

EFFICACIA DELLA MEMBRANA AMNIOTICA ARRICCHITA DI ADSCH NEL FAVORIRE LA RIGENERAZIONE ASSONALE DEL NERVO MEDIANO DEL RATTO.

Autore:

Dr Andrea Marchesini

Istituzione presso cui è stata svolta la ricerca:

**SOSD di Chirurgia Ricostruttiva e Chirurgia della Mano
A.O.U. Ospedali Riuniti di Ancona in collaborazione con
I.N.R.C.A. Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani
V.E.II. Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico. Polo
Scientifico- Tecnologico "N. Masera" Via Birarelli, 8 ANCONA**

Summary:

The use of autologous sural nerve grafts is still the current gold standard for the repair of peripheral nerve injuries with wide substance losses, even if this technique has some limits such as a limited donor nerve supply and morbidity of donor site.

At present, tubulization through the muscle vein combined graft is a viable alternative to the nerve autografts although this technique is currently limited to a critical gap of 3 cm with less favorable results for motor function recovery.

The aim of this study is the evaluation of the ability of a new tubulization method, the amnion muscle combined graft (AMCG) technique in order to obtain a nerve regeneration after trauma.

It consists in the combination of the human amniotic membrane hollow conduit with autologous skeletal muscle fragments for repairing the substance loss of peripheral nerves in a rat model with a median nerve gap of 1,5 cm. In some cases the AMCG conduit was enriched by human adipose derived stem cells (ADSC).

We evaluated clinical and histological results by using grasping test and electron microscopy.

The experimental results suggest that the AMCG is a reasonable alternative to traditional nerve autograft in selected clinical conditions.

Body of the Manuscript:

Introduzione.

Vi sono numerose situazioni cliniche prevalentemente inerenti le discipline della chirurgia plastica e della chirurgia ortopedica, caratterizzate, a seguito di traumi degli arti, da lesioni dei principali nervi periferici con lesioni più o meno complesse, spesso caratterizzate da perdita di sostanza a tutto spessore del nervo periferico. Ne scaturisce un gap di alcuni o svariati cm che richiedono la riparazione chirurgica utile a favorire una buona rigenerazione assonale ed al contempo gliale (Epinevrio) del nervo stesso ai fini del suo recupero funzionale.

L'astensione da tale gesto chirurgico comporta nel paziente gravi esiti invalidanti sul piano funzionale, ovvero la paralisi definitiva di gruppi muscolari indispensabili per funzioni fondamentali degli arti, quali la prensione e la deambulazione, oltre alla demarcazione di zone di anestesia cutanea che certamente incrementano la disabilità residua.

Va inoltre sottolineato che attualmente, in chirurgia ricostruttiva, la microchirurgia vascolare ha raggiunto la capacità di conseguire strabilianti risultati morfo-funzionali nel trattamento di traumi complessi e nella ricostruzione complessa in campo oncologico, soprattutto a seguito di accresciute conoscenze di anatomia vascolare dei tessuti molli, che consentono di disporre di zone donatrici costituite da tessuti aventi caratteristiche idonee alla ricostruzione del sito ricevente, sia sul piano del recupero funzionale che su quello del ripristino estetico, con modestissimi esiti cicatriziali a livello della zona donatrice stessa dopo l'autotrapianto. Ma se la semplice copertura ha raggiunto tali risultati morfologici ed anche funzionali, è evidente che per un reale ripristino delle funzioni è fondamentale anche ottenere una ottimale rigenerazione dei nervi periferici traumatizzati o altresì sacrificati al principio della radicalità oncologica.

Lo stato dell'arte prevede ovviamente la neurorrafia diretta, qualora sia possibile, ma le problematiche maggiori scaturiscono dalle lesioni con gap nervoso di svariati cm, nelle quali spesso gli innesti di nervo periferico non offrono risultati soddisfacenti e laddove la tecnica del tubulo mediante innesto di muscolo in vena (con frammenti di muscolo scheletrico in vena) offre risultati incoraggianti solo per perdite di sostanza con un gap limitato a 3cm. [1-4] Incerti sono i risultati della tecnica nei casi in cui il gap sia compreso fra 3 e 6 cm. Certamente insoddisfacenti sono i risultati per gap superiori a 6 cm.

Proprio allo scopo di risolvere le situazioni patologiche traumatiche e post-oncologiche caratterizzate da perdite di sostanza, a tutto spessore, di svariati cm a carico di tronchi nervosi periferici principali, si è pensato di sperimentare la capacità rigenerativa intrinseca della membrana amniotica [5], eventualmente arricchita dal potere rigenerativo delle (ADSC), nel favorire la rigenerazione assonale e gliale dei suddetti nervi periferici [6-7].

La Membrana Amniotica è un tessuto avascolare composto dallo strato più interno della Placenta, ovvero costituita da un singolo strato di cellule epiteliali e relativa Membrana Basale, sostenuto da uno strato di tessuto connettivo compatto contenente collagene tipo IV V e VII.

Le proprietà principali della Membrana Amniotica, già verificate sperimentalmente e pubblicate in letteratura, che ci inducono ad ipotizzare un suo ruolo positivo nella rigenerazione nervosa assonale e gliale, sono le seguenti:

- Non è Immunogenica
- Assenza di Antigeni HLA-A, B, C o Beta 2 Microglobuline
- Citochine immunosoppressive IL-4 IL-10 TGF
- Riduce l'infiammazione
- Riduce la formazione di tessuto cicatriziale ed esprime funzione di Barriera Antiaderenziale

- Contiene Fattori di Crescita: EGF TGF- Beta FGF PDGF tipo A e B, TIMP
- Stimola la proliferazione e la differenziazione delle cellule di Schwann dal moncone prossimale del nervo (Chemiotassi)
- Agevola lo scorrimento delle cellule di Schwann proliferate dal moncone prossimale lungo la membrana Basale della Membrana Amniotica a ricostituire un tessuto gliale una sorta di neopinevrio [8-11]

Materiali e Metodi.

Lo studio prevede l'impiego di 30 ratti del peso di 450-500 gr. Gli animali saranno stabulati in gabbie singole, nutriti con dieta standard e dissetati con acqua ad libitum. Gli animali dopo l'intervento chirurgico saranno in grado di alimentarsi e dissetarsi autonomamente.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

STUDIO IN VIVO: PROCEDURA CHIRURGICA.

I ratti, omogenei per sesso, età e peso saranno randomizzati e suddivisi nei seguenti gruppi: Gruppo A 10 ratti; Gruppo B 10 ratti; Gruppo C 10 ratti.

Anestesia: Ketamina (dosaggio 100 mgr./ Kg / i.m.) e Medetomidina (dosaggio 0,25 mgr /Kg / i.m.). Al termine dell'intervento gli animali saranno stabulati separatamente secondo protocollo etico e sottoposti a terapia antibiotica (terramicina polvere solubile nell'acqua da bere nei sei giorni successivi all'intervento) e analgesica con Carprofen (0,4 mg/Kg ogni 12 ore per il primo giorno sottocute). L'animale durante tutta la stabulazione potrà accedere liberamente all'acqua e al cibo, nonché sarà libero di praticare le sue normali attività fisiologiche e comportamentali in quanto la lesione nervosa non produce deficit motori significativi. Gli animali saranno sacrificati in camera di CO2 per gruppi a distanza **di 90** giorni dall'intervento.

Tecnica chirurgica: Mediante incisione ampia, secondo disegno, dimensioni e posizione standard (Fig. 1), dopo aver scollato i tessuti, il nervo mediano del ratto viene isolato mediante dissezione per via smussa con l'ausilio del microscopio operatorio (Fig. 2).

Negli animali del gruppo A (gruppo controllo) si eseguirà la sezione a tutto spessore con tagliente del nervo mediano per una ampiezza di 1,5 cm. con moncone distale della sezione posto a 2 mm. a monte dalla piega flessoria del gomito. Si procederà all'innesto antidromico del medesimo frammento di nervo tra i due capi del nervo stesso [12-13].

Negli animali del gruppo B (gruppo del trattamento) analoga procedura al gruppo A fino alla creazione del gap nervoso di 1,5 cm. Quindi si procederà alla riparazione del gap mediante innesto di tubulo di membrana amniotica armata con un frammento di muscolo scheletrico autologo (AMCG), prelevato attraverso la medesima incisione dal muscolo grande pettorale omolaterale, e posto al suo interno. (Fig. 3-4)

Negli animali del gruppo C (gruppo "gold standard treatment") analoga procedura al gruppo A fino alla creazione del gap nervoso di 1,5 cm. Quindi si attua analoga procedura al gruppo B, ma a differenza di quest'ultimo il gap nervoso di 1,5 cm sarà riparato mediante AMCG arricchito da ADSCh.

Le ADSCh vengono ottenute mediante tecnica incruenta di liposuzione e sottoposte a studio in vitro ed in ex vivo prima di essere impiegate in vivo a completamento di questo progetto di studio.

In tutti i gruppi verrà praticata, a livello dell'arto controlaterale, la medesima incisione, sezione del nervo mediano 2mm a monte della piega del gomito ed affondamento del moncone distale di nervo mediano così ottenuto a livello del m. grande pettorale.

Tale lesione controlaterale garantisce al ratto di non ravvisare asimmetrie propriocettive evitando così atti di automutilazione.



Fig. 1: Disegno pre operatorio.

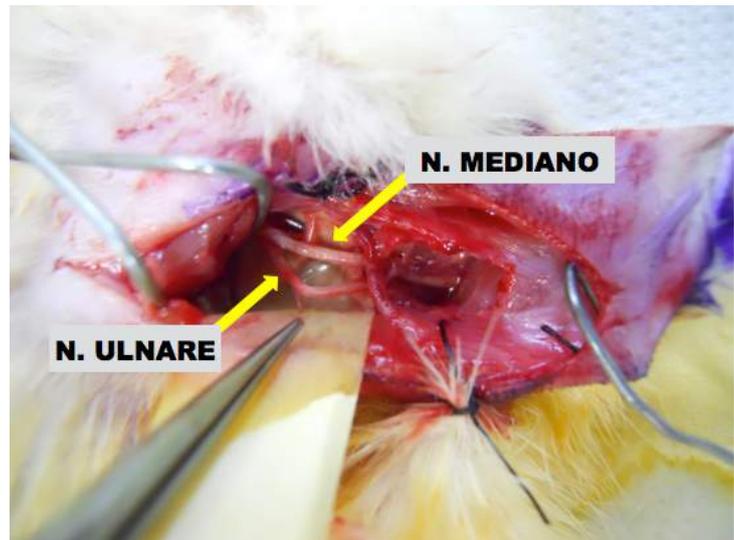


Fig. 2: Isolamento microchirurgico del n. mediano.



Fig.3 Particolare del confezionamento del tubulo AMCG.

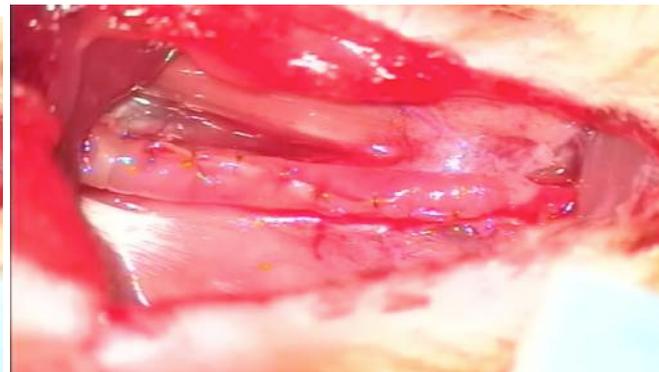


Fig.4 Tubulo AMCG come appare al termine del confezionamento.

FASE DI STUDIO IN VITRO ED EX VIVO DELLE ADSCh PRELEVATE:

Tali cellule sono ottenute a partire da 50 ml di tessuto adiposo umano prelevato, dopo consenso informato e durante procedura di liposuzione, con metodica Body Jet a traumatica ed incruenta. Tale tessuto viene sottoposto a due lavaggi in PBS (Phosphate Buffered Saline) per rimuovere le cellule ematopoietiche contaminanti, si procede quindi a centrifugare il tessuto a 3.000 giri per 3 minuti in centrifuga con rotore fisso. Si risospende poi il pellet in 20 ml di collagenasi I (0,35%) a 37°C per 30 minuti; quindi si inattiva la collagenasi con terreno completo di siero e si centrifuga nuovamente a 3000 giri per 3 minuti. Si procede infine a lavare il pellet contenente la frazione vascolare stromale in PBS e risospenderlo in soluzione fisiologica NaCl 0,9% e quindi a crioconservazione per 3 mesi a -145°C. in vapori di azoto. Tutte le cellule saranno sottoposte ad esame citofluorimetrico, di vitalità cellulare e a analisi microscopica ed immunohistochimica.

Le cellule caratterizzate e purificate (SVF) verranno messe in coltura ed espanse ai fini di ottenere una crescita su scaffold biologico di diversa natura [6].

RISULTATI

In 30a, 60a, e 90a giornata post operatoria il progressivo recupero della forza e della destrezza degli arti anteriori verrà valutata con il test del grasping (Fig. 5-6) e mediante visual assesment [14].

A completamento del progetto, tutti gli animali in 90a giornata post-operatoria saranno sacrificati ed il nervo Mediano trattato chirurgicamente verrà prelevato con un margine di 4 mm. a monte ed a valle dalla tubulizzazione chirurgica (Fig. 7-7a). Il segmento di nervo prelevato verrà avviato alle valutazioni istologiche microscopiche ed ultrastrutturali per la quantificazione della capacità rigenerativa gliale e per la conta degli assoni rigenerati.

Per l'analisi microscopica i campioni, immediatamente dopo il prelievo, saranno immersi in una soluzione di Gluteraldeide al 3.6% per 24 ore e poi immersi in soluzione salina tamponata di fosfato (0,1 mol/lt, pH 7.2) e conservati a 4°C. Dopo la fissazione in Tetrossido di Osmio ed incorporamento in resina epossidica, i campioni di nervo mediano sono sezionati trasversalmente in sezioni sottili (1 - μ m), poi colorati con Tionina. Quindi con l'ausilio di microscopio elettronico si contano gli assoni mielinici rigenerati, localizzati 3 mm a valle del tubulo.



Fig. 5 Il dinamometro per grasping test.



Fig.6 L'esecuzione del grasping Test.



Fig. 7-7a Particolari del tubulo AMCG al momento dell'espianto

I risultati di seguito riportati sono solo preliminari in quanto non si è giunti ancora al termine di tutto il protocollo sperimentale; nello specifico sono ancora in corso di follow up tutti i ratti appartenenti al Gruppo C e parte dei soggetti appartenenti ai Gruppi A e B.

Dai dati relativi all'osservazione macroscopica (tabella 1), attualmente in nostro possesso, si desume che il 50% delle cavie appartenenti al Gruppo B di trattamento presenta un recupero motorio sovrapponibile per tempistica e qualità a quello del nostro gruppo di controllo ed in

linea con quanto riportato in letteratura da altri autori. Si può notare inoltre che comunque al termine del periodo di osservazione il 75% dei casi appartenenti al Gruppo B presenta performance motorie sovrapponibili ai soggetti del gruppo di controllo. Il ratto 4 al tempo T90 mostra una contrazione attiva dei muscoli flessori della zampa contro gravità ma non valida contro resistenza mentre il ratto 8 ha sviluppato durante il periodo di controllo una neoformazione sottocutanea a livello dell'arto inferiore controlaterale all'arto trattato con il tubulo di membrana amniotica; tale riscontro per localizzazione, presentazione clinica e morfologia sembra non avere alcuna correlazione con la metodica sperimentale in esame.

Tabella riassuntiva dell'analisi macroscopica								
Ratto	Procedura e note	Valori Grasping Test						
		T30			T60		T90	
		Data	gr.	note	gr.	note	gr.	note
1 Gruppo A	INNESTO CONTROCORRENTE	27/02/14	0-0-0	No presa	190-126-90	Esegue presa a pugno	210-170-190	Esegue presa a pugno
2 Gruppo A	INNESTO CONTROCORRENTE	27/02/14	0-0-0	No presa	90-102-104	Esegue presa a pugno	180-200-160	Esegue presa a pugno
3 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	08/04/14	0-0-0	No presa	0-0-0	No presa	70-50-70	Esegue presa a pugno
4 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	08/04/14	0-0-0	Accenna presa a pugno	0-0-0	No presa	0-0-0	Accenna presa a pugno
5 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	08/04/14	0-0-0	Accenna presa a pugno	0-20-0	accenna	200-160-200	Esegue presa a pugno
6 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	08/04/14	0-0-0	Accenna presa a pugno	60-70-50	Esegue presa a pugno	220-80-120	Esegue presa a pugno
7 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	17/06/14	0-0-0	Accenna presa a pugno	110-60-80	Esegue presa a pugno	80-120-80	Esegue presa a pugno
8 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	17/06/14	0-0-0	No presa	0-0-0	Accenna presa a pugno	0-0-0	No presa Presenza di neoplasia sottocutanea controlaterale
9 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	17/06/14	0-0-0	Accenna presa a pugno. Presenza di lesioni auto inflitte	130-110-80	Esegue presa a pugno	130-110-80	Esegue presa a pugno
10 Gruppo B	HAM con MUSCOLO	17/06/14	0-40-0	Esegue presa a pugno	80-120-60	Esegue presa a pugno	150-120-150	Esegue presa a pugno

Tabella 1: Dettaglio analitico della valutazione macroscopica.

Le osservazioni microscopiche ed ultrastrutturali mostrano che i casi trattati con il tubulo di membrana amniotica secondo la metodica AMCG presentano un'ottima rigenerazione assonale già evidente all'osservazione microscopica (Fig. 8). La morfometria inoltre mostra un numero di fibre maggiore rispetto all'innesto di nervo autologo come normalmente atteso in caso di tubulizzazione. Questo elevato numero di fibre rigenerate deve però essere letto positivamente in quanto queste presentano delle caratteristiche che le rendono sovrapponibili agli assoni rigenerati nei casi di innesto nervoso e che ben le differenziano dalla caotica e non fisiologica rigenerazione assonale che si osserva normalmente nei casi di tubulizzazione (Fig. 9-10). Infatti i numerosi assoni presenti nel rigenerato dei soggetti trattati con metodica AMCG presentano valori elevati di diametro assonale e di myelin thickness che in quest'ultimo supera quello osservato nel Gruppo di controllo A (tabella 2).

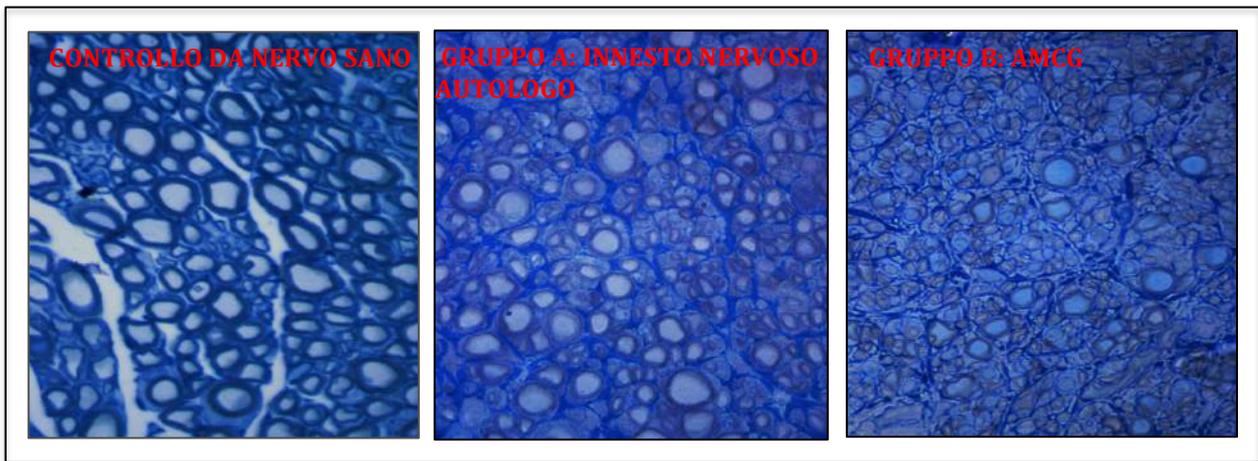


Fig. 8: Confronto istologico tra gli assoni di un nervo sano e quelli rigenerati attraverso un innesto di nervo autologo ed un tubulo AMCG.

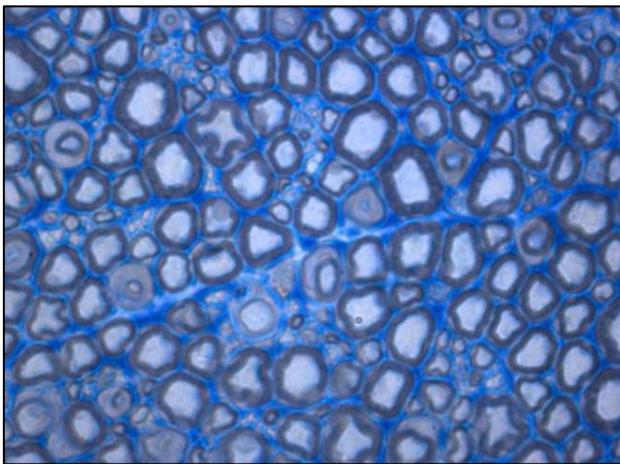


Fig. 9: Dettaglio di microscopia elettronica delle fibre nervose rigenerate a valle dell'innesto autologo di nervo (Gruppo A).

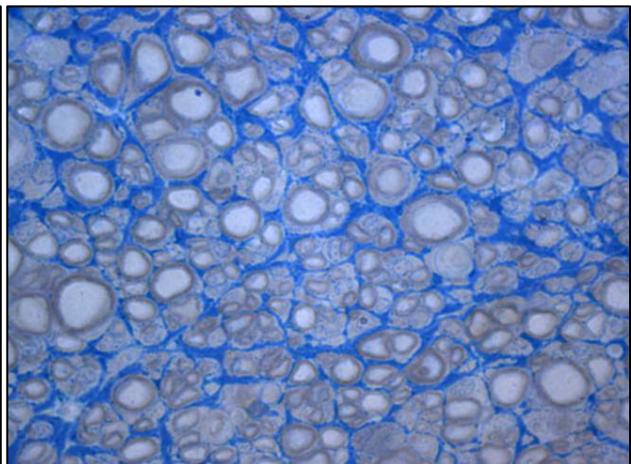


Fig. 10: Dettaglio di microscopia elettronica delle fibre nervose rigenerate a valle del tubulo AMCG (Gruppo B).

	Densit y	Total numbe r	Axon Diamete r (d)	Fiber Diamete r (D)	Myelin thicknes s (M)	M/ d	D/d	d/D (g- ratio)	Area (mm ²)
RATTO 1- T120- INNESTO	34.054	8.155	3,18	4,08	1,19	0,8 0	1,3 7	1,02	0,2394 6
SD	6.965	1.668	1,46	1,71	0,94	0,77	0,12	0,30	
RATTO 2- T120- INNESTO	50.519	7.442	2,39	3,12	1,21	0,9 1	1,3 8	1,07	0,1473 1
SD	12.307	1.813	0,93	1,12	0,81	0,70	0,09	0,30	
MEDIA	42.286	7.798	2,78	3,60	1,20	0,8 5	1,3 7	1,05	0,1933 9
SD	3.778	103	0,38	0,42	0,09	0,04	0,02	0,00	0,06516
HAM RATTO- RATTO 3- T120	30.371	19.893	3,15	4,06	1,47	1,0 4	1,3 9	1,11	0,6550 0
SD	10.404	6.814	1,79	2,21	0,86	0,73	0,11	0,30	
HAM RATTO- RATTO 4- T120	30.542	19.482	3,04	3,97	1,38	0,9 6	1,3 8	1,09	0,6378 8
SD	11.769	7.507	1,81	2,34	0,83	0,72	0,11	0,30	
HAM RATTO- RATTO 5- T120	46.020	23.553	2,49	3,11	1,33	1,0 3	1,3 7	1,13	0,5118 0
SD	17.342	8.876	1,17	1,27	0,86	0,71	0,10	0,28	
HAM RATTO- RATTO 6- T120	45.206	28.783	2,48	3,11	1,39	1,0 8	1,3 6	1,16	0,6367 1
SD	9.880	6.290	1,08	1,19	0,83	0,69	0,11	0,26	
MEDIA	38.035	22.928	2,79	3,56	1,39	1,0 3	1,3 7	1,12	0,61
SD	8.757	4.311	0,36	0,52	0,06	0,05	0,02	0,03	0,07

Tabella 2: Quadro analitico dei dati di morfometria.

DISCUSSIONE

I dati sinora raccolti confermano le ipotesi preliminari che vedono nella membrana amniotica uno scaffold di rigenerazione nervosa ottimale per le sue peculiari caratteristiche istologiche e biochimiche. Infatti questo tessuto non solo non si è dimostrato essere immunogeno, ma ha anche confermato le sue proprietà chemiotattiche, antinfiammatorie, antiaderenziali e rigenerative. Queste sue caratteristiche assommate al fatto di essere facilmente reperibile e crioconservabile, con minimi risvolti bioetici, ne fanno il supporto ideale alla rigenerazione nervosa.

Alla luce di quanto sinora osservato, ben consci degli intrinseci limiti della metodica e della parzialità dei dati sinora disponibili ci siamo sentiti supportati a proseguire con lo studio sacrificando ulteriori animali ed investendo ulteriori risorse umane ed economiche per portare al termine anche le restanti parti della ricerca. Ci si attendono infatti risultati ancor più sbalorditivi dal Gruppo C per l'ideale connubio tra le proprietà della membrana amniotica e l'attività delle ADSh.

Riteniamo infine doveroso allargare il campione in studio al fine di poter escludere senza alcun ragionevole dubbio ogni correlazione tra la metodica in esame e la comparsa di neoplasia riscontrata nel caso numero 8.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Battiston B et al. Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* 2005; 25(4):258-67.
- 2 Papari A et al. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J. Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63:1941-1948.
- 3 Maeda T et al. Regeneration across "stepping stone" nerve graft. *Brain Res.* 1993; 618(2):196-202.
- 4 Mackinnon SE, Dellon AL. Nerve Repair and Nerve Grafting. In: Mackinnon SE, Dellon AL. editors. *Surgery of the peripheral Nerve*. New York: Thieme Medical Publisher, Inc. 1988. p.118.
- 5 Riccio M et al. The amnion muscle combined graft (AMCG) conduits: a new alternative in the repair of wide substance loss of peripheral nerves. *Microsurgery*. 2014 Nov;34(8):616-22. doi: 10.1002/micr.22306. Epub 2014 Aug 18
- 6 Kolar M.K. and Kingham P.J (2014) "Regenerative effects of adipose-tissue-derived stem cells for treatment of peripheral nerve injuries" *Biochem Soc Trans.* 2014 Jun;42(3):697-701.
- 7 Gimble J.M. et al. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine" *Circ Res* 100: 1249-1260, 2007.
- 8 Yanxie Hao et al. Identification of angiogenic and anti-inflammatory protein in human amniotic membrane *Cornea*, 19, 1, 2000.
- 9 Ayaka Toda et al. The potential of Amniotic membrane/Amnion-derived cells for regeneration of various tissues *J Pharmacol Sci* 105, 215-228, 2007.
- 10 Hassan Niknejad et al. Properties of the Amniotic Membrane for potential use in tissue engineering *European Cell and Material* Vol 15 (pp. 88.99), 2008.
- 11 Kim SS. Et al. Use of human amniotic membrane wrap in reducing perineural adhesions in a rabbit model of ulnar nerve neurorrhaphy *J Hand Surg Eur* Vol. 2010 Mar;35(3):214-9.
- 12 Ronchi G et al. Standardized crush injury of the mouse median nerve. *J Neurosci Methods.* 2010 Apr 30;188(1):71-5.
- 13 Tos P et al. Employment of the mouse median nerve model for the experimental assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods.* 2008 Mar 30;169(1):119-27
- 14 Papalia I et al. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. *J Neurosci Methods.* 2003 Jul 15;127(1):43-7.