

LA RIGENERAZIONE NERVOSA NEGLI INNESTI A POLARITÀ INVERTITA: DATI A CONFRONTO TRA APPLICAZIONE SULL'UOMO E ANALISI SPERIMENTALE SU MODELLO ANIMALE

D.S. POGGI¹, M. MASSARELLA¹, G. CERULLI¹, A. CARAFFA¹, S. BURCHIELLI², M. MODENATO³,
C. CANTILE³, G. VOZZI⁴, C. DE MARIA⁴, M. LISANTI⁵, E. BONICOLI⁵, G. CANTINI⁵

¹Scuola di Specializzazione, Clinica Ortopedica Università di Perugia,

²Istituto di Fisiologia Clinica C.N.R. Pisa, ³Facoltà Medicina Veterinaria Università di Pisa,

⁴Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio" Facoltà Ingegneria Università di Pisa, ⁵Clinica Ortopedica Università di Pisa

Nerve regeneration using inverted grafts: data comparison between an experimental analysis of the animal model and the use in man

SUMMARY

Aim of the Study: *The classic method used to repair nerve injuries is to place the nerve autograft in the nerve gap maintaining the same direction it had in the harvest area. As the axon flow within the nerve cell follows a set direction, this study aims to show the extent and quality of nerve regeneration in grafts where the tissue gap was bridged using an autograft which underwent a 180 degree rotation in respect to its original position at the donor site.*

Material and Method: *As we believe that the inverted direction facilitates regeneration, we placed the graft in the nerve gap rotating it 180 degrees in two different cases: 1) isolated, chronic traumatic injury of the anterior interosseous nerve of the forearm; 2) chronic injury of the median nerve of the forearm. Following the results obtained in man, we drew up an experimental protocol for the rabbit model in order to evaluate the quality and speed of nerve regeneration both in classic and inverted grafts by means of instrumental testing (electromyography – intraoperative electroneurography) and histological sampling. The study was performed on a New Zealand male rabbit and lasted one year.*

Results: *The method we proposed had already lead to outstanding results in man consisting in complete and rapid nerve regeneration and reinnervation in sensory territories previously presenting defects. Our animal model confirmed our hypothesis and the instrumental and histological results further confirmed the value of the procedure.*

Conclusions: *Nerve repair using inverted grafts is, in our opinion, the technique to be used for chronic nerve injuries with a loss of substance. Further investigation is needed to uncover the biochemical, electrical and biological mechanisms involved in this phenomenon. Important hypotheses are presented in this paper.*

Riv Chir Mano 2007; 3: 180-194

KEY WORDS

Nerve grafts, polarity inversion, axon flow, nerve regeneration

RIASSUNTO

La riparazione delle lesioni nervose mediante innesti autologhi viene tradizionalmente eseguita posizionando l'innesto in corrispondenza del gap nervoso, così come è stato prelevato dalla sede donatrice. Postulato che il flusso assonico all'interno della cellula nervosa segua una polarità, il presente lavoro si prefigge lo scopo di verificare l'entità e la qualità della rigenerazione nervosa negli innesti in cui il gap tissutale sia stato colmato mediante auto innesto ruotato di 180° rispetto alla posizione originaria dalla sede di prelievo.

Materiale e metodo: *nella convinzione che l'inversione di polarità favorisse il processo di rigenerazione, abbiamo posizionato l'innesto nel gap nervoso*

ruotandolo di 180° in due casi distinti caratterizzati da una lesione traumatica primitiva ed isolata del n. interosseo anteriore all'avambraccio e da una lesione inveterata del n. mediano all'avambraccio. Sulla scia dei risultati ottenuti in campo umano, è stato messo a punto un protocollo sperimentale su coniglio al fine di poter verificare attraverso indagine strumentale (elettromiografia – elettroneurografia intraoperatoria) e rilievi istologici, la qualità e la velocità della rigenerazione nervosa negli impianti a montaggio classico rispetto a quelli con inversione di polarità. La sperimentazione è stata condotta su coniglio New-Zeland maschio. Il programma di studio ha avuto la durata di un anno. **Risultati:** La metodologia da noi proposta aveva portato già ad un risultato estremamente singolare nell'uomo con un processo di neurotizzazione e reinnervazione sorprendentemente veloce e completa dei territori deficitari. Nell'animale da esperimento l'epifenomeno si è decisamente confermato ed i rilievi strumentali ed istologici hanno confermato appieno la validità della metodica. **Conclusioni:** La riparazione nervosa con "innesti a polarità invertita" è a nostro avviso la metodologia da seguire nelle lesioni nervose inveterate con perdita di sostanza. Rimane da chiarire quale sia la motivazione. **Scopo:** biochimica, elettrica e biologica che regola l'epifenomeno. Nel presente lavoro si avanzano ipotesi significative.

PAROLE CHIAVE

Innesti nervosi, inversione di polarità, flusso assonico, rigenerazione nervosa

INTRODUZIONE

Il ragionamento sperimentale di Claude Bernard (1) ci è sembrato quanto mai attuale nello scandire le tappe di questo lavoro sperimentale inerente la rigenerazione nervosa. In esso si raccoglie l'essenza della motivazione che ci ha indotti a pianificare quanto effettuato: "L'investigatore osserva un fatto per caso o con premeditazione; a proposito di questo fatto nella sua mente nasce un'idea; sulla base di questa idea egli ragiona, intuisce un esperimento, lo immagina e ne realizza le condizioni materiali; infine dall'esperimento risultano i nuovi fenomeni da osservare, e così via in un processo infinito".

SCOPO DELLA RICERCA

La riparazione delle lesioni nervose mediante innesti autologhi viene tradizionalmente eseguita posizionando l'innesto in corrispondenza del gap nervoso, così come è stato prelevato dalla sede donatrice. Secondo la maggior parte degli autori, non ha alcuna importanza l'orientamento dell'innesto per quanto concerne la sua capacità biologica rigenerante (2, 3). Alcuni autori raccomandano

l'inversione dell'innesto se non altro per limitare al minimo il fenomeno di fughe assonali nel caso in cui si debbano utilizzare innesti lunghi con numerosi rami collaterali (4, 5). Postulato che il flusso assonico all'interno della cellula nervosa segua una polarità intesa come gradiente di concentrazione di mediatori chimici e di fattori rigeneranti (growth factors), già in una precedente ricerca è stata verificata l'entità e la qualità della rigenerazione nervosa negli innesti nervosi in cui il gap tissutale era stato colmato mediante auto innesto ruotato di 180° rispetto alla posizione originaria dalla sede di prelievo. La precedente ricerca si era basata sulla esperienza scaturita dalla applicazione del metodo in due esseri umani, affetti da lesione inveterata di un tronco nervoso periferico con conseguente deficit funzionale invalidante (Fig. 1-3). Dopo l'applicazione, il recupero del deficit funzionale si era rivelato sorprendentemente rapido e completo (Fig. 4). Sulla scia dei risultati ottenuti in campo umano, è stato messo a punto un protocollo sperimentale su coniglio al fine di poter verificare attraverso indagine strumentale (elettromiografia – elettroneurografia intraoperatoria) e rilievi istologici, la qualità e la velocità della rigenerazione nervosa negli impianti a montaggio classico rispetto a quelli con inversione di polarità.



Figura 1. Deficit per lesione inveterata del n. interosseo anteriore



Figura 4. Ripresa funzionale completa in 5 mesi



Figura 2. Recisione inveterata dell'interosseo anteriore all'avambraccio



Figura 3. Riparazione con innesto di peroneo omolaterale (7 cm). Ruotato di 180° rispetto alla posizione originaria di prelievo

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 7 conigli New Zeland (NZW) maschi di 1,3 kg di peso.

Il protocollo sperimentale è stato condotto in accordo con il D.L. 116/92, attuazione della direttiva CEE 609/86, in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

Ciascun animale è stato anestetizzato con Zoletil® (Tiletamina + Zolazepam, 30 mg/kg) e Atropina solfato 0,5 mg/kg im. L'anestesia è stata mantenuta con Diprivan® (Propofol 0.2-0.4 mg/kg/min) in infusione continua attraverso la vena marginale dell'orecchio.

Ciascun arto posteriore è stato sottoposto a tricotomia, disinfezione e quindi ad esame elettromiografico basale. Il nervo peroneo è stato isolato previa incisione del bicipite femorale nella sua parte mediana, quindi è stato necessario scollare il muscolo adduttore della coscia ed il semimenbranoso mediante divaricatore (Fig. 5). Dopo l'isolamento del nervo peroneo, in 5 animali è stato eseguito anche l'esame elettroneurografico. Ciascun nervo peroneo è stato sezionato prima prossimamente e poi distalmente; il moncone così ottenuto, di circa 8 mm di lunghezza, è stato suturato, in un arto, mantenendo la polarità secondo il senso di escissione, mentre nell'arto controlaterale il moncone è stato suturato dopo rotazione su se stesso di 180° e quindi con polarità invertita (Fig. 6, 7). La sutura ha interessato prima il moncone prossimale e poi il di-

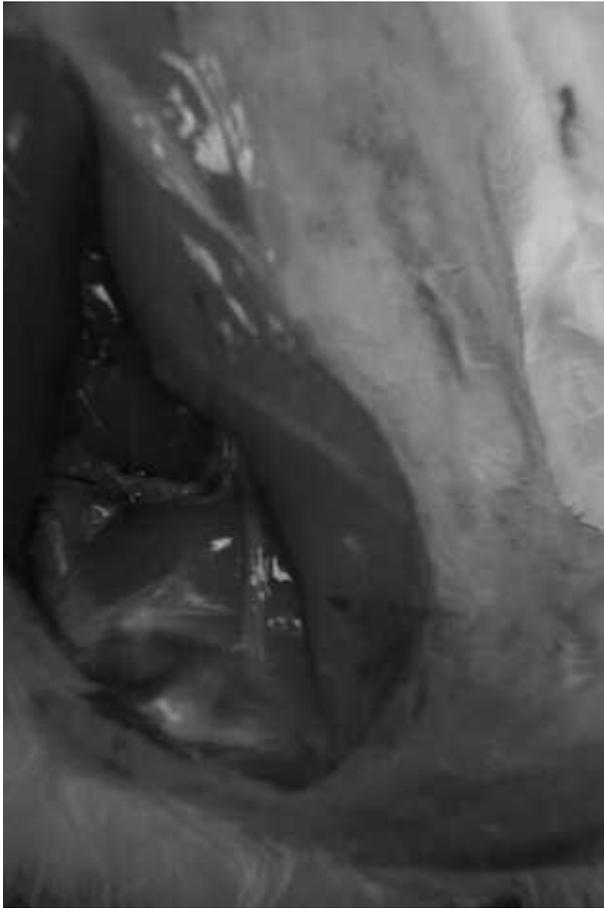


Figura 5. *Coniglio – n. peroneo comune (diametro mm 1,5)*

stale ed è stata eseguita con mezzi ottici sempre dallo stesso operatore applicando 2/3 punti staccati per ogni livello di sezione e utilizzando un filo Ethilon® 9/0. Terminata la sutura in cinque animali è stato ripetuto l'esame elettro-neurografico intraoperatorio. Le ferite chirurgiche sono state sutureate seguendo i piani anatomici utilizzando fili Dexon® 2/0. Terminata la sutura della ferita chirurgica è stato eseguito l'esame elettromiografico.

Nel periodo post operatorio ciascun animale è stato sottoposto a terapia antibiotica con Enrofloxacin (Baytril® 2.5 mg/kg) per 7 giorni ed analgesica con Flunixin Meglumina (Finadyne® 1mg/kg im) per tre giorni. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla sopravvivenza post operatoria: gruppo 1 (n=2) sopravvivenza 30 giorni, gruppo 2 (n=2) sopravvivenza 56 giorni, gruppo 3 (n=3) sopravvivenza 96 gg. Ad intervalli

regolari (7-14-30-45-60-90 giorni) sono stati eseguiti i controlli elettromiografici con l'animale in anestesia generale. Al termine del periodo di osservazione postoperatoria ciascun animale è stato anestetizzato e su ognuno di essi è stato eseguito l'esame elettromiografico ed elettro-neurografico direttamente sul nervo previo isolamento chirurgico. Terminato l'esame elettro-neurografico l'animale è stato soppresso e il nervo, precedentemente isolato è stato prelevato per tutta la sua lunghezza per l'indagine istologica.

ANALISI DEI SEGNALI EMG ED ENG

Il segnale elettromiografico è stato acquisito tramite sistema Biopac®, seguendo una procedura di posizionamento degli elettrodi, costituiti da aghi metallici, che ha consentito di formare un triangolo di Einthoven, in particolare l'elettrodo positivo è stato posizionato in posizione prossimale, quello negativo in posizione distale e in posizione intermedia tra i due è stato posizionato l'elettrodo di riferimento per eliminare il segnale di modo comune (acquisizione bipolare o differenziale).

Il segnale, acquisito con una frequenza di campionamento di 500 Hz, è stato successivamente elaborato, con la creazione di un opportuno programma in ambiente Matlab, con la procedura di seguito descritta per eliminare disturbi provenienti dalle rete elettrica di distribuzione o da eventuali interferenze elettromagnetiche dovute ai più vari strumenti da laboratorio.

In particolare il segnale è stato trattato con un filtro notch multiplo che consente di eliminare i disturbi in un intorno sufficientemente stretto delle frequenze multiple della frequenza di rete (50 Hz). È stato quindi ricavato il valore assoluto del segnale (segnale rettificato) e di questo è stato valutato il segnale l'involuppo mediante un filtro passa-basso. Il segnale involuppo rappresenta la migliore stima dell'effettiva forza sviluppata dal muscolo in contrazione.

Al fine di esprimere un giudizio sintetico ed omogeneo sui segnali acquisiti è stata messa a punto una procedura semi empirica di analisi, basata sia

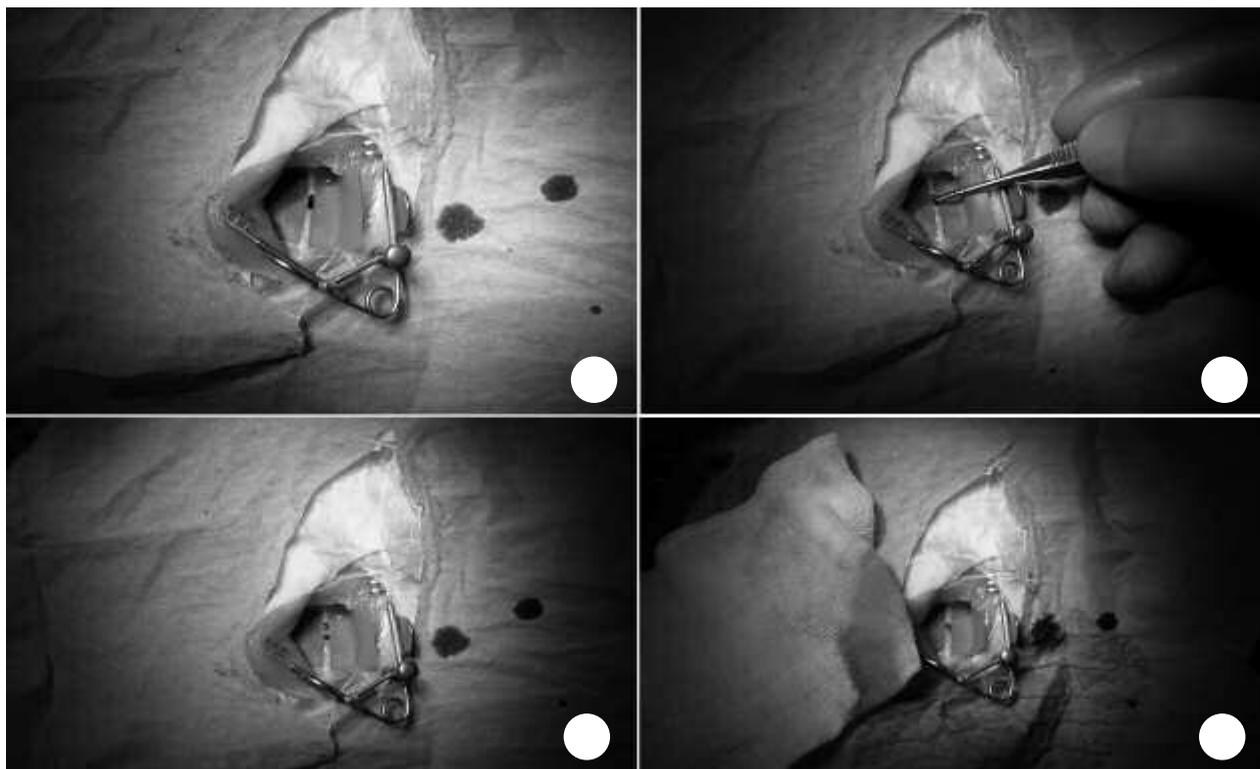


Figura 6. Sezione del n. peroneo comune per circa 8 mm. Sutura senza rotazione

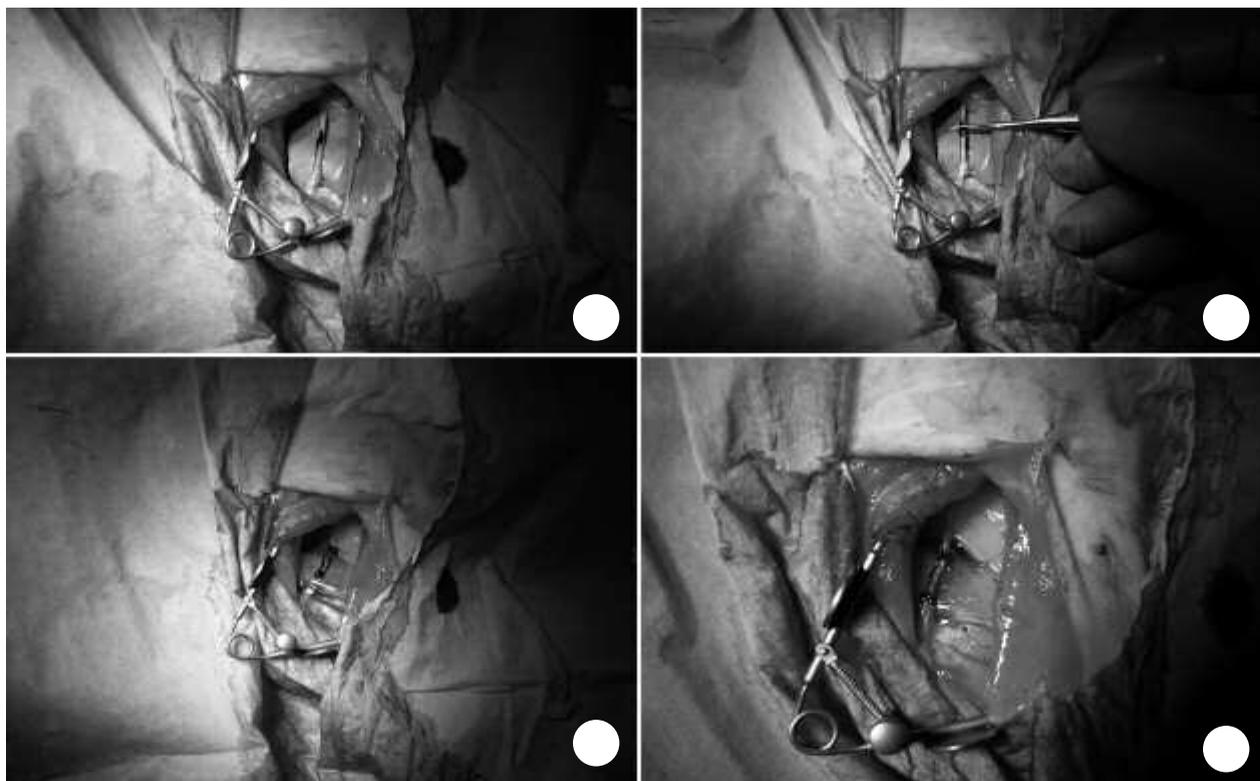


Figura 7. Sezione del n. peroneo comune per circa 8 mm e sutura dopo rotazione del segmento di 180°

sull'aspetto del tracciato sia su dati numerici opportunamente elaborati, come suggerito in letteratura.

Vengono di seguito descritti i termini di valutazione relativi ai segnali EMG:

- EMG (complessivo): analisi basata sull'aspetto del tracciato elettromiografico, ponendo particolare attenzione alla presenza di fenomeni di depolarizzazione in assenza di stimolazione esterna;
- intensità: valutazione dell'intensità del segnale acquisito e dell'inviluppo dello stesso, indipendentemente dalla loro forma; in particolare, è considerato intenso un segnale EMG superiore 1 mV mentre viene considerato debole un segnale inferiore a 0.1 mV, invece i parametri di riferimento per l'inviluppo (ottenuto tramite una media mobile su 100 campioni) sono stati fissati rispettivamente a 0.05 mV e 0.5 mV. Viene considerata positiva la presenza di un segnale intenso nelle 2, 3 settimane successive all'intervento poiché è indice di reinnervazione; la sua assenza comunque non pregiudica la riuscita dell'esperimento. Sono stati inoltre inseriti i grafici relativi all'evoluzione del valore massimo dell'inviluppo del segnale EMG;
- EMG (singolo twitch): studio della forma e dei parametri di un singolo spike opportunamente scelto;
- analisi inviluppo: studio dell'aspetto dell'inviluppo del segnale, basato principalmente sulla rapi-

dità dei fronti in salita e in discesa dei singoli spike e sulla presenza di "rumore di fondo"; quest'ultima caratteristica è direttamente collegata all'analisi dell'intensità dell'inviluppo;

- analisi spettro: valutazione delle forma dello spettro del segnale, e dell'andamento di alcune frequenze caratteristiche (es. frequenza media).

Le voci di giudizio per i tracciati ENG sono simili a quelli per EMG. A cambiare sono i parametri relativi all'intensità dei segnali: viene infatti considerata in questo caso solo una soglia, posta pari ad 1 mV.

Ogni voce prevede un voto che può assumere solo due valori. Per ogni misurazione, il voto complessivo, che sarà confrontato con quello relativo all'altro arto, è dato dalla somma "algebraica" dei voti relativi ai singoli punti. La decisione su quale arto presenti il quadro migliore è stata presa considerando la situazione globale e, ove possibile, integrando i risultati elettromiografici ed elettroneurografici. L'analisi dei segnali ENG è stata effettuata infatti solo per i conigli n. 7, n. 8, e n. 9 in quanto solo per questi animali sono disponibili i dati relativi all'operazione "finale". A causa del rumore presente in alcuni segnali non è stato sempre possibile esprimere una valutazione accurata e, in tal caso, il tracciato è stato considerato Non Giudicabile (NG).

Le schede relative ai singoli animali sono corredate con opportuni commenti.

Tabella 1. *Rabbit 2, EMG*

	Controllo	30 gg	45 gg
Dx (ruotato)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	+	-
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Sx (normale)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	+	-
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Confronto	=	=	=
Totale			=

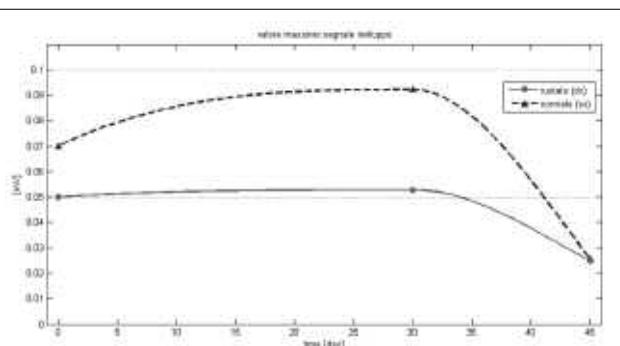


Figura 8.

Rabbit 2 (Tab. 1)

I valori relativi alla colonna controllo sono riferiti, solo nei conigli n. 2 e n. 3, ad un coniglio di riferimento, e quindi non influiscono sul giudizio finale. Complessivamente non è evidenziabile alcuna differenza significativa nei tracciati elettromiografici (Fig. 8).

Rabbit 3 (Tab. 2)

I due arti mostrano un comportamento simile, ma l'alto valore di picco del segnale a 30 gg dell'arto sinistro (ruotato) e soprattutto il valore estremamente basso del segnale a 45 gg dell'arto destro (normale) consentono di giudicare migliore il quadro complessivo dell'arto ruotato (Fig. 9).

Rabbit 5 (Tab. 3)

I risultati forniti dall'elettromiografia non consentono di esprimere un giudizio netto, a causa dell'anomalo segnale EMG a 30 gg relativo all'arto normale, senza il quale l'evoluzione dei vari parametri dei due arti sarebbe sostanzialmente identica. È possibile comunque giudicare positivo il "trend" di guarigione dell'arto con il nervo ruotato, sia osservando l'andamento del valore massimo dell'inviluppo sia considerando il fatto che, a differenza dell'altro arto

(EMG a 15 gg), non sono stati trovati fenomeni contrattili in assenza di stimolazione. Manca, infine, il riscontro elettroencefalografico, a causa del basso rapporto segnale-rumore che caratterizza i tracciati ENG relativi all'operazione "finale" (Fig. 10).

Rabbit 6 (Tab. 4)

I valori estremamente bassi del segnale EMG relativi all'arto normale, e il trend crescente mostrato dall'arto ruotato spingono a sbilanciarsi giudicando quest'ultimo migliore, anche se il periodo di osservazione è ridotto e non si ha una conferma elettroencefalografica (Fig. 11).

Rabbit 7 (Tab. 5, 6)

I tracciati EMG, ENG ed il trend dei parametri estratti da questi consentono di giudicare il quadro generale dell'arto "ruotato" molto migliore di quello relativo all'arto "normale" (Fig. 12, 13).

Rabbit 8 (Tab. 7, 8)

Il giudizio complessivo relativo al coniglio n. 8 è da considerare con riserva: risultano infatti non normali sia l'elevato valore dell'EMG a 90 gg sia il basso valore del segnale elettroencefalografico dell'operazione "finale" relativi all'arto con innesto ruota-

Tabella 2. Rabbit 3, EMG

	Controllo	30 gg	45 gg
Dx (normale)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	+	-
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Sx (ruotato)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	+	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Confronto	=	=	Sx
Totale			Sx

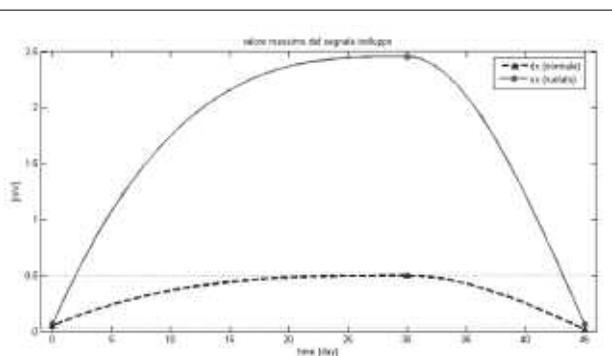


Figura 9.

Tabella 3. Rabbit 5, EMG

	Controllo	7 gg	15 gg	30 gg	33 gg
Dx (ruotato)					
EMG (complessivo)	-	+	+	+	+
Intensità	+	+	+	+	+
EMG (singolo twitch)	-	+	+	+	+
Inviluppo	-	+	+	+	+
Spettro	+	-	+	+	+
Sx (normale)					
EMG (complessivo)	+	+	-	+	+
Intensità	+	+	+	+	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+	+	+
Inviluppo	+	+	+	+	+
Spettro	-	+	+	+	+
Confronto	Sx	Sx	Dx	=	=
Totale					=

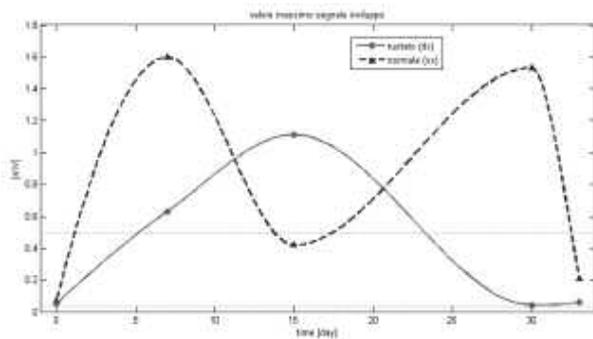


Figura 10.

to. Nel complesso, comunque il quadro complessivo dell'arto "ruotato" è sicuramente migliore rispetto a quello dell'arto "normale" (Fig. 13, 14).

Rabbit 9 (Tab. 9, 10, Fig. 16, 17)

Considerazioni analitiche

L'analisi complessiva di tutte voci di giudizio sull'intero periodo di sperimentazione, al termine del quale è stato ottenuto un buon recupero su en-

Tabella 4. Rabbit 6, EMG

	Controllo	7 gg	15 gg
Dx (ruotato)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	+	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Sx (normale)			
EMG (complessivo)	+	+	-
Intensità	-	+	-
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Confronto	=	=	Dx
Totale			Dx

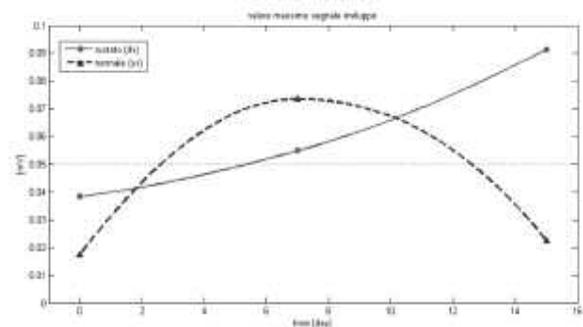


Figura 11.

Tabella 5. Rabbit 7, EMG

	Controllo	7 gg	15 gg	30 gg	45 gg	60 gg	90 gg
Dx (normale)							
EMG (complessivo)	+	-	+	+	+	NG	+
Intensità	+	-	+	+	+	NG	-
EMG (singolo twitch)	+	+	+	+	+	NG	+
Inviluppo	+	-	+	+	+	NG	+
Spettro	-	+	+	-	-	NG	+
Sx (ruotato)							
EMG (complessivo)	-	-	+	+	NG	NG	+
Intensità	-	-	+	+	NG	NG	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+	+	NG	NG	+
Inviluppo	+	-	+	+	NG	NG	+
Spettro	-	+	+	-	NG	NG	+
Confronto	Dx	=	=	=	NG	NG	Sx
Totale							Sx

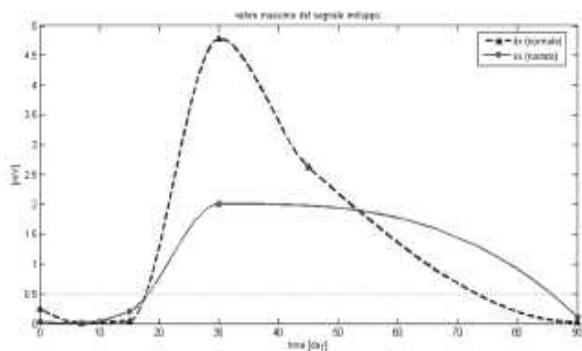


Figura 12.

trambi gli arti, mostra come l'arto "ruotato" abbia una "marcia in più".

Complessivamente, dall'analisi di 6 animali trattati per un periodo di sperimentazione completo, si evincono i risultati di seguito elencati:

- in 4 animali l'operazione di inversione del segmento nervoso ha portato ad un trend di recupero migliore rispetto all'arto non invertito (n. 3, n. 7, n. 8, n. 9). In questo numero è compreso, anche se con riserva, l'animale n. 8 in accordo con quanto espresso nella scheda di giudizio;

Tabella 6. Rabbit 7, EMG

	Controllo	Post	End
Dx (normale)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	-	-
EMG (singolo twitch)	+	+	-
Inviluppo	+	-	+
Sx (ruotato)			
EMG (complessivo)	+	+	+
Intensità	+	-	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+
Inviluppo	+	-	+
Confronto	=	=	Sx
Totale			Sx
EMG + ENG			Sx

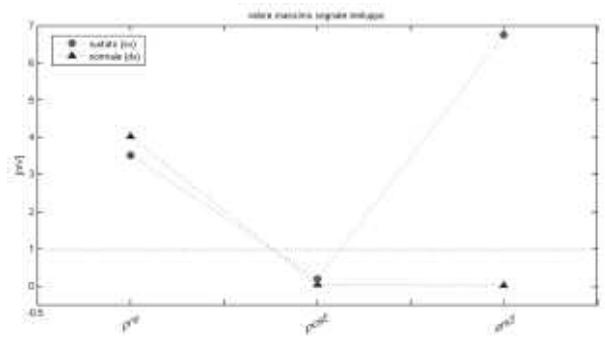


Figura 13.

Tabella 7. Rabbit 8, EMG

	Controllo	7 gg	15 gg	30 gg	45 gg	60 gg	90 gg
Dx (normale)							
EMG (complessivo)	+	+	+	+	NG	NG	+
Intensità	+	+	-	+	NG	NG	-
EMG (singolo twitch)	+	+	-	+	NG	NG	+
Inviluppo	+	+	+	+	NG	NG	+
Spettro	+	+	-	+	NG	NG	+
Sx (ruotato)							
EMG (complessivo)	+	+	+	+	NG	NG	+
Intensità	+	-	+	+	NG	NG	+
EMG (singolo twitch)	+	+	-	+	NG	NG	+
Inviluppo	+	+	+	+	NG	NG	+
Spettro	+	+	-	+	NG	NG	+
Confronto	=	Dx	Sx	=	NG	NG	Sx
Totale							Sx

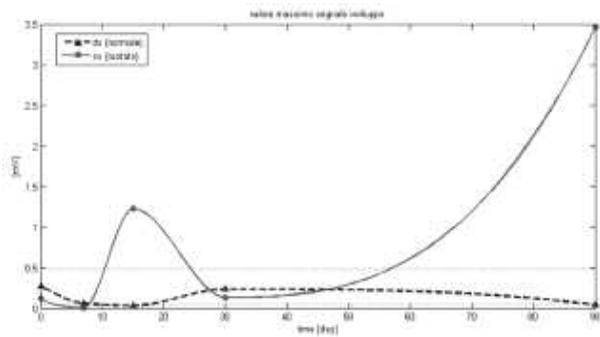


Figura 14.

- in 2 animali (n. 2, n. 5) il trend di recupero è sostanzialmente analogo su entrambi gli arti;
- in nessun caso è stato riscontrato un recupero migliore da parte dell'arto con l'innesto suturato in posizione "normale".

A questi bisogna aggiungere il coniglio n. 6, in cui il recupero nell'arto con il nervo ruotato ha mostrato un andamento migliore rispetto all'altro, ma il breve periodo di sperimentazione non consente di inserirlo nel gruppo degli animali trattati.

Tabella 8. Rabbit 7, EMG

	Controllo	Post	End
Dx (normale)			
ENG (complessivo)	+	-	+
Intensità	-	-	-
Inviluppo	+	-	-
Spettro	+	-	-
Sx (ruotato)			
ENG (complessivo)	+	+	+
Intensità	-	-	-
Inviluppo	+	+	+
Spettro	-	+	+
Confronto	Sx	Sx	Sx
Totale			Sx
EMG + ENG			Sx (?)

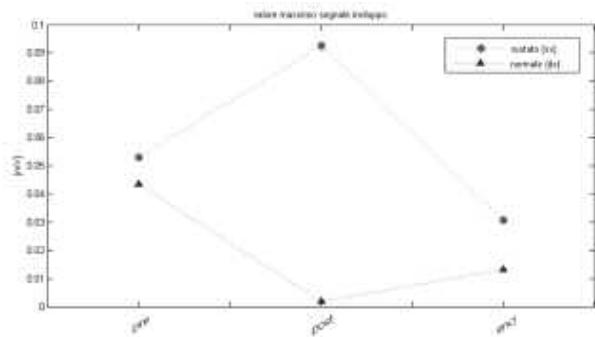


Figura 15.

Tabella 9. Rabbit 9, EMG

	Controllo	7 gg	15 gg	30 gg	45 gg	60 gg	90 gg
Dx (ruotato)							
EMG (complessivo)	+	+	+	+	NG	NG	+
Intensità	+	+	+	+	NG	NG	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+	+	NG	NG	+
Inviluppo	+	+	+	+	NG	NG	+
Spettro	+	+	+	+	NG	NG	+
Sx (normale)							
EMG (complessivo)	+	+	+	+	NG	NG	+
Intensità	-	-	+	-	NG	NG	+
EMG (singolo twitch)	+	+	+	+	NG	NG	+
Inviluppo	+	+	+	+	NG	NG	+
Spettro	+	+	+	+	NG	NG	+
Confronto	=	Dx	=	Dx	NG	NG	=
Totale							Dx

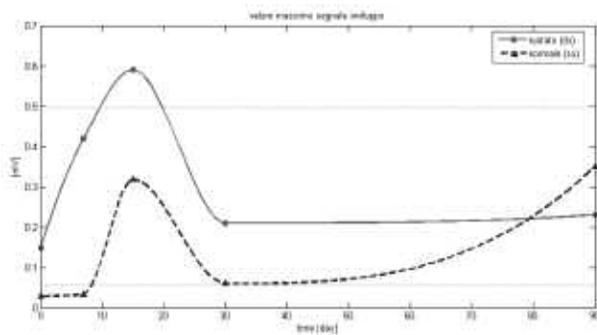


Figura 16.

INDAGINE ISTOLOGICA

Immediatamente dopo l'eutanasia di ogni soggetto sono stati prelevati i nervi peronei destro e sinistro e sono stati fissati in una soluzione al 2, 5% di glutaraldeide. I segmenti di nervo sono stati posti in delicata tensione su un supporto di legno mediante l'infissione di due aghi ai capi del nervo stesso, dopo aver opportunamente identificato il capo prossimale e quello distale. Alla fissazione in glutaraldeide è seguita la riduzione del campione e

Tabella 10. Rabbit 9, ENG

	Controllo	Post	End
Dx (ruotato)			
ENG (complessivo)	+	+	+
Intensità	-	+	+
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	-	+
Sx (normale)			
ENG (complessivo)	+	+	+
Intensità	-	-	-
Inviluppo	+	+	+
Spettro	+	+	+
Confronto	=	=	Dx
Totale			Dx
EMG + ENG			Dx

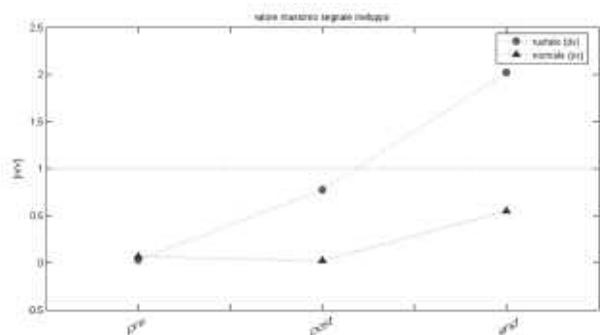


Figura 17.

la successiva post-fissazione in una soluzione all'1% di tetrossido d'osmio. In questa fase, sono stati campionati segmenti della lunghezza di circa 2 mm sia dalla porzione di nervo prossimale alla neurotmesi prossimale, sia dalla porzione distale alla neurotmesi distale. Le fasi successive hanno previsto la disidratazione e l'inclusione in resina epossidica dei segmenti prossimali e distali di ogni nervo. I blocchetti sono stati sezionati allo spessore di 1 µm e le sezioni sono state colorate con una soluzione di blu di toluidina e osservate al microscopio ottico.

RISULTATI

L'osservazione istologica dei segmenti prossimali e distali di ogni nervo è stata indirizzata alla valutazione complessiva della morfologia del nervo, alla

valutazione del numero delle fibre di grosso e medio diametro, al loro grado di mielinizzazione, alla presenza di fibre degenerate e in fase di rigenerazione, alla presenza di gemmazioni assonali, nonché all'evidenziazione di proliferazione di tessuto connettivo e presenza di edema. I risultati sono stati riassunti nella tabella 11.

Le porzioni prossimali di tutti i nervi esaminati mostrano caratteri morfologici sovrapponibili, rappresentati da moderata perdita di fibre di grosso e medio diametro, degenerazione assonale multifocale prevalentemente a carico delle fibre di grosso diametro, presenza di numerose gemmazioni assonali prevalentemente nei conigli n. 2 e n. 3 e numerose fibre rigeneranti caratterizzate da una guaina mielinica matura, ma di spessore non adeguato al calibro assonale. I segmenti distali generalmente

Tabella 11.

Coniglio	n. 2				n. 3				n. 5			
	prox		distale		prox		distale		prox		distale	
Segmento di nervo	dx	sx	dx	sx	dx	sx	dx	sx	dx	sx	dx	sx
Lato												
N. fibre grosso e medio diametro	++	++	-	-	++	++	-	-	+++	+	-	-
Degenerazione assonale	+	-	+	++	+	-	-	+	++	+	++	+
Gemmazioni assonali	++	+++	-	+	++	++	-	+	+	+	++	-
Fibre rigeneranti	+++	++	++	++	++	++	+++ ^b	++	++	++	+++	++ ^b
Tessuto connettivo	-	-	-	+ ^a	-	-	++ ^a	+ ^a	-	-	++ ^a	+++
Edema	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Coniglio	n. 6		n. 7		n. 8		n. 9						
	prox	dist	prox	dist	prox	dist	prox	dist					
Segmento di nervo	dx	sx	dx	sx	dx	sx	dx	sx					
Lato													
N. fibre grosso e medio diametro	++	+++	+	-	++	++	-	-	+++	+++	-	-	
Degenerazione assonale	++	++	++	+++	++	++	+	+	++	+	+	++	
Gemmazioni assonali	++	++	++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	
Fibre rigeneranti	++	++	++	+++ ^b	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	
Tessuto connettivo	-	-	+ ^a	++ ^a	-	-	+ / ++ ^a	-	-	-	-	+	++
Edema	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	++	+	++

Legenda: - = assenza; + = grado lieve; ++ = grado moderato; +++ = grado marcato; a = prevalente localizzazione nell'epinevrrio; b = scarsa componente mielinica; prox = prossimale; dist = distale

mostrano un epinevrio con fibre rigeneranti ectopiche a guaina mielinica sottile, riunite in cluster.

Nel coniglio n. 2 in entrambe le porzioni distali non si osservano fibre di grosso e medio diametro ed è evidente un moderato numero di fibre rigeneranti. Nel campione distale sinistro sono maggiori sia gli aspetti degenerativi assonali, sia la proliferazione di tessuto connettivo epinevriale e si osservano rare gemmazioni assonali.

Nel coniglio n. 3 la porzione distale del nervo peroneo destro mostra i caratteri morfologici di un nervo neoformato con presenza nell'endonevrio di gruppi di fibre rigeneranti con guaina mielinica molto sottile. Il perinevrio risulta discontinuo e le fibre rigeneranti si disperdono nell'epinevrio che mostra moderato aumento di tessuto connettivo. La porzione distale sinistra mostra scarsa proliferazione di tessuto connettivo epinevriale, un moderato grado di fibre rigeneranti con guaina mielinica matura e rare gemmazioni assonali.

Entrambe le porzioni prossimali dei nervi del coniglio n. 5 mostrano lieve edema subperinevriale, oltre alle caratteristiche sopra descritte. Il segmento distale sinistro mostra morfologia delle fibre rigeneranti simile al campione distale destro del coniglio n. 3, caratterizzata da rivestimento mielinico molto sottile con una marcata proliferazione di tessuto connettivo endonevriale. Il campione distale destro mostra marcata presenza di fibre rigeneranti con guaina mielinica matura e un moderato numero di gemmazioni assonali. La proliferazione di tessuto connettivo è moderata, ma coinvolge l'epinevrio.

La porzione distale del nervo peroneo sinistro del coniglio n. 6 mostra l'aspetto di un nervo neoformato con scarsa componente mielinica, presenta numerose degenerazioni assonali, edema subperinevriale, oltre a moderata proliferazione di tessuto connettivo nell'epinevrio. Il campione distale destro presenta lieve proliferazione di tessuto connettivo epinevriale e moderata presenza di fibre rigeneranti con mielina matura, oltre a un moderato numero di gemmazioni assonali. È inoltre evidente un minor numero di degenerazioni assonali rispetto al campione sinistro.

Nel coniglio n. 7 entrambi i campioni distali mostrano moderata presenza di fibre rigeneranti

con guaina mielinica matura e simili aspetti degenerativi assonali. Il campione destro mostra un numero maggiore di gemmazioni rispetto al campione sinistro, associato a moderato edema subperinevriale e proliferazione di tessuto connettivo nell'epinevrio e nell'endonevrio.

I campioni distali dei nervi del coniglio n. 8 mostrano simili aspetti rigenerativi, anche se nel campione destro risulta maggiore l'edema e si osserva un maggior numero di degenerazioni assonali.

Nel coniglio n. 9 tutti i segmenti osservati mostrano moderata presenza di edema subperinevriale. Il campione distale destro mostra un maggior numero di fibre rigeneranti con guaina mielinica matura, un minor numero di degenerazioni assonali e una minore proliferazione di tessuto connettivo endonevriale rispetto al campione sinistro.

CONSIDERAZIONI ANALITICHE

I conigli n. 3, n. 5, n. 6, n. 7 e n. 9 mostrano una migliore rigenerazione nel campione ruotato. Generalmente i rispettivi segmenti distali sono formati da fascetti multipli con perinevrio continuo ed endonevrio con fibre rigeneranti a guaina mielinica matura, ma sottile rispetto al calibro assonale (Fig. 18). Nei segmenti distali dei campioni non ruotati l'aspetto morfologico è talvolta alterato (n. 3) e si osserva una maggiore proliferazione di tessuto con-

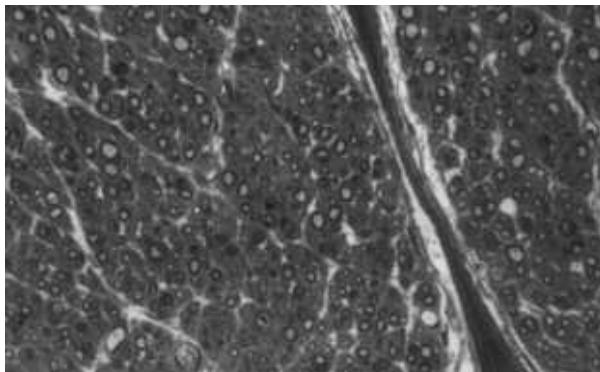


Figura 18. *Nervo peroneo distale destro (ruotato). Si osservano numerose fibre rigeneranti di medio e piccolo diametro con guaina mielinica sottile rispetto al calibro assonale, gemmazioni assonali multifocali e rare degenerazioni assonali.*

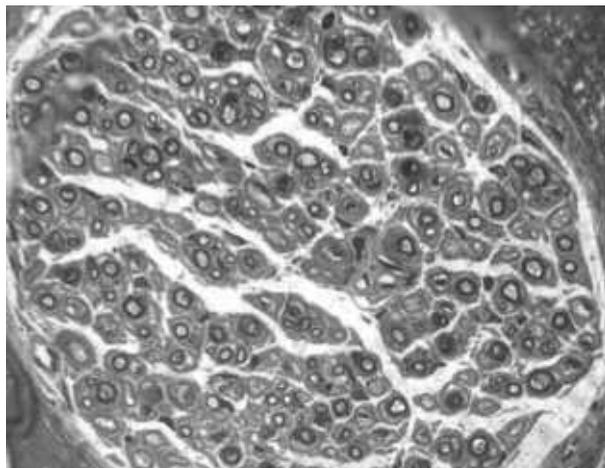


Figura 19. *Nervo peroneo distale sinistro (non ruotato). Si osserva un moderato numero di fibre rigeneranti con guaina mielinica sottile rispetto al calibro assonale, rare gemmazioni assionali e marcata proliferazione delle cellule di Schwann prive di assone. È evidente anche lieve fibrosi endonevriale.*

nettivo epinevriale e/o endonevriale (n. 3, n. 5, n. 6, n. 7, n. 9). Inoltre i segmenti distali non ruotati di questi soggetti hanno l'aspetto di nervi neoformati con gruppi di fibre a guaina mielinica sottile (Fig. 19). Nel coniglio n. 7 gli aspetti rigenerativi sono simili nei campioni distali sinistro e destro, ma quest'ultimo è risultato avere maggior edema subperinevriale e maggior fibrosi endo ed epinevriale. I conigli n. 2 e n. 8 non mostrano significative differenze tra i campioni distali destro e sinistro.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La pianificazione della sperimentazione è stata condotta con estremo rigore scientifico e la sua singolarità è dovuta al fatto che contrariamente a quanto avviene di norma, è stata condotta nell'animale da esperimento per validare una applicazione e un metodo già effettuato sull'essere umano. Di tutti i componenti del gruppo di ricerca, uno soltanto era a conoscenza della mappatura degli innesti ruotati, al fine di eliminare dalla valutazione finale eventuali componenti soggettive che avrebbero potuto invalidare il risultato della ricerca stessa. La metodologia da noi proposta che aveva portato già ad un risulta-

to estremamente singolare nell'uomo con un processo di neurotizzazione e reinnervazione sorprendentemente veloce e completo dei territori deficitari, si è pienamente e decisamente confermata nell'animale da esperimento e i rilievi strumentali ed istologici hanno confermato appieno la validità della metodica. La polarità, espressa come gradiente di concentrazione di mediatori chimici gioca a nostro avviso un fattore estremamente importante nel processo di rigenerazione della fibra nervosa. Gli studi di Weiss (6) hanno già accertato come all'interno della cellula nervosa esista un flusso di tali mediatori che pervadono l'unità cellulare nel suo insieme, ma è a livello della sinapsi che si concentra la massima parte di tali mediatori. Essi sono responsabili della plasticità della cellula nervosa che continuamente si adatta e si modifica attraverso la produzione di segnali elettrici che sono poi alla base della fisiologia del sistema nervoso. La riparazione di perdite di sostanza ha incontrato momenti di euforia e di delusione e a tutt'oggi, anche dopo una riparazione accurata sia per profusione di mezzi e di capacità, non si assiste ad un recupero completo qualitativo e quantitativo della funzione (7, 8) anche se negli ultimi tempi la tecnica di tubulizzazione di muscolo in vena ha dato risultati più confortanti (9-11). A tal punto, esaurita la prima fase della sperimentazione, rimane da chiarire perchè un innesto nervoso invertito di polarità porta ad un processo di reinnervazione più rapido e completo. Anche se ampiamente studiato (12), sarà necessario investigare nelle pieghe più recondite del processo di reinnervazione, studiando le modificazioni chimiche, bioelettriche ed istologiche con particolare selettività anche della componente cellulare staminale presente a livello delle superfici di sezione del tronco nervoso. È indubbiamente un campo totalmente oscuro della scienza medica, e riuscire a capire questo meccanismo porterebbe conoscenza alla fisiopatologia del sistema nervoso. La ricaduta in campo umano è facilmente intuibile, basti pensare a quanti tentativi siano stati fatti nelle riparazioni delle lesioni del midollo spinale. La scienza medica non si è mai spiegata il perchè dopo l'assemblamento di numerosi innesti nervosi in lesioni del midollo spinale, il processo di neurotizzazione si arrestasse alla prima sutura senza possibilità di superare la se-

conda sutura con risultati poveri e deludenti per ciò che riguardava la ripresa funzionale. E ancora, nelle riparazioni inveterate con perdite di sostanza nervosa del sistema nervoso periferico, avere la certezza basata su seria base scientifica che l'inversione di polarità di un innesto nervoso sia garanzia di ripresa rigenerativa completa comporterebbe minore impegno manuale da parte del chirurgo, minore impegno da parte del paziente, minore impegno finanziario nell'impianto di succedanei neuroconduttori che possano facilitare il processo di neurotizzazione. È indubbio che il programma sperimentale non si esaurisce con questa prima fase, ma continua per capire quale sia la motivazione che regola l'epifenomeno. Esso è indubbiamente complesso e richiede l'impegno di risorse umane e tecnico scientifiche di rilievo.

BIBLIOGRAFIA

1. Guida Medica, Storia della Medicina 2. Fabbri Editori 1964; XVIII: 521-4.
2. Brunelli GA. Lesioni nervose dell'arto superiore. Edimes, 2006: 49-50.
3. Oberlin C. Manuel de chirurgie du membre supérieur. Elsevier, 186-188.
4. Battiston B, Tos P. Tecniche di riparazione nervosa. In: Trattato di chirurgia della mano, Vol 1, Verduci Ed, 2006: 623-32.
5. Caserta G, Landi A, Leti Acciaro A, et al. Tecnica Ortopedica Internazionale – Le lesioni nervose periferiche. 2002: 1-7.
6. Weiss P, Hiscoe HB. Experiments on the mechanism of nerve growth. J Exp Zool 1948; 107: 315-93.
7. Rampoldi M, Cammarano G, De Marinis G, Bonica J, De Peppo M, Manetta L. Gli innesti nervosi autologhi nella riparazione degli esiti delle lesioni dei nervi periferici Riv Chir Mano 1995; 32: 109-15.
8. (Celli L, Balli A, Montorsi A, et al. Gli insuccessi nelle neurorafie ed innesti nervosi in chirurgia della mano. Riv Chir Mano 1981; 18: 351-73.
9. Brunelli G, Battiston B, Vigasio A, Marocolo D. Bridging nerve defects with combined skeletal and vein conduits. Microsurgery 1993; 14: 247-51.
10. Battiston B, Pasquali M, Ferrero S, Calcagni M, Brunelli G. The use of vein filled with muscle in repair of nerve defects. 6th Congress of IFSSH, Helsinki, July 3-7, 1995.
11. Leccese G, Tortora A. Tubulizzazione biologica autologa secondo Battiston nella riparazione dei difetti nervosi: nostra esperienza preliminare. Riv Chir Mano 1997; 34: 305-10.
12. Lundborg G. Nerve injuries and nerve repair. Churchill Livingstone, London, 1988.