

LO STRESS OSSIDATIVO E IL SUO RUOLO NELL'ATTIVITÀ NEUTROFILA DEI PAZIENTI CON DAAT

a cura della Redazione

Commento a: Magallón M, Castillo-Corullón S, Bañuls L, Pellicer D, Romero T, Martínez-Ferraro C, Navarro-García MM, Herrejón A, González C, Dasí F. Hypoxia Enhances Oxidative Stress in Neutrophils from ZZ Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Patients. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Apr 3;12(4):872. doi: 10.3390/antiox12040872. PMID: 37107247; PMCID: PMC10135227.

INTRODUZIONE

Il deficit di alfa-1 antitripsina (DAAT) è una rara condizione genetica caratterizzata da bassi livelli plasmatici della proteina alfa-1 antitripsina (AAT). Poiché la funzione principale di AAT è proteggere i polmoni dai danni provocati da enzimi proteolitici, come l'elastasi neutrofila (NE), i pazienti con DAAT perdono tale protezione, con il rischio di broncopneumopatia ostruttiva cronica (BPCO) e frequenza maggiore rispetto alla popolazione con normali livelli di AAT. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che lo squilibrio tra proteasi e antiproteasi (NE vs. AAT) non è sufficiente a spiegare la variabilità clinica della malattia, suggerendo che altri fattori potrebbero influenzarne il decorso.

Un fattore biochimico che si ritiene possa essere alla base della variabilità clinica di DAAT è lo stress ossidativo, uno squilibrio tra meccanismi antiossidanti e pro-ossidanti, a favore di questi ultimi (1). Lo stress ossidativo è infatti caratterizzato dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS), le quali reagiscono con acidi nucleici, lipidi e proteine, ossidandoli e causando danni cellulari irreversibili e distruzione dei tessuti (2).

Il DAAT è una malattia pro-infiammatoria dove i neutrofili giocano un ruolo centrale nei meccanismi fisiopatologici sottostanti la patologia. In particolare, l'eccessiva attivazione neutrofila conduce a un aumentato rilascio di proteasi, citochine pro-infiammatorie e alla generazione di stress ossidativo dovuto al danno nei tessuti (3). In condizioni fisiologiche, i neutrofili circolanti sono esposti ad diverse concentrazioni di ossigeno (pO_2), da 13 kPa nelle principali arterie, a 3 kPa nei capillari e venule (ipossia fisiologica). L'ipossia patologica è invece una componente del normale processo infiammatorio che si verifica in presenza di danni tissutali o infezioni; pertanto, i neutrofili possono funzionare efficacemente in queste condizioni (3). È dunque ragionevole ipotizzare che, nei pazienti con DAAT, l'ipossia possa indurre uno stato di stress ossidativo nei neutrofili.

ANALISI DELLO STRESS OSSIDATIVO NEI NEUTROFILI DI PAZIENTI CON DAAT

Lo studio di Magallón e colleghi mira a verificare

come l'ipossia influisca sul profilo di stress ossidativo nei neutrofili dei pazienti affetti da DAAT. A questo scopo, sono stati isolati i neutrofili sia di pazienti con DAAT ($n = 54$) sia di alcuni volontari di controllo ($n = 7$). I neutrofili isolati sono stati a ipossia (1% di ossigeno per 4 ore) e a seguito di questa procedura sono stati misurati i quantitativi di ROS/RNS, i parametri di funzionalità mitocondriale e lo stato delle difese antiossidanti non enzimatiche (tramite citometria a flusso); sono state inoltre valutati i livelli di espressione delle difese antiossidanti enzimatiche attraverso tecniche di biologia molecolare (PCR quantitativa).

Dei 54 pazienti con DAAT, 31 possedevano un genotipo MZ (51%), 8 un genotipo SZ (13%) e 15 un genotipo ZZ (25%); i 7 volontari sani esibivano invece tutti un genotipo MM (11%). Non sono state osservate differenze significative riguardo all'età, al sesso, all'indice di massa corporea, ai test di funzionalità polmonare o ai marcatori di danno epatico tra i gruppi. Questo indica che tutti i partecipanti allo studio erano clinicamente sani, sia in base al loro stato fisico che ai test polmonari e epatici.

Alla valutazione quantitativa dei livelli di specie ossidanti nei neutrofili, gli autori dello studio hanno riscontrato una significativa alterazione nei livelli ROS e RNS nei soggetti con DAAT rispetto ai soggetti di controllo. In particolare, i pazienti con il genotipo ZZ hanno mostrato livelli significativamente più elevati di perossido di idrogeno (H_2O_2), perossinitrito ($ONOO^-$) e ossido nitrico (NO) rispetto ai soggetti di controllo e un maggiore stress ossidativo rispetto ai pazienti con genotipo MZ e SZ. Questo risultato suggerisce che i neutrofili attivati aumentino il consumo di ossigeno, producendo ROS e RNS, contribuendo alla condizione di ipossia locale e danno ossidativo nei tessuti colpiti.

In termini di sistemi antiossidanti, i pazienti affetti da DAAT con genotipo ZZ presentano invece neutrofili con ridotte espressioni di catalasi, superossido dismutasi (SOD) e glutazione reduttasi (GR) rispetto agli altri genotipi. Tale osservazione concorre all'ipotesi di uno squilibrio ossidativo a favore dei meccanismi d'azione pro-ossidanti nei neutrofili di pazienti con DAAT.



L'analisi della funzionalità mitocondriale ha rilevato un significativo calo del potenziale di membrana mitocondriale nei pazienti con DAAT rispetto ai soggetti di controllo, suggerendo il coinvolgimento dei mitocondri nella produzione di ROS. Tuttavia, non sono state osservate differenze significative per i livelli di ossigeno molecolare (O_2) e il calcio intracellulare (iCa^{2+}).

Infine, è stato riscontrato un significativo aumento dei livelli di proteine e lipidi ossidati nei pazienti affetti da DAAT rispetto ai soggetti di controllo, indicando un incremento del danno ossidativo alle biomolecole, spiegabile dello squilibrio ossidativo precedentemente menzionato.

La Tabella 1 fornisce una panoramica dei parametri significativamente aumentati o ridotti nei genotipi di DAAT rispetto agli individui di controllo.

CONCLUSIONI

Il DAAT è una patologia pro-infiammatoria accompagnata da grave ipossia nei tessuti colpiti. L'infiammazione e l'ipossia sono correlati e interagiscono a livello molecolare anche attraverso i prodotti biochimici delle cellule del sistema immunitario, tra cui

i neutrofili. L'attivazione eccessiva di neutrofili può portare alla degranulazione e al rilascio di enzimi proteolitici, causando danni ai tessuti circostanti. Oltretutto, i neutrofili attivati aumentano il consumo di ossigeno, producendo specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) che contribuiscono alla condizione di ipossia locale e danno ossidativo nei tessuti.

Complessivamente, questo studio contribuisce a chiarire il ruolo dello stress ossidativo nei neutrofili di pazienti con DAAT, evidenziando l'effetto dell'ipossia sulla produzione di ROS/RNS e suggerendo che i neutrofili di questi pazienti possono causare danni ai tessuti circostanti. Ciò potrebbe fornire nuove informazioni per lo sviluppo di strategie terapeutiche per il trattamento del DAAT e di altre malattie respiratorie correlate. Tuttavia, come menzionato dagli stessi autori, lo studio presenta alcune limitazioni, come il numero ridotto di pazienti con determinati genotipi di DAAT e l'assenza di valutazione delle differenze di genere, lasciando spazio a futuri approfondimenti sul tema attraverso nuovi studi.

Parametri valutati	MM	MZ	SZ	ZZ
Superossido (O_2^-)	Controllo	↓↓	↓↓	↓
Perossido d'idrogeno (H_2O_2)	Controllo	n.s.	n.s.	↑
Perossinitrito ($ONOO^-$)	Controllo	n.s.	n.s.	↑↑↑↑
Ossido nitrico (NO)	Controllo	n.s.	n.s.	↓
Potenziale di membrana ($\Delta\psi_m$)	Controllo	n.s.	n.s.	↓
Anione superossido (O_2^-)	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.
Calcio intracellulare (iCa^{2+})	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.
Perossidazione lipidica	Controllo	n.s.	↑	↑
Proteine ossidate	Controllo	↑	↑	↑↑
Superossido dismutasi (SOD)	Controllo	n.s.	↓	↓
Glutazione reduttasi (GR)	Controllo	n.s.	↓	↓
Catalasi	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.
SOD Mn-dipendente	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.
Glutazione perossidasi	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.
Fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (NRF2)	Controllo	n.s.	n.s.	n.s.

↑↓ (p = 0,05); ↓↓↑↑ (p = 0,01); ↓↓↓↓↑↑↑↑ (p = 0,001)

Tabella 1 - Confronto parametri ossidativi valutati Controllo vs. Genotipi DAAT



Bibliografia

1. Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet J Rare Dis.* 11 luglio 2018;13(1):114.
2. Loreto Palacio P, Godoy JR, Aktas O, Hanschmann EM. Changing Perspectives from Oxidative Stress to Redox Signaling-Extracellular Redox Control in Translational Medicine. *Antioxid Basel Switz.* 16 giugno 2022;11(6):1181.
3. Williams AE, Chambers RC. Neutrophils and tissue damage: is hypoxia the key to excessive degranulation? *Thorax.* novembre 2016;71(11):977–8.

