmatico e ioni Ca^{++}

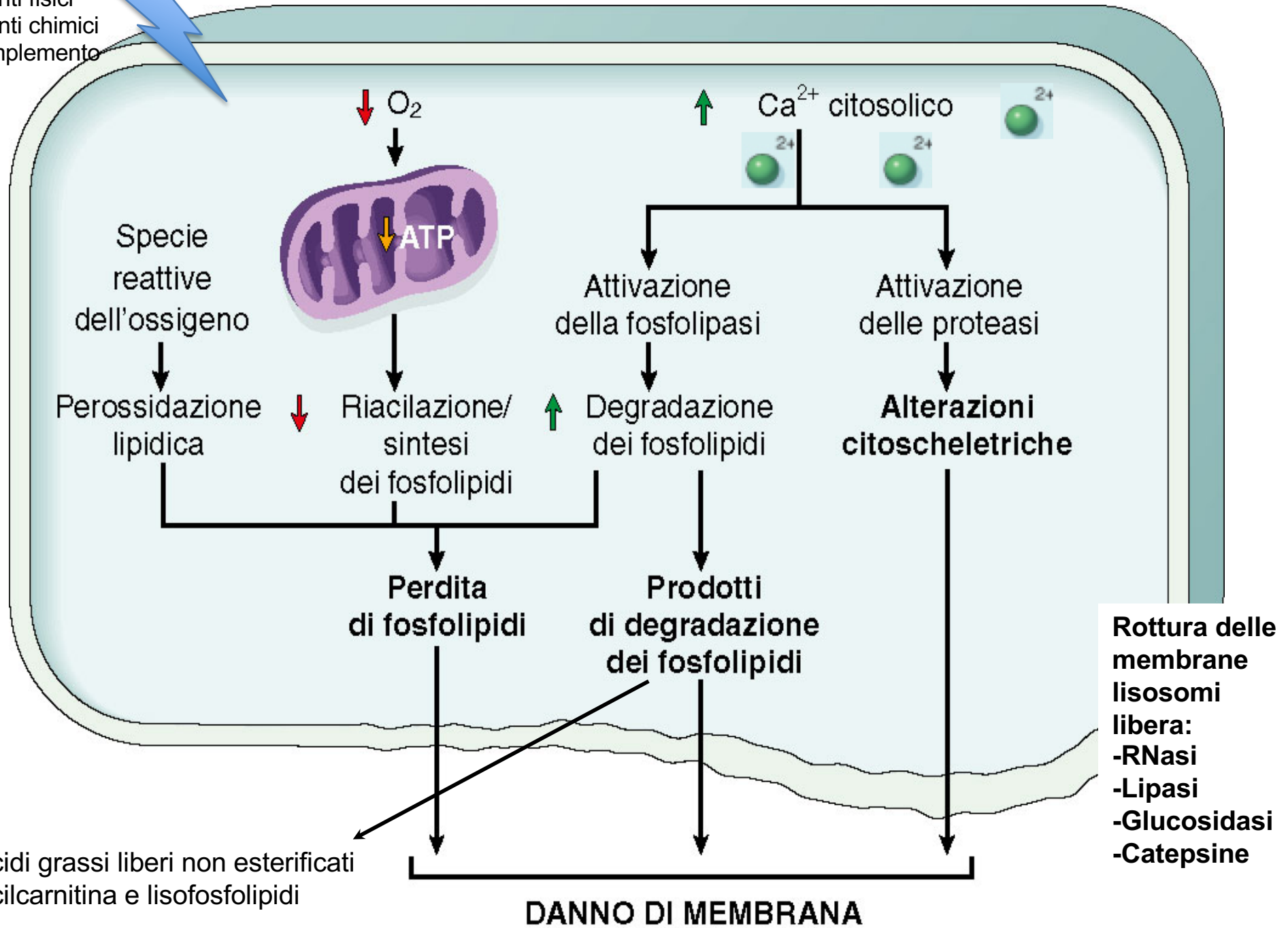


(A) In condizioni normali, la concentrazione degli ioni Ca^{2+} è maggiore nel lume del RE che nel citosol. Questo equilibrio è mantenuto dalla pompa SERCA che porta Ca^{2+} dentro il RE e dai canali del Ca^{2+} (RyR and IP₃R) che rilasciano Ca^{2+} nel citoplasma per il normale “signaling” cellulare.

(B) Nel caso di stress del RE, il gradiente di Ca^{2+} è disturbato, portando al rilascio di Ca^{2+} dal RE e aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel citoplasma.

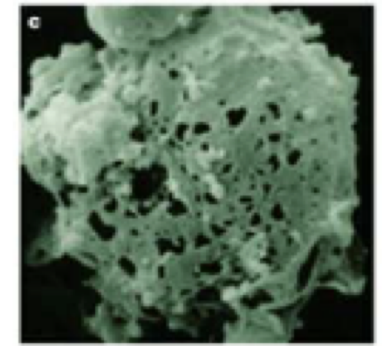
Ischemia
Tossine
Agenti fisici
Agenti chimici
Complemento

Danno di membrana nello stress cellulare



Danno alle membrane causata da:

- Perdita e danneggiamento dei fosfolipidi per:
 - ridotta sintesi es. riduzione di ATP (inibizione di enzimi ATP-dipendenti);
 - degradazione per attivazione delle fosfolipasi
 - perossidazione indotta da ROS
- Degradazione del citoscheletro per azione delle proteasi e distacco dalle membrane
- Formazione di prodotti catabolici di degradazione lipidica (acidi grassi non esterificati, acilcarnitina, lisofosfolipidi) che inserendosi nelle membrane ne alterano permeabilità e caratteristiche elettrofisiologiche.



- **Danno alla membrana citoplasmatica**

Perdita del bilancio osmotico, afflusso di fluidi e ioni, perdita di contenuto cellulare e metaboliti

- **Danno alla membrana lisosomiale**

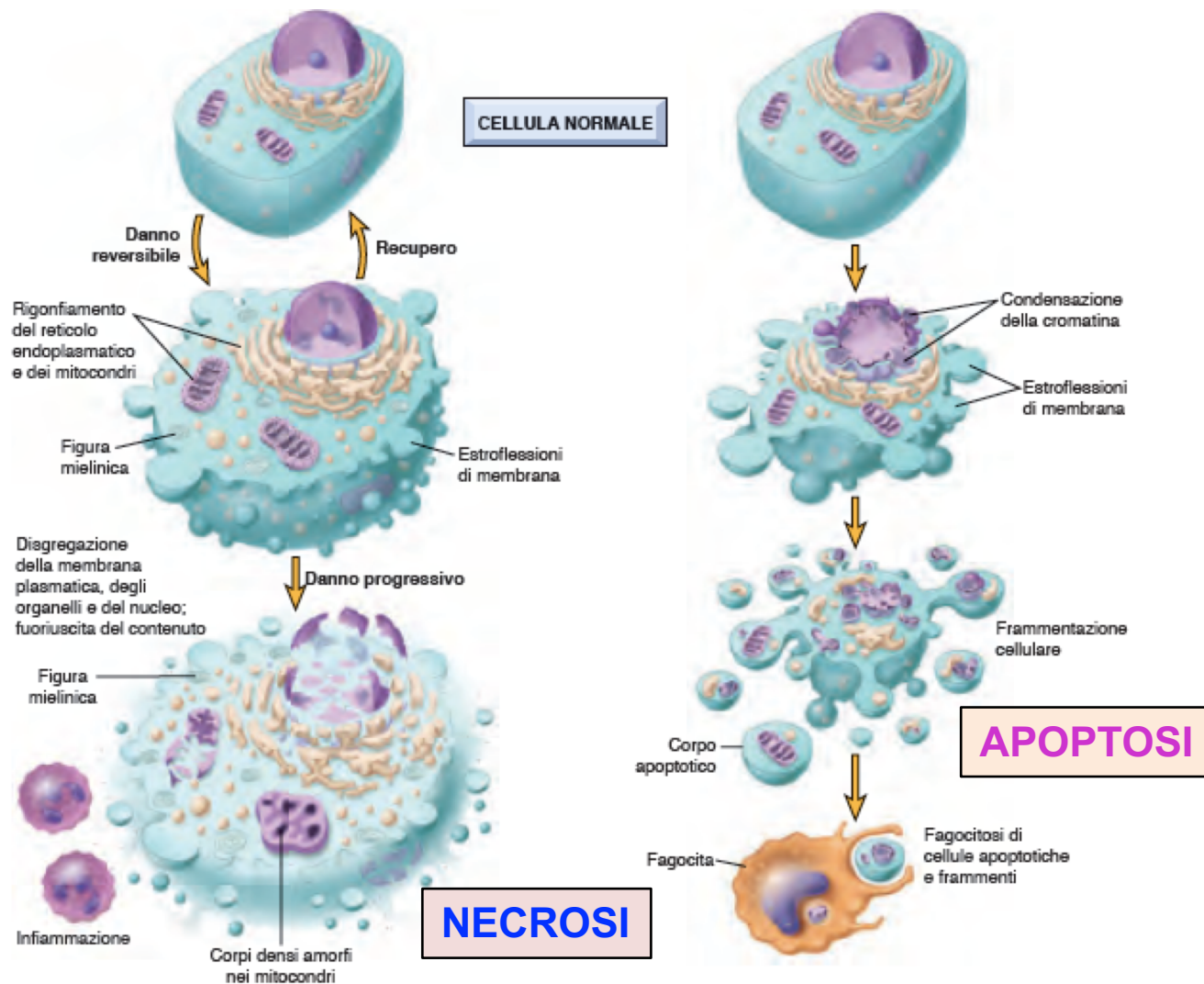
Fuoriuscita nel citosol di idrolasi acide: proteasi, RNasi, DNasi, fosfatasi, lipasi, glicosidasi, attivate dal pH acido citosolico di cellule danneggiate → digestione enzimatica di componenti cellulari → necrosi



- **Danno alla membrana mitocondriale**

Riduzione della produzione di ATP

Quando il danno diventa irreversibile allora la cellula muore e può farlo in almeno due diversi modi: necrosi o apoptosi

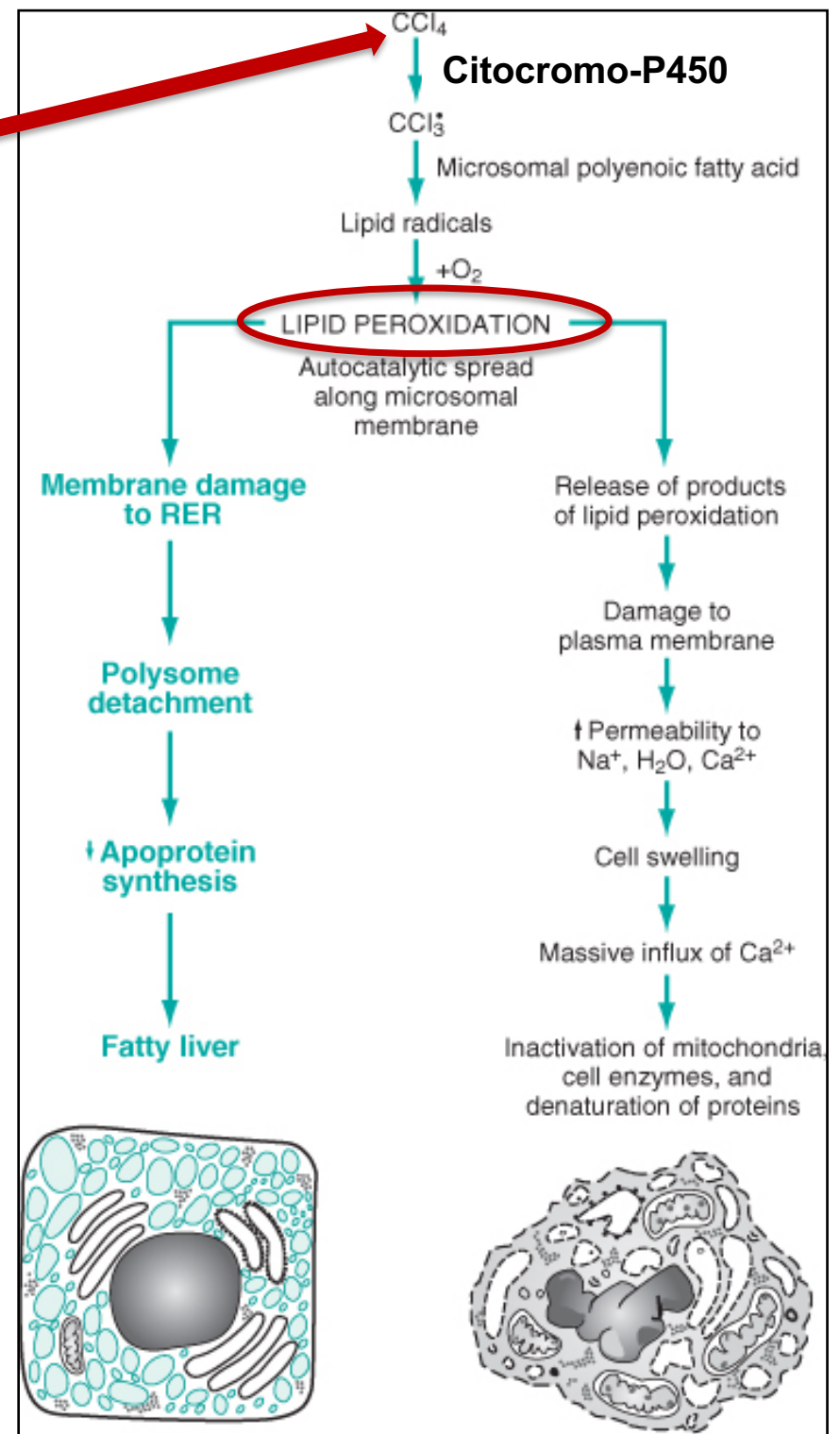


L'apoptosi è attivata da un programma genetico che incide poco sul microambiente mentre la necrosi è un meccanismo di rottura delle membrane con forte alterazione del microambiente e con attivazione di una risposta infiammatoria

**Danno cellulare da agenti chimici
e farmaci (tossici)**

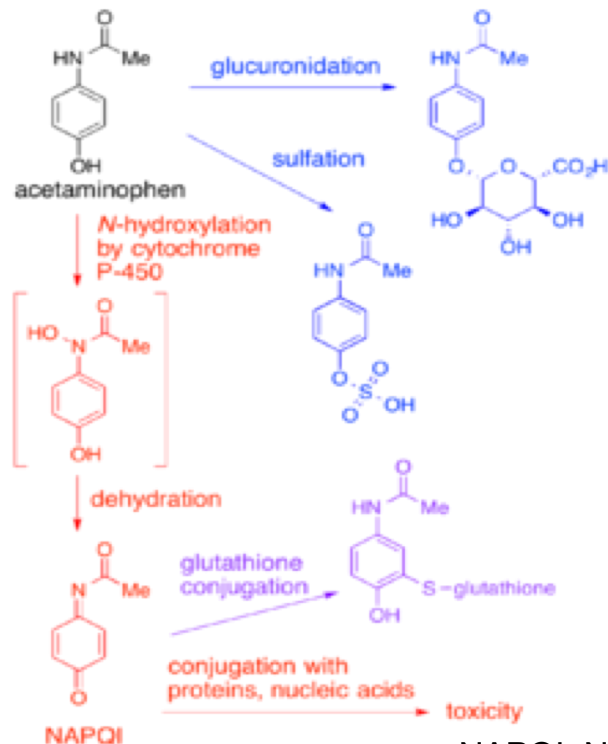
Danno da agenti chimici: esempi

- **Tetracloruro di carbonio** (CCl_4) è convertito dal citocromo P-450 in triclorometilene ($\text{CCl}_3\cdot$) altamente reattivo che danneggia le membrane in modo irreparabile e induce steatosi epatica ed epatite fulminante.
- **Cianuro:** avvelena la ferri-citocromo ossidasi mitocondriale inibendo l'utilizzazione dell' O_2 per la respirazione cellulare.
- **Cloruro di mercurio:** Aumento della permeabilità della membrana cellulare e blocco del trasporto ionico ATP-dipendente dovuto a legame del mercurio ai gruppi sulfidrici delle proteine di membrana.

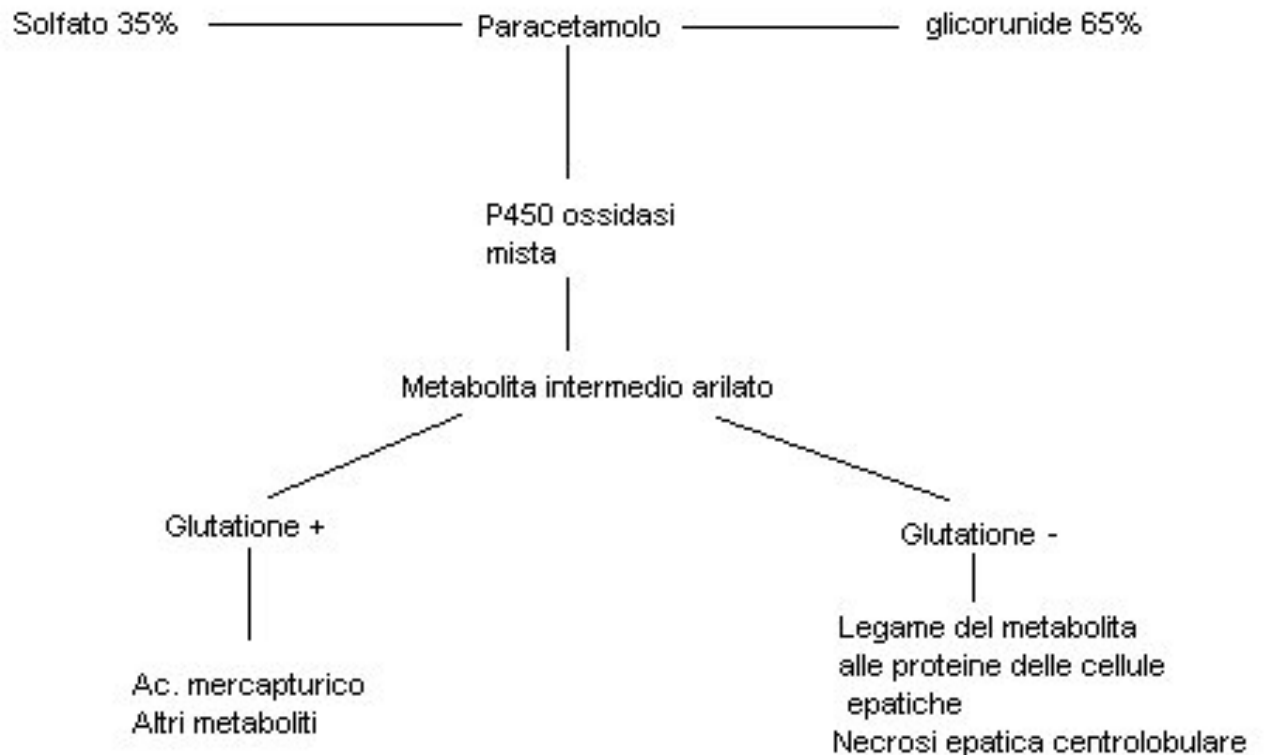


Danno da farmaci: il caso del paracetamolo

Il paracetamolo viene metabolizzato nel fegato attraverso tre vie: sulfazione, glucuronidazione oppure dal **citocromo P-450** con produzione di intermedi ossidativi che vengono detossificati dal **glutathione**. In assenza di glutathione, questi composti reagiscono con le strutture epatiche provocando morte cellulare.



NAPQI: N-acetyl-p-benzoquinone imine



Un eccesso di tachipirina oppure una diminuzione del glutathione disponibile può avere quindi gravi conseguenze.

Negli Stati Uniti il sovradosaggio di tachipirina è una causa frequente di intossicazione.