

PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER LO STUDIO DELLE ADERENZE EPI-PERINEURALI POST CHIRURGICHE.

A. CROSIO, M. CHERUBINO, M. IZZO, C. ARRIGONI, S. DEVIVO, A. MASSÈ, S. GEUNA, P. TOS

Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, Università degli Studi Insubria/Varese, Via J.H. Dunant 3, Varese (VA).

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, sezione di Anatomia Umana. AOU San Luigi Gonzaga, Regione Gonzole 10, Orbassano (TO)

Experimental protocol for the study and the standardization of post surgical epi-perineural adhesions

SUMMARY

Purpose: The post surgical perineural adhesions are extensively studied and induce considerable clinical and economical consequences. Many authors use animal models to evaluate the effectiveness of synthetic and biocompatible devices in reducing post surgical perineural adhesions. There are described a lot of methods to create perineural scars, but there's no a standardized protocol to do that. Our work intends to compare some methods reported in other studies in order to determine which method is capable of giving rise to the top perineural adhesion and standardize valid and repeatable protocol for the study of postoperative perineural scar. **Methods:** We used 25 athymic nude mice. On every mice we worked on both sciatic nerves. We tested 2 methods of lesion: the first reaction was created by burning muscle bed (17 nerves), the second by scratching the nerve and the muscle bed using a cotton swab (17 nerves); we use also a control group (16 nerves). The mice were sacrificed 3 weeks after surgery. In each group perineural fibrotic reaction was investigated by measurement of peak force required to dissociate the nerve from the muscle bed, using an instrument we designed for, and we perform histological analysis using Sirius Red staining. The control group was subjected to histological and biomechanical evaluation too. **Results:** Both methods under study give rise to the formation of fibrous tissue. The biomechanical results are expressed in grams needed to dislocate nerve from muscular bed. Burning groups shows a mean peak pull out force of 62,62g, scratching group 47,17g and control group 37,17g. Statistical analysis shows statistically significant difference between burning group and control group; the comparison between the scratching group and control group was not statistically different. Histological analysis shows that both methods rise up scar tissue, but with different pattern. **Conclusion:** The burning methods was the best method to create experimental perineural scar tissue according to biomechanical and histological analysis. The protocol used to operate the experimental animals was easy and quick to perform. The instrument created to carry out biomechanical analysis was cheap and effective. We found that doing only the histological analysis perineural scar could underestimate the intensity of the scar because in both groups we had scar tissue formation, so a complete analysis of perineural scar must always include biomechanical evaluation. Nevertheless to create a standardized method we need to enlarge the sample and we have to perform the study on normal mice. This model could be use to studying the efficacy of anti adhesion materials in pre clinical area to understand which material show the best anti-adherence property. Riv Chir Mano 2013; 1: 48-53

KEY WORDS

Compressive syndromes, perineural scar.

RIASSUNTO

Scopo dello studio: Le aderenze post chirurgiche sono un argomento estesamente studiato e sono inoltre responsabili di conseguenze notevoli dal punto di vista clinico ed economico. Molti autori utilizzano modelli animali per valutare l'efficacia dei dispositivi antiaderenziali sintetici e e biocompatibili nel ridurre la cicatrizzazione post chirurgica. In letteratura sono descritti metodi molto diversi per creare una cicatrice perineurale sperimentale, ma non esiste a tutt'oggi un protocollo standard. Il nostro lavoro ha come scopo comparare alcuni dei metodi riportati in altri studi per determinare quale metodo sia in grado di dare origine alla cicatrice di maggiore entità e standardizzare un metodo valido e ripetibile per studiare la reazione fibrotica perineurale post chirurgica. **Materiali e metodi:** Abbiamo utilizzato 25 topi nudi atimici. Per ogni animale si è intervenuto su entrambi i nervi sciatici. Abbiamo testato 2 diversi metodi di lesione: il primo consiste nella cauterizzazione del letto muscolare (17 nervi), il secondo consta nello sfregamento della superficie nervosa e del letto muscolare mediante un batuffolo di cotone (17 nervi); abbiamo anche creato un gruppo di controllo con 16 nervi. I topi sono stati sacrificati dopo 3 settimane dall'intervento. In ogni gruppo la reazione fibrotica formatasi è stata analizzata mediante la misurazione della forza massima necessaria a dissociare il nervo dal letto muscolare circostante attraverso uno strumento da noi ideato e tramite l'analisi istologica attraverso la colorazione con Rosso Siria. Anche il gruppo di controllo è stato sottoposto ad analisi biomeccanica e istologica. **Risultati:** Entrambi i metodi in studio inducono una reazione cicatriziale perineurale. L'analisi biomeccanica è espressa come grammi di acqua necessari a dissociare il nervo dal muscolo circostante. Il gruppo di cauterizzazione mostra una forza massima media di 62,62g, il gruppo di sfregamento 47,17g, il gruppo di controllo 37,17g. Vi è una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di cauterizzazione e il gruppo di controllo; non vi è una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di sfregamento e il controllo. L'analisi istologica dimostra che entrambi i metodi in studio inducono una cicatrice perineurale, ma con pattern differente. **Conclusione:** la cauterizzazione del letto muscolare si rivela essere il metodo migliore per dare origine a una cicatrice perineurale sperimentale dopo analisi istologica e biomeccanica. Il protocollo realizzato appare molto semplice da realizzare e rapido. Lo strumento creato per eseguire l'analisi biomeccanica è inoltre economico ed altresì efficace. Riteniamo inoltre che eseguendo esclusivamente l'analisi istologica la cicatrice perineurale venga sottostimata poiché in entrambi i gruppi si è visto formazione di tessuto cicatriziale, pertanto una analisi completa del tessuto cicatriziale deve comprendere sempre la valutazione biomeccanica. Nonostante tutto per creare un modello standardizzato è necessario allargare il campione ed eseguire la medesima analisi su topi normali. Questo modello può essere impiegato per studiare l'efficacia dei dispositivi anti aderenziali in area pre clinica e capire quale dispositivo mostra la migliore efficacia antiaderenziale.

PAROLE CHIAVE

Cicatrice perineurale, sindromi compressive

INTRODUZIONE

La formazione di una cicatrice epi-perineurale è una delle principali cause di recidiva delle sindromi nervose compressive (1). Una possibile strategia per limitare la formazione di cicatrici epi-perineurali post chirurgiche è rappresentata dall'applicazione di dispositivi antiaderenziali durante l'intervento di neuretomi. Prima della loro introduzione clinica, i dispositivi antiaderenziali devono essere studiati in modelli pre-clinici per valutarne l'efficacia e la biocompatibilità. Differenti tecniche sono state impiegate per simulare una reazione fibrotica epi-perineurale e non

esiste ad oggi una metodica standard per la realizzazione di fibrosi epi-perineurale in modelli sperimentali pre-clinici (2). Ciò rende impossibile definire quale dispositivo abbia il maggior potenziale antiaderenziale in ambito pre-clinico. Dall'analisi della letteratura emergono due principali tipologie di lesione per indurre una reazione fibrotica epi-perineurale: la prima consiste nella lesione diretta della superficie neurale (2, 3, 6, 7), la seconda nella lesione del letto muscolo-fasciale circostante (3, 4, 8).

Le metodologie utilizzate per la valutazione dell'entità delle aderenze è altrettanto variabile e si basano principalmente sull'analisi morfologica, macro

e microscopica (5, 6), sull'analisi biomeccanica e su quella elettrofisiologica (3, 7, 8).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di definire un modello sperimentale preclinico di riferimento per la valutazione dei dispositivi antiaderenziali, mettendo a confronto la reazione fibrotica epi-perineurale che insorge dopo lesione della sola superficie nervosa con quella che insorge dopo lesione del letto muscolo-fasciale circostante. La valutazione è stata condotta tramite analisi biomeccanica e istologica.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale.

Lo studio è stato condotto su 25 topi nudi ceppo CD1 maschi adulti (5 settimane) (Charls River Laboratories) del peso di circa 30g ciascuno. Lo studio è stato condotto sul nervo sciatico. Gli animali sono stati sottoposti ad intervento chirurgico bilaterale dopo circa sette giorni dall'arrivo in stabulario. Si sono quindi creati in modo random tre gruppi sperimentali come riportato in tabella (Tab 1). Gruppo 1: cauterizzazione del letto muscolo-fasciale (17 nervi), Gruppo 2: scarificazione per sfregamento diretto dell'epinevrio (17 nervi); Gruppo 3: controllo non lesionato (16 nervi).

Intervento chirurgico

Dopo anestesia generale intraperitoneale con Ketamina 100mg/Kg + Xylazina 15mg/Kg e sotto ingrandimento microscopico, si è proceduto ad esporre il nervo sciatico dell'animale mediante dis-

sezione dei muscoli gluteo e bicipite femorale. Dopo l'esposizione del nervo si è proceduto all'applicazione dei due metodi di induzione cicatriziale:

- Gruppo 1 si è eseguita la cauterizzazione tessuto muscolare circostante il nervo sciatico senza apportare una lesione diretta del nervo.
- Gruppo 2 si è eseguita la scarificazione per sfregamento diretto della superficie nervo sciatico mediante cottonfioc, ripetuto per 20 volte.
- Gruppo 3 si è esposto il nervo senza apportare alcun tipo di lesione e richiudento immediatamente la ferita chirurgica.

La cute è stata chiusa mediante filo di sutura monofilamento 3-0.

In figura (Fig. 1a e b) sono illustrati i due metodi utilizzati.

Monitoraggio post operatorio

Nel periodo post operatorio gli animali sono stati custoditi in condizioni standard di luminosità ed è stato dato accesso illimitato a cibo e acqua. Gli

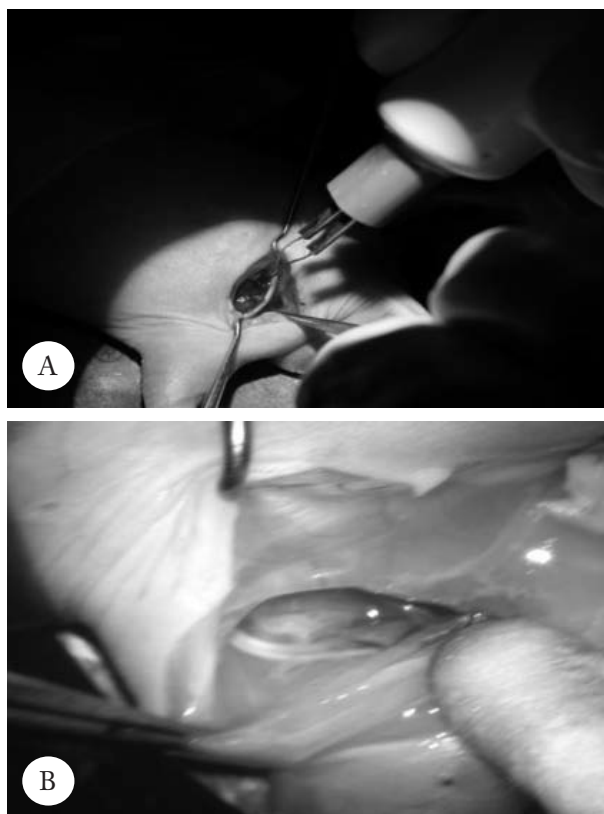


Figura 1. *Ae B Metodi di lesione*

Tabella 1. *Suddivisione gruppi secondo metodo di lesione e metodo di analisi*

Metodo Analisi	Biomeccanica	Istologica	TOT
Gruppo 1 Cauterizzazione	13	4	17
Gruppo 2 Scarificazione	12	5	17
Gruppo 3 Controllo	12	4	16
TOT	37	13	

animali sono stati sacrificati dopo 3 settimane dall'intervento mediante esposizione ad aria sovrassatura di CO₂.

Analisi biomeccanica

L'analisi biomeccanica è stata condotta attraverso la misurazione della forza necessaria a dislocare il nervo dal tessuto cicatriziale circostante come già proposto in altri lavori (2, 7, 8). Il nervo sciatico è stato separato a monte e a valle del punto di lesione così che rimanesse connesso al letto muscolare esclusivamente attraverso la reazione fibrotica. Il capo prossimale è stato connesso ad un contenitore sospeso nel quale è stata fatta fluire acqua in modo costante (100mL/min) attraverso un deflussore da flebo. La tensione sul nervo aumentava progressivamente all'aumentare del volume di acqua contenuta nel cestello. Si è andata infine a misurare la quantità di acqua, espressa in grammi, necessaria a distaccare il nervo dal letto muscolare.

In figura (Fig. 2) viene schematizzato lo strumento impiegato per l'analisi biomeccanica.

Analisi istologica

L'analisi istologica è stata condotta dopo aver prelevato en bloc i muscoli della loggia posteriore della coscia (con all'interno il nervo sciatico). I campioni sono stati quindi fissati in paraformaldeide, inclusi in paraffina e sezionati allestendo sezioni trasversali (spessore 10 µm) colorate tramite Rosso Siria e Acido

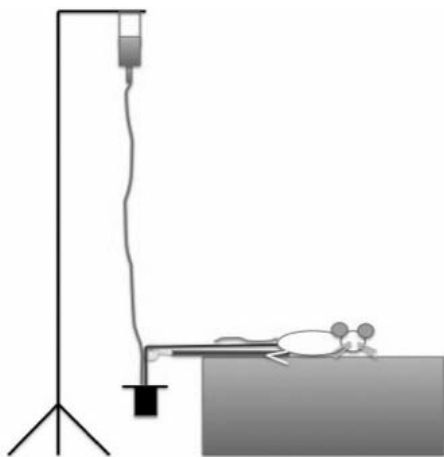


Figura 2. Rappresentazione schematic dello strumento utilizzato per l'analisi biomeccanica schematica.

Picrico come descritto in precedenza (9).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati biomeccanici è stata condotta mediante il Test T a 2 code.

RISULTATI

Analisi biomeccanica

I risultati dell'analisi biomeccanica, espressi in g di acqua necessari a dissociare il nervo dal muscolo circostante, sono riportati nel grafico (Fig. 3).

L'analisi statistica evidenzia una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di cauterizzazione e il gruppo controllo con un $p < 0.05$. Non vi è invece differenza statisticamente significativa tra il gruppo di sfregamento e il gruppo controllo ($p > 0.05$).

Analisi istologica

L'analisi istologica ha messo in evidenza la formazione di tessuto cicatriziale dopo applicazione di entrambe le metodiche in studio in comparazione con i controlli dove non si evidenzia tessuto cicatriziale patologico. La distribuzione del tessuto fibroso è differente a seconda del metodo applicato: dopo cauterizzazione del letto muscolo-fasciale circostante il tessuto fibrotico infiltra non solo la superficie neurale ma anche il tessuto muscolare. In seguito a lesione per sfregamento della superficie neurale invece la reazione fibrotica si sviluppa tra la fascia perineurale e l'epinevrio. È impossibile tuttavia individuare, a livello morfologico, differenze quantitative

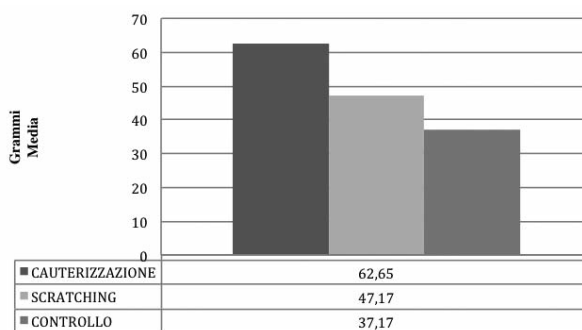


Figura 3. Risultati analisi biomeccanica. Media di g necessaria ad ottenere la dissociazione del nervo dal letto muscolare

in termini di infiltrazione fibrotica tra i due gruppi sperimentali a causa dell'elevata variabilità istologica tra i diversi animali ed anche, nel medesimo animale, nei vari tratti lungo il decorso del nervo.

In figura (Fig. 4) sono riportate sezioni di ogni singolo metodo applicato.

DISCUSSIONE

I risultati biomeccanici da noi ottenuti evidenziano che la reazione fibrotica indotta dalla cauterizzazione del letto muscolo-fasciale è maggiore rispetto alla cicatrice che si sviluppa dopo lesione diretta per sfregamento della superficie neurale. Questo dato è in accordo con l'analisi biomeccanica condotta da altri autori su modelli animali di dimensioni maggiori (2, 7).

L'analisi istologica evidenzia che in entrambi i casi si forma tessuto cicatriziale, ma da sola, non è sufficiente a definire quale metodo sia il migliore per indurre una reazione fibrotica epi-perineurale.

La differente distribuzione del tessuto fibrotico riscontrata durante l'analisi istologica ci permette invece di avanzare delle ipotesi circa un diverso meccanismo patogenetico in relazione al tipo di danno indotto aprendo interessanti prospettive di ricerca volte ad approfondire le attuali conoscenze sul processo di cicatrizzazione post chirurgica epi-perineurale (3, 5).

Infine, possiamo concludere che lo studio da noi condotto ha evidenziato che la lesione del letto muscolo-fasciale circostante mediante cauterizzatore risulta essere il metodo più efficace nell'indurre e studiare le aderenze epi-perineurali post-chirurgiche. Il metodo è inoltre di facile e rapida realizzazione. Questo metodo potrà essere impiegato in futuro per lo studio di efficacia dei vari dispositivi antiaderenziali biocompatibili oggi disponibili così da cercare di mettere ordine in un campo in cui non vi è ancora poca chiarezza in termini di reale efficacia clinica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per la realizzazione tecnica dell'analisi istologica il dott. Simone Bompasso. Si ringra-

zia per la collaborazione nell'esecuzione degli interventi chirurgici il dott. Igor Pellegatta.

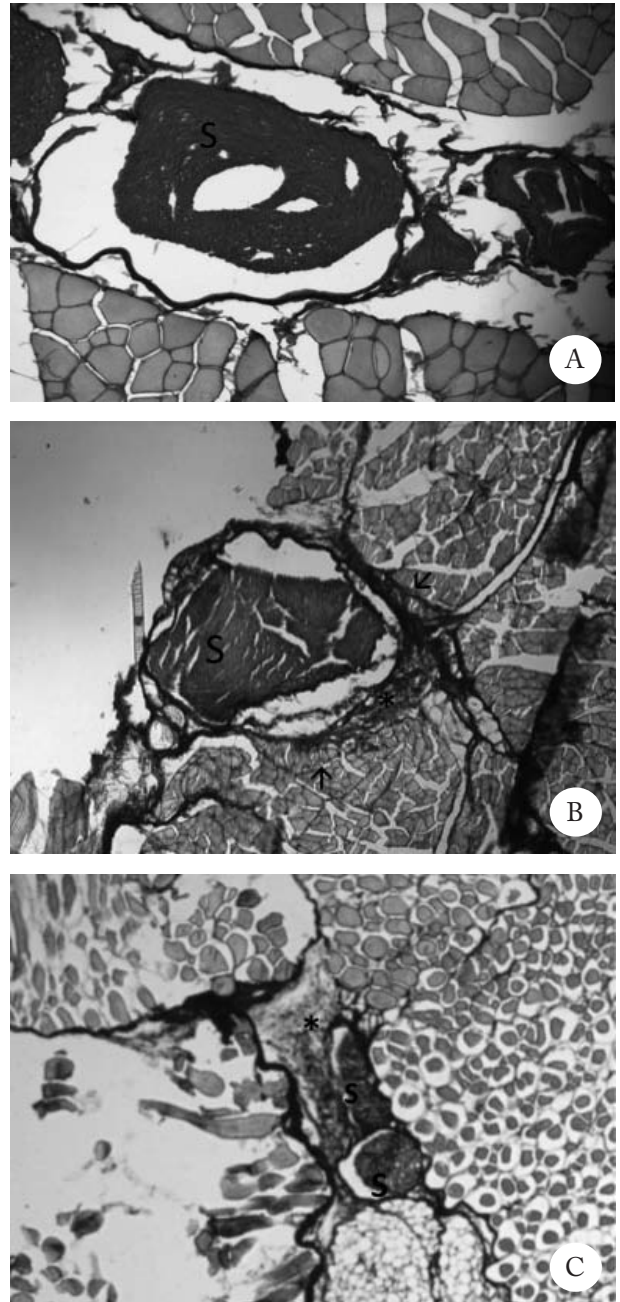


Figura 4. A) Controllo; B) Lesione da cauterizzatore; C) Lesione da sfregamento. Sezioni istologiche del campione. Colorazione Sirius Red. Ingrandimento 10x. S nervo sciatico. * tessuto cicatriziale. → infiltrazione tessuto cicatriziale nel letto muscolare. Si noti che in B e C compare il tessuto cicatriziale. In C non vi è infiltrazione del tessuto muscolare.

BIBBLOGRAFIA

1. Jones NF, Ahn HC, Eo S. Revision Surgery for Persistent and Recurrent Carpal Tunnel Syndrome and for Failed Carpal Tunnel Release. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2012; 129(3): 683–692
2. Xander Smit MD, Van Neck JW, Afoke A, Hovius S. Reduction Of Neural Adhesions By Biodegradable Autocrosslinked Hyaluronic Acid Gel After Injury Of Peripheral Nerves: An Experimental Study. *J Neurosurg* 2004; 101: 648–652.
4. Yamamoto M, Endo N, Ito M et al. Novel Polysaccharide-derived hydrogel prevents perineural adhesions in a rat model of sciatic nerve adhesion. *Journal of Orthopaedic Research* 2010; 28: 284–288.
3. Ikeda K, Yamauchi D, Osamura N, Hagiwara N, Tomita K. Hyaluronic acid prevents peripheral nerve adhesion. *British Journal of Plastic Surgery* 2003; 56(4): 342–347.
5. Park JS, Lee JH, Han CS, Chung DW, Kim GY. Effect of Hyaluronic Acid-Carboxymethylcellulose Solution on Perineural Scar Formation after Sciatic Nerve Repair in Rats. *Clinics in Orthopedic Surgery* 2011; 3(4): 315.
6. Dam-Hieu P, Lacroix C, Said GR, Devanz P, Liu S, Tadie, M. Reduction of Postoperative Perineural Adhesions by Hyaloglide Gel: An Experimental Study in the Rat Sciatic Nerve. *Neurosurgery* 2005; 56(Supplement 2): 425–433.
7. Zuijdendorp M, Smit X, Blok JH et al. Significant reduction in neural adhesions after administration of the regenerating agent OTR4120, a synthetic glycosaminoglycan mimetic, after peripheral nerve injury in rats. *J Neurosurg* 2008; 109: 906007–900703.
8. Abe Y, Doi K, Kawai S. An experimental model of peripheral nerve adhesion in rabbits. *British Journal of Plastic Surgery* 2005; 58(4): 533–540.
9. Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Campos A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochem Cell Biol.* 2011; 136(6):709–17.