

# EFFETTO DELLA CICLOSPORINA A SULLA DEGENERAZIONE E RIGENERAZIONE DELLE PLACCHE MOTRICI IN MUSCOLI DENERVATI DI RATTO

G. BONASPETTI\*, L. RODELLA\*\*, R. FENU\*, R. REZZANI\*\*, C. AGOSTINI\*\*, L. BIANCHI\*\*, U.E. PAZZAGLIA\*

\* Clinica Ortopedica dell'Università degli Studi di Brescia

\*\* Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, sezione di Anatomia, Università degli Studi di Brescia

## *The effects of cyclosporin A on end plates degeneration and regeneration in denervated muscles of rat.*

**SUMMARY.** *Two groups of twelve rats were used. In the first group was cut the sciatic nerve, six rats of this group were treated with cyclosporine A. In the second group the internal peroneal nerve was cut and removed. The external peroneal nerve was neurotized to the medial head of the gastrocnemius. A direct neurotization instead of a suture of the nerve to stop rehabilitation of end plates was done. In the second group six rats were treated with cyclosporine A. For the control the controlateral muscle as sample was prelevated. The rats were killed 30 and 60 days after the surgical treatment. The quantitative analysis of end plates was realized at the microscopy. Any statistical differences between the group of muscles neurotized with cyclosporine A and the groups of the muscles not treated with cyclosporine A was found. The statistical differences was found in the group of denervated muscles treated with cyclosporine A. In the muscle not treated with cyclosporin A the number of end plates was  $12 \pm 2$ ; In the muscle treated with cyclosporin A it was  $23 \pm 5$  (4 w). After 8 weeks the number of end plates was  $7 \pm 3$  in non treated muscles, against  $11 \pm 6$  in treated muscles. The slow degeneration of end plates in muscle treated with cyclosporin A could be due induced to inhibition of ossidonitric syntetasy by calcineurina. What eventually avoids neurotoxic effect. Riv Chir Mano 2001; 38: 6-13*

## KEY WORDS

Cyclosporine A, end plates, nerve regeneration

## RIASSUNTO

*In questo lavoro abbiamo voluto studiare l'effetto delle ciclosporina A (Cys A) sulla degenerazione delle placche motrici. L'esperimento è stato eseguito su 24 ratti. Al primo gruppo di 12 ratti è stata eseguita una sezione del nervo sciatico, 6 ratti sono poi stati sottoposti a trattamento con ciclosporina A. Il secondo gruppo è stato sottoposto a sezione e asportazione dello sciatico popliteo interno. In seguito il gemello mediale è stato neurotizzato con lo sciatico popliteo esterno sezionato il più distalmente possibile. È stata eseguita una neurotizzazione muscolare diretta e non una neurorrafia per evitare che le placche motrici denervate venissero riabitate. Questo ha permesso di valutare placche motrici in fase di degenerazione e nuove placche in fase di rigenerazione. Di questo secondo gruppo 6 ratti sono stati trattati con ciclosporina A. Come campione controllo è stato prelevato il muscolo gemello mediale sano dell'arto controlaterale. I ratti sono stati sacrificati a 30 e 60 giorni. È stata eseguita al microscopio ottico l'analisi quantitativa delle placche motrici acetilcolinesterasi positive per unità di campo, i risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza. Non abbiamo trovato differenze statisticamente significative nel numero di placche motrici in muscoli sottoposti a neurotizzazione muscolare diretta trattati con ciclosporina A e non trattati. Il dato rilevante è stato trovato nel conteggio di placche motrici nel muscolo denervato trattato e non trattato con ciclosporina A. Nel muscolo non trattato il numero di placche motrici a 1 mese era di  $12 \pm 2$  per unità di campo contro  $23 \pm 5$  dei muscoli trattati con ciclosporina A. A due mesi il dato si è riconfermato. Nel muscolo non trattato con l'immunosoppressore le placche erano  $7 \pm 3$  per unità di campo contro le  $11 \pm 6$  del muscolo trattato con ciclosporina A, differenze statisticamente significative. Il meccanismo d'azione che sta alla base del rallentamento della degenerazione delle placche motrici trattate con la ciclosporina A potrebbe essere l'inibizione dell'ossidonitrico sintetasi da parte della calcineurina prevenendo così il rilascio del neurotrasmettitore e il fenomeno di neurotossicità.*

## PAROLE CHIAVE

Ciclosporina A, placche motrici, rigenerazione nervosa

Arrived: 21 novembre 2000

Accepted: 19 gennaio 2001

Correspondence: Dr. Giovanni Bonaspetti, Via Valotti, 26 - 25133 Brescia - Tel. 030/2006377 - e-mail: g.bonaspetti@libero.it

## INTRODUZIONE

L'allotrapianto di organi è da anni entrato nella comune pratica clinica, negli ultimi 5 anni anche l'allotrapianto di tessuti come osso, muscoli e nervi sta fondando delle solide basi tanto da pensare che nel prossimo futuro anche i trapianti detti "non salva vita" saranno routinariamente eseguiti.

Doi et al. nel 1994 descrivono 1 caso di trapianto allogeneico di fibula vascolarizzata (1) con terapia immunogenica associata. Nel 1998 Hofmann et al. (2) descrivono 2 casi di trapianto allogeneico vascolarizzato di femore e 3 casi di trapianto allogeneico vascolarizzato di ginocchio, nei casi del ginocchio oltre all'osso sono stati trapiantati anche tessuti come la cartilagine, il muscolo e la sinovia.

Sempre nel 1998 è stato eseguito il primo trapianto di mano in Francia (3) e nel 1999 negli USA hanno eseguito il secondo trapianto di mano.

Nel 1998 Jones ha descritto un caso di allotrapianto di muscolo scheletrico vascolarizzato per la ricostruzione dello scalpo in un paziente trapiantato renale affetto da spinalioma (4).

Numerosi esperimenti sono stati inoltre eseguiti per studiare gli allotrapianti del sistema nervoso periferico per la riparazione di grosse perdite di sostanza (5, 6).

Tutti i pazienti sottoposti ad allotrapianto sono stati ovviamente trattati con terapia immunosoppressiva. Solo nel caso del trapianto di mano eseguito in Francia è stato utilizzato l'FK-506 (Tacrolimus), mentre negli altri casi è stata utilizzata la Ciclosporina A (Cys A).

Il problema che sorge con gli allotrapianti non è solo la capacità di sopravvivenza concessa dalla terapia a cui i pazienti vengono sottoposti, ma anche la capacità degli organi o tessuti di rigenerare correttamente per conservare la loro funzione o riconsegnarla come nel caso di trapianti che comprendano il tessuto nervoso periferico ed il muscolo.

Abbiamo condotto uno studio sperimentale sulle placche motrici di muscoli di ratti, sottoposti a terapia immunosoppressiva con Cys A, denervati e successivamente reinnervati mediante neurotizzazione muscolare diretta. Sono stati valutati gli ef-

fetti del farmaco a breve e medio termine sulla degenerazione delle placche motrici.

## MATERIALI E METODI

Ventotto ratti Wistar del peso di 250-270 gr (Charles River) sono stati divisi in sette gruppi. Due gruppi di 4 soggetti sono stati sottoposti ad intervento di denervazione dei muscoli della gamba posteriore destra mediante resezione ed asportazione del nervo sciatico comune (gruppo 3 e 6) Fig. 1-2. Due gruppi di 4 soggetti sono stati sottoposti ad intervento di denervazione della gamba destra mediante resezione ed asportazione del nervo sciatico popliteo interno e successiva neurotizzazione diretta del gemello mediale del tricipite della sura con il nervo sciatico popliteo esterno. Prima di suturare il nervo al muscolo sono stati separati i fascicoli del nervo per aumentare la superficie di contatto e nel muscolo è stata aperta una breccia nel perimysio per permettere il contatto diretto tra i fascicoli del nervo e le cellule muscolari.

La neurotizzazione muscolare diretta è stata eseguita in tutti 8 i ratti sul terzo prossimale posteriore del ventre muscolare del gemello mediale. La sutura è stata eseguita con Nylon 10-0 tra il perimysio e l'epinervio (gruppo 2 e 5).

Due gruppi di 4 soggetti non sono stati operati (gruppo 1 e 4).

L'accesso chirurgico è stato posteriore con il ratto in posizione prona. L'anestesia è stata eseguita con Ketamina e Rompum.

La metà dei soggetti di ogni gruppo è stata trattata con Cys A (15 mg. pro Kg di peso corporeo in unica somministrazione giornaliera).

A 4 settimane dall'intervento 2 ratti per ogni gruppo sono stati perfusi con paraformaldeide al 4%.

Ai 12 ratti è stato prelevato il muscolo gemello mediale dell'arto operato (il posteriore destro). I pezzi sono stati poi conservati in paraformaldeide al 4%.

A 8 settimane lo stesso procedimento è stato effettuato sui restanti 12 ratti.

Nel settimo gruppo di 4 ratti i soggetti sono stati trattati per 2 settimane con CysA. Al termine del

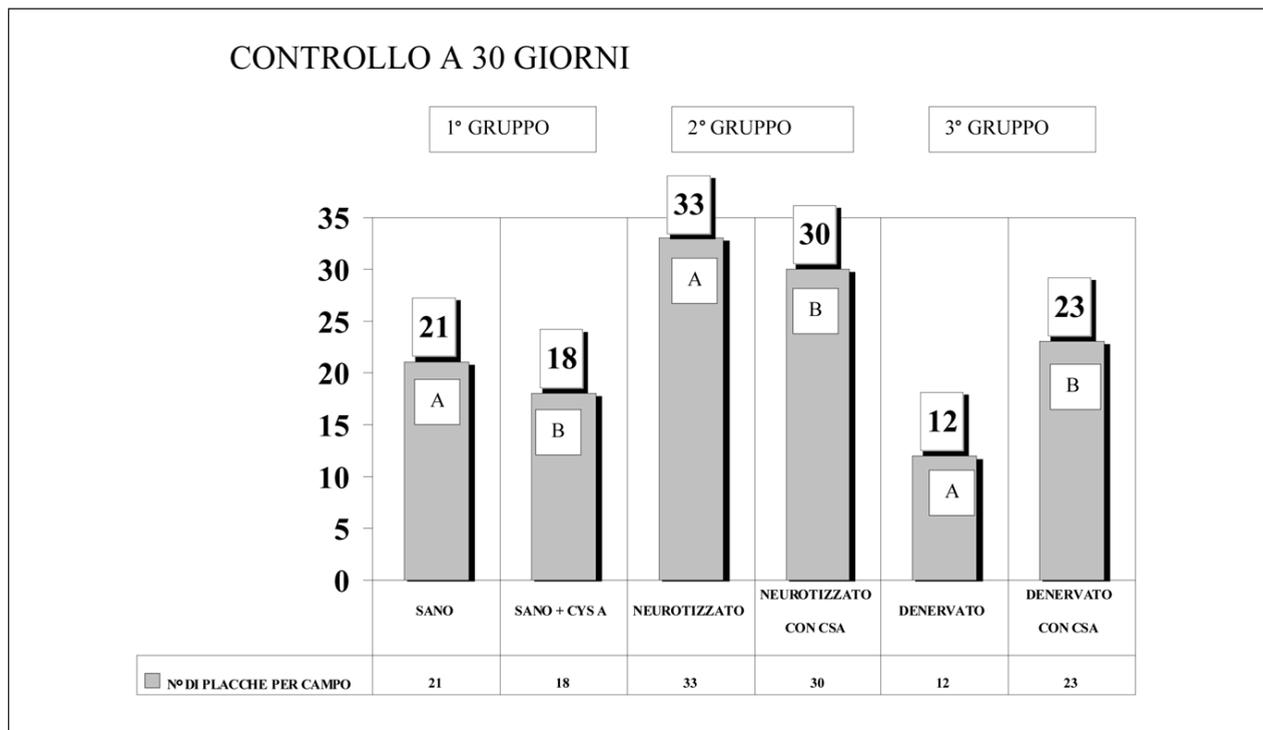


Figura 1.

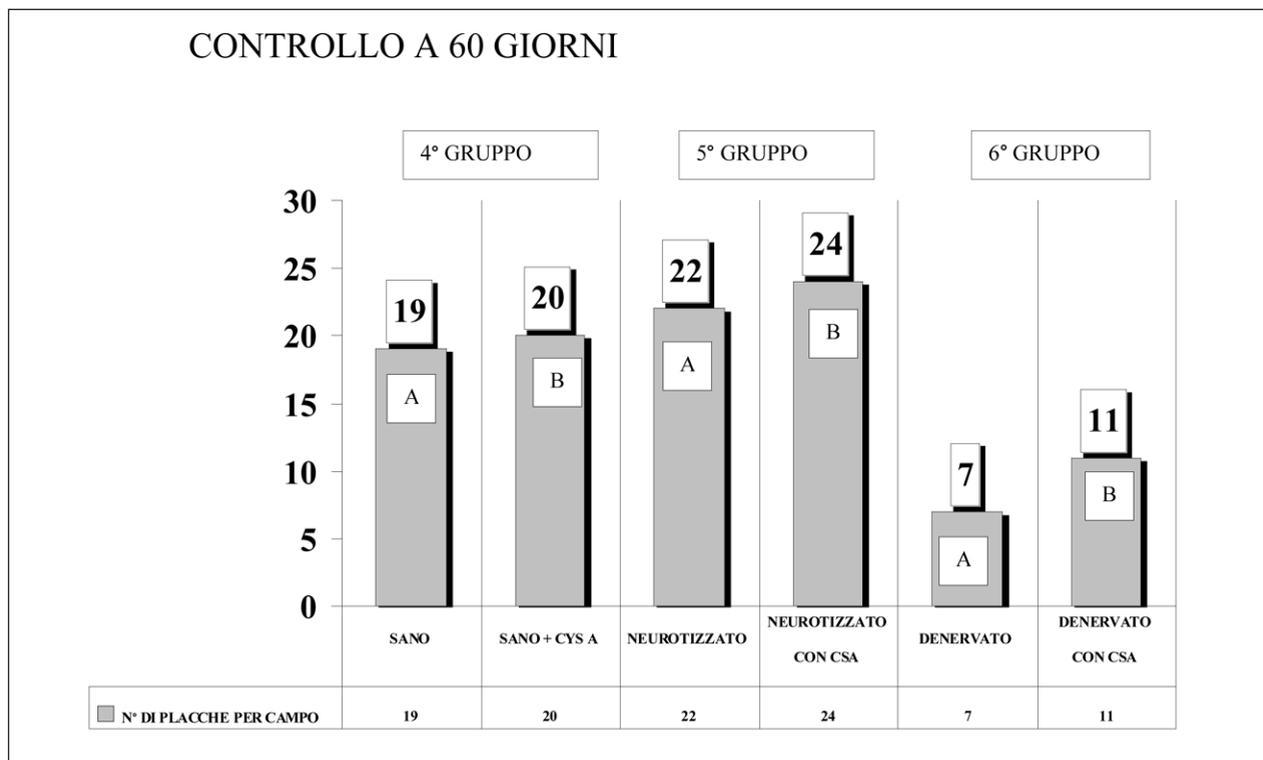


Figura 2.

trattamento con immunosoppressore ogni ratto è stato sottoposto ad intervento di denervazione della muscolatura della gamba posteriore destra. A 2 settimane dall'intervento i ratti sono stati perfusi con paraformaldeide al 4%.

Ad ogni ratto è stato prelevato il gemello mediale denervato dell'arto posteriore e posto in paraformaldeide al 4%.

### Studio al microscopio ottico

I muscoli sono stati lasciati in saccarosio al 30% per 24h, e successivamente si è isolata un'area di 8x8 mm da ciascun ventre muscolare. Si sono quindi eseguite al criostato delle sezioni seriali longitudinali di 10 micron.

Su ogni vetrino sono state incluse cinque sezioni per ogni muscolo alla distanza di 400 micron l'una dall'altra. Le placche motrici sono state messe in evidenza per mezzo dell'attività acetilcolintrasferasica utilizzando il metodo di Karnowsky (Tsuji and Larabi, 1983). Dopo un lavaggio in tampone citrato pH 5.0 le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente nel seguente mezzo di incubazione: 9,15 ml di tampone citrato 0,1M, 0,5 ml di potassio ferricianuro, 0,25 ml di cloruro di rame e 0,1 ml di acetilcolina cloruro 0,1 M. Le sezioni sono state lavate in Trisi-buffer per 5 min. allo scopo di rimuovere eventuali depositi di rame non specifici, disidratati e montati per l'osservazione al microscopio.

Nell'analisi quantitativa è stato contato il numero di placche motrici acetilcolinesterasi positive in unità di campo ( $0,12 \text{ mm}^2$ ) presenti su ciascuna sezione ed i risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza per evidenziare differenze significative tra i gruppi.

### RISULTATI

Nella Fig. 1 osserviamo i controlli a 4 settimane. Nel 1° gruppo il numero di placche motrici nel muscolo trattato con immunosoppressore non è significativamente diverso dal muscolo non trattato

con CysA, (sano  $21 \pm 9$  placche per campo, sano + CysA  $18 \pm 7$  placche per campo).

Nel 2° gruppo il muscolo sottoposto a neurotizzazione muscolare diretta al conteggio per campo delle placche motrici non mostra significative differenze tra quello trattato con CysA e quello non trattato (neurotizzato  $33 \pm 10$  placche per campo, neurotizzato + CysA  $30 \pm 8$  placche per campo). In questo secondo gruppo analizzato il numero delle placche motrici per campo è superiore al numero di placche motrici del muscolo sano in quanto si addizionano le placche motrici in fase di degenerazione a quelle in fase di rigenerazione.

Nel 3° gruppo di studio abbiamo il muscolo denervato. Il conteggio per unità di campo delle placche motrici mostra una significativa differenza tra il muscolo denervato non trattato con CysA e quello trattato. Il numero di placche motrici presenti nel muscolo trattato con immunosoppressore è di  $23 \pm 5$  placche per unità di campo, mentre il numero di placche motrici nel muscolo non sottoposto a terapia immunosoppressiva trattato è di  $12 \pm 2$  placche per unità di campo, la differenza è statisticamente significativa. Nel muscolo denervato trattato con CysA la degenerazione delle placche motrici è significativamente più lenta rispetto al muscolo senza CysA.

A due mesi i dati sostanzialmente sono sovrapponibili.

Nella Fig. 2 osserviamo il controllo a 8 settimane. Nel 4° gruppo il numero di placche motrici per unità di campo del muscolo sano ( $19 \pm 7$  placche per campo) e del muscolo trattato con CysA ( $20 \pm 6$  placche per campo) non mostra differenze statisticamente significative.

Nel 5° gruppo la differenza tra il numero di placche motrici per unità di campo del muscolo sottoposto a neurotizzazione muscolare diretta non trattato con CysA ( $22 \pm 8$  placche per campo) e trattato con CysA ( $24 \pm 4$  placche per campo) non è statisticamente significativa.

A due mesi il numero delle placche del muscolo neurotizzato è ancora superiore rispetto al numero di placche del muscolo sano, le placche motrici non più connesse al nervo sono ancora in fase di degenerazione. La differenza tra il 1° ed il 2° gruppo a 8 settimane è minore rispetto al controllo a 4 setti-

mane. Il numero di placche motrici degenerato a due mesi è superiore.

Nel 6° gruppo il numero di placche motrici per unità di campo nel muscolo denervato non trattato con CysA ( $7\pm 3$  placche per campo) è ulteriormente diminuito rispetto al numero di placche del muscolo sano ( $19\pm 7$  placche per campo). Il numero di placche per unità di area del muscolo denervato trattato con CysA ( $11\pm 6$  placche per campo) anche a due mesi continua ad essere significativamente superiore rispetto al muscolo sano non trattato ( $7\pm 3$  placche per campo).

Nella Fig. 3 osserviamo il 7° gruppo. Il numero di placche motrici per unità di campo del muscolo trattato per le 2 settimane prima di essere sottoposto ad intervento di denervazione e sacrificato a 2 settimane dall'intervento è statisticamente superiore rispetto al muscolo non trattato con CysA (denervato  $14\pm 5$  placche per campo; denervato con CysA  $20\pm 4$  placche per campo).

Le placche motrici del muscolo sano sono facilmente evidenziabili al microscopio ottico. Nella fig. 4 si vede una placca sana, si nota l'accumulo di ve-

scicole ripiene di acetilcolina visualizzabile come una soletta, la placca è tondeggiante.

A 30 giorni le placche denervate appaiono a forma di fuso; la soletta, espressione degli accumuli di acetilcolina, non è praticamente visualizzabile. Sempre in fig. 4 osserviamo una placca denervata a un mese non trattata e trattata con CysA e la placca motrice del muscolo sottoposto a neurotizzazione diretta.

E' impossibile distinguere con certezza al microscopio ottico le placche motrici in fase di degenerazione da quelle in fase di rigenerazione. Si osserva comunque un numero decisamente superiore di placche motrici sia nel muscolo trattato con CysA che in quello non trattato rispetto al muscolo denervato trattato e non trattato con CysA (Fig. 1-2). Nel muscolo sottoposto a neurotizzazione muscolare diretta si osservano, a 30 giorni e in maggior misura a 60 giorni, delle placche con modesti accumuli di acetilcolina contrapposte a placche vuote.

A 60 giorni le osservazioni sono praticamente sovrapponibili, si osserva un ulteriore decadimento morfostrutturale delle placche.

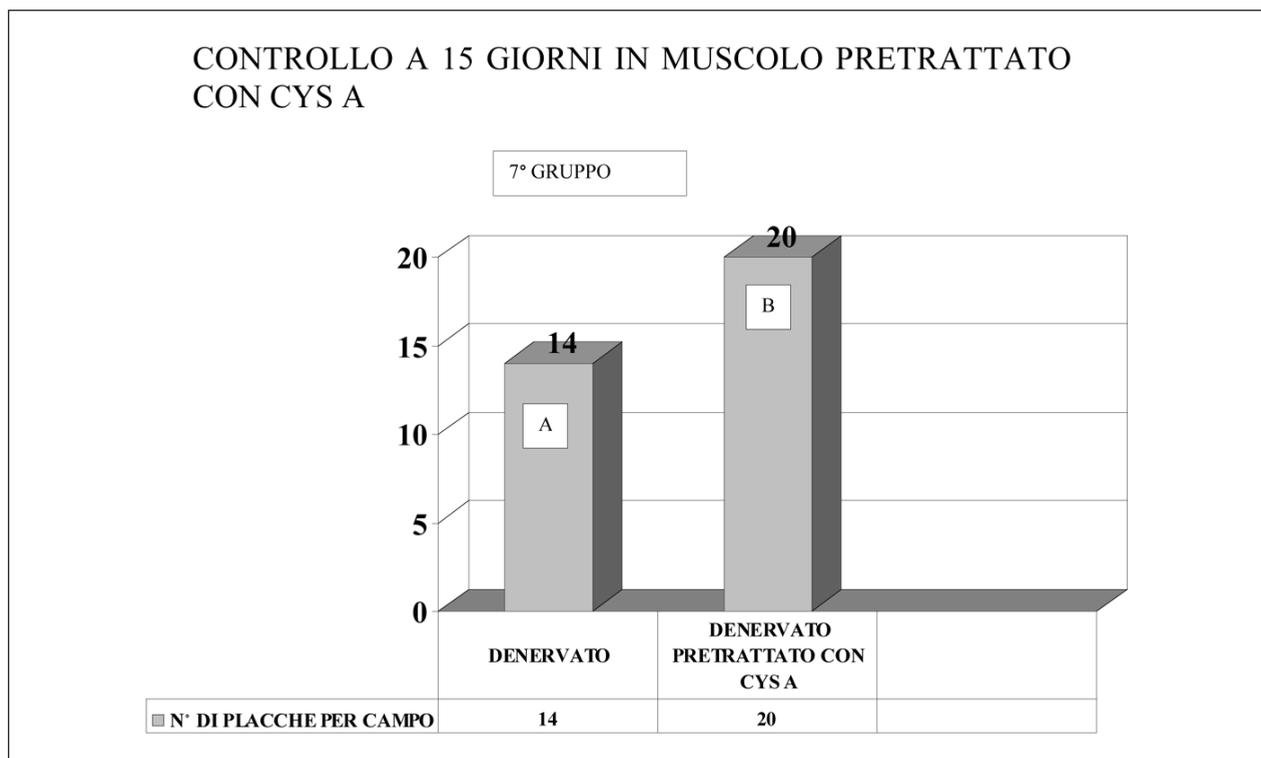


Figura 3.

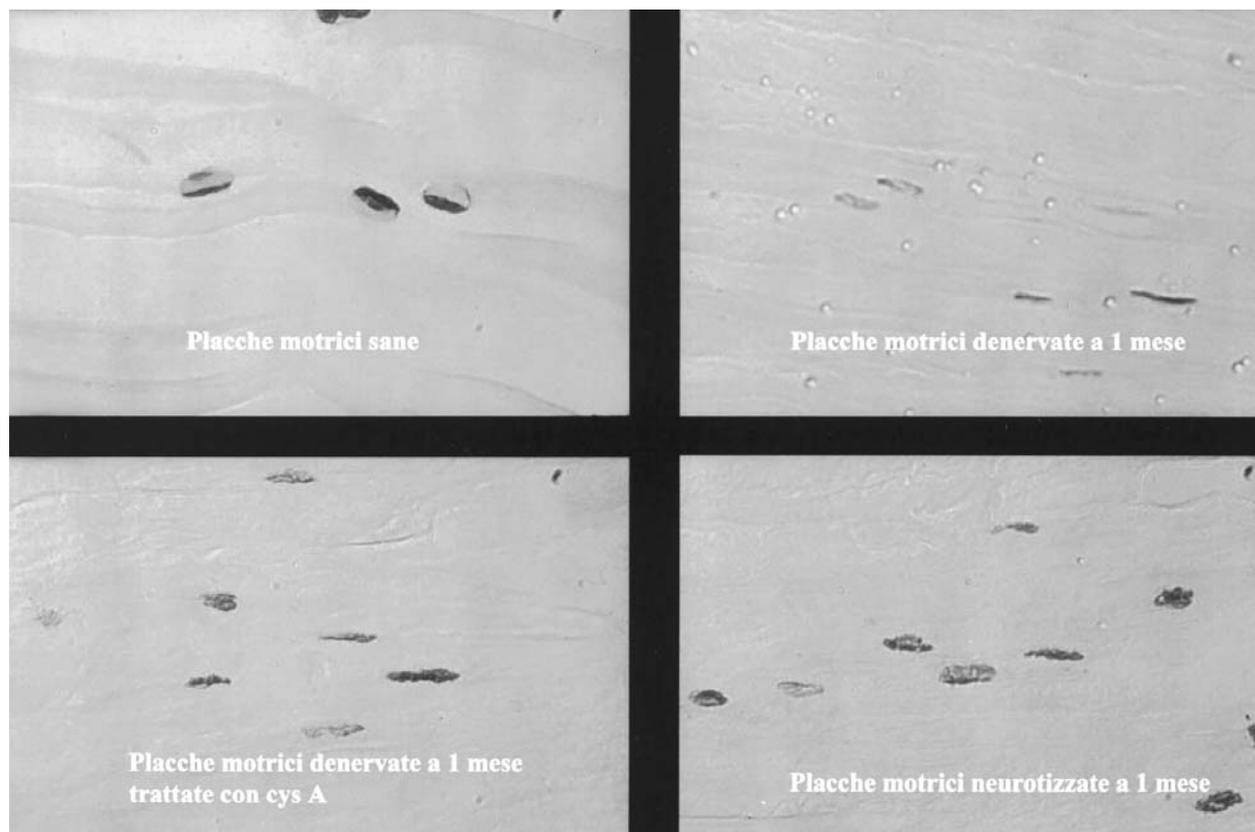


Figura 4.

## DISCUSSIONE

Ai ratti sottoposti a denervazione è stato asportato tutto il nervo sciatico. Ai ratti sottoposti a neurotizzazione è stato asportato lo sciatico popliteo interno e utilizzato lo sciatico popliteo esterno per eseguire la neurotizzazione, questo per evitare di lasciare residui del nervo originale.

Non è stata eseguita una lesione e successiva sutura del nervo perché si voleva osservare l'effettiva capacità di rigenerazione di nuove placche motrici. Nel caso di sutura le placche in fase di degenerazione avrebbero ristabilito un contatto con il nervo interrompendo la degenerazione.

I risultati ottenuti dall'analisi dei grafici della degenerazione delle placche motrici in muscoli di ratti denervati non sottoposti a somministrazione di CysA non si discostano da quanto già descritto in letteratura internazionale (6-10).

La presenza di giunzioni neuromuscolari a 8 settimane di distanza dalla denervazione è stata de-

scritta da Vedung e Olsson nel 1983 (11), ma già Coers nel 1953 e poi Savay e Csillik nel 1956 trovarono positività all'*AchE* di placche motrici a 3 mesi e 6 mesi in muscoli denervati.

Il numero di placche motrici diminuisce progressivamente con il passare del tempo e la morfologia delle giunzioni neuromuscolari cambia.

Già a due settimane le placche si svuotano, microscopicamente appaiono più affusolate, la reazione all'*AchE* è ridotta, tale fenomeno è visualizzabile con una minor intensità di colore delle placche.

La rigenerazione delle placche motrici è già dimostrata a 4 settimane. Nel gruppo 2A il numero di placche per unità di area è significativamente superiore sia al muscolo denervato (gruppo 3A) che al muscolo sano (gruppo 1A). Il maggior numero di placche per unità di area è dovuto al fatto che si sommano le placche non ancora degenerate a quelle già rigenerate. Questo dato dimostra che la somministrazione di CysA alla dose terapeutica non impedisce la rigenerazione e non modifica la velo-

cità di crescita del sistema nervoso periferico (12).

Nel gruppo 4A e 4B si evidenzia comunque un trend negativo rispetto al gruppo 2A e 2B, probabile espressione dell'effetto sul sistema nervoso periferico indotto dalla CysA (13, 14).

Nel gruppo 3 la colonna B (muscolo denervato trattato con CysA) mostra una netta riduzione della velocità di degenerazione del nervo. Il numero di placche motrici per unità di area è di 23 contro le 12 presenti nel muscolo non trattato con CysA, colonna 3A.

Gli stessi dati vengono riconfermati a 8 settimane.

Nel gruppo 4 non ci sono differenze statisticamente significative tra la colonna A e la colonna B. Nel gruppo 5 il numero di placche motrici per unità di area è ridotto rispetto al gruppo 2, espressione della progressiva degenerazione delle placche. Dato interessante, anche se non statisticamente significativo, è l'inversione del trend tra la colonna A e la colonna B, a 4 settimane A è maggiore di B, a 8 settimane A è minore di B. Questo dato trova espressione nell'effetto che la CysA ha sulla degenerazione nervosa; rallentando la degenerazione delle placche motrici a 8 settimane la colonna B risulta essere maggiore della A (gruppo senza CysA).

Nel gruppo 6, a 8 settimane dalla denervazione, il numero di placche motrici per unità di area del muscolo trattato con CysA è ancora statisticamente superiore ( $<0,05$ ) al numero delle placche del muscolo non trattato con CysA (densità  $7\pm 3$ ; den ciclo  $11\pm 6$ ).

Le osservazioni fatte quindi mostrano un significativo rallentamento della degenerazione delle placche motrici in muscoli denervati trattati con CysA.

E' stato proposto un meccanismo di protezione per la neurotossicità e l'inibizione del rilascio del neurotrasmettitore mediato da immunosoppressori.

Il glutammato, rilasciato dalle terminazioni nervose dei neuroni adiacenti attiva la classe NMDA di recettori inotropici per il glutammato, e ciò determina un aumento di calcio intracellulare. Il calcio si lega alla calmodulina che attiva la calcineurina e l'ossidonitrico sintetasi. Al contrario quando è presente il complesso costituito dall'associazione di

ciclosporina A e ciclofillina, l'ossidonitrico sintetasi viene fosforilata, rimanendo inattiva.

Con l'inibizione dell'ossidonitrico sintetasi si previene il rilascio del neurotrasmettitore e si previene il fenomeno di neurotossicità (15-17).

Questo potrebbe essere il meccanismo che sta alla base del ritardo di degenerazione delle placche motrici.

## CONCLUSIONI

I risultati da noi ottenuti mostrano un rallentamento della degenerazione delle placche motrici in muscoli denervati e trattati con Ciclosporina A.

Quanto evidenziato potrebbe migliorare la ripresa funzionale dei muscoli reinnervati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Doi K, Akino T, Shigetomi M, et al. *Microsurgery* 1994; 15: 831-41.
2. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Brauns L, Gonschorek O, Buhren V. Allogenic vascularized transplantation of human femoral diaphyses and total knee joint - first clinical experiences. Elsevier; *Transplantation Proceedings* 1998; 30: 2754-61.
3. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *The Lancet* 1999; 17: 1315-20.
4. Jones TR, Humphrey PA, Brennan DC. Transplantation of vascularized allogenic skeletal muscle for scalp reconstruction in a renal transplant patient. Elsevier, *Transplantation Proceedings* 1998; 30: 2746-53.
5. Strasberg SR, Hertl MC, Mackinnon SE, et al. Peripheral nerve allograft preservation improves regeneration and decreases systemic Cyclosporin A requirements. *Experimental Neurology* 1996; 139: 306-16.
6. McArdle JJ. Complex End-Plate potentials at regenerating neuromuscular junction of the rat. *Experimental Neurology* 1975; 49: 629-37.
7. Mallonga RL, Ontell M. Reinnervation of Murine Muscle Following Fetal Sciatic Nerve Transection. *Journal of Neurology* 1991; 22: 887-96.
8. Bewick GS, Tonge DA. Characteristics of end-plates formed in mouse skeletal muscles reinnervated by their own or by foreign nerves. *The Anatomical Record* 1991; 230: 273-82.

9. Fuvhtbauer EM. Nerve transplantation shows that that motor end plate disease is not a primary schwann cell defect. *Experimental Neurology* 1987; 97: 135-42.
10. Selling LC, Libelius R, Lundquist I, Tagerud S, The-sleff S. Membrane and biochemical alteration after denervation and during reinnervation of mouse skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1980; 110: 181-6.
11. Vedung S. Formation of neuromuscular junction in transplanted peroneus longus muscles in the rat. A quantitative comparison with reinnervation of muscle in situ. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1983; 17: 7-18.
12. Wang MS. Comparative dose-dependence study of FK506 and Cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 421-34.
13. Strasberg SR. Peripheral nerve allografts preservation improves decrease systemic cyclosporine A requirements. *Exp. Neurology* 1996, 139: 306-16.
14. Zalewski AA. The loss of regenerated host axons in berve allografts after stopping immunosuppression with cyclosporine A is related to immune effects on allogenic Schwann cells. *Exp Neurol* 1995; 133: 189-97.
15. Gold BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 15: 28-306.
16. Lassner F. Time limited immunosuppression in allogenic nerve transplant in rat. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 1996; 28: 176-80.
17. Kuroki H. Nerve regeneration of vascularized rat limb allograft and functional recovery of long-term graft survivals treated by short course of FK506 or cyclosporine. Elsevier. *Transplantation Proceeding* 1995; 27: 348-59.