

Patologia cellulare

R. Virchow
(1862)



“La cellula rappresenta la forma organizzata più piccola della materia vivente nella quale la malattia si può manifestare”

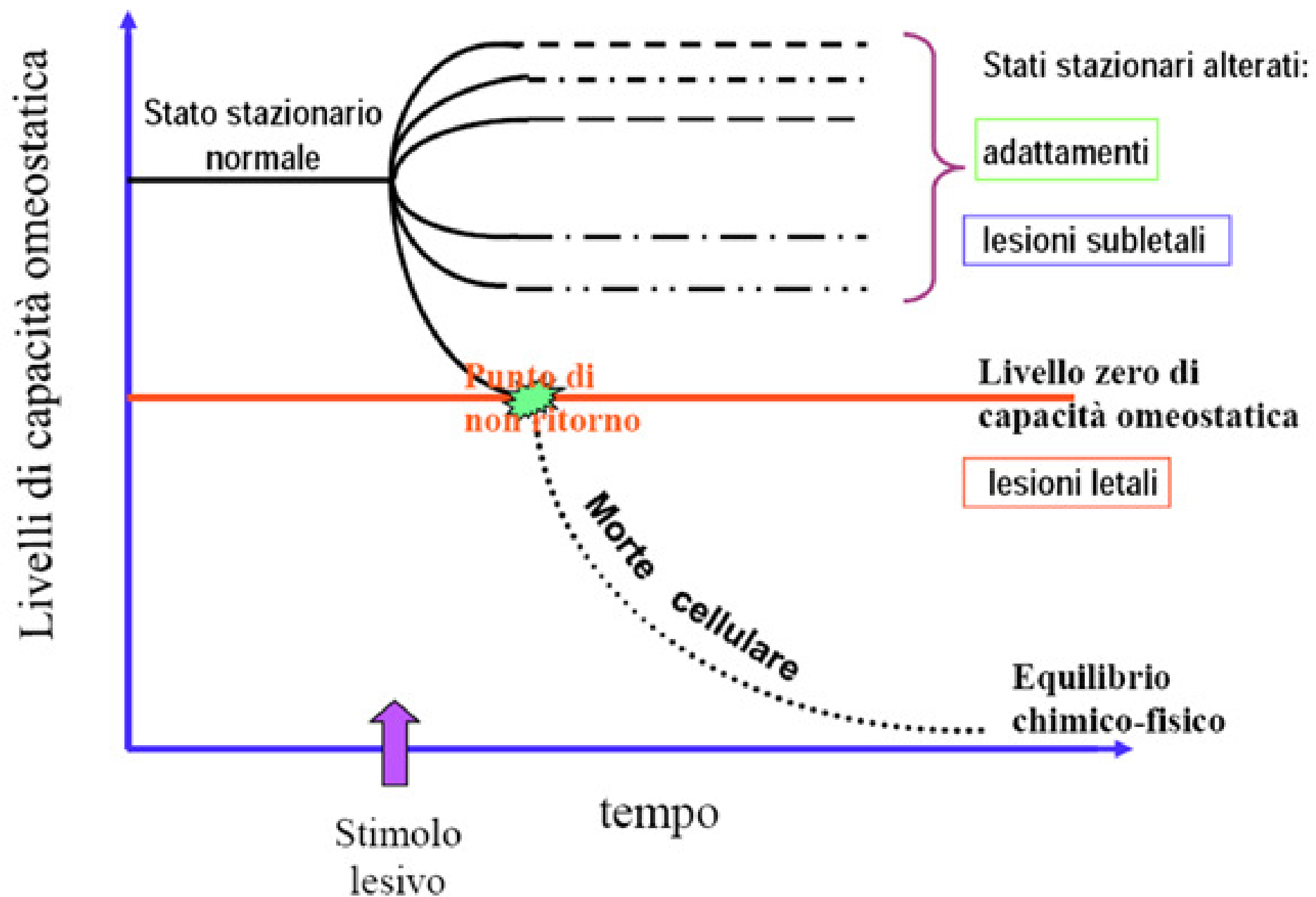
“Ogni malattia intesa nel senso macroscopico (clinico e anatomico-patologico) ha il suo fondamento nella lesione delle cellule”

DANNO CELLULARE

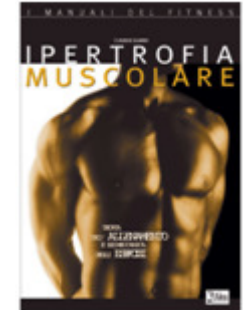
La cellula normale è limitata ad un ambito abbastanza ristretto di strutture e funzioni:

- dai suoi **programmi genetici (tipo cellulare)**
- dall'**influenza delle cellule circostanti**
- dalla **disponibilità di substrati metabolici.**

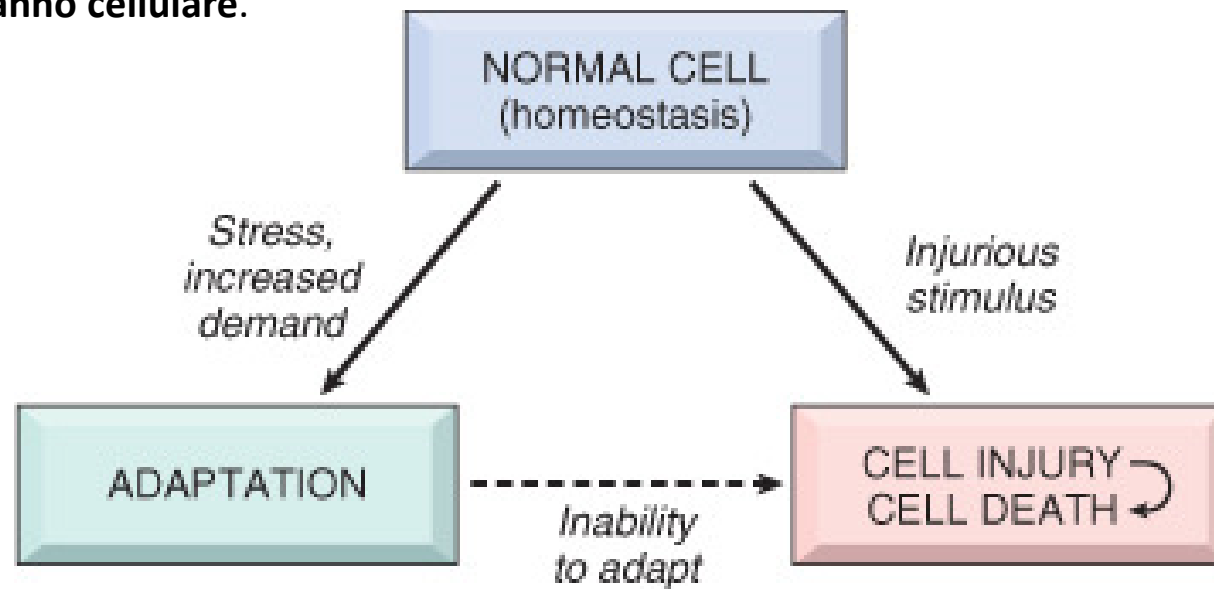
...tuttavia è capace di soddisfare le normale richieste fisiologiche, mantenendo il suo stato di normale omeostasi.



Entro certi limiti, eccessive stimolazioni fisiologiche o alcuni stimoli patologici possono innescare varie forme di **adattamenti cellulari** morfologici e fisiologici, grazie ai quali le cellule acquisiscono nuove caratteristiche, che seppur anomale, ne preservano la vitalità e ne modulano la funzione in risposta a tali stimoli (Es. *body building*, risposta adattativa ⇒ **ipertrofia**).

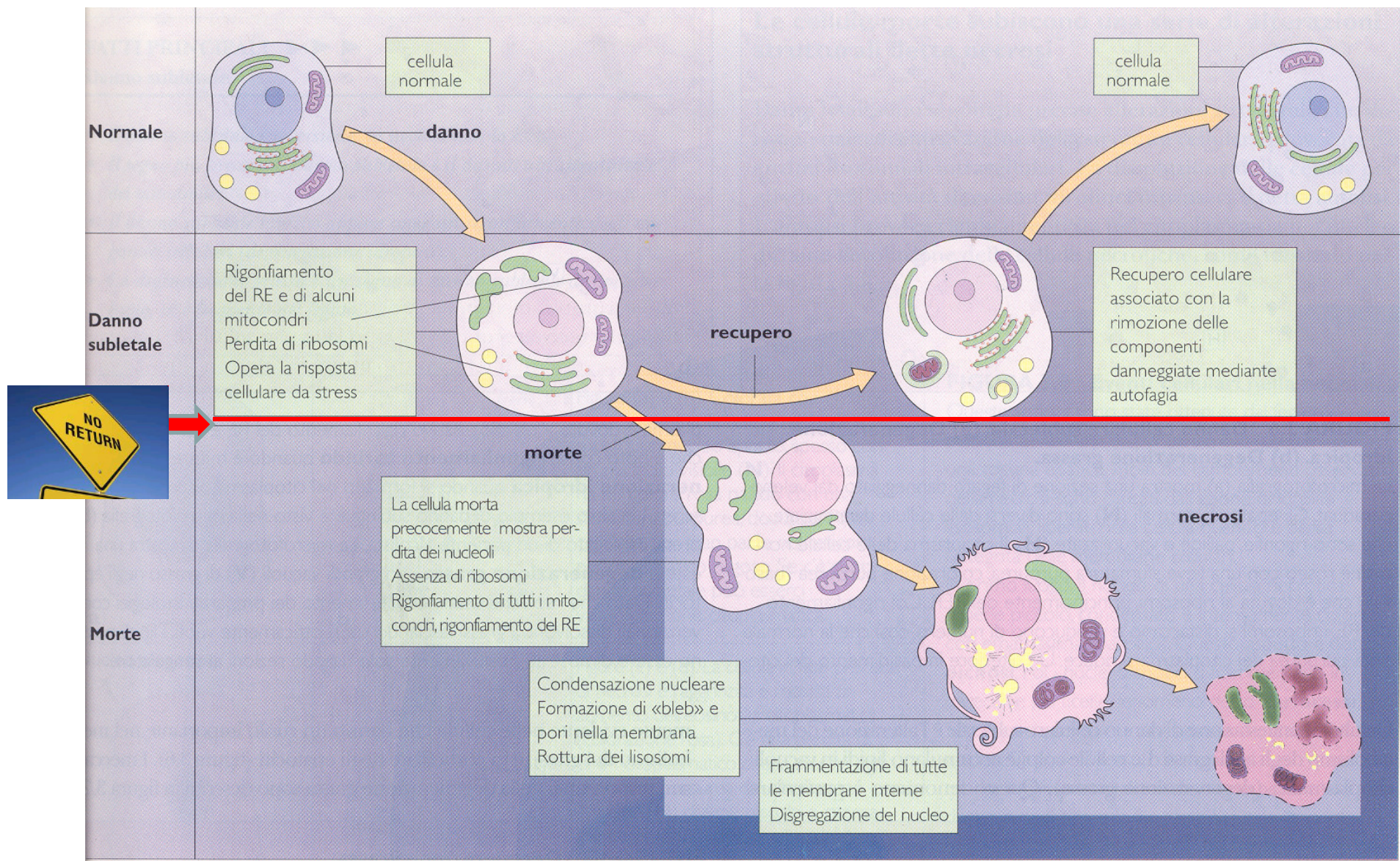


Se il limite della risposta di adattamento viene superato o se in alcuni casi **l'adattamento (nuovo stato stazionario-non morboso)** non è possibile, seguono una sequenza di eventi chiamati **danno cellulare**.



© Elsevier 2005

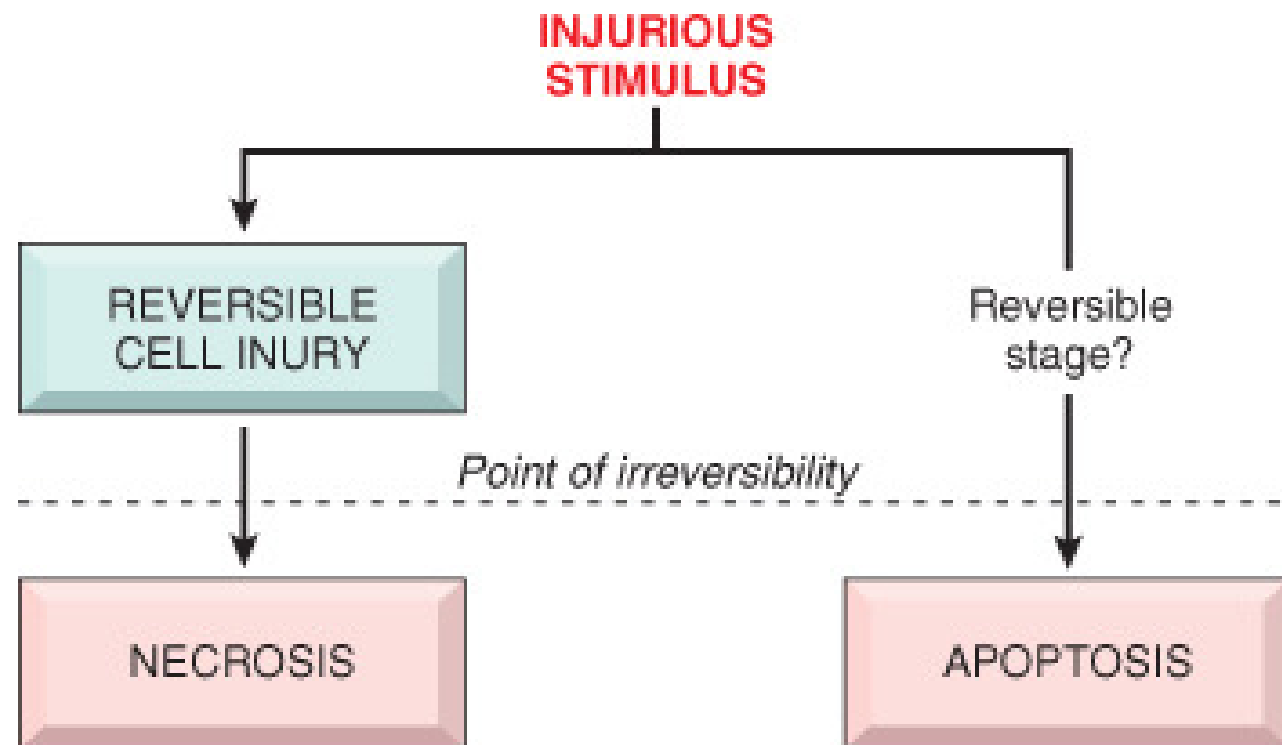
Il danno cellulare fino ad un certo punto è **reversibile (nuovo stato stazionario- morboso)**, ma se lo stimolo persiste o è sufficientemente intenso sin dall'inizio la cellula raggiunge il **“punto di non ritorno”** subisce un **danno cellulare irreversibile** e va incontro a morte.....



La **MORTE CELLULARE** è l'esito ultimo del danno cellulare ed è uno degli eventi cruciali in patologia perché interessa ogni tipo di cellula, è un evento critico durante l'embriogenesi, lo sviluppo del tessuto linfoide, l'involuzione indotta da ormoni di alcuni organi, i trapianti ed è lo scopo della chemio- e radioterapia.

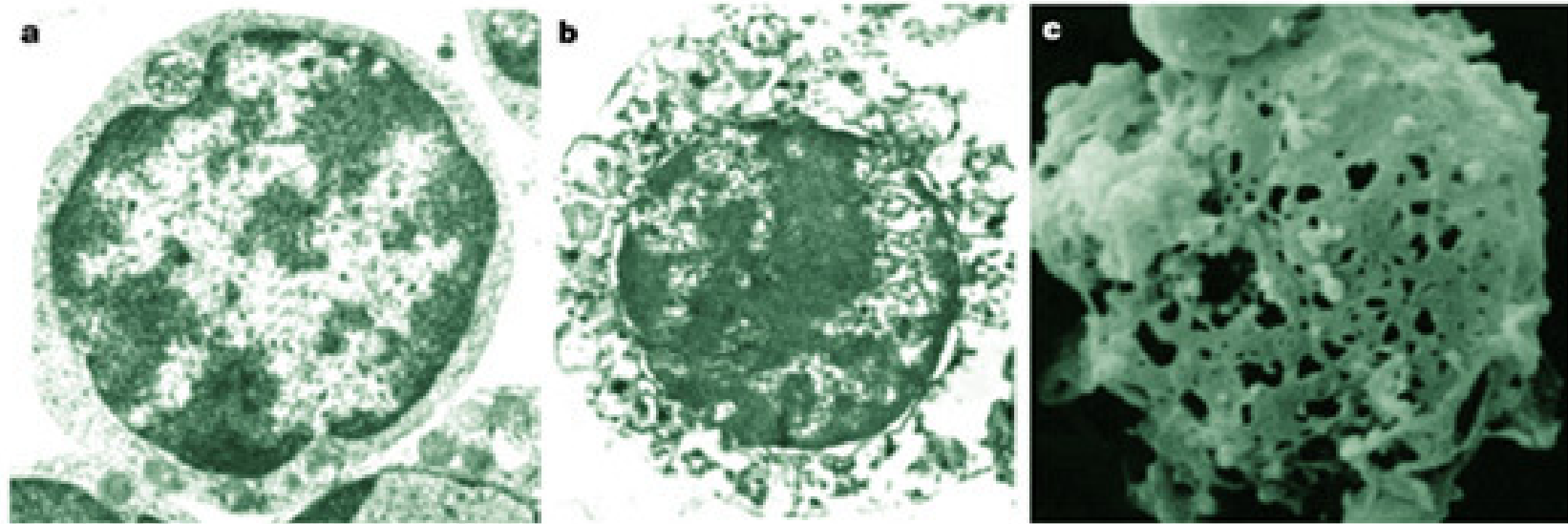
Esistono due modalità principali di morte cellulare:

- la necrosi
- l'apoptosi



La necrosi è il tipo **più comune di morte** cellulare in seguito a stimoli esogeni come l'ischemia e danno chimico.

Si manifesta con **rigonfiamento e/o rottura cellulare**, denaturazione e coagulazione delle proteine citoplasmatiche e rottura degli organelli cellulari.



Nature Reviews | **Neuroscience**

Necrotic cell death.

*Electron micrographs of
a normal cell (a) and a cell undergoing necrotic cell death (b).*

Extensive distortion of the cytoplasm and the plasma membrane is evident.

*The scanning electron micrograph shown in c illustrates the **marked lesions** that appear on the surface of the plasma membrane at late stages of necrotic cell death.*

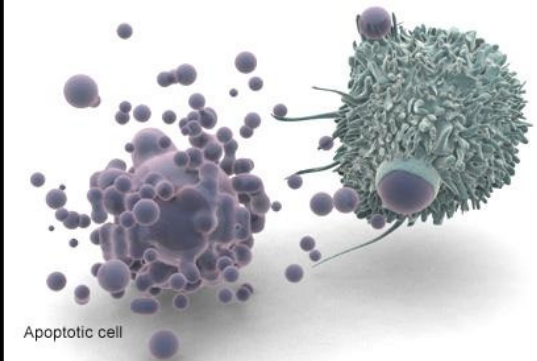
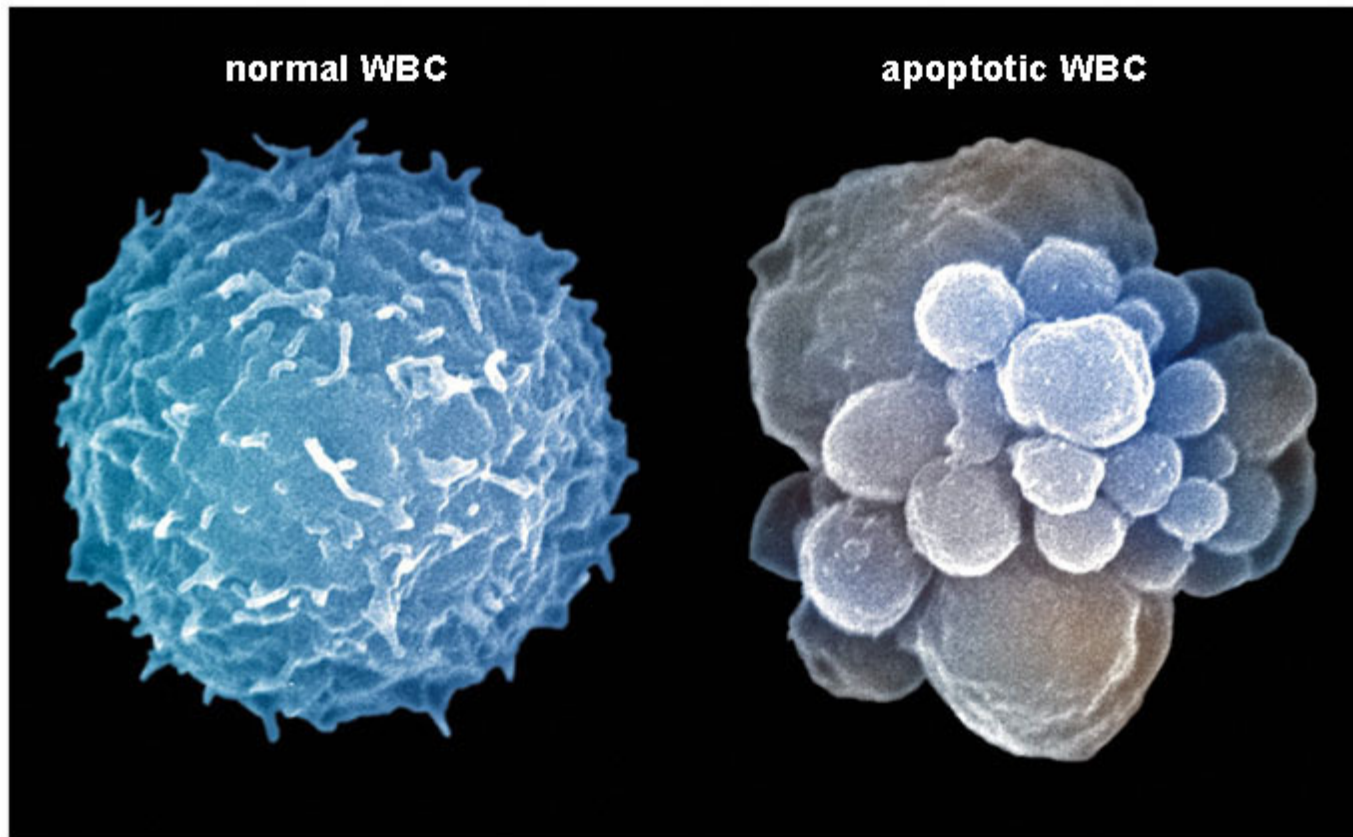
Adapted, with permission, from Ref. 181 © (1997) MMK Holdings Inc. in association with Purdue University Cytometry Laboratories.

L'apoptosi si verifica quando una cellula muore attraverso l'attivazione di un programma di suicidio internamente controllato (**richiede energia**).

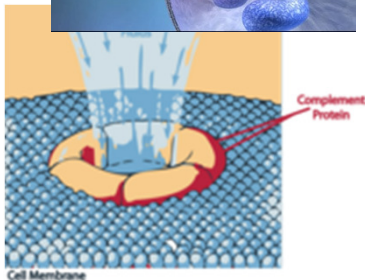
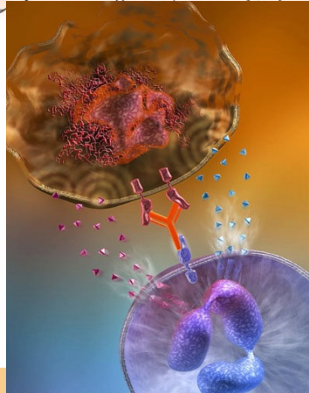
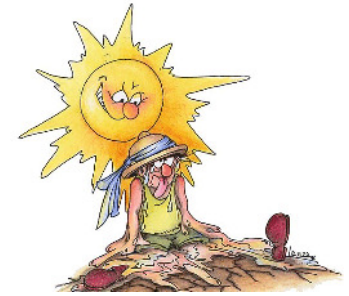
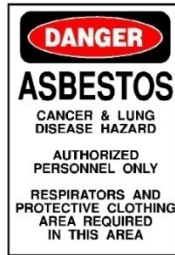
Si tratta di un sottile e ben orchestrato disassemblaggio dei componenti cellulari allo scopo di eliminare **cellule inutili** durante l'embriogenesi e in vari altri processi fisiologici.

Le cellule condannate vengono rimosse con il **minimo interessamento dei tessuti circostanti**.

Le sue caratteristiche morfologiche sono la **condensazione e frammentazione della cromatina**.

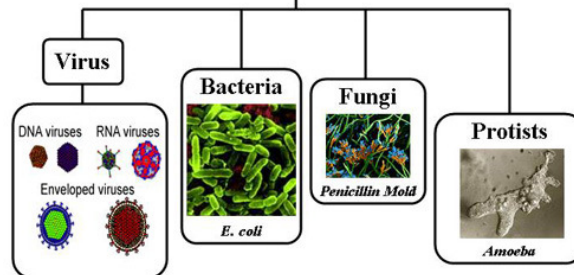


CAUSE DI DANNO CELLULARE

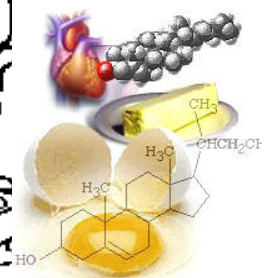
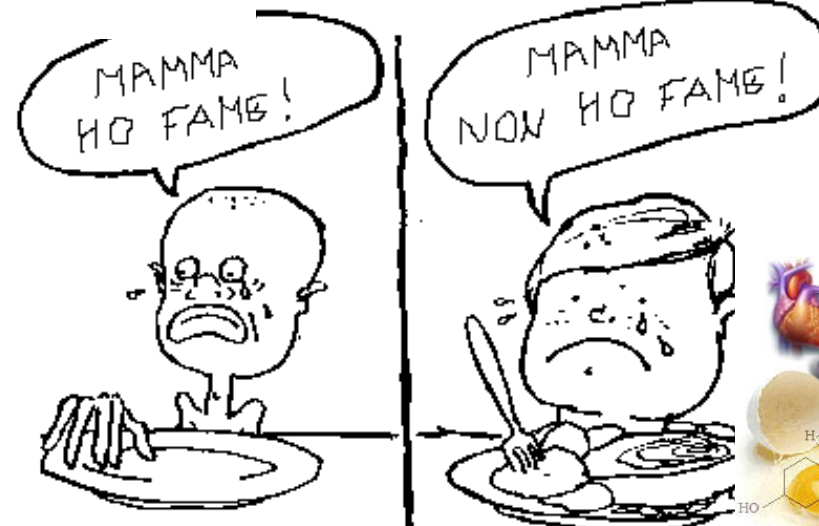


Microorganisms

Routes of Exposure:
Ingestion, Injection, Inhalation



Canadian Genetic Diseases Network
Réseau canadien de maladies génétiques



CAUSE DI DANNO CELLULARE

• **Agenti fisici:** traumi meccanici, temperature estreme, cambiamenti improvvisi della pressione atmosferica, radiazioni e shock elettrico.

• **Agenti chimici:**

-Semplici composti come il glucosio e i sali se in concentrazioni elevate possono causare danno direttamente o alterando l'omeostasi elettrolitica della cellula. Anche l'ossigeno a concentrazioni elevate è tossico.

-Veleni (arsenico, cianuro, sali di mercurio)

-Inquinanti atmosferici, insetticidi, erbicidi...

-Fattori di rischio professionali (monossido di carbonio, asbesto)

-Stimoli sociali (alcool e droghe)

-Farmaci

• **Agenti infettivi:** dai virus ai vermi. Includono tossine e perforine batteriche...

• **Reazioni immunologiche:** es. malattie autoimmuni (complesso C5-9 del complemento agisce come le perforine, così pure come fattori litici di cells natural killer e linfociti citotossici)

• **Disordini genetici:** grossolani come nella sindrome di Down o più sottili come la sostituzione di un solo aminoacido nell'emoglobina S nella anemia falciforme o una carenza enzimatica...

• **Squilibri nutrizionali:** deficienze proteiche, vitaminiche, sovra- o sottonutrizione, eccesso di lipidi (predisporre all'aterosclerosi, endemica in USA)

• **Privazione di ossigeno: anossia**

RISPOSTE CELLULARI AL DANNO

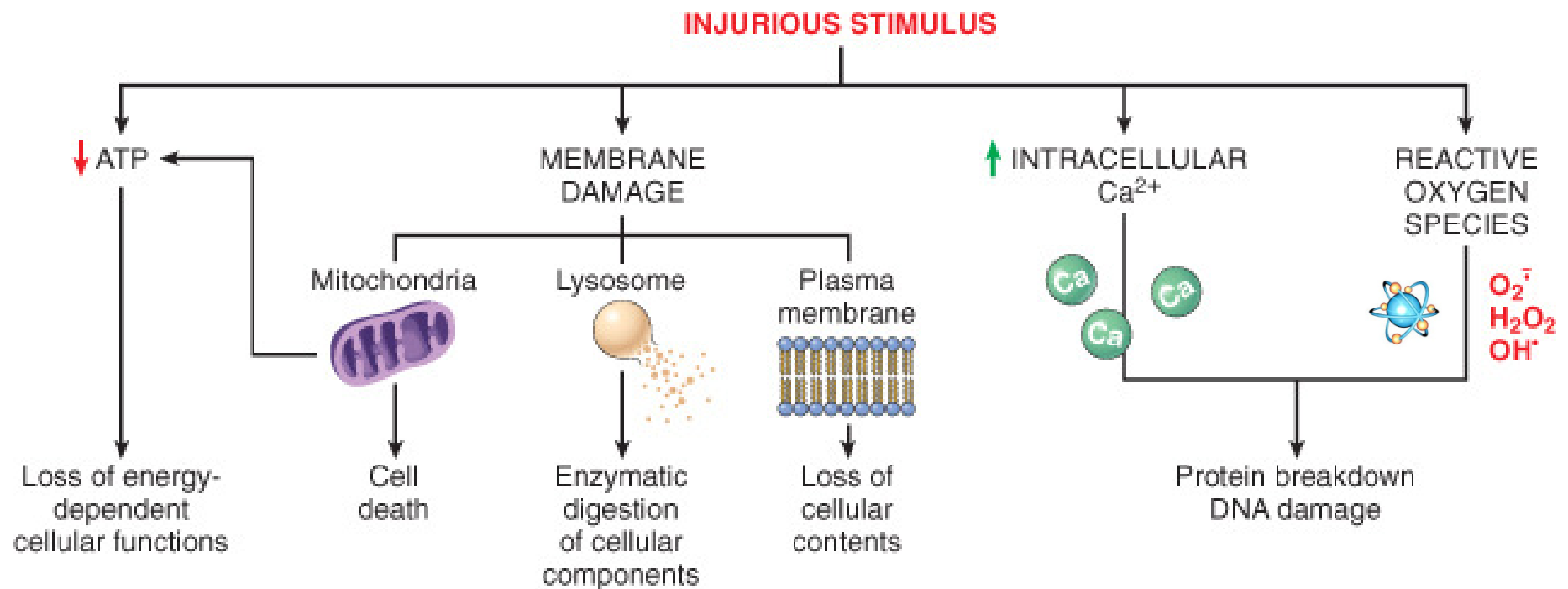
La risposta di una cellula a stimoli dannosi dipende dal

- **tipo di stimolo,**
- dalla sua **durata** e
- dalla sua **intensità**

Le conseguenze del danno cellulare dipendono dal

- **tipo cellulare,**
- dal suo **stato** e
- dall'**adattabilità** della cellula danneggiata

Bersagli cellulari e biochimici del danno cellulare



RISPOSTE CELLULARI AL DANNO

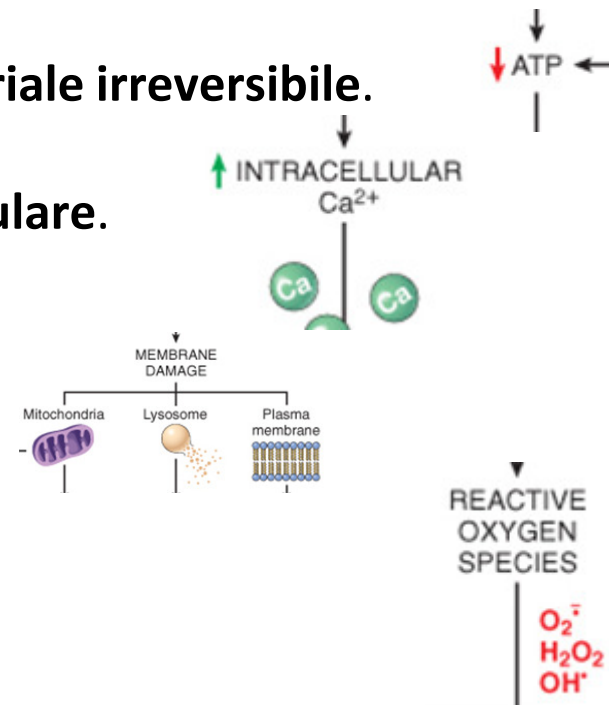
- Per alcuni agenti dannosi i siti biochimici di attacco sono ben definiti (es. il cianuro inattiva la citocromo ossidasi mitocondriale, fosfolipasi prodotta da *Clostridium perfringens* attacca i fosfolipidi delle membrane cellulari...) per molti altri le modalità con cui portano alla morte cellulare non sono del tutto conosciute.
- Indipendentemente dall'agente scatenante esistono alcuni aspetti biochimici comuni che sono rilevanti nell'induzione del danno cellulare e della morte cellulare per necrosi.

- **La deplezione di ATP e il danno mitocondriale irreversibile.**

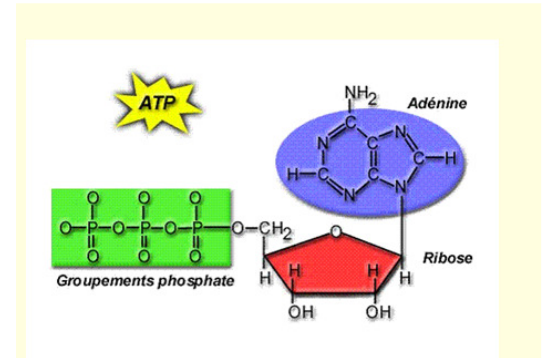
- **Perdita dell'omeostasi del calcio intracellulare.**

- **Difetti nella permeabilità di membrana.**

- **Ossigeno e radicali liberi dell'ossigeno.**



LA DEPLEZIONE DI ATP



Il fosfato ad alta energia sottoforma di ATP è richiesto in molti processi sintetici e degradativi all'interno della cellula (trasporto di membrana, sintesi proteica, lipogenesi, *turnover* dei fosfolipidi....).

L'ATP è prodotto in 2 modi: **fosforilazione ossidativa**
glicolisi

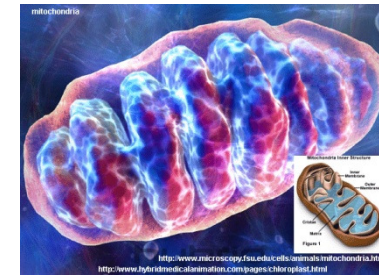
La **fosforilazione ossidativa** dell'ADP è la via principale nei mammiferi: si tratta di una reazione che dà origine a riduzione dell'ossigeno da parte della catena di trasporto elettronica mitocondriale.

La **glicolisi** genera ATP in assenza di ossigeno usando il glucosio derivato di fluidi corporei o dall'idrolisi del glicogeno.

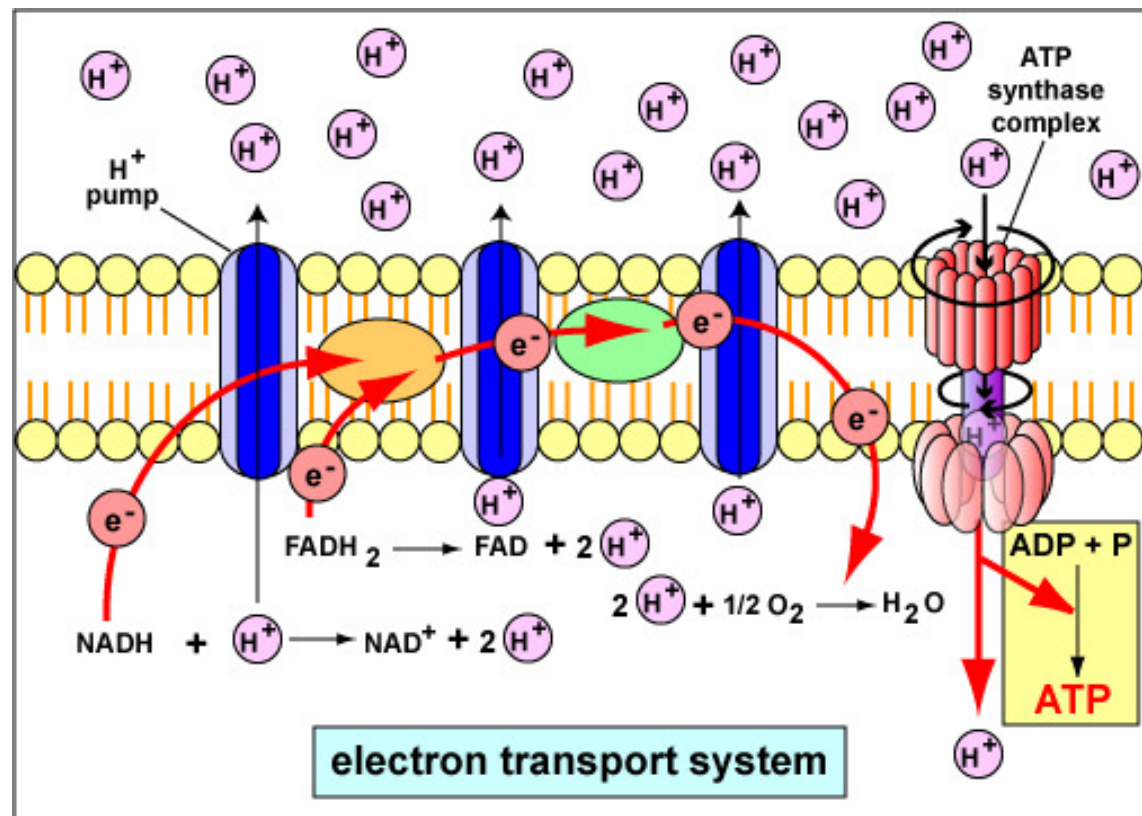
I tessuti con una maggiore capacità glicolitica (es. il fegato) risulteranno quindi avvantaggiati quando i livelli di ATP scendono.

La deplezione e la diminuzione della sintesi di ATP sono conseguenze comuni del danno ischemico e tossico.

LA DEPLEZIONE DI ATP: I MITOCONDRI



- Responsabili della produzione di 50-90% dell'ATP cellulare
- Detossificazione cellulare
- Biosintesi degli steroidi
- Produzione di calore (termogenina)
- Omeostasi del calcio (RE)
- Apoptosi (*storehouses of apoptotic factors*)



DANNO MITOCONDRIALE

Le cellule di mammifero dipendono obbligatoriamente dal metabolismo ossidativo per la loro sopravvivenza a lungo termine, indipendentemente dalla loro capacità glicolitica.

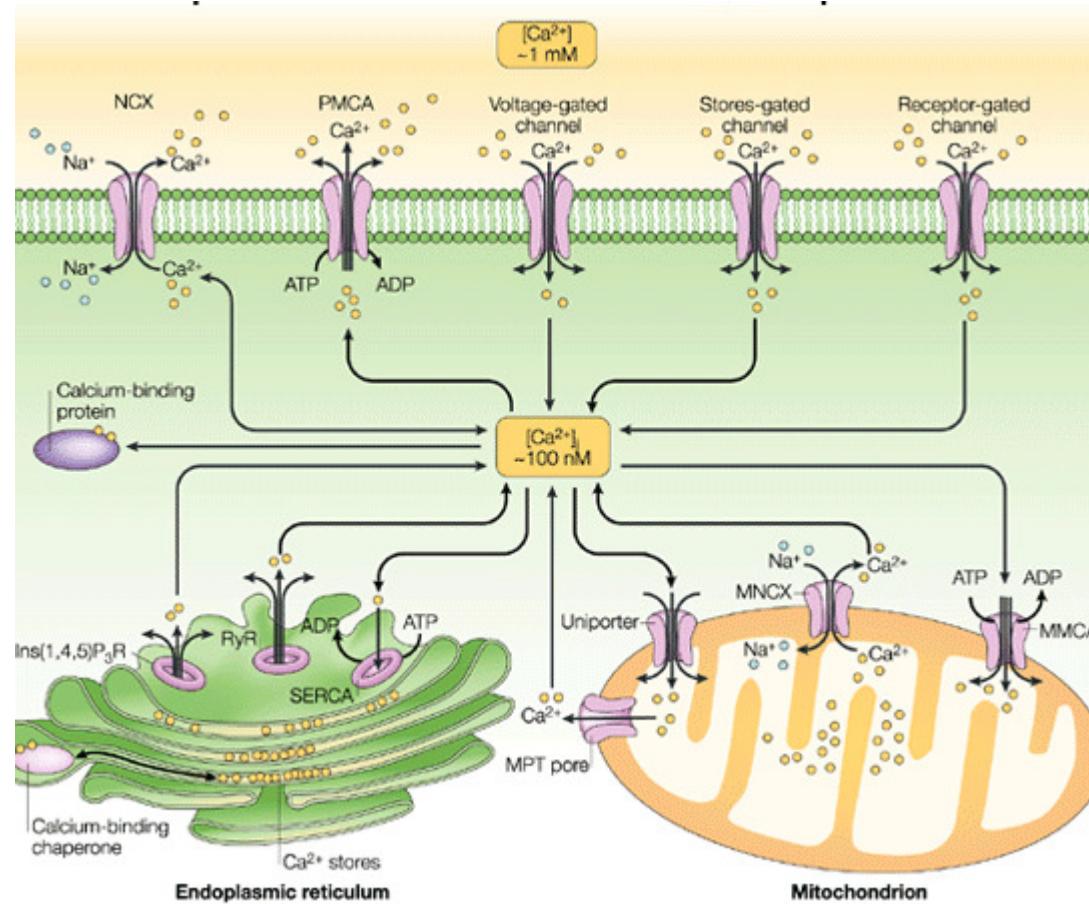
Quindi un danno irreparabile ai mitocondri ucciderà inevitabilmente la cellula.



CALCIO INTRACELLULARE

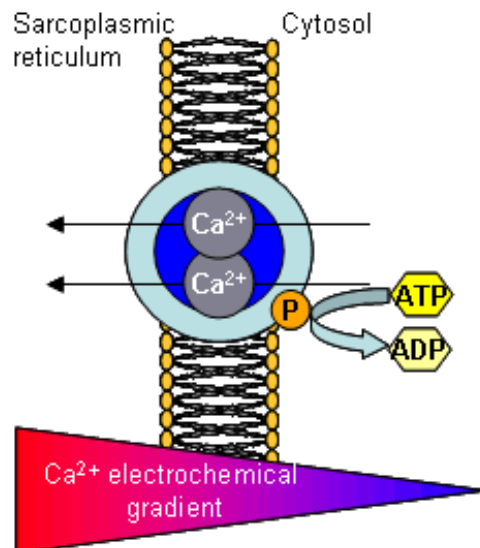
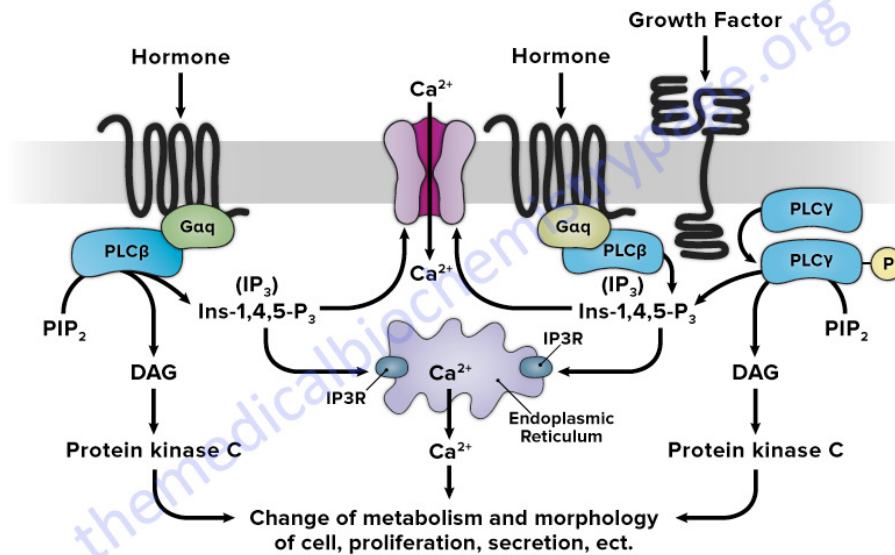
In confronto con la

- **[Ca²⁺] extracellulare** assai elevata (**1mM**), la cellula eucariota mantiene la propria
- **[Ca²⁺] intracellulare** bassissima (**100nM**) e la > parte del calcio è sequestrato nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico (RE).



CALCIO INTRACELLULARE

- Il flusso di Ca^{2+} , che si verifica lungo questo gradiente enorme in risposta a certi segnali extracellulari, costituisce un mezzo per trasmettere proprio questi segnali all'interno della cellula attraverso la membrana plasmatica.



- Poche risposte:
1. secrezione
 2. movimento: locomozione, endocitosi, fagocitosi
 3. metabolismo: cicli metabolici, sintesi proteica, produzione di ligandi
 4. ciclo cellulare: crescita, differenziazione, morte

- In parte il gradiente viene mantenuto da pompe del Ca^{2+} presenti sulla membrana plasmatica, le quali lo trasportano fuori dalla cellula.
- Alcune sono ATP-asi associate alle membrane (es Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasi).

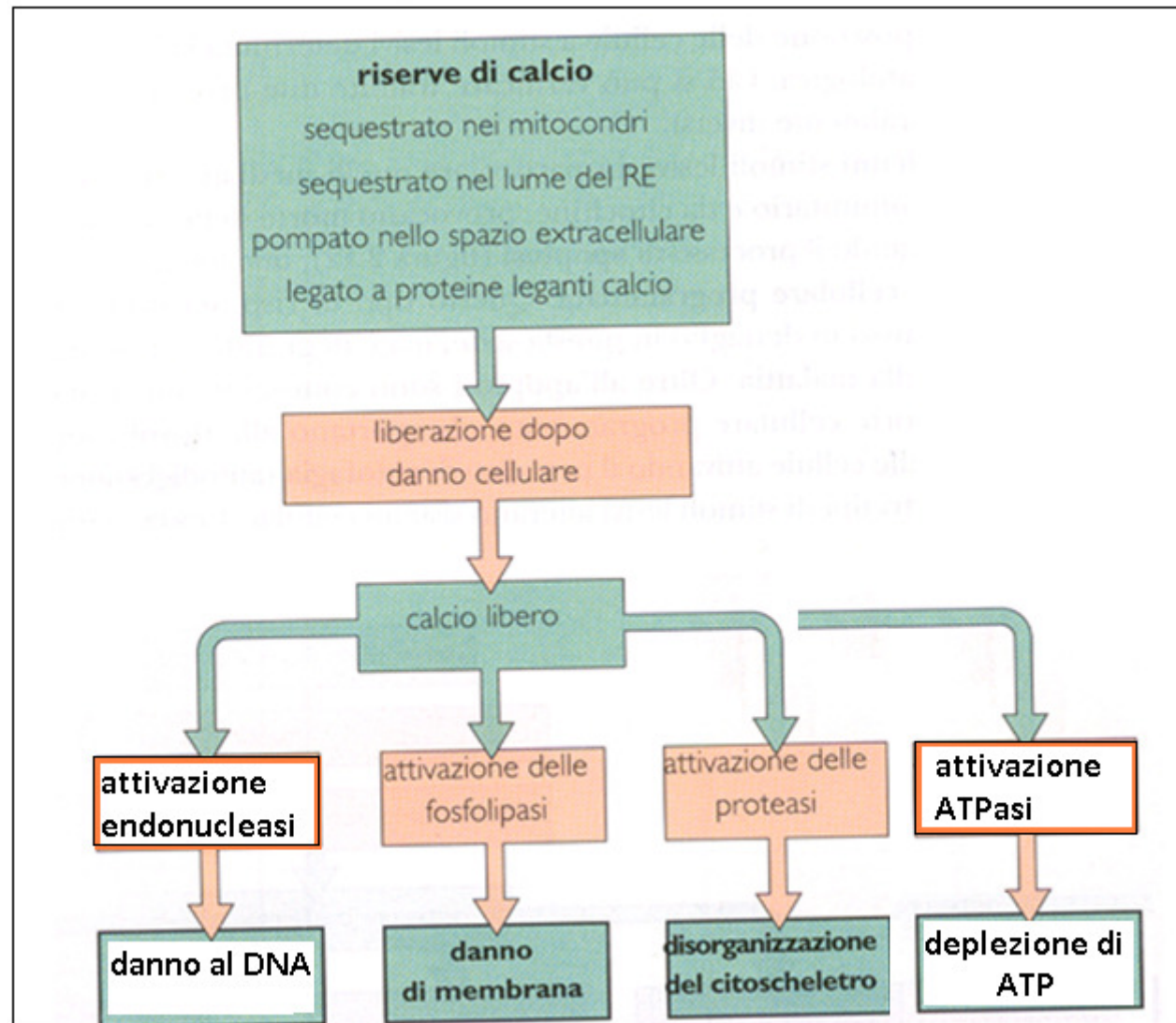
CALCIO INTRACELLULARE

DANNO DA CALCIO

Il calcio libero nel citosol è un potente agente distruttivo.

Il Ca^{2+} attiva una serie di enzimi potenzialmente deleteri per la cellula:

- FOSFOLIPASI → danno di membrana
- PROTEASI → danno alle proteine di membrana e del citoscheletro
- ATPasi → accelera deplezione di ATP
- ENDONUCLEASI → frammentazione della cromatina.

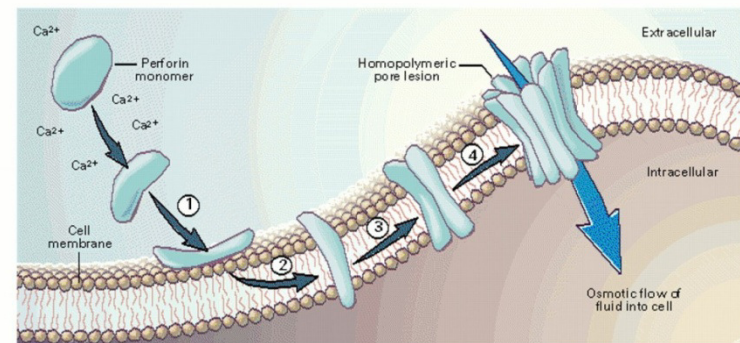


DIFETTI NELLA PERMEABILITA' DI MEMBRANA

La perdita precoce della permeabilità selettiva di membrana (riguarda tutte le membrane cellulari) che alla fine porta ad un danno di membrana conclamato è una caratteristica saliente di tutte le forme di danno cellulare.

Può risultare da una serie di eventi che coinvolgono

- la **deplezione di ATP** e l'attivazione modulata dal **calcio** delle **fosfolipasi**;
- ma anche tossine batteriche, proteine virali, componenti litiche (complemento, perforine linfocitarie
- agenti chimici e fisici;
- **radicali liberi...**





IMPORTANZA DELLA Na^+, K^+ -ATPasi nel mantenimento del VOLUME CELLULARE e dell'integrità della membrana plasmatica.

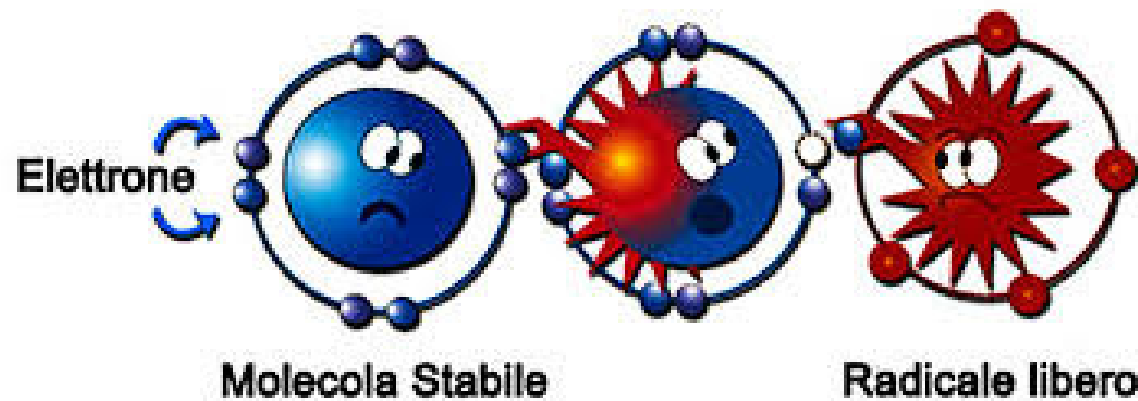
- ***30% dell'energia mitocondriale prodotta viene consumato per mantenere l'equilibrio ionico e con esso il volume cellulare!***

"Nobody realizes that some people expend tremendous energy merely to be normal."

Albert Camus



Radicali liberi dell'ossigeno (ROS)



RADICALI LIBERI

Definizione:

- specie molecolari contenenti uno o più elettroni (e^-) spaiati negli orbitali periferici (di valenza) degli atomi costitutivi;
 - specie chimica dall'esistenza indipendente, a cui sono associati uno o più e^- spaiati
 - ... oppure con un numero dispari di e^-
-
- Il numero dispari di e^- rende il radicale libero «differente» dalle altre specie chimiche (come lo ione ad es.) e gli conferisce proprietà nuove...
 - come ad es quelle paramagnetiche sfruttate nella Spettroscopia di risonanza dello spin dell' e^- per ottenerne un'evidenza;
 - Inoltre non tutti i radicali sono in sé molto instabili e molto reattivi.

Affermazione definitiva della «chimica sei radicali liberi» nel decennio 1935-1945

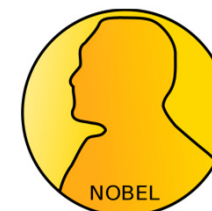


TABLE 2: Researchers in the field of free radicals and antioxidants awarded with the Nobel Prize.

Fritz Haber	1918 Chemistry	For the ammonia synthesis process
Albert Szent-Györgyi	1937 Medicine	For his discoveries on biological combustion processes, with particular reference to vitamin C and fumaric acid catalysis
Linus C. Pauling	1954 Chemistry	For his researches in the field of the molecular attraction and its applications for the explanation of the structure of complex substances
Nikolaj N. Semënov	1956 Chemistry	For his researches on mechanisms of chemical reactions
Cyril N Hinshelwood	1956 Chemistry	For his researches on mechanisms of chemical reactions
Gerhard Herzberg	1971 Chemistry	For his contributions to the knowledge of electronic structure and the geometry of molecules, in particular free radicals
Louis J Ignarro	1998 Medicine	For the discovery of NO [•] as signal molecule
Ferid Murad	1998 Medicine	For the discovery of NO [•] as signal molecule
Robert F. Furchgott	1998 Medicine	For the discovery of NO [•] as signal molecule

Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants

Sergio Di Meo  and Paola Venditti 

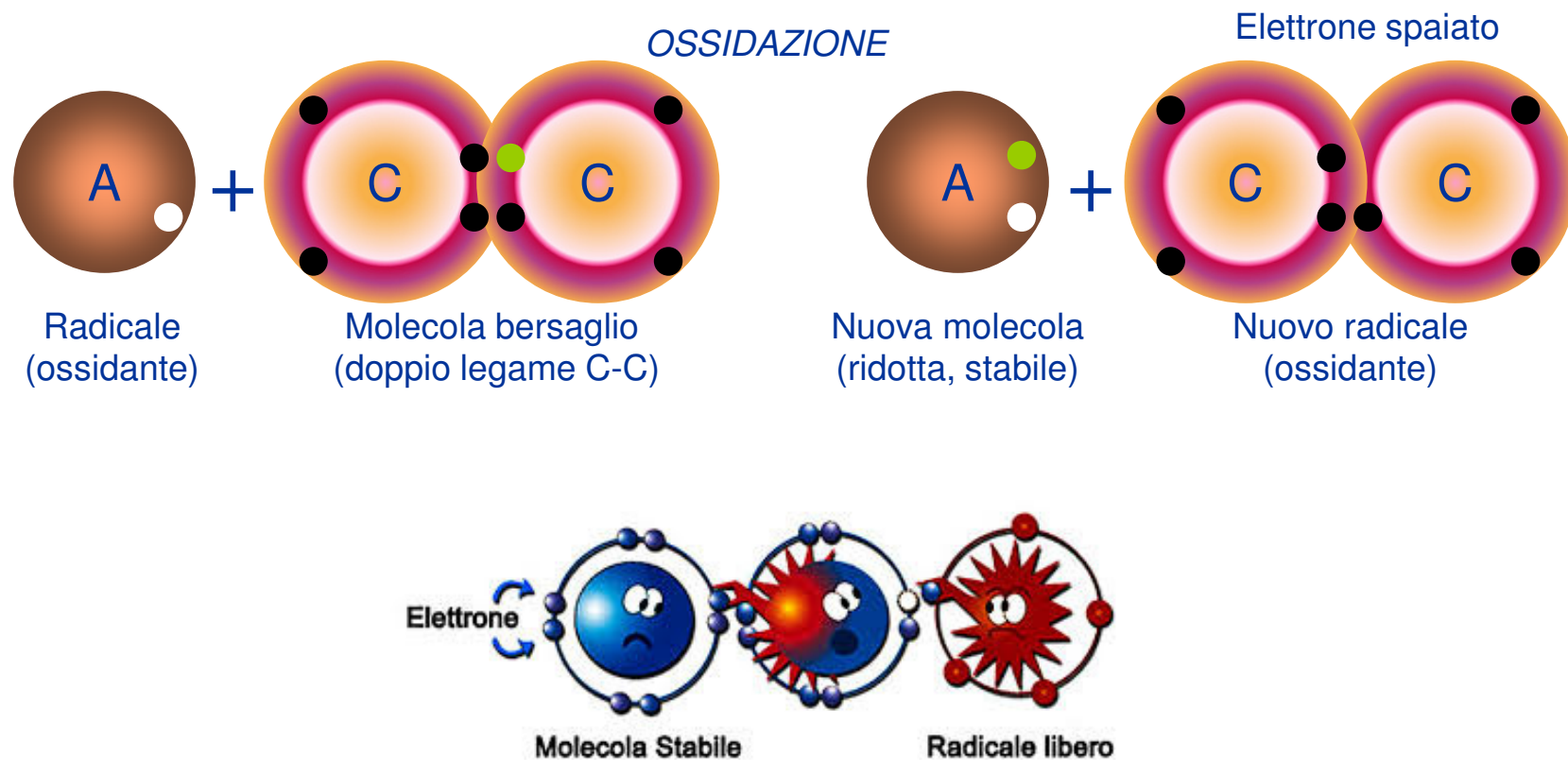
RADICALI LIBERI

L'energia necessaria per rompere un legame chimico (energia di dissociazione) può riscontrarsi in tre tipi di processi:

- 1) Irraggiamento
- 2) Termolisi
- 3) Reazioni di ossidoriduzione



Le specie chimiche reattive, radicaliche, agiscono come ossidanti



L'ossidazione, ovvero il trasferimento di uno o più elettroni, è la base chimica dello stress ossidativo.

Nei sistemi biologici, i radicali liberi dell'ossigeno o **ROS (Reactive Oxygen Species)** vengono generati ed eliminati continuamente.

I principali **ROS** sono:

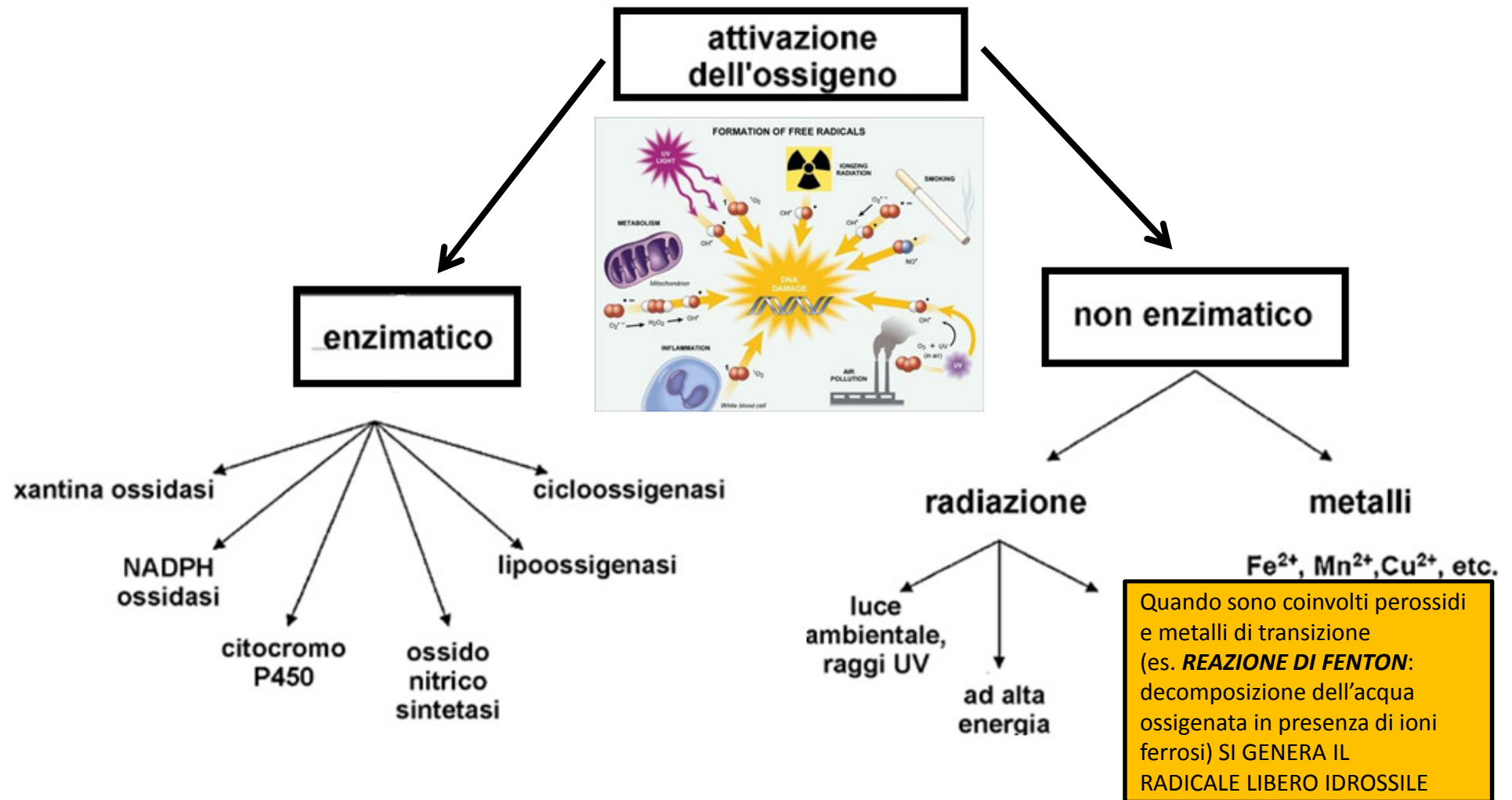
- $\bullet\text{O}_2^-$ (anione superossido)
- $\bullet\text{OH}$ (radicale idrossilico)
- $\text{NO}\bullet$ (monossido d'azoto)

si forma nell'organismo per via enzimatica.

In presenza di ossigeno forma NO_2 , anch'esso un radicale libero, e, in presenza di superossido dà luogo a perossinitrito (ONO_2^-), una molecola non radicalica ma molto reattiva.)

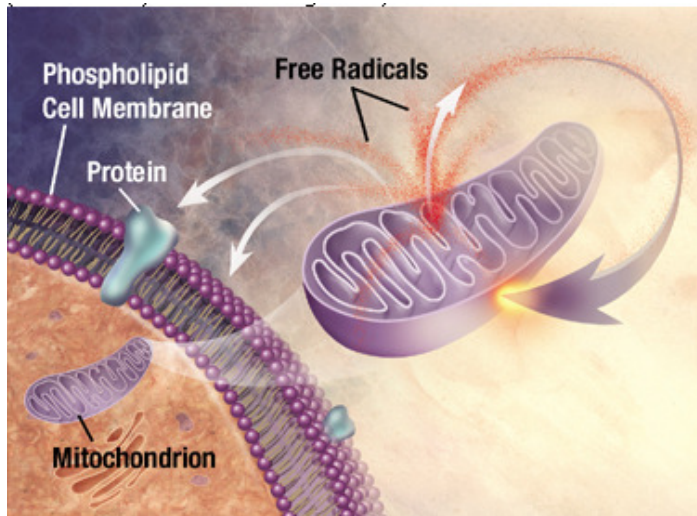
...

Esistono altre molecole, quali H_2O_2 (perossido d'idrogeno) e HOCl (acido ipocloroso) che pur non essendo radicali di per sé, producono facilmente il radicale idrossilico ($\bullet\text{OH}$), altamente reattivo.

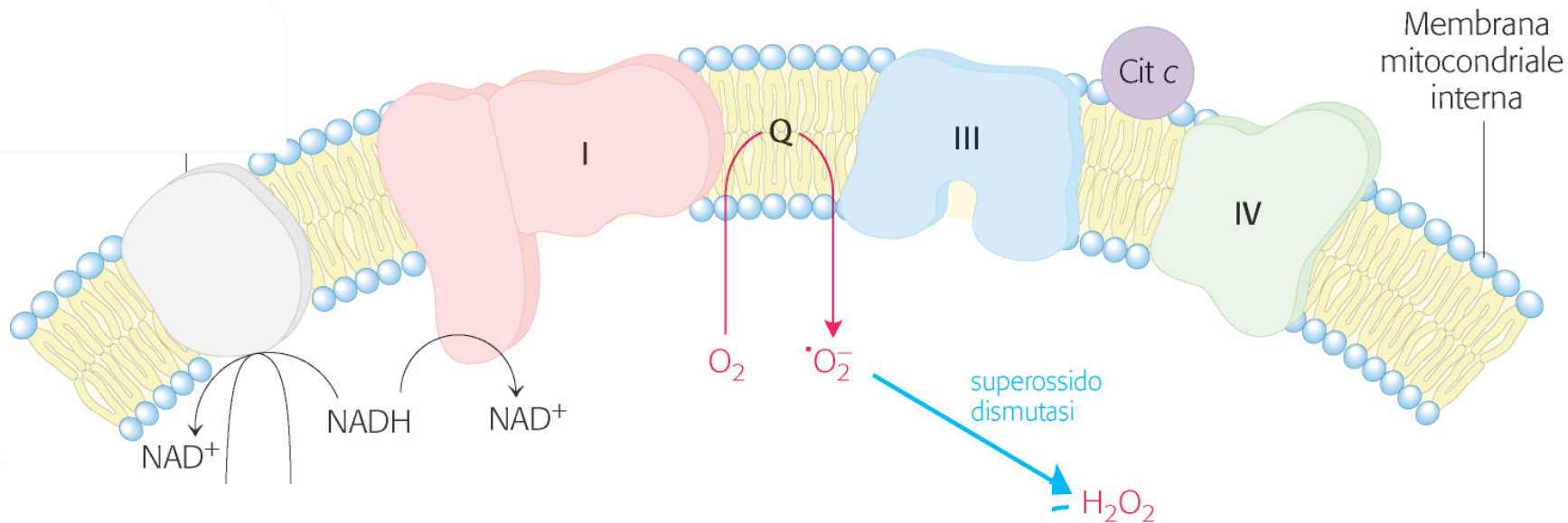


I ROS vengono prodotti sia attraverso una serie di reazioni catalizzate da **enzimi** che attraverso reazioni di **natura non enzimatica**.

I ROS possono essere prodotti anche in seguito ad esposizione a **radiazioni ionizzanti e xenobiotici** [farmaci (agenti chemioterapici), pesticidi, additivi alimentari...]



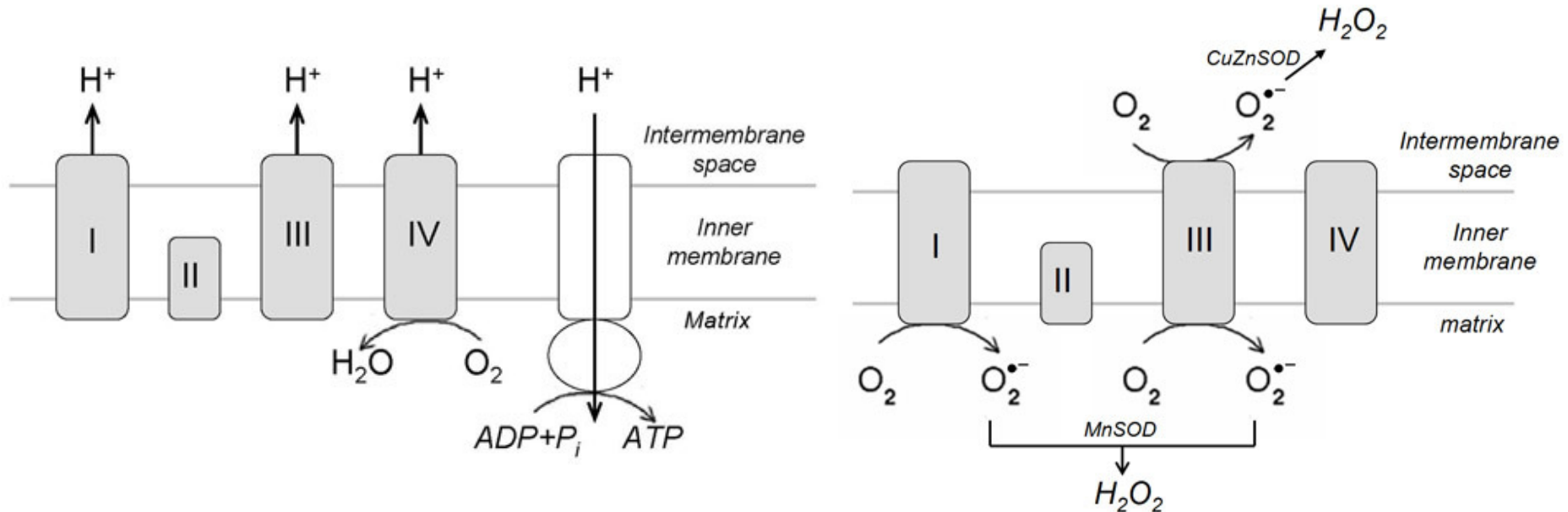
I mitocondri vengono considerati la fonte principale di ROS cellulari poiché i radicali del superossido vengono generati costantemente durante la fosforilazione ossidativa e possono essere convertiti in H_2O_2 ed altre specie reattive dell'ossigeno



Durante i processi di fosforilazione ossidativa, il **4-5%** dell'ossigeno non viene completamente ridotto ad H_2O , ma forma prodotti intermedi dell' O_2 altamente reattivi.

OSSIGENO E RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO

RADICALI LIBERI E FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA



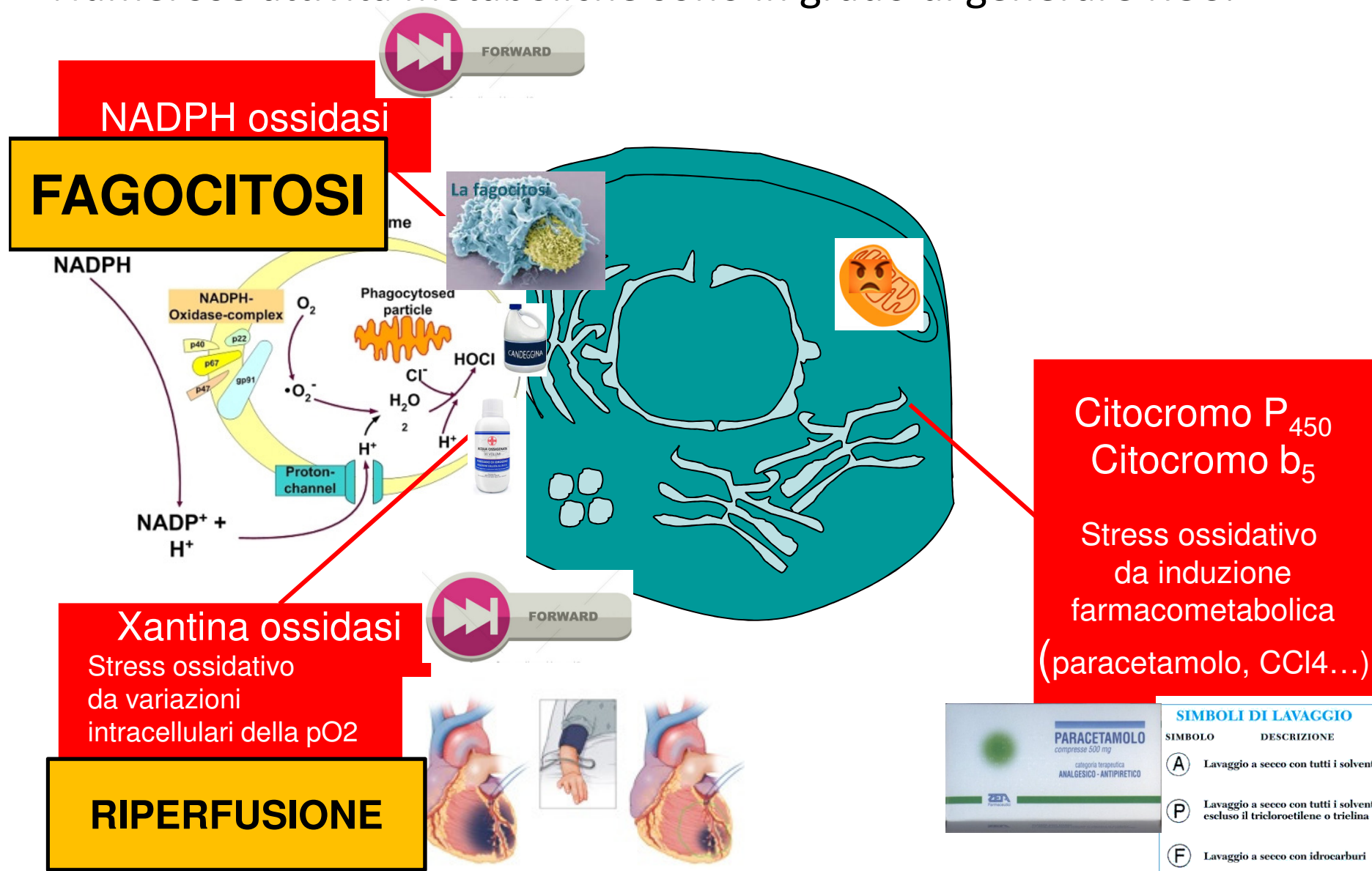
Durante la respirazione l'ossigeno molecolare viene sequenzialmente ridotto dall'aggiunta di 4 elettroni per generare H₂O.

In questo processo vengono prodotte piccole quantità di intermedi tossici:

- Quando un ossigeno guadagna un elettrone, si trasforma in radicale anione superossido, **•O₂⁻**.
- L'aggiunta di un secondo elettrone (insieme con due protoni) trasforma quest'ultimo in perossido di idrogeno, **H₂O₂**. Si tratta del composto più stabile e quindi più facilmente accumulabile
- Il perossido non è un radicale ma guadagna facilmente un altro elettrone dando spazio ad un radicale idrossilico, **•OH** che è una particella chimica molto attiva che inizia facilmente reazioni a catena incontrollabili. E' considerato l'ossidante più potente della chimica organica!

Nella cellula, i ROS **oltre che nei mitocondri**, vengono generati anche in altri compartimenti e da molti enzimi.

Numerose attività metaboliche sono in grado di generare ROS.

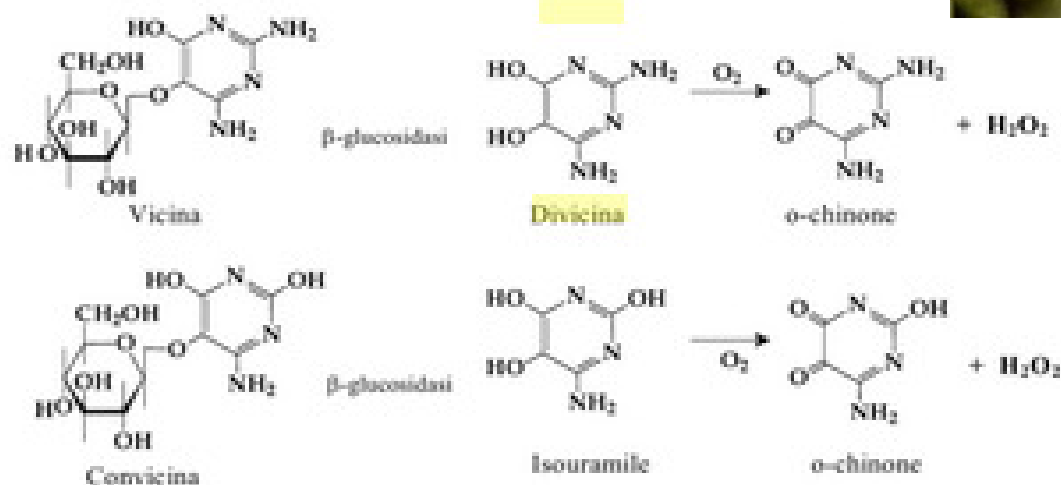


Farmaci in grado di indurre la formazione di radicali liberi.

Citocromo P₄₅₀
Citocromo b₅

Stress ossidativo
da induzione
farmacometabolica
paracetamolo, CCl₄...

Doxorubicina	Furazolidone	Acido nalidixico
Nitrofurantoina	Sulfametoxazolo	Sulfanilamide
Sulfapiridina	Primachina	





L'esempio del tetracloruro di carbonio

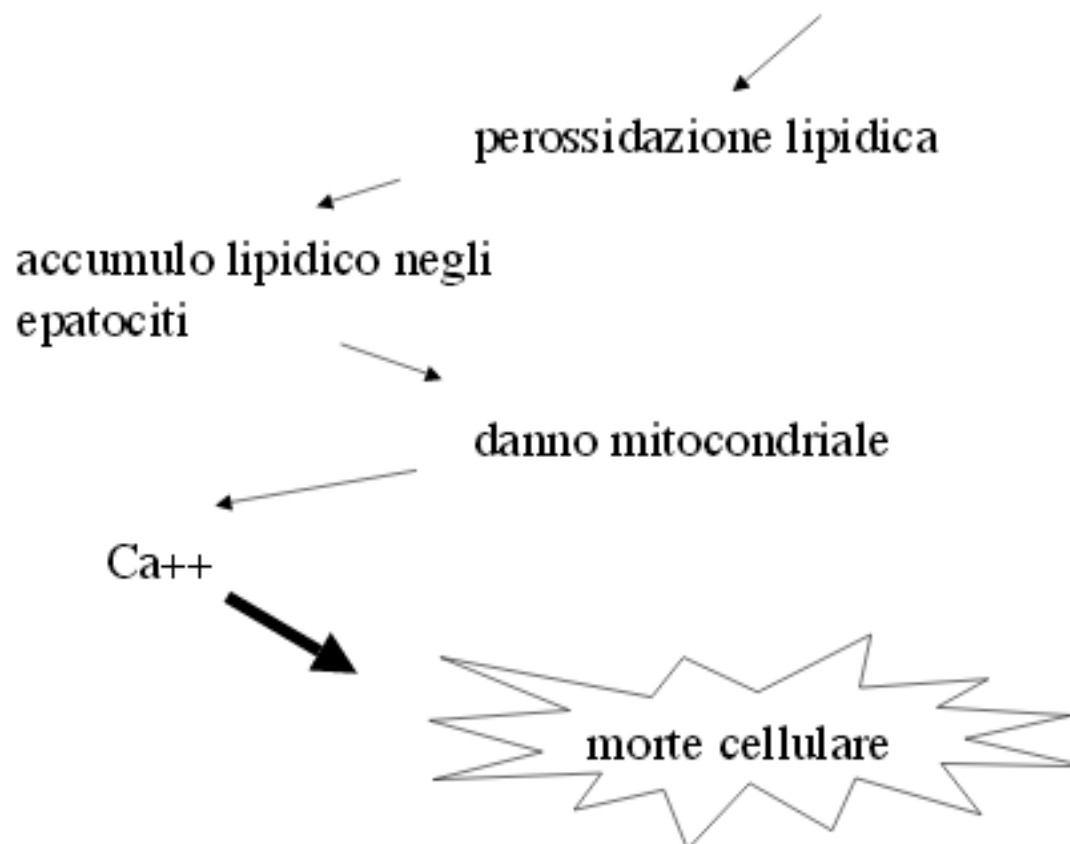
Citocromo P₄₅₀
Citocromo b₅

Stress ossidativo
da induzione
farmacometabolica
paracetamolo, CCl₄...



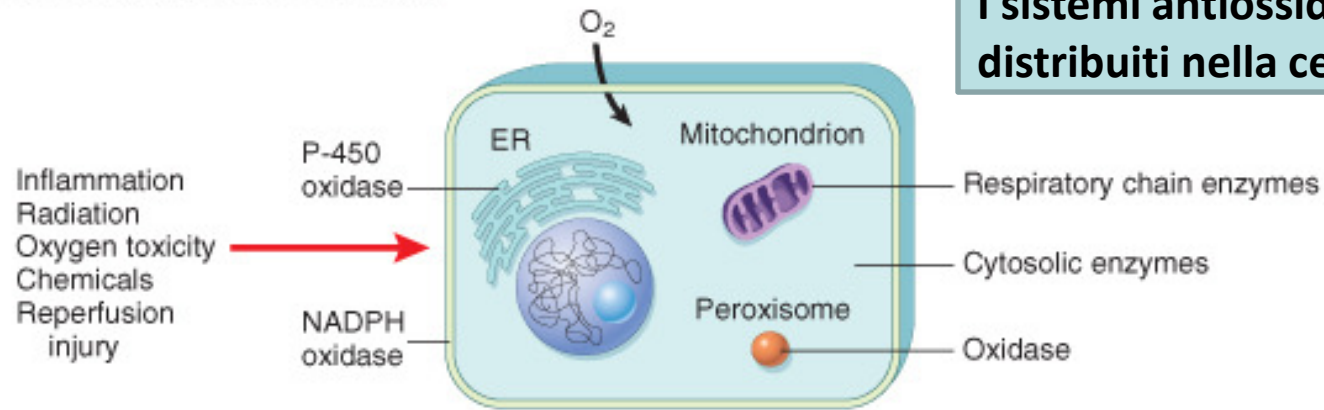
SIMBOLI DI LAVAGGIO

SIMBOLO	DESCRIZIONE
(A)	Lavaggio a secco con tutti i solventi
(P)	Lavaggio a secco con tutti i solventi, escluso il tricloroetilene o trielina
(F)	Lavaggio a secco con idrocarburi



PARACETAMOLO... dopo

A. FREE RADICAL GENERATION



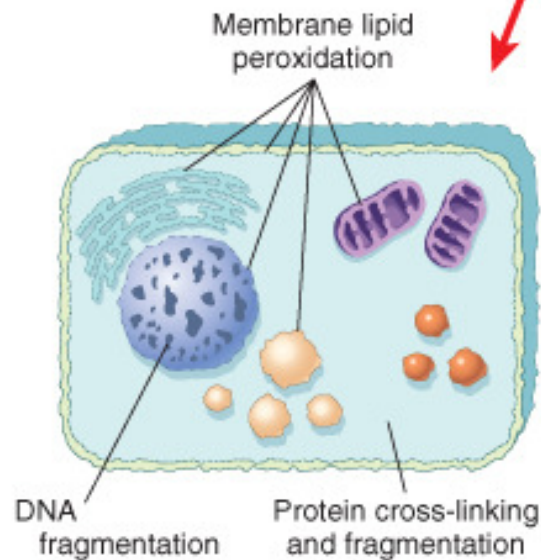
I sistemi antiossidanti sono regolarmente distribuiti nella cellula

A differenza, nel liquido extracellulare, NON sono presenti sistemi antiossidanti

(nel plasma tioli, ascorbato... implicate nel controllo di Cu e Fe)

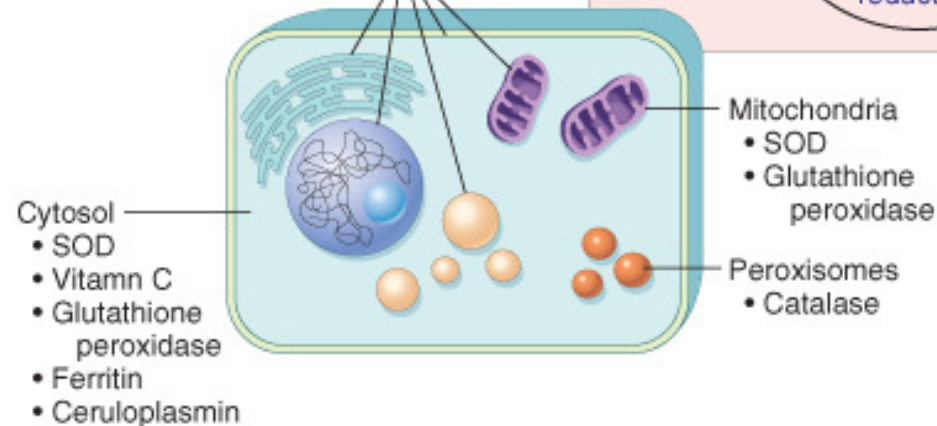
Reactive oxygen species:
 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$

Reactive oxygen species:
 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$

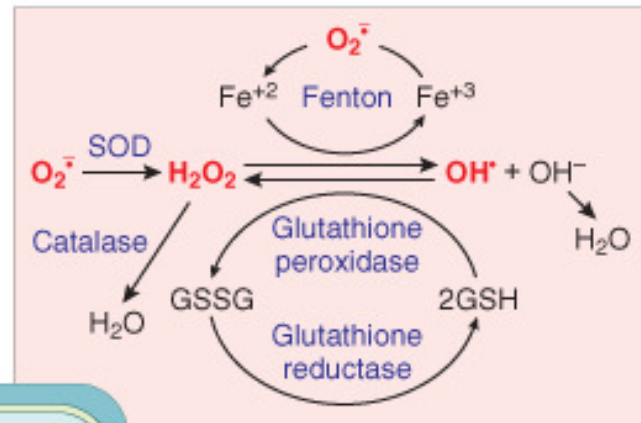


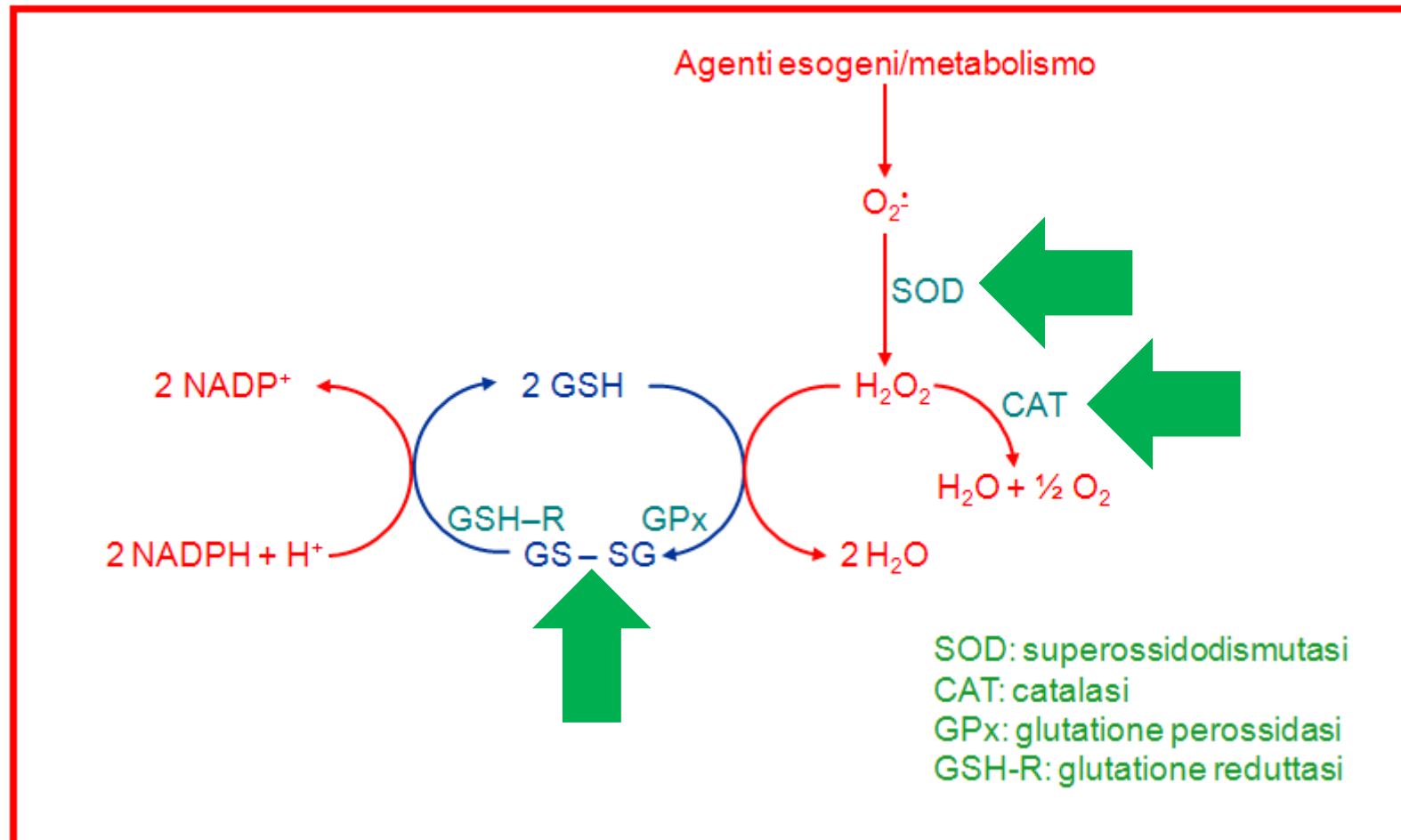
B. CELL INJURY BY FREE RADICALS

All membranes
• Vitamins E and A
• β -carotene



C. NEUTRALIZATION OF FREE RADICALS – NO CELL INJURY





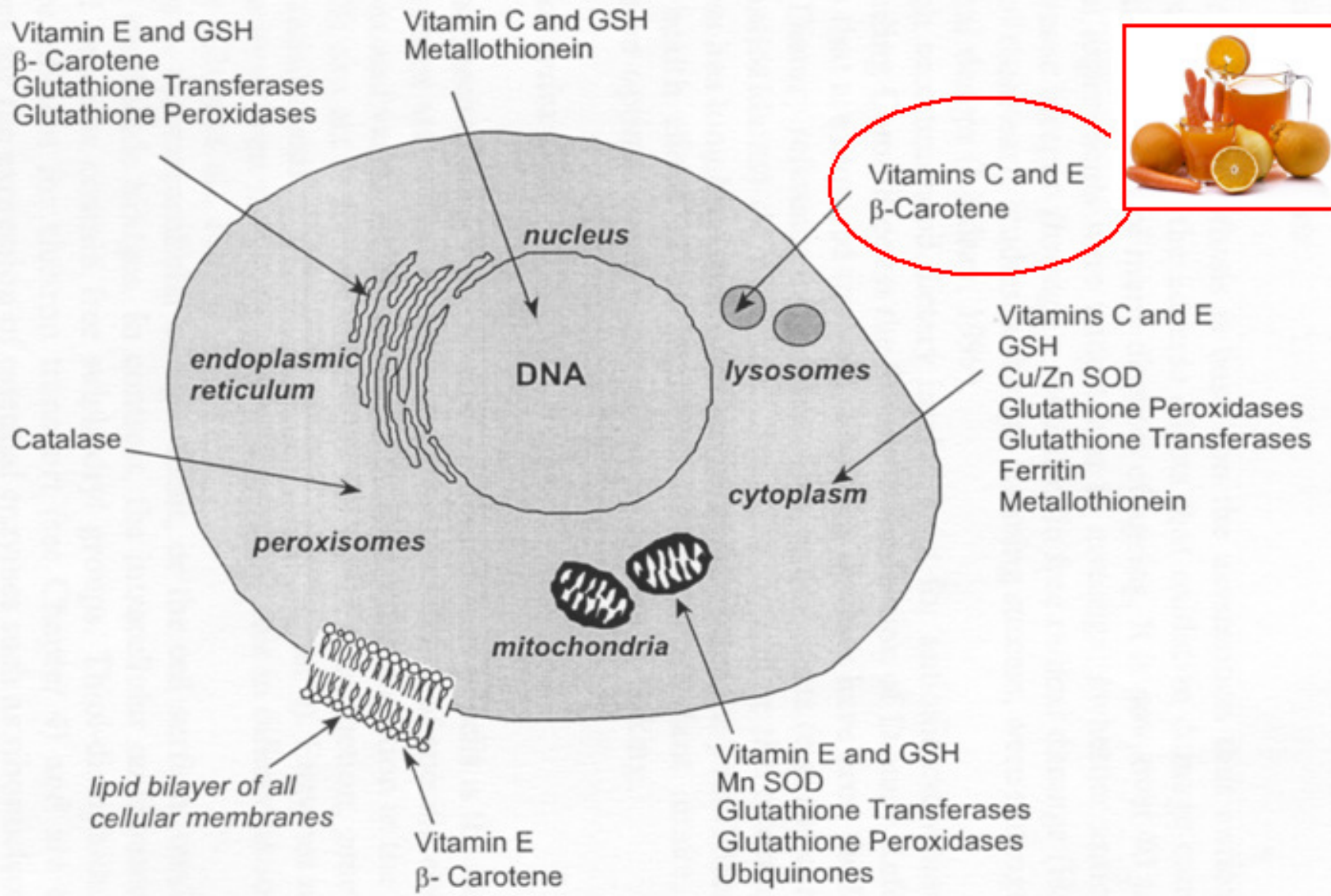
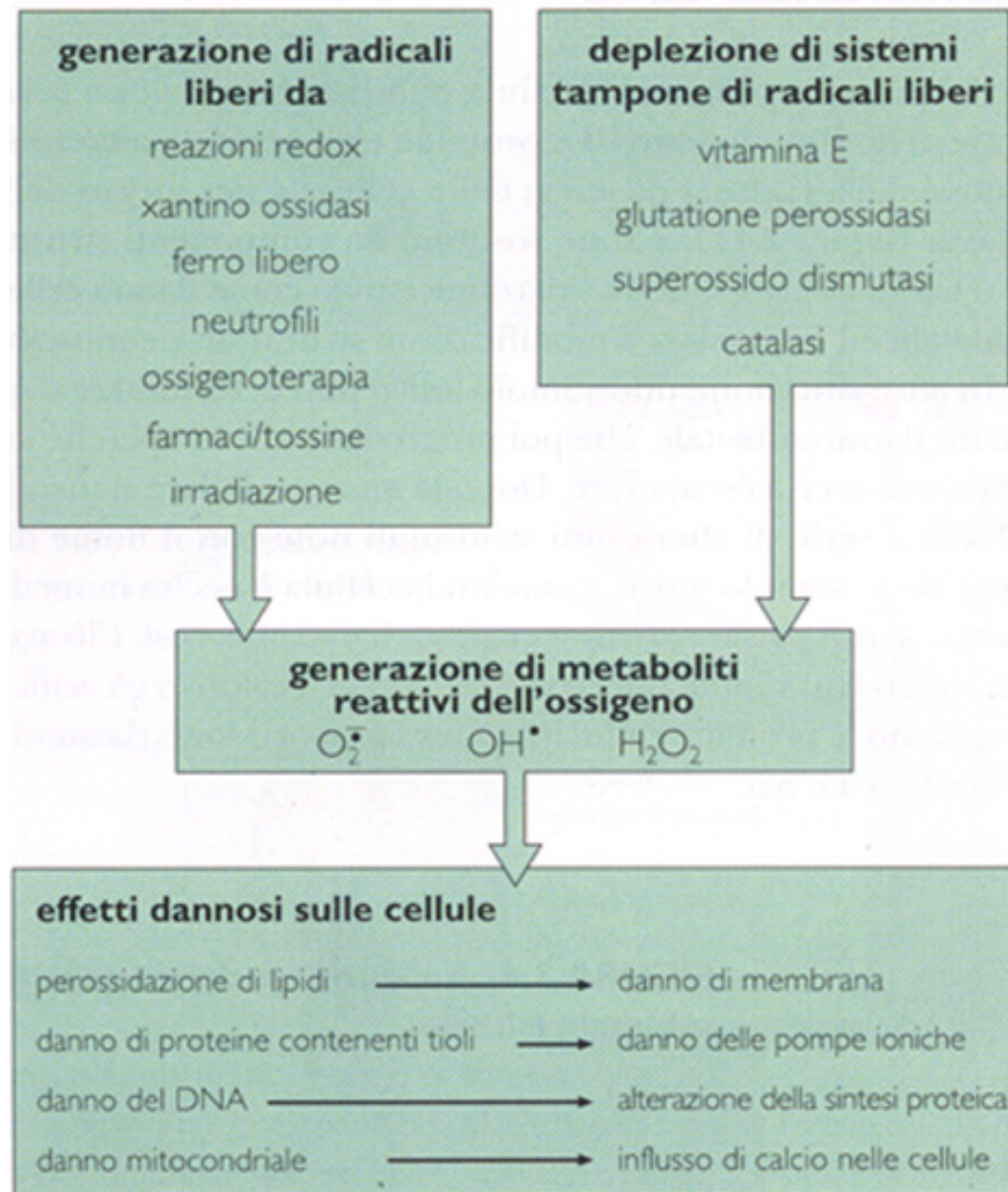
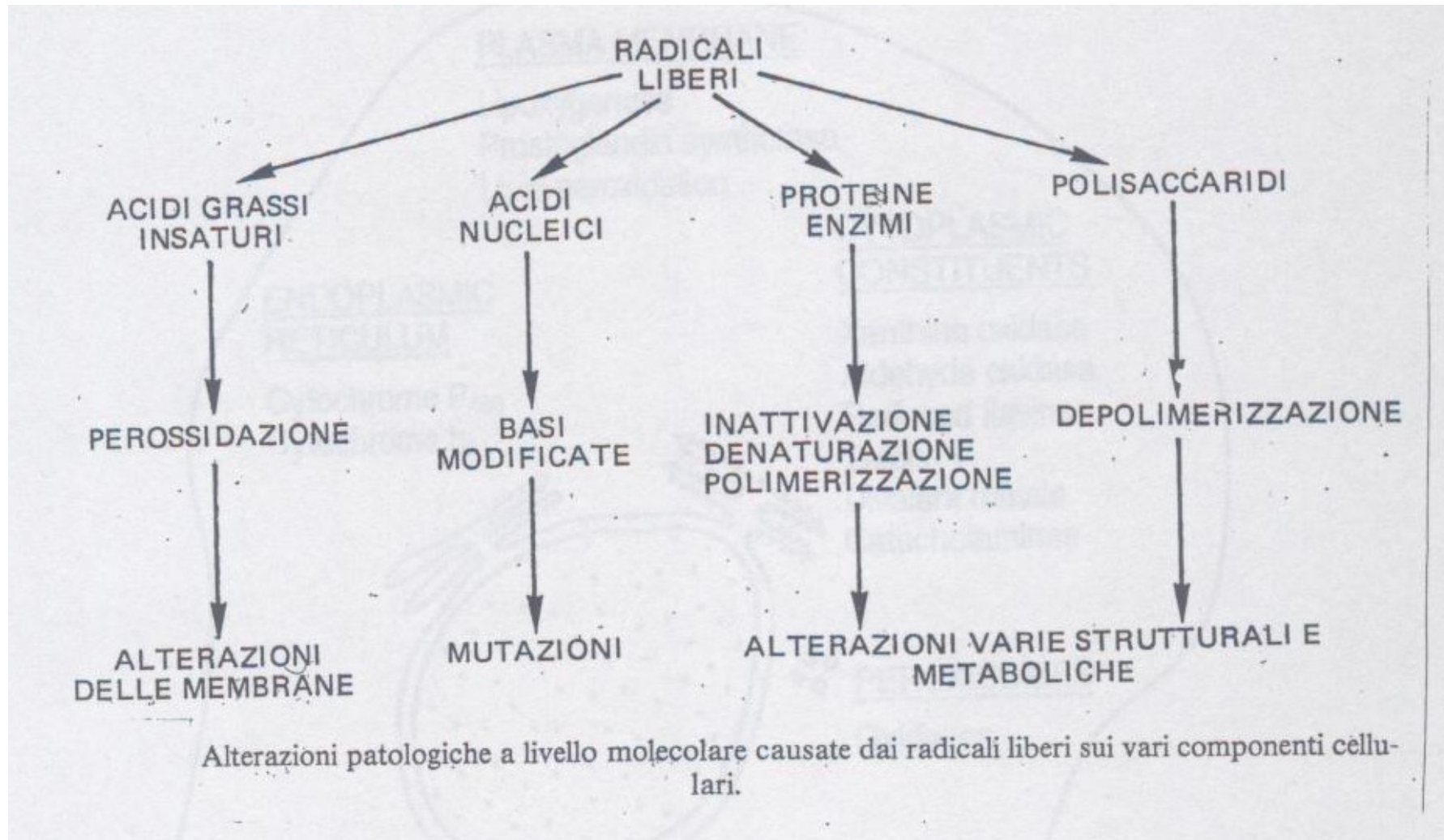


Fig. 1. Antioxidant defence systems in the cell.

OSSIGENO E RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO



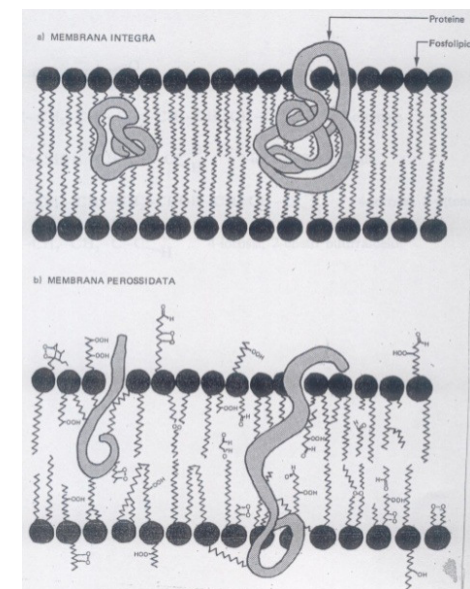
EFFETTI DEI RADICALI LIBERI NEI SISTEMI BIOLOGICI



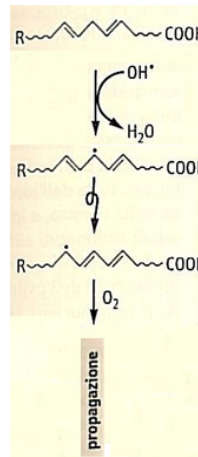
Perossidazione lipidica

Uno dei siti più sensibili al danno causato dai ROS è la membrana plasmatica, in particolare il bersaglio è a livello degli acidi grassi poliinsaturi.

Il radicale idrossilico $\bullet\text{OH}$ sottrae un atomo di idrogeno ad un acido grasso poliinsaturo, iniziando così una **catena di reazioni di perossidazione lipidica**.



**RADICALI
LIBERI**



**perossidazione
dei PUFA
(acidi grassi polinsaturi)**

**ridotta fluidità
di membrana**

**compromessa
attività cellulare**

NEOPLASIE

INVECCHIAMENTO

MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Aterosclerosi (oxLDL)

STRESS OSSIDATIVO

Stress chimico indotto dalla presenza, in un organismo vivente, di un eccesso di specie chimiche reattive, generalmente centrate sull'ossigeno (***reactive oxygen species, ROS***), secondario ad un'aumentata produzione delle stesse e/o a una ridotta efficienza dei sistemi fisiologici di difesa antiossidanti.





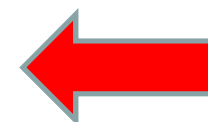
Un esempio: il Paracetamolo

- Tylenol: il farmaco più venduto negli Stati Uniti - analgesico ed antipiretico
- Tachipirina in Italia (Paracetamolo)
N-acetil-*p*-aminofenolo per i chimici
- Metabolismo epatico: una piccola quota é convertita, dalle citocromo P450 ossidasi epatiche, ad un metabolita elettrofilo (N-acetyl-benzochinoneimina - NABQI) che viene neutralizzato dal GSH (glutathione cellulare) in acido mercapturico.
- Intossicazione da paracetamolo: il pool di GSH viene consumato ed il metabolita NABQI attacca proteine, acidi nucleici e lipidi.

Si riscontra in seguito un aumento del Ca^{++} intracellulare risultando in massiva **necrosi** epatica (fatale in alcuni casi), che può essere ridotta da massiccio impiego di antiossidanti (acetil-cisteina o forti dosi di alcol).

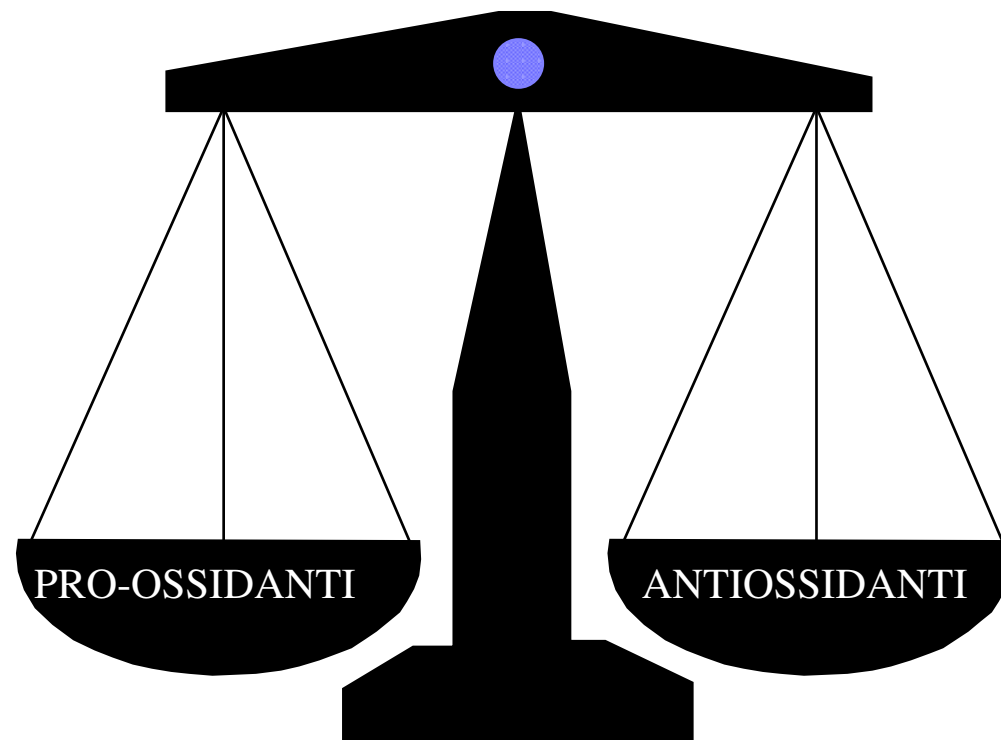
Citocromo P₄₅₀
Citocromo b₅

Stress ossidativo
da induzione
farmacometabolica
paracetamolo, CCl₄...



STRESS OSSIDATIVO

**Sbilanciamento dell'equilibrio tra pro-ossidanti e antiossidanti
nell'organismo a favore dei pro-ossidanti**



Lo stress ossidativo è la conseguenza di uno squilibrio tra processi pro-ossidanti e processi antiossidanti

Radiazioni, farmaci, metalli pesanti
Fumo di sigaretta, alcool, inquinamento
Esercizio fisico inadeguato, sedentarietà
Infezioni ed altre malattie
Specie reattive ↑

Ridotta assunzione
e/o diminuita sintesi
e/o ridotta capacità di utilizzazione
e/o aumentato consumo di antiossidanti
Difese antiossidanti ↓

Danno cellulare

Danno tissutale

Danno d'organo

Danno sistemico

**Malattie
cardiovascolari**

**Demenza,
M. di Parkinson**

**Invecchiamento
precoce**

**Infiammazioni,
tumori**

**Altre
malattie**

Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants

Sergio Di Meo  and Paola Venditti 

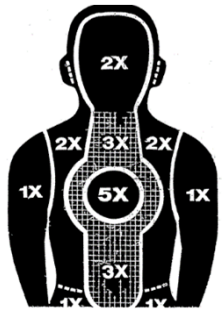
Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Volume 2020, Article ID 9829176, 32 pages

<https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

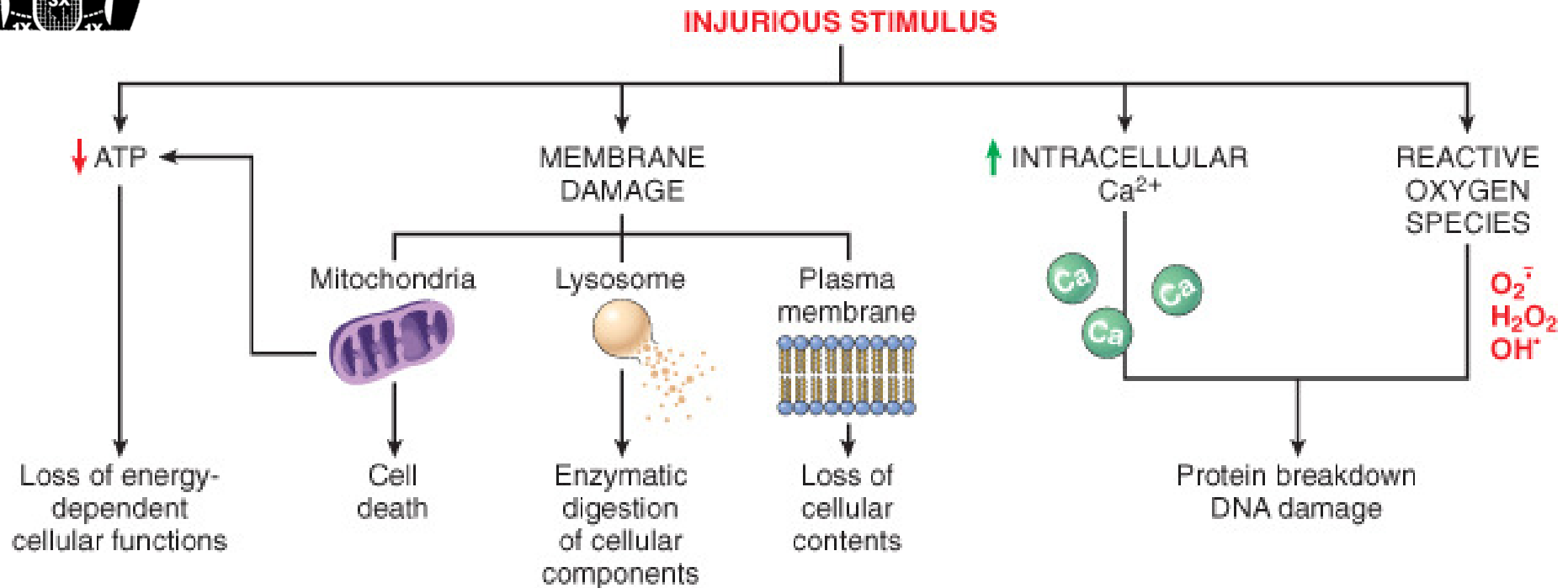
TABLE 3: Selected diseases/disorders for which a role of free radicals has been suggested.

Adult respiratory distress syndrome	Gout
Allergic encephalomyelitis	Haemachromatosis
Alzheimer's disease	Hearing loss
Amyotrophic lateral sclerosis	Hypertension
Asbestosis	Insulin resistance
Autism	Keshan disease
Autoimmune vasculitis	Lypofuscinosis
Bloom syndrome	Malaria
Bronchopulmonary dysplasia	Multiple sclerosis
Burns	Muscular dystrophy
Cancer	Myasthenia gravis
Cataract	Pancreatitis
Chronic autoimmune gastritis	Parkinson disease
Chronic granulomatous disease	Psoriasis
Cirrhosis	Psychosis
Contact dermatitis	Retinal degeneration
Depression	Retrolental fibroplasias
Dermatomyositis	Rheumatoid arthritis
Dermatomyositis	Schizophrenia
Diabetes mellitus	Sickle cell anemia
Emphysema	Stroke
Emphysema	Systemic lupus erythematosus
Favism	Thalassemia
Glomerulonephritis	Ulcerative colitis



Remember!

Bersagli cellulari e biochimici del danno cellulare



© Elsevier 2005