Danno da ischemia e riperfusione del muscolo scheletrico. L'uso combinato di WEB2170 e la terapia di HBO nella modulazione del danno su un modello di coniglio

M. RICCIO, P.P. PANGRAZI, A. CAMPODONICO, D. TALEVI, A. MARCHESINI, A. BERTANI
Unità Funzionale di Chirurgia della Mano e Microchirurgia, Clinica di Clinica Chirurgia Plastica e Ricostruttiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona

Ischaemia and reperfusion injury of the skeletal muscle. The combined use of WEB2170 and HBO therapy in the modulation of the damage on a rabbit model.

Summary

Purpose: *The ischemia and reperfusion injury (I-R) is regarded as the main cause of failure in the revascularization of limbs and the transfer of free flaps, with the so called non-reflow phenomenon. This type of damage is caused by the production of free radicals, above all of the neutrophiles, that release great quantities of extra cellular superoxide through the action of a membrane enzyme. The objective of this study is to individualize a valid method of protection of a striated muscle from the damage caused by I-R.* **Methods:** *In our study, 40 white rabbits were used, since their rectus femoris muscle represents a valuable model for the study of ischemia-induced reperfusion injury as this muscle is perfused by a single artery and vein. We have tested the effectiveness of the Web 2170, a PAF antagonist, of the hyperbaric oxygen therapy (HBO), and of combined employment of the Web 2170 + HBO.* **Results:** *The results show that the PAF and the HBO play an important protective role against the damage of I-R, and that combined use of these therapeutic methods has a synergic effect.* **Conclusions:** *We therefore propose a new therapeutic protocol for the prevention of I-R damage through the simultaneous employment of the PAF and the HBO.*

Riv Chir Mano 2004; 2: 106-112

Key words
Ischaemia, reperfusion, HBO, WEB 2170

Riassunto

Scopo: *Il danno da Ischemia-Riperfusione (I-R) è considerato la causa principale del fallimento della rivascolarizzazione degli arti e del trasferimento di lembi liberi. Questo tipo di danno è causato dalla produzione di radicali liberi da parte, soprattutto, dei neutrofili, che liberano grandi quantità di superossido extracellulare attraverso l'azione di un enzima di membrana. L'obiettivo di questo studio è di individuare un metodo efficace di protezione del muscolo striato dal danno di I-R.* **Materiali e metodi:** *Nel nostro studio abbiamo utilizzato 40 conigli bianchi, il*

Arrived: 10 January 2005
Accepted: 10 April 2005
Corrispondence: Dr. Michele Riccio, Clinica di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti, via Conca 71, Torrette di Ancona, Ancona - Tel. 071.596.3945-3462 - fax. 071.5963481
E-mail: chirurgiamano.ancona@ao-umbertoprimo.marche.it

cui muscolo retto femorale rappresenta un modello prezioso per lo studio del danno da I-R, in quanto vascolarizzato da una sola arteria e da una sola vena. Abbiamo testato l'efficacia di Web 2170, un PAF, e quella dell'ossigenoterapia iperbarica (HBO), e quella combinata del Web 2170 + HBO. **Risultati:** *I risultati mostrano che sia il PAF che l'HBO esercitano un importante ruolo protettivo nei confronti del danno da I-R, e che l'utilizzo combinato di entrambe le metodiche terapeutiche ha un effetto sinergico.* **Conclusioni:** *Proponiamo quindi un nuovo protocollo terapeutico per la prevenzione del danno da I-R che prevede l'impiego simultaneo del PAF e dell'HBO.*

Parole chiave
Ischemia, riperfusione, HBO, WEB 2170

Introduzione

Il danno da ischemia e riperfusione (I-R) è considerato la causa principale del fallimento della rivascolarizzazione degli arti e del trasferimento di lembi liberi, per il cosiddetto fenomeno di "non reflow".

Molti studi biochimici hanno dimostrato che il momento fisiopatologico responsabile del danno si ha nel momento in cui, dopo la riperfusione tissutale, vengono prodotti i radicali liberi (1-3).

I radicali liberi più implicati nel danno da ischemia-riperfusione derivano da due importanti fonti: la xantino-ossidasi ed i neutrofili.

La prima è localizzata preferenzialmente a livello delle cellule endoteliali microvascolari, mentre i neutrofili sono capaci di liberare grandi quantità di superossido extracellulare attraverso un enzima della membrana cellulare, il NADPH ossidasi.

Molti esperimenti hanno dimostrato che la produzione di radicali liberi da parte dei neutrofili attivati può essere più importante di quella prodotta dalla xantino-ossidasi, soprattutto per quello che riguarda il muscolo scheletrico (4, 5).

Gli esperimenti hanno mostrato che in seguito ad un periodo di ischemia globale, a livello muscolare si registra un aumento significativo del numero di neutrofili addossati all'endotelio delle venule post capillari, non evidenziabile nelle preparazioni non ischemiche di controllo.

La conseguente liberazione di radicali liberi è l'evento che conduce al danno endoteliale e al fallimento della microcircolazione, associati al danno da I-R.

Fra le sostanze che sperimentalmente promuovono l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali, gioca un ruolo fondamentale il Fattore attivante le Piastrine (PAF) (6).

Questi eventi scatenano un circolo vizioso che provoca l'ulteriore adesione di neutrofili ed il conseguente danno vascolare.

Il nostro intento era quello di interrompere questo circolo vizioso proprio al momento iniziale in cui si instaura il meccanismo patogenetico che causa il danno da I-R, quando cioè i neutrofili aderiscono alle cellule endoteliali.

Gli strumenti terapeutici che hanno mostrato un efficace ruolo protettivo del muscolo nei confronti dal danno da ischemia sono stati individuati nel Web 2170, un PAF-antagonista, e nell'ossigeno iperbarico (2, 7).

La mieloperossidasi, un enzima presente nel compartimento secretivo dei neutrofili e dei monociti, catalizza l'ossidazione dell'ione chroride prodotto dal perossido di idrogeno.

I ricercatori generalmente sono d'accordo sul ruolo giocato dall'infiltrazione di granulociti nella patogenesi del danno da I-R nel muscolo scheletrico; perciò l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperossido dovrebbero essere utilizzati come rivelatori del grado dell'infiltrazione.

Materiali e metodi

Nel nostro studio sperimentale abbiamo utilizzato 40 conigli bianchi della Nuova Zelanda di peso compreso tra 2 e 3 kg.

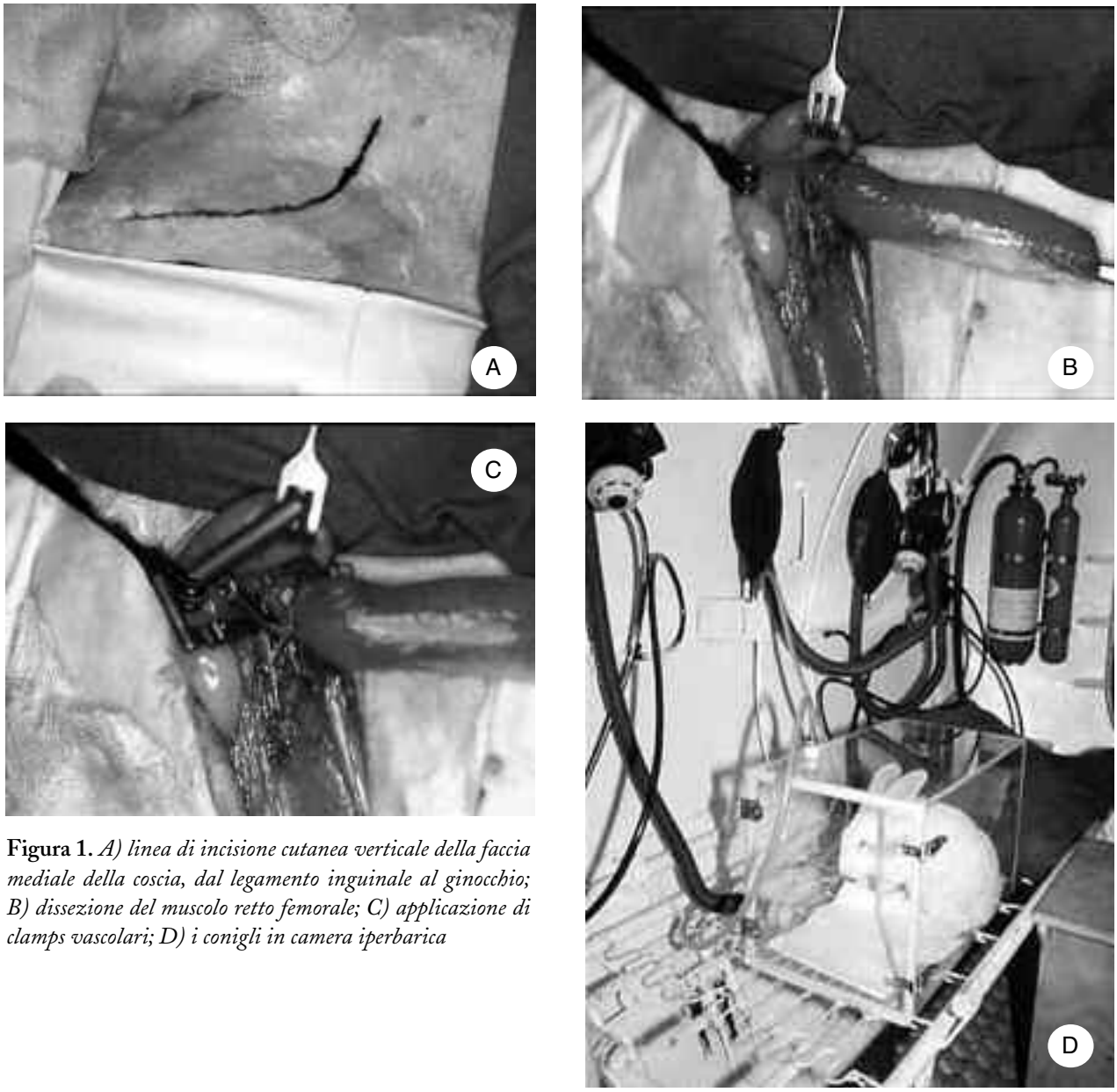

Figura 1. *A) linea di incisione cutanea verticale della faccia mediale della coscia, dal legamento inguinale al ginocchio; B) dissezione del muscolo retto femorale; C) applicazione di clamps vascolari; D) i conigli in camera iperbarica*

Il muscolo retto femorale di coniglio rappresenta un modello prezioso per lo studio del danno da ischemia-riperfusione indotto su un muscolo scheletrico in quanto vascolarizzato da una sola arteria e drenato da una sola vena (8).

Questo studio si pone l'obiettivo di individuare un metodo valido di protezione del muscolo dal danno di ischemia-riperfusione. In particolare gli Autori hanno considerato la capacità protettiva dal danno tissutale dell'associazione del Web 2170, un antagonista di PAF, e dell'Ossigeno Terapia Iperbarica (HBO), in grado di interferire con l'adesione endoteliale dei neutrofili.

La preparazione chirurgica del muscolo retto femorale consiste nelle seguenti fasi: anestesia dei conigli con iniezione di cloropromazine intramuscolare, e di ketamine sottocutaneo come sedativo; incisione cutanea verticale della faccia mediale della coscia, dal legamento inguinale al ginocchio (Fig. 1A); esposizione dei vasti, sezione dell'aponeurosi

nel punto di connessione del vasto medio con quello laterale, esposizione della superficie anteriore del retto femorale; liberazione del retto da ogni connessione dell'aponeurosi con le strutture muscolari circostanti; cauterizzazione tramite bipolare di tutti i vasi collaterali, inclusi i piccoli vasi satelliti del ramo motore del nervo femorale; sezione del nervo motore del muscolo per riprodurre sperimentalmente la situazione neurovascolare di un arto amputato o di un lembo muscolare trasferito microchirurgicamente; identificazione del peduncolo vascolare del muscolo e sezione con ingrandimento ottico, in modo da esporre l'origine dei vasi femorali comuni; sezione del muscolo il più vicino possibile alla sua inserzione distale tendinea (Fig. 1B); produzione di ischemia calda per un periodo di tre ore e mezzo attraverso l'utilizzo di clamps vascolari (Fig. 1C); cauterizzazione dell'arteria femorale all'origine del peduncolo e inizio dell'infusione di soluzione salina o farmacologica alla velocità di 0,06 l/min, con una pompa peristaltica, 10 minuti prima della fine dell'ischemia e per 40 minuti dall'inizio della riperfusione dopo declampaggio; allacciamento del segmento distale dell'arteria femorale, chiusura della ferita e risveglio del coniglio dall'anestesia.

Il muscolo retto femorale viene sezionato in modo tale da isolarlo completamente dai tessuti circostanti ed interrompere ogni tipo di connessione vascolare.

Alla fine della dissezione il muscolo retto femorale risulta peduncolato solo sul suo asse vascolare principale, così che l'infusione e l'ischemia-riperfusione sono ottenuti rispettivamente attraverso un catetere arterioso e clampando il peduncolo. (8)

Gli animali in esame sono stati divisi in quattro gruppi di 10 conigli ciascuno, chiamati A, B, C e D (Tab. 1).

Nel gruppo di controllo A, nel retto femorale di ogni coniglio è stata iniettata una soluzione salina per dieci minuti prima del trattamento e per 40 minuti dopo aver declampato l'arteria femorale (per un totale di 50 minuti).

Nel gruppo B la soluzione salina è stata somministrata come nel gruppo A, ma alla fine dell'iniezione è stato somministrato HBO a 2.5 ATA (Tensione Assoluta Atmosferica) (Fig. 1D) per 80 minuti in due fasi, la prima dopo 2 ore e la seconda 16 ore dopo l'inizio della riperfusione del muscolo femorale.

Negli animali appartenenti al gruppo C abbiamo iniettato una soluzione di 60 mg/ml di Web 2170 diluita in soluzione salina per lo stesso periodo di tempo.

Nel gruppo D abbiamo iniettato Web 2170 come nel gruppo C ed alla fine dell'iniezione abbiamo aggiunto HBO a 2.5 ATA come nel gruppo B.

Ventiquattro ore dopo la riperfusione, i conigli, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, vengono sacrificati e si procede all'espianto del muscolo retto femorale, che viene esposto e sezionato in tre segmenti a 3-5 mm di intervallo, perpendicolarmente al suo asse maggiore, in senso disto-prossimale (distale, intermedio e prossimale), ed ogni

Tabella 1 - Schema riassuntivo della sperimentazione

	A	B	C	D
Conigli	10	10	10	10
Ischemia	3,5 h	3,5 h	3,5 h	3,5 h
Infusione/HBO	Soluzione salina	SS/HBO	Web 2170	Web 2170/HBO
Infusione	50 min (10 min prima + 40 min dopo declampaggio)	50 min (10 min prima + 40 min dopo declampaggio)	50 min (10 min prima + 40 min dopo declampaggio)	50 min (10 min prima + 40 min dopo declampaggio)
HBO 2h + 16h dopo riperfusione		2.5 ATA 80 min x 2		2.5 ATA 80 min x 2

intervallo è stato esaminato biochimicamente, subito dopo averlo preparato con immersione in ghiaccio

Campioni di muscolo sono stati omogeneizzati in 20 mM di potassio fosfato buffer (pH 7.4) contenenti 0.1 mM di EDTA, attraverso un omogenizzatore di tessuto Polytron.

L'attività della mieloperossidasi (MPO) è stata determinata attraverso una variazione del metodo di Krawisz et al (9).

Il contenuto di idroperossido è stato misurato attraverso il test dell'Ione Ferroso Ossidazione-Xylenol Orange (FOX) secondo il metodo di Jiang et al (10).

Risultati

La tabella 2 riporta l'attività della mieloperossiadasi ed il contenuto dell'idroperossido nei segmenti distale, intermedio e prossimale del muscolo, trattati con soluzione salina.

L'attività della mieloperossidasi non ha mostrato differenze significative tra i tre segmenti.

Il contenuto di idroperossido è risultato più elevato nei campioni rispetto a quelli trattati rispettivamente con HBO, Web 2170, e HBO + Web 2170, ma il segmento distale ha un contenuto di idroperossido significativamente più alto di quello dei segmenti intermedio e prossimale.

La tabella 3 mostra l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperosidasi nei segmenti distale, intermedio e prossimale di muscolo trattati con HBO.

Sia l'attività della mieloperossidasi che il contenuto di idroperossido sono significativamente diversi nel segmento intermedio rispetto a quelli distale e prossimale.

La tabella 4 mostra l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperosidasi nei segmenti distale, intermedio e prossimale di muscolo trattati con Web 2170.

Anche n questo caso l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperossido sono significativamente diversi nel segmento intermedoi rispetto a quelli distale e prossimale.

La tabella 5 mostra l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperosidasi nei segmenti distale, intermedio e prossimale di muscolo trattati con Web 2170 e HBO.

In questo caso i risultati mostrano un'attività più bassa rispetto a quella mostrata nella figura 2 o 3, che suggerisce un effetto additivo dovuto al trattamento combinato.

Tabella 2. *A: gruppo di controllo (soluzione salina)*

Segmento muscolare	Attività della mieloperossidasi (μg/mg prot)	Contenuto di idroperossidasi (nmol/mg prot)
Segmento distale (a)	0.915 ± 0.066	19.08 ± 1.72 *, **
Segmento intermedio (b)	0.878 ± 0.087	14.43 ± 1.20 *
Segmento prossimale (c)	0.947 ± 0.099	14.37 ± 3.70 **

* b vs a $p < 0.001$; ** c vs a $p < 0.001$

Tabella 3. *B: terapia HBO*

Segmento muscolare	Attività della mieloperossidasi (μg/mg prot)	Contenuto di idroperossidasi (nmol/mg prot)
Segmento distale (a)	0.732 ± 0.066 *	14.44 ± 1.25 *
Segmento intermedio (b)	0.412 ± 0.097 *, **	9.22 ± 0.77 *, **
Segmento prossimale (c)	0.639 ± 0.084 **	13.61 ± 1.35 **

* b vs a $p < 0.001$; ** c vs b $p < 0.001$

Tabella 4. *C: infusione di Web 2170*

Segmento muscolare	Attività della mieloperossidasi (μg/mg prot)	Contenuto di idroperossidasi (nmol/mg prot)
Segmento distale (a)	0.434 ± 0.056 *	10.26 ± 0.26 *
Segmento intermedio (b)	0.256 ± 0.024 *, **	6.82 ± 0.78 *,**
Segmento prossimale (c)	0.616 ± 0.042 *, **	7.88 ± 1.04 *,**

* c vs a, b $p < 0.001$; ** b vs c $p < 0.001$

Tabella 5. *D: infusione di Web 2170 + terapia HBO*

Segmento muscolare	Attività della mieloperossidasi (μg/mg prot)	Contenuto di idroperossidasi (nmol/mg prot)
Segmento distale (a)	0.368 ± 0.060 *	9.78 ± 0.24 *
Segmento intermedio (b)	0.230 ± 0.031 *, **	6.05 ± 0.62 *,**
Segmento prossimale (c)	0.582 ± 0.053 *, **	6.26 ± 0.74 *,**

* c vs a, b $p < 0.001$; ** b vs c $p < 0.001$

Nelle figure 2 e 3 si mettono a confronto l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperossido rispettivamente nei segmenti distale, intermedio e prossimale.

Si deve sottolineare che l'attività della mieloperossidasi ed il contenuto di idroperossido diminuiscono progressivamente dal trattamento con soluzione salina, con HBO, con Web 2170 e con HBO + il Web 2170.

Inoltre il segmento intermedio mostra sempre un'attività della mieloperossidasi ed un contenuto di idroperossido più bassi rispetto ai segmenti distale e prossimale (8).

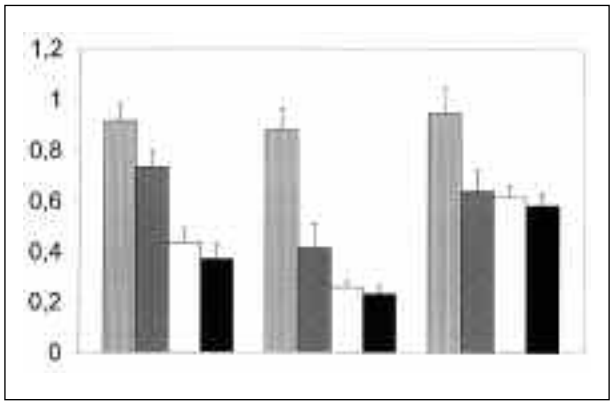

Figura 2. *Attività della mieloperossidasi. I tre gruppi di colonne rappresentano da sinistra a destra il segmento distale, intermedio e prossimale, rispettivamente. L'area tratteggiata indica il trattamento con soluzione salina; l'area disegnata indica il trattamento con HBO; l'area piena indica il trattamento con web 2170el'area nera indica il trattamento combinato con HBO + Web 2170*

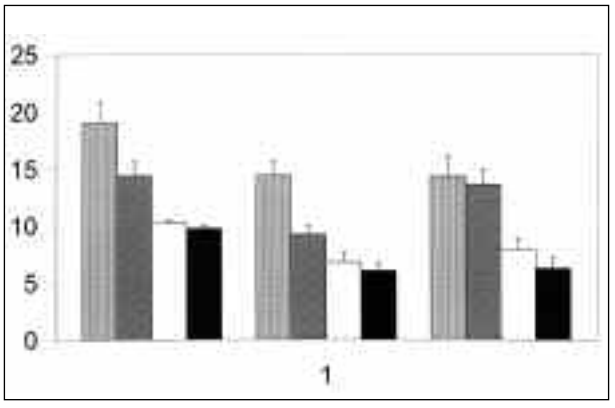

Figura 3. *Contenuto di idroperossido. I tre gruppi di colonne rappresentano da sinistra a destra il segmento distale, intermedio e prossimale, rispettivamente. L'area tratteggiata indica il trattamento con soluzione salina; l'area disegnata indica il trattamento con HBO; l'area piena indica il trattamento con web 2170el'area nera indica il trattamento combinato con HBO + Web 2170.*

Discussione

I dati ottenuti da campioni di muscolo trattati con ossigeno terapia iperbarica (HBO) e Web 2170 mostrano una diminuzione dell'infiltrazione di neutrofili a livello del tessuto ischemico, a conferma della loro reale efficacia nel trattamento del danno da ischemia-riperfusione.

Il contenuto di idroperossido, indice del grado di perossidazione tissutale è ridotto positivamente sia dal trattamento con HBO che dalla somministrazione di Web 2170.

Gli Autori sottolineano l'evidenza dell'effetto sinergico dell'associazione di HBO e Web 2170 nella diminuzione dell'infiltrazione di neutrofili nel tessuto ischemico, e nella conseguente riduzione del danno muscolare durante la riperfusione post ischemica (3 ore e 30 minuti) nel muscolo retto femorale di coniglio.

Questi risultati sperimentali evidenziano l'importanza raggiunta, a livello clinico, dall'ossigeno terapia iperbarica, che rappresenta uno strumento terapeutico ormai consolidato, efficace, di cui sono ben note le capacità nell'avviare il processo di guarigione di tessuti distrofici, per traumi o malattie metaboliche. Con questo studio si sottolinea l'efficacia della HBO proponendone una nuova indicazione terapeutica nel l'utilizzo della stessa, sia per il salvataggio di lembi muscolari, che per la prevenzione della sindrome da ischemia-riperfusione a carico delle grandi masse muscolari.

Il Web 2170, PAF antagonista, in questo studio conferma la sua efficace attività anti-aggregante, già evidenziata nello studio in pazienti cardiopatici, nella prevenzione del danno da ischemia-riperfusione.

Il nostro studio, inoltre, evidenziando l'effetto sinergico di HBO e Web 2170, suggerisce la creazione di un protocollo terapeutico che proponga l'utilizzo combinato delle due metodiche sopra descritte.

Bibliografia

1. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischaemia reperfusion injury: a review. Microsurgery 1993; 14: 165-75.
2. Zamboni WA, Kindwall EP, ed. The microcirculation and ischaemia-reperfusion: basic mechanism of HBO. Hyperbaric Medicine Practice, 1995.
3. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ. Free radical defense mechanism and neutrophil infiltration in post-ischaemic skeletal muscle. Am J Physiol 1989; 256: H789-H793.
4. Inauen W, Suzuki M, Granger DN. Mechanism of cellular injury. Potential source of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. Microcirculation, Endothelium and Limphatics 1989; 5: 143-55.
5. Zamboni WA, Roth AC, Russel RC, et al. Morphological analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg 1993; 91: 1110-23.
6. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J Clin Invest 1988; 82: 2045-55.
7. Inoculano M, Squadrito F, Altavilla D, et al. Protective effects of L-659,989 a platelet-activating factor receptor antagonist, in myocardial ischaemia and reperfusion in rats. J Cardio Pharmacol 1994; 23: 7-12.
8. Hickey MJ, Hurley JV, Angel MF, O'Brien B. McC. The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischaemia and reperfusion. J Surg Res 1992; 53: 369-77.
9. Bozeman PM, Lewn DB, Thomas EL. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. J Immunol Meth 1990; 126: 125-33.
10. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal Biochem 1992; 202: 384-9.