UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

EFFETTI PROTETTIVI DEL CITOZYM SULL'ICTUS INDOTTO SU ANIMALI C57BL/6N

Scopo della ricerca.

L'ictus ischemico è una patologia cerebrovascolare distruttiva che in molti casi porta a morte. Al momento non sono utilizzabili agenti protettivi efficaci. Esperimenti preliminari effettuati su neuroni isolati hanno mostrato che il Citozym, una miscela di antiossidanti commercializzata come integratore alimentare presenta un'azione neuro protettiva durante l'induzione del danno neuronale in ipossia (dati preliminari non pubblicati). Il fine della presente ricerca è stato quello di valutare l'effetto di tale integratore in su animali C57BL/6N per mezzo di un modello di ictus.

Metodo

I topi maschi C57BL/6N sono stati trattati con PBS i.v. come controllo e con Citozym i.v. a due concentrazioni (1:2 e 1:4 v.v.) 300 μl giornalmente per 14 giorni. Ai topi sia di controllo che trattati veniva occlusa per 2 ore l'arteria cerebrale mediana per mezzo di una metodica denominate MCAO (1). Gli stessi topi subivano dopo la rimozione dell'occlusione una riperfusione per 22 ore. I topi venivano sacrificati e immediatamente dopo si valutava il danno neurologico. Il cervello veniva prelevato al fine di valutare le dimensioni della zona infartuata e sezionato in fettine. Al fine di valutare il danno alla barriera emato-encefalica dovuto al MCAO, si adottava il colorante Evans blue (EB)(2).

Risultati

Il pretrattamento con Citozym alla concentrazione 1:2 ha ridotto significativamente il deficit neurologico conseguente al MCAO con una evidente riduzione della zona infartuata e del rigonfiamento degli emisferi. La estravasione di EB risultava ridotta nei topi trattati rispetto ai controlli dimostrando un ridotto danno alla EB.

Bibliografia

1. Lo AC, Chen AY, Hung VK, Yaw LP, Fung MK, Ho MC, Tsang MC, Chung SS, Chung SK. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Aug;25(8):998-1011.
2. Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. Ann Neurol. 2004 Oct;56(4):468-77.

RISULTATI

Distribuzione del danno neurologico

Dopo il MCAO I topi venivano osservati e classificati in base alle conseguenze del danno neurologico: Ogni segno viene valutato con un punteggio (vedi Tabella 1):

0: nessun segno di danno neurologico (normale)

1: incapace di estendere le zampe anteriori (leggero)

2: girare attorno a se stessi (moderato)

3: perdita della capacità di camminare e dei riflessi dalla parte destra (grave)

Tabella 1

Distribuzione del danno neurologico

Score	0	1	2	3	Media±SEM
PBS CONTROLLO (n = 8)	0	2	4	2	2.00±0.27
CYT 1:4 (n = 7)	0	4	3	0	1.43±0.20
CYT 1:2 (n = 7)	0	6	1	0	1.14±0.14*

* P<0.05 CYT 1:2 vs. control, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test.

Il deficit neurologico appare meno severo nei topi trattati con Citozym (CYZ) 1:2 dopo MCAO

Valutazione dell'area infartuata

Il cervello di ogni topo è stato sezionato in 5 fettine ed in ognuna è stato valutata la percentuale dell'area infartuata per mezzo di un analizzatore d'immagine computerizzato. E' interessante notare come il trattamento con CYZ 1:4 mostra un effetto protettivo sulla sezione encefalica numero 4 simile a quello del trattamento con CYZ 1:2 (cerchio rosso). Nelle sezioni precedenti il CYZ 1:2 mostra una protezione maggiore rispetto al CYZ 1:4 (sezione 2 e 3). Si può concludere che l'effetto protettivo del CYZ 1:2 è omogeneo nelle varie aree cerebrali (Figura 1)

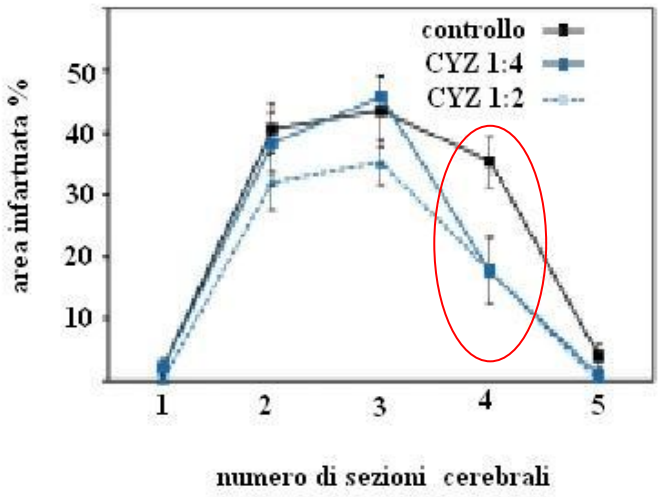


FIGURA 1

Valutazione dell'edema cerebrale

Similmente alla riduzione dell'area infartuata (Figura 1) è stato osservato un rigonfiamento edematoso ridotto nei topi trattati con CYZ 1:2 (ca. 15%) rispetto ai controlli (ca. 22%) (Figura 2). Una riduzione è anche stata osservata per il trattamento con CYZ 1:4 (ca. 20%). In ogni caso solo la riduzione con il CYZ 1:2 è stata considerata significativa (*).

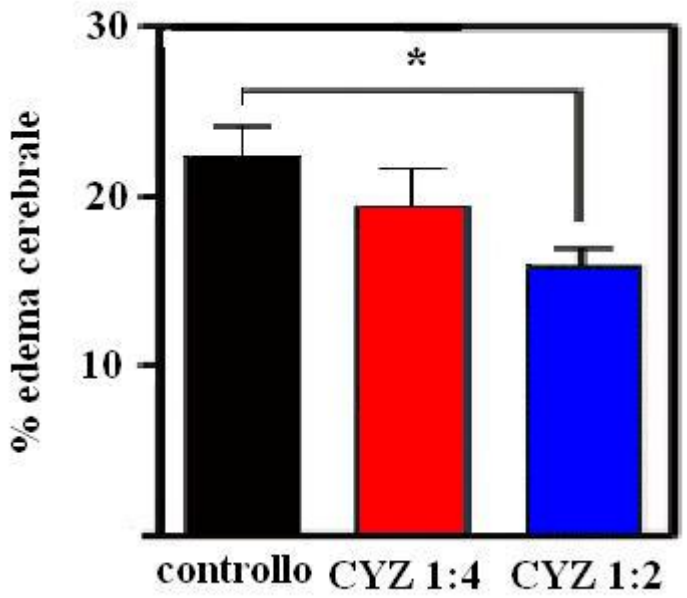


FIGURA 2

Valutazione del danno alla barriera emato-encefalica

Anche in questo caso (Figura 3) l'effetto sul danno della barriera emato-encefalica risulta ridotto dal trattamento con CYZ 1:2 rispetto al CYZ 1:4 comparati con il controllo. Il dato è stato ottenuto sulla base della diffusione del colorante Evans blue secondo una metodica pubblicata (2).

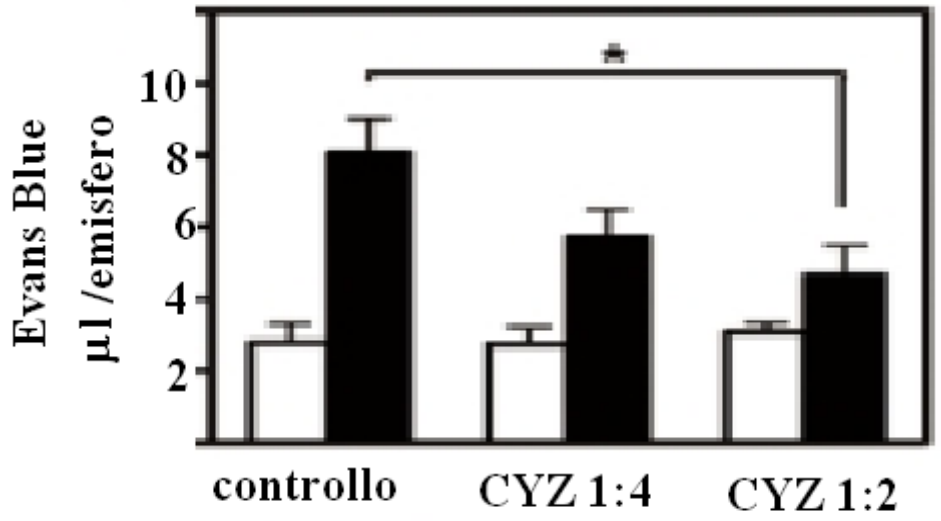


FIGURA 3

Conclusioni

14 giorni di pretrattamento di topi C57BL/6N con Citozym i.v. (300 µl 1:2 v.v.) riducono significativamente il deficit neurologico, diminuiscono la zona infartuata e l'edema cerebrale cosi come proteggono la barriera emato-encefalica dalla distruzione, nel modello animale di ictus MCAO. Il presente studio suggerisce che la somministrazione di Citozym per via i.v. può essere usata come neuro protezione in pazienti ad alto rischio di ictus ischemico.

Roma il 01/08/12

Prof. Simone Beninati

