

Stress Ossidativo e Rigenerazione Assonale



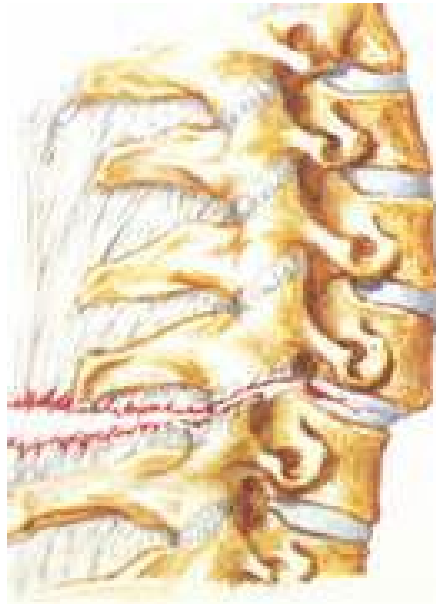
Beninati Simone

Laboratorio di Citologia, istologia ed Oncologia Sperimentale

Dipartimento di Biologia

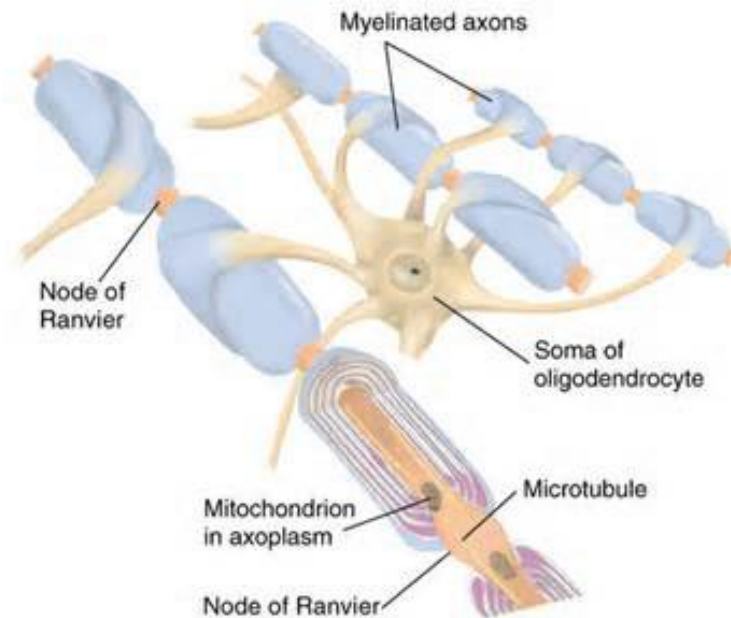
Università di Roma Tor Vergata

I traumi al midollo spinale hanno l'attenzione della ricerca medica da anni, ma finora i trattamenti sviluppati hanno avuto scarso successo.

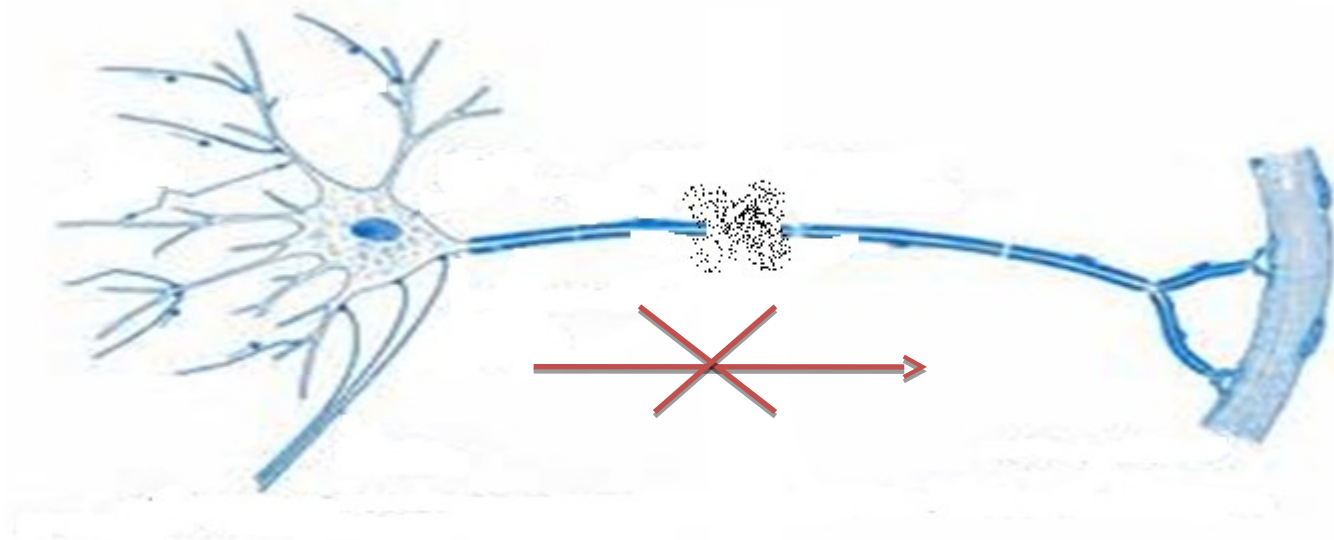


Al momento della lesione del midollo spinale si scatena una serie di eventi che diffonde nel sito di lesione e coinvolge differenti tipi di cellule.

Gli assoni sono danneggiati, gli oligodendrociti, le cellule nervose del SNC che formano lo strato mielinico intorno agli assoni, cominciano anch'essi a morire.



L'assone così esposto all'esterno degenera, la connessione tra i neuroni è quindi interrotta e il flusso d'informazioni tra il cervello e il midollo spinale risulta bloccato.



Rigenerazione assonale

La rigenerazione assonale nel midollo spinale adulto è estremamente limitata a causa di numerosi fattori che sono sia intrinseci che estrinseci al neurone.

In primo luogo, la formazione (gliosi) di una cicatrice gliale da astrocitosi reattiva, che pulisce i detriti e stabilizza la zona lesa, ostacolando la ricrescita assonale.

Cicatrice gliale

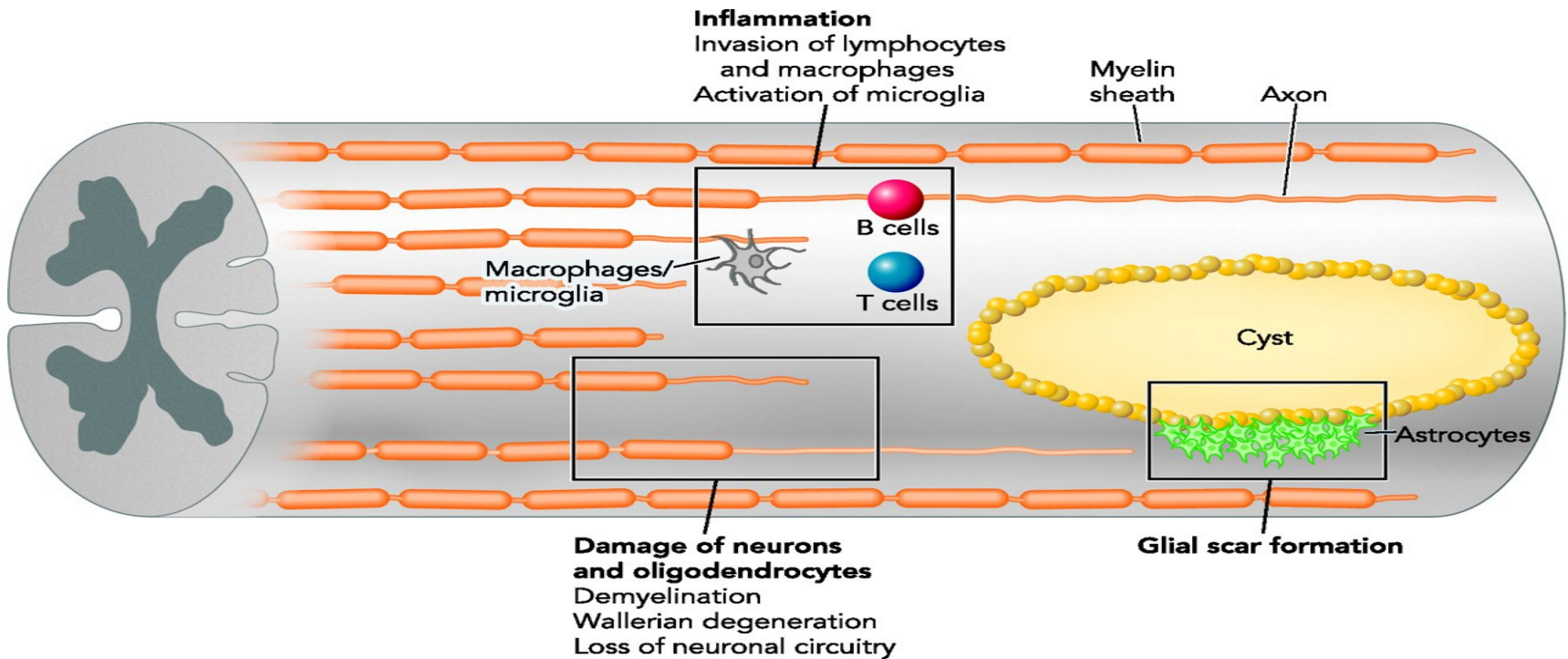
In secondo luogo, presso il sito della lesione sono presenti varie molecole inibitrici che possono essere suddivise in due gruppi:

1. inibitori associati alla mielina

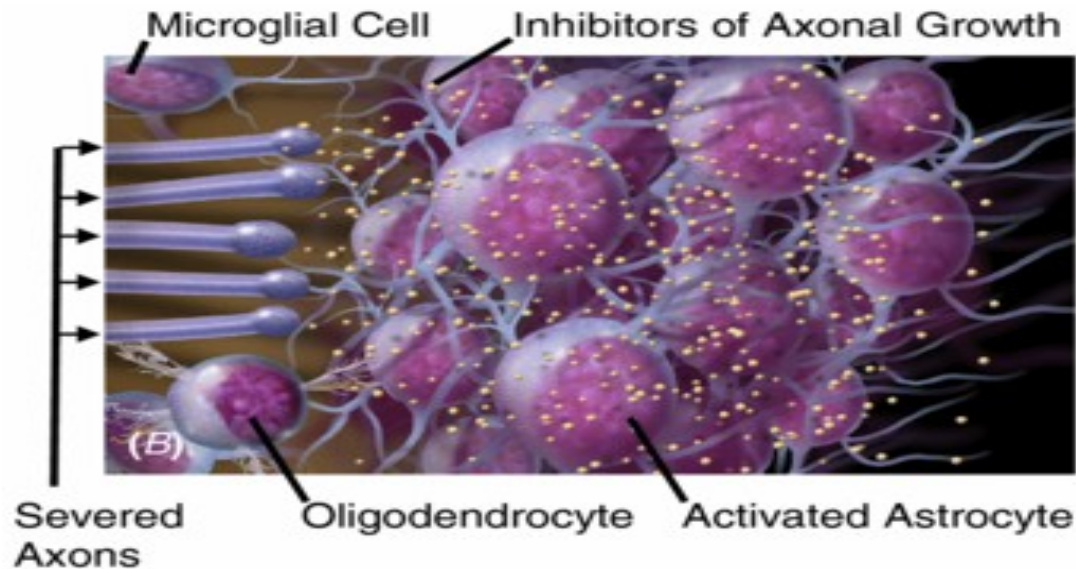
2. molecole sintetizzate dai componenti cellulari della cicatrice gliale, che sono presenti sia sulla cellula che nella matrice extracellulare.

Le molecole inibitrici associati alla mielina sono gli inibitori primari della ricrescita assonale nella fase acuta della lesione del midollo spinale.

L'area necrotica del midollo spinale viene gradualmente riassorbita e sostituita da tessuto cicatriziale, cisti o cavità. La formazione di cicatrici gliali aiutano a ripulire i detriti e tamponare il sito primario della lesione. Il sito di lesione acuta risulterà ricco di detriti di mielina e di oligodendrociti che inibiscono la ricrescita assonale.



Entro le prime 48 ore dal trauma, cellule di microglia migrano verso il sito della lesione, dove fagocitano i detriti di mielina, che potrebbe contribuire a promuovere la germinazione assonale. In seguito la cicatrice gliale è infiltrata da precursori di oligodendrociti che nelle zone amieliniche, sono in grado di maturare e differenziarsi in nuovi oligodendrociti.



Infine, gli astrociti migrano verso la cicatrice gliale dove producono la GFAP, (proteina gliale fibrillare acida).

La GFAP aiuta la comunicazione astrociti-neuroni e promuove la ulteriore formazione della cicatrice gliale.

Gli astrociti avvolgono il sito necrotico di lesione primaria con un rivestimento gliale riempiendo lo spazio vuoto della lesione stessa.

La gliosi può derivare anche da:

Traumi

Ischemia

Ictus

malattie neurodegenerative

Gran parte delle lesioni al sistema nervoso centrale (SNC) conducono a paralisi o deficit psico-funzionali permanenti ed a tutt'oggi gran parte delle lesioni al SNC risultano pressoché incurabili in misura efficace.

Grazie alla scoperta in campo biologico delle cellule staminali neurali (NSC), aventi potenzialità neurogeniche, si sono aperte prospettive inaspettate per terapie cellulari in questo ambito.

Tuttavia un supporto fisico per l'innesto di cellule è necessario nel caso in cui lesioni traumatiche, esiti post-operatori o patologie degenerative lascino ampi spazi vuoti o cavità nel tessuto da rigenerare, evento frequente nel caso delle lesioni cronicizzate al midollo spinale.

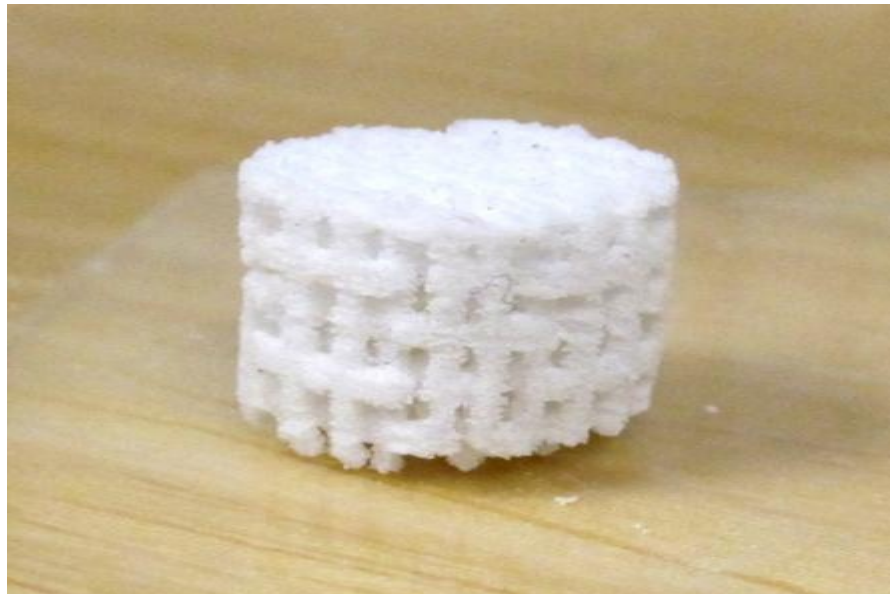
Attualmente alcuni approcci di ingegneria dei tessuti biologici (facente uso sinergico di biomateriali e di cellule) hanno portato ad applicazioni dal definitivo successo in ambito clinico (ed esempio nel caso di ricostruzione di pelle, trachea, cornea e vescica).

Tuttavia, in ambito del sistema nervoso tale approccio, è al momento ancora da raggiungere.

RIPARAZIONE DELLA LESIONE

Attualmente si sta tentando la riparazione dopo lesioni complete o dopo una lesione cronica attraverso l'impianto di una struttura di transizione orientata a ripristinare la continuità dei tessuti attraverso la zona del trauma.

Queste matrici o ponteggi devono essere biocompatibili e creare un ambiente che faciliti la crescita dei tessuti e la vascolarizzazione, e permettere agli assoni di rigenerare attraverso e oltre l'impianto al fine di ristabilire il contatto con il tessuto distale "normale".

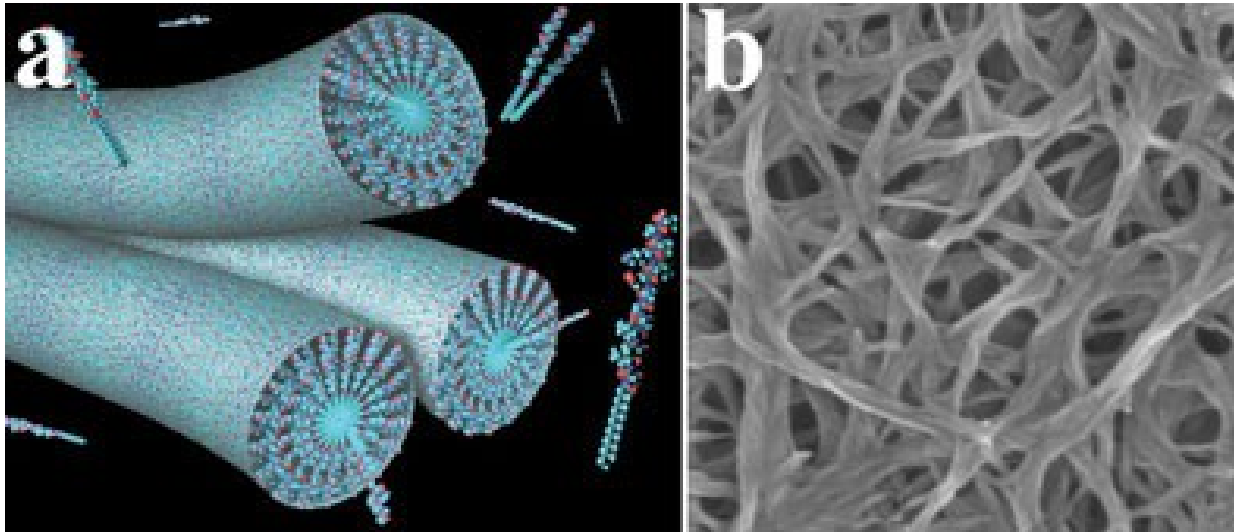


matrici

Molti diversi tipi di matrice sono ancora allo studio. Possono essere biodegradabili o non degradabili, naturali o sintetiche.

Queste matrici possono essere progettate per incorporare molecole o immobilizzare cellule ritenute idonei per la riparazione del midollo spinale o utilizzati come dispositivi per il rilascio controllato di agenti terapeutici e fattori di crescita.

Sono state utilizzate proteine che si auto-assemblano in nanofibre nel sito della lesione, stimolando i nervi a ricrescere.



Progetto sperimentale

L'ipotesi di lavoro è quella di poter costruire una matrice con maglie di larghezza regolabile, che possa permettere agli assoni rigeneranti di essere guidati verso la porzione distale e quindi fondersi con essa rigenerando la conduzione neuronale

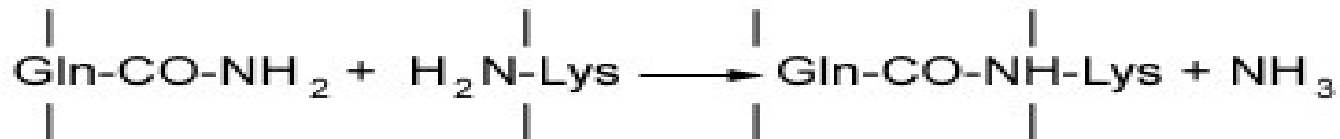
Polimerizzazione covalente

Sono stati saggiati diversi peptidi che hanno permesso di costruire matrici di varia consistenza grazie all'effetto polimerizzante della transglutaminasi.

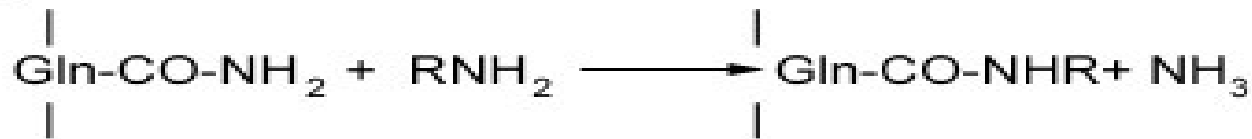
Transglutaminasi

Le transglutaminasi (TGasi) rappresentano una famiglia di enzimi funzionalmente e strutturalmente correlati che catalizzano la reazione di trasferimento acilico Ca^{2+} -dipendente tra il gruppo γ -carbossiamidico di residui di glutamina e il gruppo amminico di varie ammine primarie.

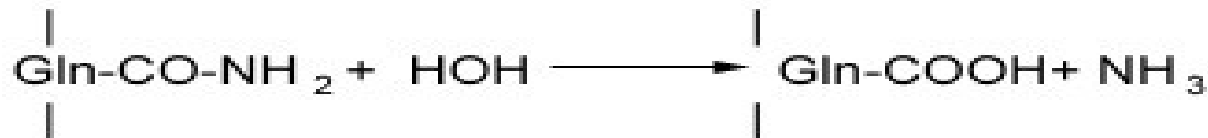
a.



b.

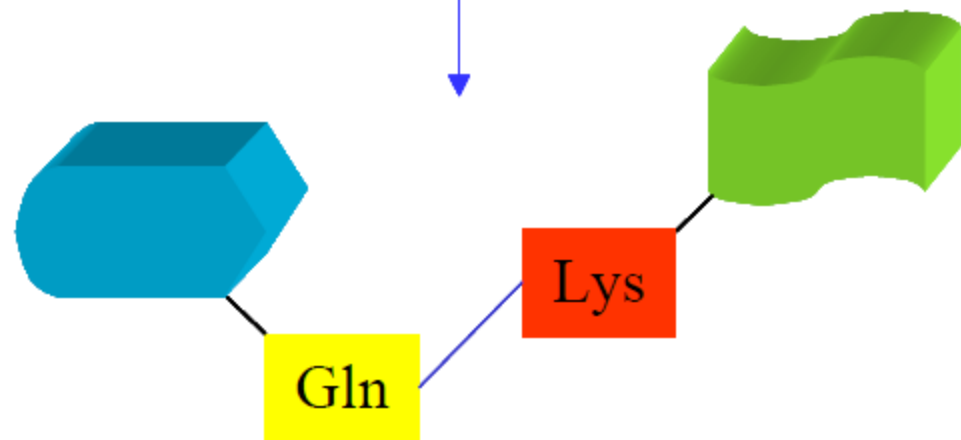


c.



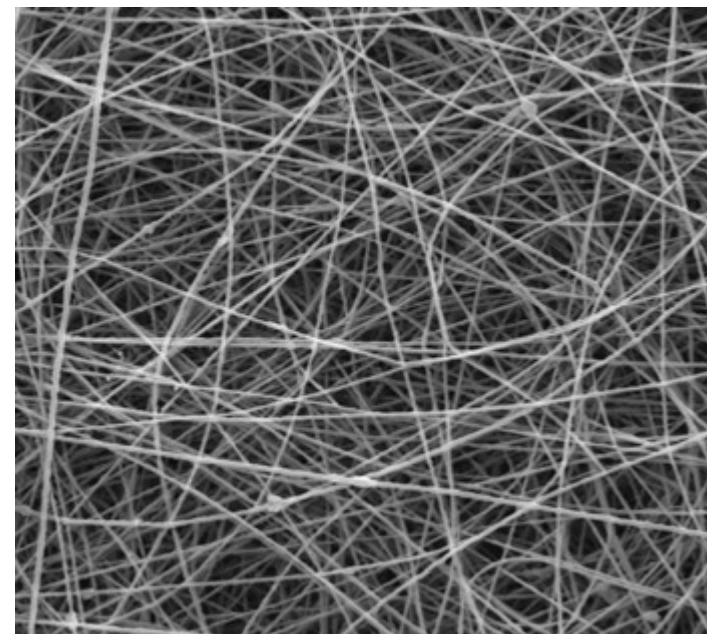
Peptide A

Peptide B



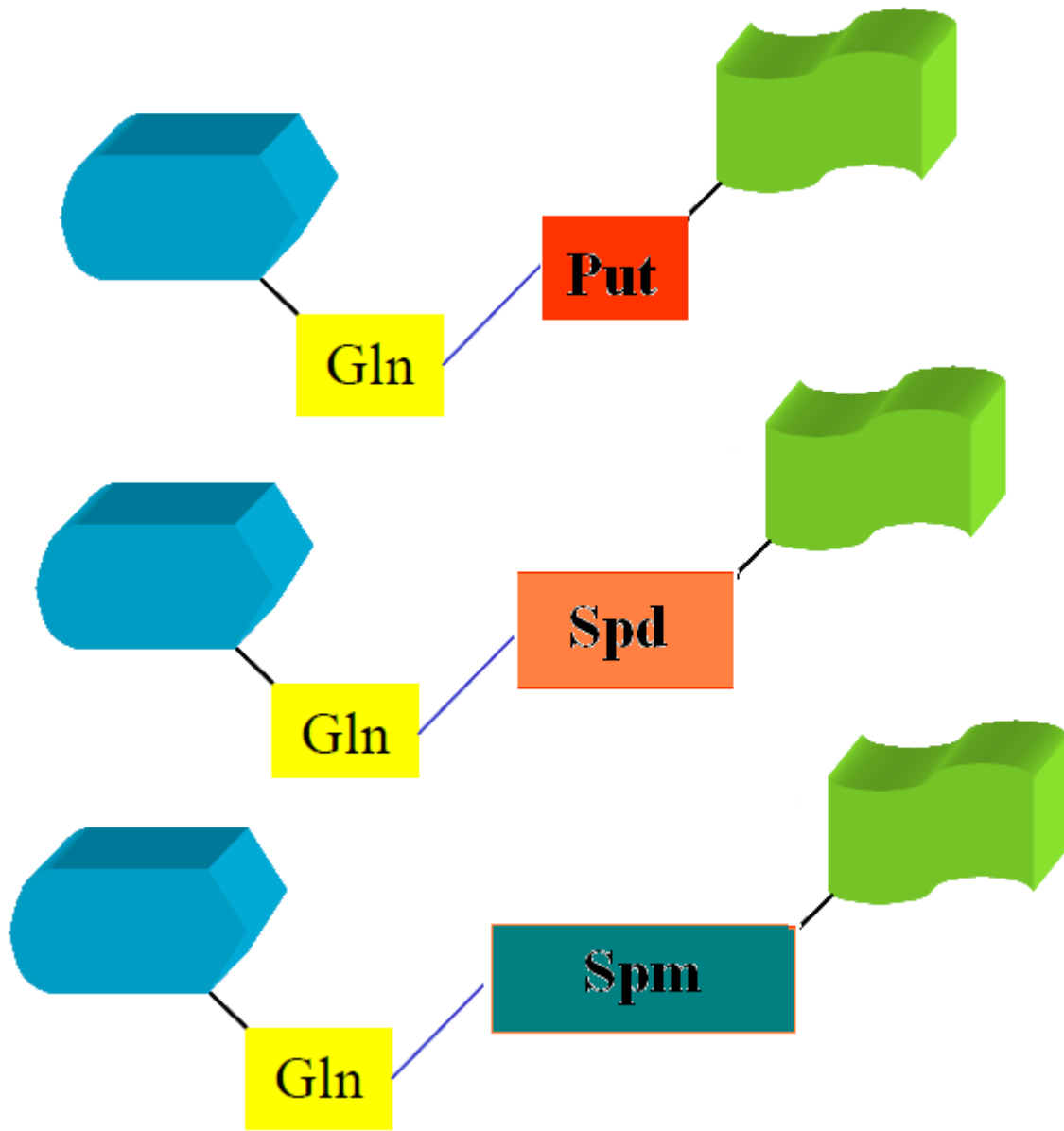
Legame crociato

In questo tipo di legame la matrice che si ottiene ha dimensioni costanti e molto piccole, inadatte per l'attraversamento degli assoni neuronali

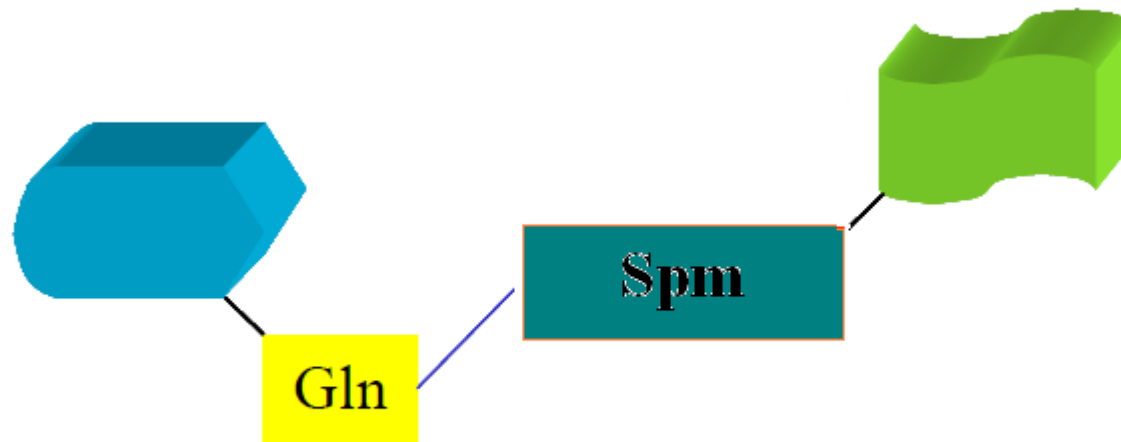


Modulare la larghezza delle maglie

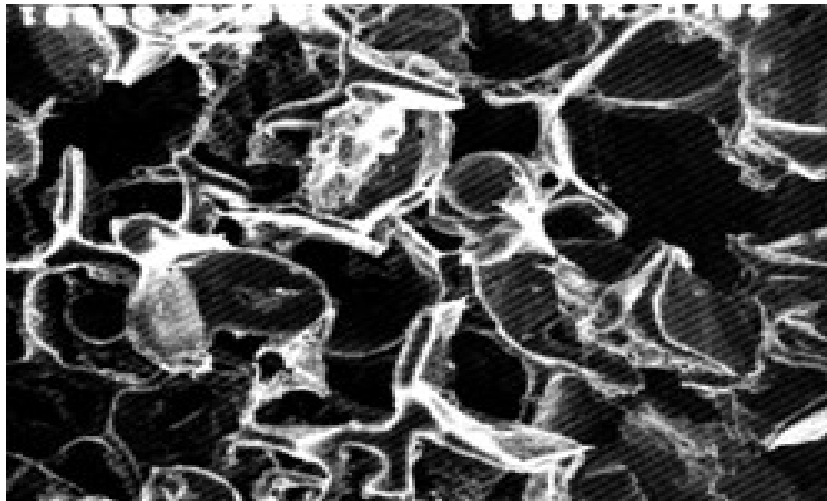
Utilizzando le poliammine putrescina, spermidina e spermina è possibile costruire matrici con maglie di diverse dimensioni. Infatti la lunghezza di queste ammine è diversa come ovviamente sono diversi i pesi molecolari



- Lys**
- Put**
- Spd**
- Spm**



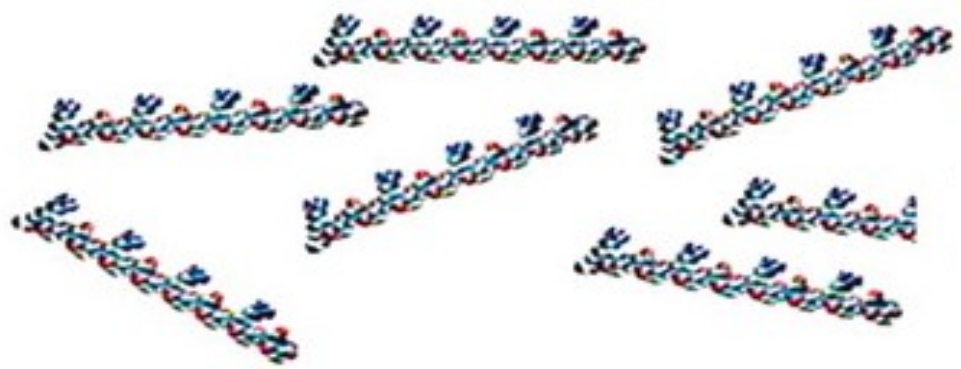
Tipica matrice ottenibile con la **spermina**. Ricca di cariche positive e quindi dal forte potere adesivo per peptidi e micronutrienti



Peptide mix

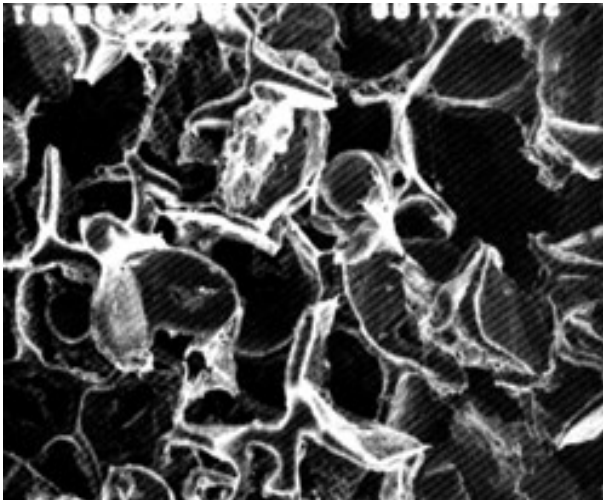
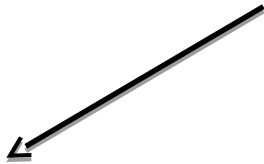
Gli assoni sono stimolati a crescere ed ad invadere la struttura per mezzo di una miscela di peptidi a pH basico contenente una serie di citochine come stimolanti la crescita assonale, il Citozym come miscela antiossidante e nutriente, la transglutaminasi e poliammine

peptidi



spermina

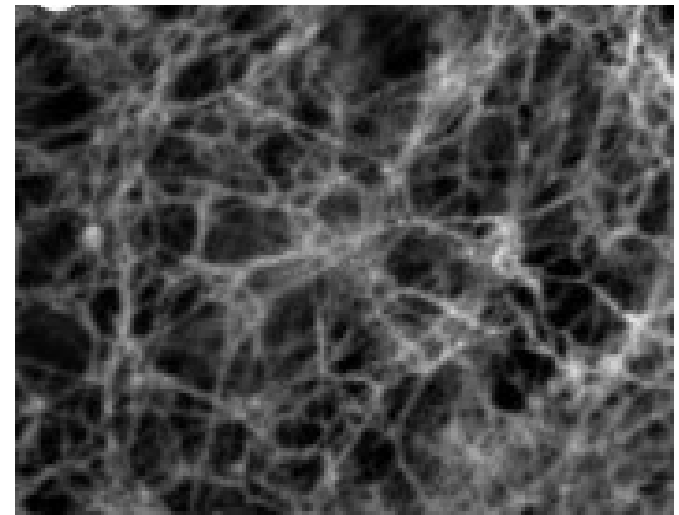
Transglutaminasi



Miscela di citochine

Citozym 3%

NGF.....



Applicazioni

Il protocollo sperimentale applicato su midollo spinale isolato dal topo comprende la sezione completa del midollo spinale e l'applicazione della miscela polimerizzante denominata “**peptide mix**”.

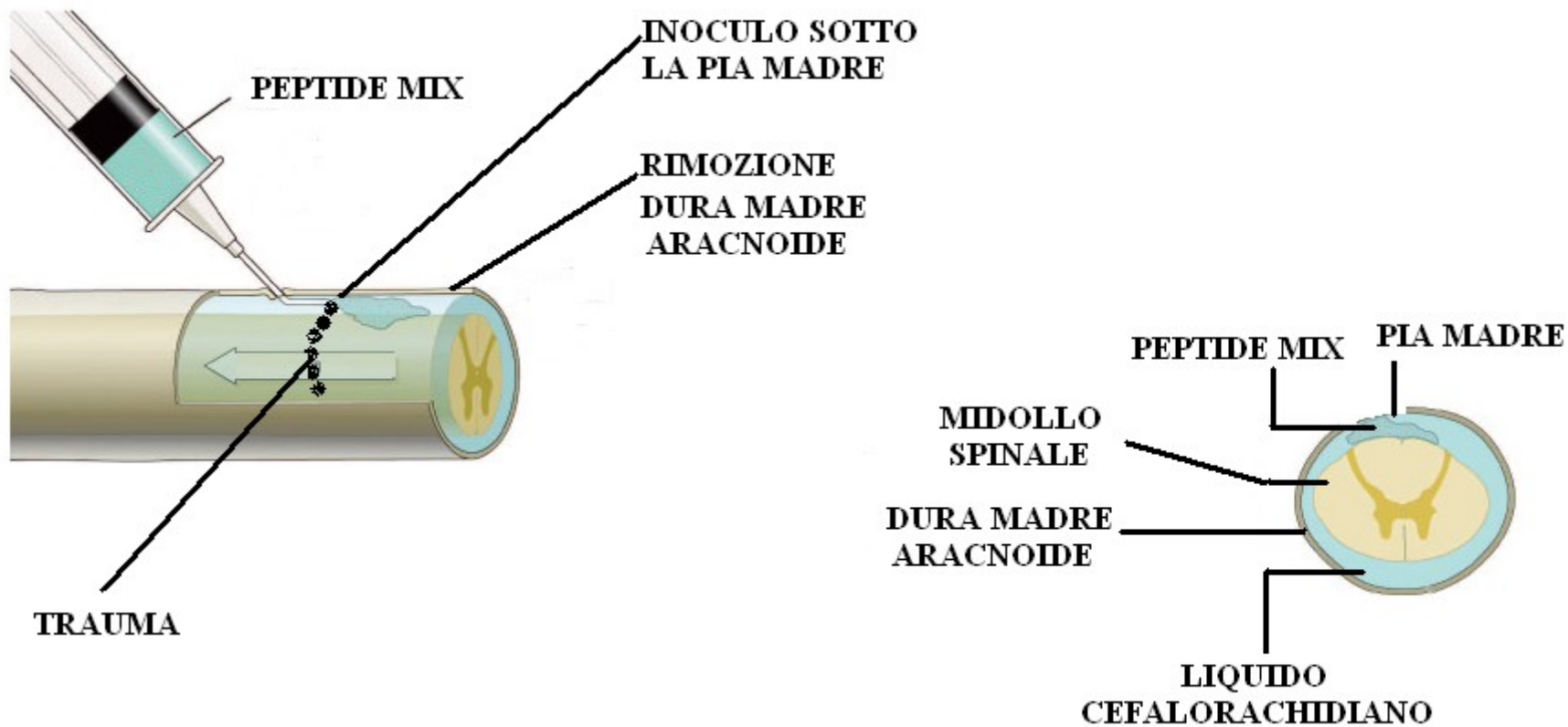
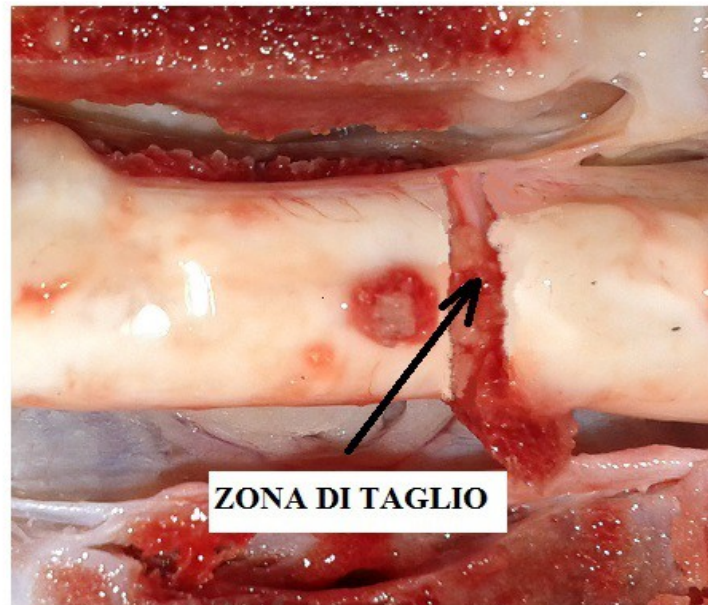


Figura schematica che illustra la procedura di inoculo del
"peptide mix"

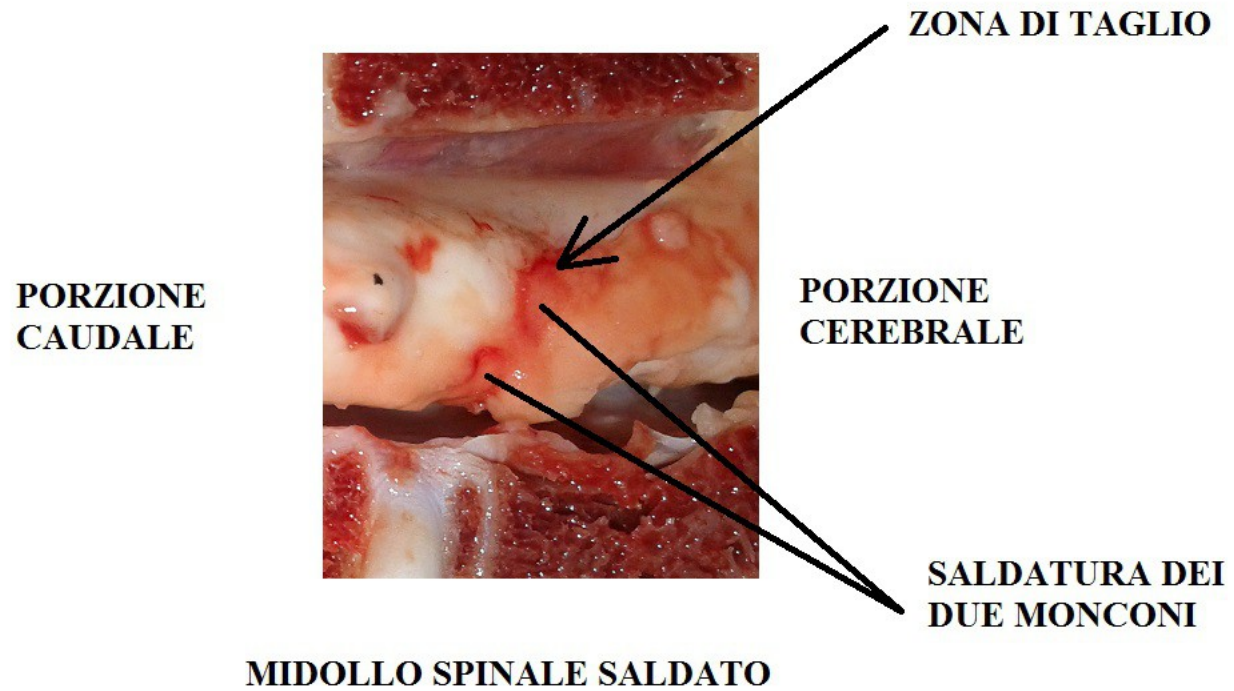
Applicazione del “peptide mix” al midollo spinale dopo sezione completa nel topo

**PORZIONE
CAUDALE**



**PORZIONE
CEREBRALE**

MIDOLLO SPINALE



Saldatura della sezione di midollo spinale resecato

conclusioni

Forse la presentazione potrebbe apparire poco esauriente, ma le procedure e i protocolli presentati sono oggetto di brevetto, quindi non saranno oggetto di pubblicazione.

Il lavoro è in progresso per dimostrare se la saldatura della porzione lesionata possa ripristinare la conduzione assonale.

I problemi da affrontare sono diversi non ultima la riemielinizzazione della porzione degli assoni rigeneranti e la resistenza alla digestione da metalloproteasi della matrice peptidica.

Grazie per l'attenzione