

Disfunzione endoteliale e stress ossidativo nella sepsi

O. Parodi, B. De Chiara, J. Campolo, V. Sedda, E. Roubina

Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Milano, Dipartimento Cardiologico, A. De Gasperis, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Endothelial dysfunction and oxidative stress in sepsis

Central to the pathophysiology of sepsis and septic shock is an alteration in endothelial cell function and oxidative stress. Highly complex, integrated responses that include the activation of a number of cell types, inflammatory mediators and the hemostatic system are involved in endothelial dysfunction. On the other hand, the imbalance between the excessive production of reactive oxygen species and/or inadequate antioxidant defenses characterizes the oxidative stress. The overview of all these mechanisms suggests clinical biochemical markers as a possible therapeutic target together with correct intervention timing. (G Ital Nefrol 2006; 23 (suppl 36): S69-73)

KEY WORDS: Endothelial dysfunction, Sepsis, Oxidative stress, Antioxidants, Nitric oxide

PAROLE CHIAVE: Disfunzione endoteliale, Sepsis, Stress ossidativo, Antiossidanti, Ossido nitrico

La sepsi rappresenta la più frequente causa di morte fra i pazienti ricoverati nelle unità di cure intensive non cardiologiche. Nuove strategie terapeutiche ed, ancor prima, una profonda conoscenza dei presupposti fisiopatologici sembrano essere indispensabili per migliorare la sopravvivenza di tali pazienti.

È noto che la sepsi implica la risposta dell'ospite verso un agente patogeno e coinvolge una moltitudine di cellule, mediatori dell'infiammazione e fattori della coagulazione. Lo scenario entro cui si svolgono e si perpetuano molte di queste reazioni è l'endotelio.

A livello intracellulare (es. cellule endoteliali, globuli rossi, neutrofili), ma anche nell'ambiente extracellulare, le modificazioni strutturali e funzionali indotte dalla sepsi si traducono in una disregolazione tra produzione di specie reattive dell'ossigeno e loro rimozione da parte di molecole antiossidanti endogene.

Sia la disfunzione endoteliale sia lo stress ossidativo sono due momenti fisiopatologici, peraltro collegati tra loro, di estrema rilevanza in corso di sepsi.

Attivazione/disfunzione endoteliale e sepsi

L'endotelio è ormai considerato un organo vero e proprio ed ha il compito di presiedere diverse funzioni, che sono determinanti per l'omeostasi vascolare (Fig. 1). Sul versante endoluminale l'endotelio regola i processi di fibrinolisi, aggregazione piastrinica, coagulazione, permeabilità, adesività ed infiammazione. Sul versante della membrana elastica interna, invia segnali alle cellule muscolari lisce in termini di vasoregolazione. In particolare, promuove la vasodilatazione con l'ossido nitrico (NO), il fattore iperpolarizzante (EDHF), la prostaciclina (PGI₂), e la vasocostrizione con le prostaglandine (PGH₂), l'endotelina-1 (ET-1), il trombossano A₂ (TXA₂); inoltre, attraverso i diversi fattori crescita, regola la proliferazione delle cellule muscolari lisce.

In condizioni normali, l'endotelio reagisce attivamente agli stimoli provenienti dall'ambiente extracellulare con una risposta di tipo adattativo, la cui natura e durata sono in funzione del tipo di stimolo e della reazione stessa dell'organismo.

In corso di sepsi, l'agente patogeno può infettare diretta-

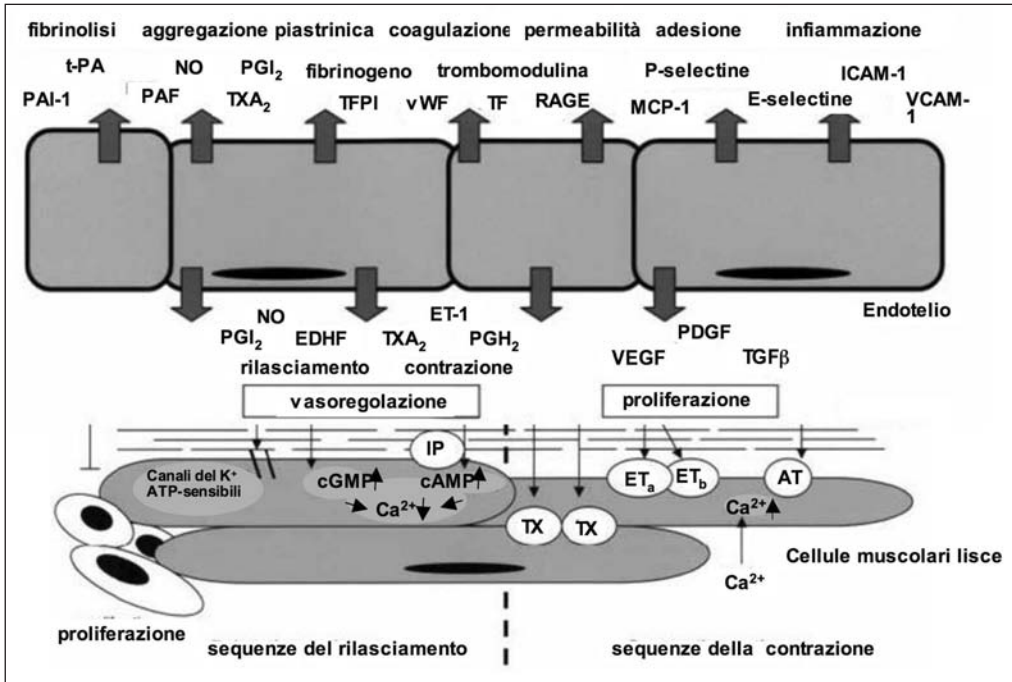


Fig. 1 - Funzioni regolate dall'endotelio sul versante endoluminale e sul versante della membrana elastica interna (cellule muscolari lisce). (Per abbreviazioni si veda testo).

mente le cellule endoteliali, ma più comunemente sono i componenti della parete batterica (es. lipopolisaccaridi) ad attivare la superficie endoteliale. Il "link" fisiopatologico tra sepsi e danno endoteliale è stato suggerito alcuni decenni fa, con un esperimento nel quale i lipopolisaccaridi si sono dimostrati in grado di indurre una denudazione non-meccanica dell'endotelio (1).

Tale attivazione endoteliale può portare a modificazioni sia strutturali, che includono la vacuolizzazione nucleare, il rigonfiamento e la frammentazione del citoplasma (2), sia funzionali quali uno stato di ipercoagulabilità, un'eccessiva risposta infiammatoria, un'aumentata permeabilità cellulare e l'incremento di segnali apoptotici.

Vedendo in maggior dettaglio le modificazioni funzionali dell'endotelio che è venuto a contatto con un agente patogeno, l'ipercoagulabilità è stata dimostrata in numerosi studi sperimentali. L'aggiunta di lipopolisaccaridi a cellule endoteliali *in vitro* ha dimostrato una diminuzione della sintesi di trombomodulina e dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) (anche per un aumento del suo inibitore, PAI-1); si è osservato inoltre un aumento dell'espressione del fattore tissutale (TF) e della deposizione di fibrina (3). Lo stato procoagulante è a sua volta amplificato dalla presenza di un flusso ridotto e dal fatto che cellule endoteliali attivate hanno proprietà chemioattrattive per piastrine, monociti e neutrofili.

L'endotelio risponde poi ai mediatori dell'infiammazione esprimendo sulla superficie cellulare molecole di adesione quali la P-selectina, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (*intracellular e vascular adhesion molecules*) (4). In realtà, tale risposta si è dimostrata variabile a seconda degli orga-

ni e dei segmenti del distretto vascolare considerati.

In un recente lavoro, Mutunga et al (5) hanno messo a punto un metodo per rilevare la presenza di cellule endoteliali circolanti in corso di sepsi, fornendo quindi una prova diretta di danno endoteliale in tale patologia. Le cellule endoteliali sono state identificate tramite immunofluorescenza indiretta, dopo marcatura con anticorpi anti-fattore di von Willebrand (vWF) e con il recettore per il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Inoltre, il numero di cellule endoteliali circolanti ha dimostrato una buona correlazione con la gravità della patologia, raggiungendo i valori più elevati nello *shock* settico.

Un'altra caratteristica peculiare dell'endotelio esposto ad agenti patogeni è l'incremento di permeabilità cellulare con il libero passaggio di elementi circolanti da un versante all'altro e con la formazione di edema tissutale, che peggiora l'ipovolemia, l'emoconcentrazione e la stasi ematica.

Sebbene i lipopolisaccaridi abbiano prodotto solo in alcuni studi apoptosi diretta delle cellule endoteliali, tale fenomeno ha ragione d'essere a causa di mediatori e di reazioni prodotte in corso di sepsi, come il TNF-α, IL-1, IL-8, interferone, i radicali liberi dell'ossigeno e la stessa ipossia (6). L'apoptosi, a sua volta, accentua lo stato pro-infiammatorio, ad esempio inducendo l'espressione delle molecole di adesione a livello della superficie cellulare.

In realtà il termine di disfunzione endoteliale è identificato nella maggior parte della letteratura degli ultimi anni come un'alterazione della vasodilatazione endotelio-dipendente, specificatamente causata da una perdita di attività del NO. In pratica, in una patologia come la sepsi sarebbe un po' riduttivo intendere la disfunzione endoteliale come

alterazione causata da una sola molecola, anche se indotta da molteplici meccanismi. Più realistico quindi, in tale contesto, è definire la disfunzione endoteliale come una risposta dell'endotelio che da adattativa è divenuta maladattativa, eccessiva e generalizzata.

Momento centrale nella fisiopatologia dello *shock* settico è rappresentato dalla disfunzione endoteliale, responsabile dello squilibrio tra vasocostrizione e vasodilatazione. Tale squilibrio, a favore di una vasodilatazione massiva, è responsabile dell'elevata letalità e dell'inefficacia terapeutica dei farmaci vasopressori somministrati. Solitamente in pazienti con ipotensione e scarsa perfusione tissutale la vasocostrizione operata dalle cellule muscolari risulta inefficace; l'apoptosi di cellule endoteliali, l'inadeguata estrazione periferica di ossigeno e l'incrementata attività vasodilatante della PGI₂ rendono pressoché irreversibile il quadro clinico. Studi più recenti (7) hanno evidenziato altri meccanismi implicati nella vasodilatazione da *shock* settico: l'attivazione di canali del potassio ATP-sensibili situati a livello della membrana plasmatica delle cellule muscolari lisce, l'attivazione della forma inducibile dell'enzima nitrossido-sintasi e la carenza dell'ormone vasopressina. Inoltre, è stato dimostrato che il potenziale a livello della membrana plasmatica delle cellule muscolari lisce gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del calibro del vaso: l'apertura dei canali del potassio ATP-sensibili induce un efflusso di ioni potassio con conseguente iperpolarizzazione della membrana ed inibizione della vasocostrizione. Tali canali del potassio sono attivati a livello cellulare da una diminuzione di ATP e da un aumento di ioni idrogeno e lattati, questi ultimi dipendenti dal flusso ematico. Pertanto, l'attivazione dei canali del potassio si è rilevato un meccanismo cruciale nell'ipotensione e nella vasodilatazione da *shock* settico.

Anche l'aumentata sintesi di NO a livello delle cellule endoteliali contribuisce al quadro di vasodilatazione massiva e di resistenza a farmaci vasopressori. Ciò in qualche modo contraddice, a proposito della disfunzione endoteliale, la connotazione negativa che la scarsa biodisponibilità di NO riveste. In natura, come dimostrano diversi fenomeni, anche un eccesso di sostanza "benefica" può portare ad effetti negativi. L'eccesso di NO nello *shock* settico è il risultato dell'aumentata espressione della forma inducibile dell'enzima nitrossido-sintasi (8), evento in cui sono coinvolte anche numerosi citochine pro-infiammatorie. In particolare, l'NO causa vasodilatazione attivando i canali del potassio calcio-sensibili che a loro volta hanno anche il compito di ostacolare l'effetto di agenti vasopressori, endogeni ed esogeni. Come conferma di tale effetto, la somministrazione di inibitori della sintesi di NO migliora notevolmente la risposta agli agenti vasopressori (9), indispensabili nel trattamento dello *shock* vasodilatatorio. Inoltre, le specie reattive dell'ossigeno favoriscono la deattivazione, in termini di autossidazione, delle catecolamine esogene quali dopamina, noradrenalina ed epinefrina, trasformandole nei loro rispettivi dopacromi ed adrenocromi; tali sostanze hanno dimostrato la perdita

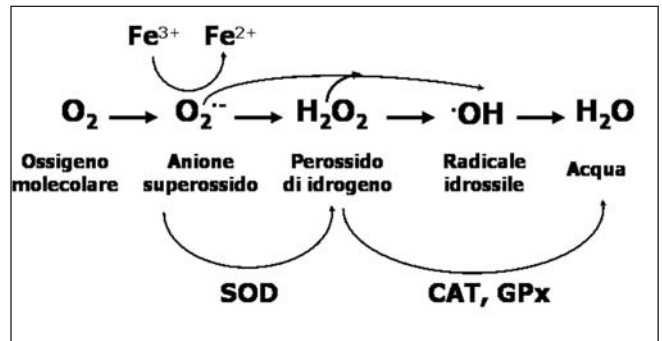


Fig. 2 - Formazione di specie reattive dell'ossigeno a partire dall'ossigeno molecolare ed enzimi antiossidanti, quali difese endogene. (Per abbreviazioni si veda testo).

della loro capacità vasocostrittoria (10) e di esercitare un effetto cardi tossico (11).

Stress ossidativo e sepsi

In condizioni fisiologiche, esiste un preciso equilibrio tra produzione di specie reattive dell'ossigeno e loro rimozione da parte di molecole antiossidanti endogene. La formazione di specie reattive dell'ossigeno avviene quando, durante la respirazione cellulare o durante l'attivazione di cellule fagocitarie, le diverse molecole vanno incontro ad un processo di ossidazione; in corso di tale processo l'ossigeno molecolare si riduce a H₂O, dando origine a specie reattive dell'ossigeno (Fig. 2) quali l'anione superossido (O₂^{•-}), il perossido di idrogeno (H₂O₂) e il radicale idrossile (•OH). Tra gli enzimi ad azione antiossidante, la superossido dismutasi (SOD) converte l'anione superossido in perossido di idrogeno che, in assenza di metalli di transizione, è un composto relativamente stabile. Nei neutrofili attivati, tuttavia, il perossido di idrogeno favorisce l'ossidazione, tramite l'enzima mieloperossidasi (MPO), dello ione cloro ad acido ipocloroso, producendo un effetto citotossico aggiuntivo. A sua volta, il perossido di idrogeno in eccesso viene convertito ad H₂O da altri enzimi antiossidanti quali la catalasi (CAT), la glutazione perossidasi (GPx) ed altre perossidasi. Il radicale idrossile, composto estremamente reattivo, può formarsi dalla reazione del superossido con il perossido di idrogeno in presenza di uno ione metallo (es. ferro), che dalla forma ridotta (ione ferroso, Fe²⁺) passa alla forma ossidata (ione ferrico, Fe³⁺). È da notare che il ferro plasmatico è solitamente legato a proteine (eme, ferritina, transferrina) e, in tal modo, viene sottratto all'azione dei radicali liberi.

Alle citate difese antiossidanti intracellulari va aggiunto il glutazione ridotto (GSH) che oltre a funzionare da substrato per la GPx, ha un'attività antiossidante diretta nella riparazione del DNA. Antiossidanti di membrana sono invece l' α -tocoferolo, il β -carotene, il licopene e il co-enzi-

ma Q che impediscono la formazione di acidi grassi poliinsaturi. Le specie reattive dell'ossigeno sono presenti anche nell'ambiente extracellulare, in seguito ad attivazione neutrofilica; le difese antiossidanti a tale livello includono proteine che legano ioni metallo quali l'apotransferrina, ceruloplasmina, lattoferrina ed albumina, e molecole quali l'acido ascorbico che reagisce con il superossido a formare acido deidroascorbico.

La condizione di stress ossidativo si manifesta, quando l'equilibrio tra le diverse forme è alterato da un'eccessiva produzione di specie reattive e/o da un'inadeguata difesa antiossidante. Le specie reattive dell'ossigeno, in quantità eccessiva, sono dannose in quanto ossidano il DNA e le proteine, modificandone la struttura e la funzione o in quanto danneggiano le membrane cellulari tramite la perossidazione lipidica, alterando la permeabilità delle membrane stesse (12). In particolare, a livello della membrana mitocondriale il danno ossidativo esita in un disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con conseguente alterazione della respirazione cellulare e, da ultimo, attivazione delle caspasi ed apoptosi.

Ormai numerosi lavori sono stati pubblicati a favore di un incremento dello stress ossidativo in corso di sepsi; sono stati riportati da una parte ridotti livelli di α -tocoferolo ed aumentati livelli di acido tio-barbiturico (13, 14) espressione di aumentata perossidazione lipidica, dall'altra un'elevata attività della xantina-ossidasi (15). Vi sono dimostrazioni che anche il metabolismo del GSH è alterato in corso di sepsi, a seguito di stimolazione con lipopolisaccaridi; una rapida diminuzione di GSH a livello delle cellule endoteliali consegue ad un aumento del TNF- α , con un rapido *turnover* tra GSH e glutatione ossidato (GSSG) (16).

Tale incremento di stress ossidativo riconosce numerose fonti alternative di produzione di specie reattive, quali l'attivazione della xantina-ossidasi a seguito di una condizione di ischemia/riperfusion, il *burst* respiratorio da attivazione neutrofilica ed il metabolismo dell'acido arachidonico. L'attivazione neutrofilica produce un agente citotossico, quale il superossido, attraverso la NADPH-ossidasi legata alla membrana, la cui azione è modulata dall'angiotensina II, norepinefrina e TNF- α ; inoltre, vi è un aumento del NO sotto forma di radicale (NO \cdot) che, se presente in eccesso, può reagire con il superossido e produrre perossinitrito (ONOO \cdot), un composto altamente reattivo che, di per sé, deprime la contrattilità. Il perossinitrito, come le altre specie reattive, è coinvolto anche nel processo di deattivazione delle catecolamine esogene con formazione di composti quali gli adrenocromi.

Conclusioni

L'evidenza che l'endotelio riveste un ruolo fisiopatologico fondamentale nella sepsi suggerisce anche la possibilità

di considerare tale "organo" un *target* terapeutico per migliorare la sopravvivenza di pazienti così critici. Inoltre, importanti risvolti diagnostici e terapeutici possono emergere misurando marcatori circolanti di stress ossidativo; le concentrazioni degli aminotioili, dei prodotti di perossidazione lipidica, degli enzimi antiossidanti, delle molecole antiossidanti di membrana ed extracellulari possono fornire utili informazioni sull'evoluzione giornaliera, sul *timing* d'intervento terapeutico e sulla risposta stessa alle terapie in pazienti con sepsi o *shock* settico.

Riassunto

La disfunzione endoteliale e lo stress ossidativo rivestono un ruolo centrale nella patogenesi della sepsi e dello *shock* settico. La disfunzione endoteliale coinvolge un complesso *network* di risposte a livello cellulare, dei mediatori dell'infiammazione e dei fattori della coagulazione. Lo stress ossidativo, invece, è prodotto da uno squilibrio tra produzione di specie reattive dell'ossigeno e loro rimozione da parte di molecole antiossidanti endogene. Una panoramica su questi meccanismi è rilevante dal punto di vista diagnostico/prognostico, suggerendo *marker* di evoluzione clinica, identificando possibili bersagli terapeutici ed indirizzando verso il giusto *timing* d'intervento nel singolo paziente.

Indirizzo degli Autori:

Prof. Oberdan Parodi

Istituto di Fisiologia Clinica CNR - Milano

Ospedale Niguarda Ca' Granda

P.zza Ospedale Maggiore, 3

20162 Milano

e-mail: ifcnig@tin.it

Bibliografia

1. Reidy MA, Bowyer DE. Scanning electron microscopy: morphology of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Atherosclerosis* 1977; 26: 319-28.
2. Lee MM, Schuessler GB, Chien S. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. *Artery* 1988; 15:71-89.
3. Moore KL, Andreoli SP, Esmen NL, Esmen CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987; 79:124-30.
4. Lopez S, Prats N, Marco AJ. Expression of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1391-7.
5. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 195-200.
6. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; 117: 841-54.
7. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 588-95.
8. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 437-55.
9. Hollenberg SM, Piotrowski MJ, Parrillo JE. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to endothelin-1 in septic rats. *Am J Physiol* 1997; 272: R969-74.
10. Bindoli A, Rigobello MP, Deebble DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 391-405.
11. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1173-85.
12. Zimmerman JJ. Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 1995; 23: 616-7.
13. Takeda K, Shimada Y, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I. Plasma lipid peroxides and alpha-tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med* 1984; 12: 957-9.
14. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23: 646-51.
15. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1996; 24: 1649-53.
16. Malmezat T, Breuille D, Capitan P, Mirand PP, Oblad C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr* 2000; 130: 1239-46.