

IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELL'NGF NEGLI INNESTI DI MUSCOLO IN VENA: RICERCA SPERIMENTALE

A. PAGNOTTA#, P. TOS*, S. GEUNA°, M. FORNARO°, B. BATTISTON*

Istituto di Clinica Ortopedica, Università di Ancona, Ancona

* Gruppo Interdivisionale di Microchirurgia (GIM), Ospedale C.T.O., Torino

° Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Ospedale San Luigi, Università di Torino, Torino

NGF-immunoreactivity in muscle-vein-combined grafts: an experimental study.

SUMMARY. *Clinical results have shown that a vein segment filled with skeletal muscle led to good nerve repair. The vein guides regeneration and the muscle prevents collapse of the vessel and provides tropic support to the axons (basal laminae of muscle fibres). Anyway, the biological and molecular basis that could explain these good clinical results still remains to be completely clarified. Since Schwann cells are vital for the process of axonal regeneration and one of their roles consists in producing neurotrophic factors, like Nerve Growth Factor (NGF), the aim of our study was to verify the expression of NGF in the muscle-vein-combined grafts, with a particular attention to Schwann cells. The muscle-vein combined grafts were experimentally investigated in 12 rat sciatic nerves by means of immunohistochemistry, using the following antibodies: anti-S100, anti-glial fibrillary acid protein (GFAP), and anti-NGF. Five days after surgery, we observed many Schwann cells in the muscle-vein grafts reacting for GFAP and NGF, but not for S-100. These cells expressed an immature phenotype in response to loss of axonal contact, but demonstrated to survive also in the absence of this contact. Moreover, they actively produce NGF that may enhance axonal regeneration by upregulating neuronal adhesion molecules (CAMS) expression. Riv Chir Mano 2001; 38: 23-27*

KEY WORDS

NGF, muscle-vein-combined graft, nerve regeneration, Schwann cells

RIASSUNTO

La tecnica di innesti di muscolo in vena ha portato a buoni risultati clinici nella riparazione delle lesioni nervose periferiche. L'involucro esterno fornito dalla parete della vena impedisce la dispersione degli assoni rigeneranti e il muscolo garantisce una corretta progressione assonale per mezzo delle membrane basali delle fibrocellule muscolari. Tuttavia, le basi biologiche e molecolari che possono spiegare questi risultati rimangono ancora in parte da chiarire. Poiché le cellule di Schwann sono fondamentali nel processo di rigenerazione assonale anche in questo tipo di innesti ed uno dei loro ruoli è quello di produrre fattori neurotrofici, primo tra tutti il Nerve Growth Factor (NGF), scopo del nostro studio è stato quello di verificare l'espressione dell'NGF nel muscolo in vena, con particolare attenzione alle cellule di Schwann. Il muscolo in vena è stato innestato nel nervo sciatico di 12 ratti e valutato con tecnica immunoistochimica, utilizzando i seguenti anticorpi: anti-S-100, anti-proteina gliale fibrillare acida (GFAP), ed anti-NGF. Dopo 5 giorni, nel muscolo in vena si osservano numerose cellule di Schwann che appaiono negative per la proteina S-100, ma positive per il GFAP e per l'NGF. Queste cellule esprimono un fenotipo immaturo, che è la conseguenza della perdita di contatto con l'assone, ma dimostrano di sopravvivere anche in assenza di questo contatto. Sono, inoltre, attive produttrici di NGF che, stimolando la sintesi di molecole d'adesione neuronali (CAMS) da parte delle terminazioni nervose, potenzia la rigenerazione assonale.

PAROLE CHIAVE

NGF, innesti di muscolo in vena, rigenerazione nervosa, cellule di Schwann

Arrived: 24 novembre 2000

Accepted: 7 febbraio 2001

Corrispondence: Dott. Pierluigi Tos, III Divisione di Ortopedia e Traumatologia-GIM, Università di Torino, Azienda Ospedaliera CTO, Via Zuretti 29, 10126 Torino; Tel: 011 6933573 - E-mail: tospilu@hotmail.com

INTRODUZIONE

La riparazione di lesioni nervose periferiche con perdita di sostanza è eseguita di solito per mezzo di innesti nervosi autologhi, una metodica che assicura ancora oggi la migliore affidabilità (1). Come innesti si utilizzano nervi sensitivi, come il nervo surale. L'utilizzo di questa procedura ha però dei limiti: 1) il danno creato dal prelievo di un nervo sano (zona di anestesia residua e cicatrice chirurgica); 2) il capitale limitato (in termini di lunghezza degli innesti) a disposizione per la riparazione di lesioni molto estese come ad esempio quelle del plesso brachiale; 3) la direzione "obbligata" che il chirurgo fa assumere al nervo rigenerante quando effettua innesti interfascicolari dovendo "collegare" alcuni gruppi di fascicoli dei due monconi nervosi sezionati morfologicamente simili tra loro.

Per questi motivi la ricerca si sta spingendo a studiare nuove soluzioni biologiche e di sintesi (2-5). Tra queste, la tecnica del muscolo in vena ha mostrato buoni risultati clinici, anche per lunghe perdite di sostanza (6). Questa tecnica consiste nel riempire una vena con tessuto muscolare, entrambi prelevati nella sede della lesione nervosa, e a questa suturare le due estremità del nervo (7). L'involucro esterno fornito dalla parete della vena impedisce la dispersione degli assoni rigeneranti e il muscolo garantisce una corretta progressione assonale con l'ausilio delle membrane basali delle fibre muscolari che fungono come substrato d'adesione per la progressione assonale (la laminina e la fibronectina presenti nelle membrane basali delle cellule muscolari mimano l'azione delle membrane basali delle cellule di Schwann). L'utilizzazione congiunta di muscolo e vena nell'innesto da migliori risultati rispetto alla loro utilizzazione indipendente; infatti, una vena vuota tende a collabire se è più lunga di 1-2 cm (8) mentre nel caso di innesti di muscolo isolato gli assoni tendono a disperdersi (5).

Inoltre è stato dimostrato come all'interno degli innesti di muscolo in vena le fibre nervose rigeneranti possano orientarsi spontaneamente all'interno del tubulo stesso ricercando la propria destinazione finale richiamate da segnali chimici o di altro gene-

re provenienti dal segmento nervoso distale (chemiotropismo) (9).

Le basi biologiche e molecolari alla base dei buoni risultati clinici del muscolo in vena nella riparazione delle lesioni nervose periferiche, rimangono tuttavia ancora in parte da chiarire.

La degenerazione e la rigenerazione nervosa coinvolgono numerosi elementi cellulari che interagiscono tra loro e con la matrice extracellulare (10). I macrofagi sono richiamati nel sito della lesione nel corso di tutta la prima settimana (11), contribuendo alla lisi e alla fagocitosi della mielina e alla proliferazione delle cellule di Schwann (12). Entrambi i tipi cellulari producono mitogeni e fattori di crescita che hanno un ruolo centrale nella rigenerazione e nella remielinazione (13, 14).

Poiché le cellule di Schwann sono fondamentali nel processo di rigenerazione assonale (15) ed uno dei loro ruoli è quello di produrre fattori neurotrofici, primo tra tutti il Nerve Growth Factor (NGF), scopo principale del nostro studio è stato quello di studiare l'espressione dell'NGF nel muscolo in vena, con particolare attenzione alle cellule di Schwann.

MATERIALI E METODI

Modello sperimentale

Sono stati utilizzati 12 ratti di tipo Wistar (Charles River, Italia), dal peso di 250-300 gr ciascuno. Lo studio sperimentale ha avuto il consenso del Comitato Etico e dell'Istituto di protezione Animale. I ratti sono stati anestetizzati con Ketamina intramuscolo ad una dose di 90 mg/kg. Attraverso un accesso posteriore transgluteo a destra abbiamo tagliato il nervo sciatico per una lunghezza di 0,5 cm. Il nervo è stato poi riparato con un innesto di muscolo in vena della lunghezza di 1,5 cm. per evitare la sutura in tensione. L'innesto è stato allestito con la vena femorale controlaterale riempita di muscolo scheletrico fresco orientato longitudinalmente (bicipite femorale - accesso anteriore). Le due estremità degli innesti sono state suture con 3 o 4 punti di filo nylon 9-0 secondo la tecnica

usuale. Il tempo chirurgico è stato eseguito con l'ausilio di un microscopio operatorio (Zeiss OP-MI 7, Jena, Germania). Sei ratti sono stati sacrificati 5 giorni dopo l'intervento e sei di controllo immediatamente dopo l'intervento (tempo 0). In tutti i casi il nervo sciatico è stato esposto ed esciso.

Istologia ed immunoistochimica

I nervi sono stati inclusi in paraffina e tagliati longitudinalmente al loro asse. Alcune delle sezioni così ottenute (5-8 mm) sono state colorate con ematossilina-eosina per l'analisi istologica standard.

Per l'immunoistochimica è stata utilizzata la procedura dell'avidina-biotina perossidasi (Vectastain Elite kit, Vector, CA, U.S.A.). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-S100 monoclonale (Dako, Italia) (1:30), anti-GFAP policlonale (Dako, Italia) (1:200) ed anti-NGF monoclonale (Chemicon, Italia) (1:500).

Come controllo, sono state utilizzate immunoglobuline di ratto e di topo alle stesse diluizioni degli anticorpi. L'incubazione con la DAB (Sigma-Italy) allo 0.05% per 5 minuti a temperatura ambiente ha evidenziato l'attività della perossidasi.

I vetrini sono stati lavati, deidratati e montati con Eukitt (O. Kindler GmbH & Co., Germany). L'osservazione e la fotografia dei preparati è stata fatta con il microscopio (Zeiss Axiophot, Germany).

RISULTATI

Negli innesti di controllo (tempo 0), il tessuto nervoso in sezione longitudinale evidenzia lunghi nastri ad andamento parallelo (le fibre nervose). Sono visibili tra le fibre, nuclei di Schwann e di cellule del perinevrio. Tra i fasci si osserva anche qualche piccolo vaso arterioso e venoso.

Il muscolo in alcuni punti del preparato è in sezione longitudinale e questo rende visibile la striatura trasversale con l'alternanza di bande. I nuclei delle cellule muscolari sono in posizione periferica, sottosarcolemmale.

Negli innesti a 5 giorni, il muscolo ha perso la sua cellularità ed è circondato da numerose cellule

che occupano l'interstizio. L'immunoistochimica ha permesso una migliore definizione delle proprietà tissutali. La proteina S-100 ha marcato il moncone prossimale e distale del nervo, localizzandosi in particolare nelle cellule di Schwann (Fig. 1). Il muscolo in vena non ha mostrato marcatura specifica per la proteina S-100 (la reazione non è stata osservata né nel tessuto muscolare, né nella vena e neppure nelle numerose cellule sparse tra le fibre muscolari) (Fig. 2). Le numerose cellule attorno al muscolo hanno mostrato un'immunolocalizzazione citoplasmatica per il GFAP, e sono quindi state identificate come cellule di Schwann (GFAP+, S100-) (Fig. 3). L'an-

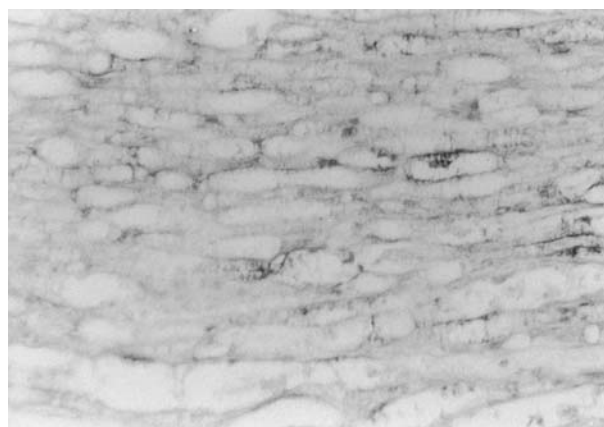


Figura 1. Immunoreattività per l'S-100 nel moncone nervoso distale. La reazione si localizza nelle cellule di Schwann. (200X) (Controcolorata con E-E).

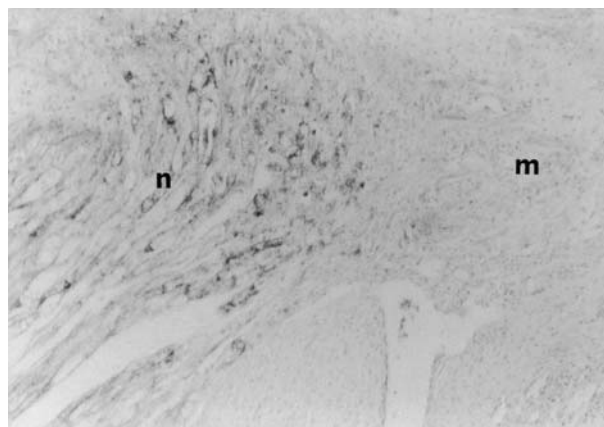


Figura 2. Nella zona di passaggio tra il nervo ed il muscolo in vena si osserva la marcatura per la proteina S-100 nel tessuto nervoso (n), ma non nel muscolo (m), non nella vena e non nelle cellule di Schwann sparse tra le fibre muscolari. (100X) (Controcolorata con E-E).

ti-NGF ha marcato il nervo (Fig. 4), ma anche le cellule di Schwann sparse tra le fibre muscolari ed alcune aree del muscolo stesso (Fig. 5). Nei controlli

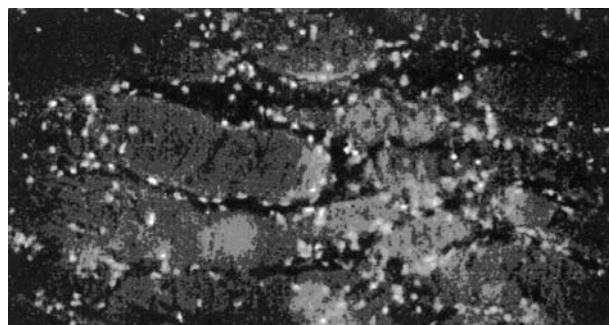


Figura 3. Le cellule di Schwann localizzate tra le fibre muscolari sono positive al GFAP. (200X)

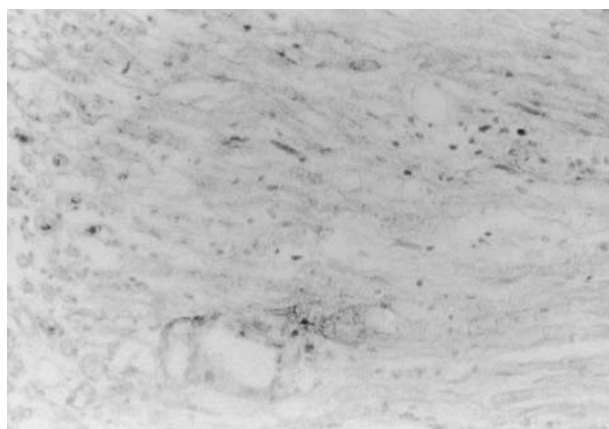


Figura 4. Il tessuto nervoso mostra una marcatura specifica per l'NGF. (200X) (Controcolorata con E-E).

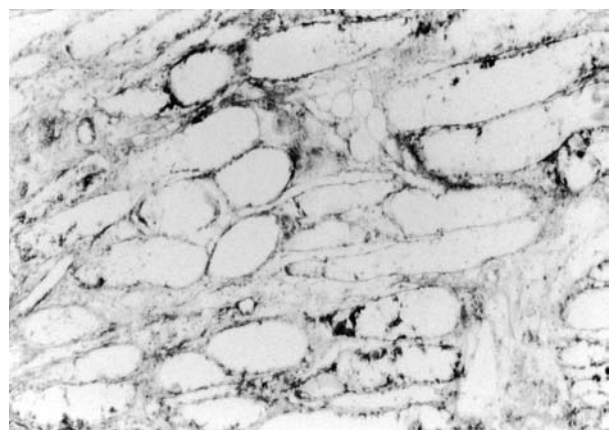


Figura 5. Tra le fibre muscolari si osservano numerose cellule marcate con l'anti-NGF ed anche alcune aree del muscolo mostrano una marcatura specifica. (100X) (Controcolorata con E-E).

la marcatura per l'NGF è stata osservata solo nel tessuto nervoso: il complesso muscolo-vena non ha mostrato marcatura specifica.

DISCUSSIONE

Dopo 5 giorni dall'intervento chirurgico, nel muscolo innestato si osservano numerose cellule di Schwann che appaiono negative per la proteina S-100, ma positive per la proteina gliale fibrillare acida (GFAP) e per l'NGF. La proteina S-100 è un marker delle cellule di Schwann mature ed è normalmente assente nei loro precursori (16). Anche il GFAP, insieme alla p75 (recettore per le neurotrofine) e alla molecola di adesione neurale (NCAM) sono espressi nelle cellule di Schwann immature e nelle mature non-mielinizzanti (17).

Quando una cellula di Schwann matura perde il contatto con l'assone, per esempio per una lesione nervosa, immediatamente cambia nella sua morfologia e nella sua espressione genica, tornando verso un fenotipo immaturo. Questo processo si accompagna ad una proliferazione delle Schwann e ad una fagocitosi della mielina da parte dei macrofagi (16). Il risultato è che cresce una popolazione cellulare che, anche se non identica, è molto simile alle cellule di Schwann immature neonatali (18). Queste cellule producono molte neurotrofine e molte molecole di adesione che formano un microambiente che stimola la ricrescita assonale (16).

Secondo la teoria neurotrofica, le neurotrofine sono sintetizzate nei tessuti bersaglio, prese dai terminali nervosi e trasportate per via retrograda nei loro assoni fino al soma, dove esplicano il loro effetto in termini di trofismo e sopravvivenza. (19). Nell'embriogenesi le neurotrofine sono i fattori che selezionano le popolazioni neuronali che sopravviveranno (20). L'NGF è stata la prima neurotrofina scoperta e rappresenta il prototipo della teoria neurotrofica, che è specifica per i neuroni sensitivi e simpatici (21). La sua importanza non è però limitata al periodo embrionale, infatti il recettore per l'NGF (trkA) continua ad esser espresso nell'adulto (22) e le neurotrofine continuano ad esser sintetizzate da numerosi tipi cellulari (23). Nella rigenera-

zione che segue una lesione nervosa l'NGF è espresso anche dalle cellule di Schwann e si crede che stimoli l'espressione delle molecole di adesione neuronali (CAMS), che promuovono in contatto assone-Schwann e quindi dirigono la rigenerazione (24).

I nostri risultati ci consentono di affermare che le cellule di Schwann osservate tra le fibre muscolari del muscolo in vena esprimono un fenotipo immaturo, che è la conseguenza della perdita di contatto con l'assone. Queste cellule dimostrano però di sopravvivere anche in assenza di contatto con l'assone. Inoltre, sono attive produttrici di NGF che stimolando la sintesi di CAMS da parte delle terminazioni nervose, potenzia la rigenerazione assonale.

BIBLIOGRAFIA

1. Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical and basic science review: past, present and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 1997; 13: 215-25.
2. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen NP, Hansson HA, Larsson K. Reorganisation and orientation of regenerating nerve fibers, perineurium and epineurium in preformed mesothelial tubes: an experimental study on the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Res* 1981; 6: 265-81.
3. Jimming K, Shizhen Z, Shengxin Z. Experimental study on bridging the peripheral nerve gap with skeletal muscle. *Microsurgery* 1986; 7: 183-9.
4. Brunelli G, Fontana G, Jaeger C, Bartolaminelli P, Franchini A. Chemiotactic arrangement of axons inside and distal to a venous graft. *J Reconstr Microsurg* 1987; 10: 137-44.
5. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg* 1990; 85: 419-24.
6. Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. Clinical results. *Microsurgery* 2000; 20: 32-6.
7. Brunelli G, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery* 1993; 14: 247-51.
8. Chiu DTW, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Microsurg* 1990; 86: 928-34.
9. Tos P, Battiston B, Geuna S, et al. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery* 2000; 20: 65-71.
10. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999; 194: 1-14.
11. Perry VH, Brown MC, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J Experimental Medicine* 1987; 165: 1218-23.
12. Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J of Neurocytology* 1984; 13: 767-96.
13. De Vries GH. Schwann cell proliferation. In Dyck PJ ed. "Peripheral neuropathy". Saunders WB, Philadelphia, 1993: 290-8.
14. Reynolds ML, Woolfe CJ. Reciprocal Schwann cell-axon interaction. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 683-93.
15. Hall SM. Regeneration on cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropath Appl Neuro* 1986; 12: 27-46.
16. Jessen K, Mirsky R. Schwann cells and their precursors emerge as a major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 1999; 22: 402-10.
17. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R. Three markers of adult non-mieline-forming schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-schwann cell interactions. *Development* 1990; 109: 91-103.
18. Jessen K, Mirsky R. Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol* 1992; 2: 575-81.
19. Campenot RB. NGF and the local control of nerve terminal growth. *J of Neurobiology* 1994; 25: 599-611.
20. Davies AM. The neurotrophic hypothesis: where does it stand? *Biological Sciences* 1996; 351: 389-94.
21. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirtyfive years later. *EMBO Journal* 1987; 6: 1145-54.
22. McMahon SB, Armanini MP, Ling LH, Phillips HS. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulation of adult primary sensory neurons projecting identified peripheral targets. *Neuron* 1994; 12: 1161-71.
23. Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Filos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351 (1338): 365-73.
24. Friedlander DR, Grumet M, Edelman GM. Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effect of chronic sciatic nerve section. *Brain Res* 1985; 332: 131-41.