

Malattia di Dupuytren: Collagenasi da colture di Vibrio Alginolyticus come nuova opzione nella terapia non chirurgica.

Autori: Maschio N Bassetto F, Brun P, Abatangelo G, Zavan B, Vindigni V

Introduzione

I collagene sono strutture proteiche caratterizzate da una tipica conformazione rigida a tripla elica sinistrorsa ricca in prolina, idrossiprolina e glicina. Vengono degradati da una famiglia di proteine chiamate collagenasi, enzimi prodotti oltre che dall'uomo anche da molti batteri come Clostridium Histolyticum e Vibrio Alginolyticus. Le collagenasi assumono attualmente grande rilevanza nella cura delle patologie fibroproliferative della fasce, in particolar modo nella malattia di Dupuytren, caratterizzate dall'anomala deposizione del collagene in esse. Scopo dello studio è valutare l'attività degradativa della collagenasi da Vibrio Alginolyticus nei confronti dei collagene di tipo I e III implicati nella patogenesi di tali malattie, esaminandone soprattutto il profilo di sicurezza e l'efficacia .

Materiali e metodi

Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due tempi. Durante la prima parte dello studio è stata prodotta la collagenasi, se ne è verificata la purezza in vitro, è stata poi valutata la degradazione del collagene misurando la grandezza dei frammenti ottenuti ed infine si sono eseguiti i test MTT di citotossicità cellulare e DMEM di proliferazione. Nella seconda parte la collagenasi è stata iniettata in campioni di tessuto di corda fibrosa prelevata in corso di aponevrectomie in pazienti affetti da malattia di Dupuytren, senza applicare altri trattamenti. Sono stati successivamente condotti altri studi sottoponendo i campioni a preventivi stress meccanici o a contemporanea iniezione con EDTA. Tutti i campioni sono stati trattati con 20µl di collagenasi da Vibrio Alginolyticus e sottoposti ad analisi istologica. Le sezioni ottenute sono state sottoposte a colorazione Azan Mallory, immunoistochimica per collagene di tipo I, III, osteopontina ed immunofluorescenza per osteopontina. È stato applicato infine il software ImageJ per analizzare in maniera semiquantitativa il segnale cromatico del collagene III.

Risultati

I test eseguiti hanno permesso di evidenziare che la collagenasi ottenuta dal Vibrio Alginolyticus è altamente pura. Si è riscontrato inoltre che essa possiede un'ottima capacità degradativa dose e tempo dipendente, che non inficia né la sopravvivenza né la proliferazione cellulare. Dall'osservazione microscopica delle sezioni colorate è emerso in primo luogo che nel contesto dei campioni di corda fibrosa esistono dei nuclei di calcificazione. In secondo luogo la collagenasi da Vibrio Alginolyticus causa, nei campioni trattati, una diminuzione della colorazione per il collagene: questo evento risulta dipendente dal tempo di esposizione all'enzima e dal preventivo trattamento con stress meccanici o con chelanti del calcio. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi semiquantitativa della variazione del segnale cromatico per il collagene III eseguita in modo informatico col software ImageJ .

Conclusioni

In base ai risultati ottenuti appare possibile aprire prospettive cliniche riguardanti la collagenasi da Vibrio Alginolyticus. Viste le sue capacità evidenti in vitro e su campioni biologici essa potrebbe rappresentare un'opzione nella terapia non chirurgica nelle malattie fibroproliferative delle fasce, in special modo per la malattia di Dupuytren. Essendo stata sottoposta a studio sperimentale ha infatti dimostrato la sua efficacia nella degradazione dei collagene I e III tipici della patogenesi di tali malattie. Essendo inoltre dotata di un alto profilo di purezza ed essendo isolata da colture di un batterio non patogeno limita il rischio di contaminazioni e reazioni immunitarie contro i suoi componenti. La collagenasi da Vibrio Alginolyticus si propone quindi come una possibile futura opzione terapeutica sicura ed efficace per la malattia di Dupuytren.