

# “L’EFFETTO TUNNEL” MEDIANTE TUBI BIOERODIBILI NELLA NERVE REGENERATION

## “THE TUNNEL EFFECT” USING BIOERODABLE TUBES IN NERVE REGENERATION

FABIO CARLUCCI <sup>(1)</sup>, FRANCESCA DINI <sup>(2)</sup>, GIOVANNI VOZZI <sup>(3)</sup>,  
FEDERICO VOZZI <sup>(3)</sup>, VALENTINA CHIONO <sup>(4)</sup>, CLAUDIA SALVADORI <sup>(5)</sup>,  
MARIO ARISPICI <sup>(6)</sup>, CLAUDIO DOMENICI <sup>(7)</sup>,  
GIANLUCA CIARDELLI <sup>(8)</sup>, PAOLO GIUSTI <sup>(4)</sup>

### RIASSUNTO

I nervi periferici possono essere gravemente danneggiati in seguito ad un trauma meccanico, in particolare quando è presente una totale resezione del nervo (neurotmesi). Le difficoltà che si incontrano durante la riunione chirurgica dei monconi nervosi sono: la reazione cicatriziale che si forma attorno al nervo, la reazione granulomatosa in seguito alla sutura microchirurgica, l’interposizione di sangue o altre sostanze sul decorso del nervo in rigenerazione, il corretto allineamento dei monconi nervosi e la tensione nel sito di riunione che si può creare se il gap è molto vasto.

Allo scopo di ottenere un perfetto e funzionale ri-allineamento delle fibre neuronali sono state sviluppate numerose tecniche di ricostruzione del gap nervoso, in particolare, ha mostrato risultati considerevoli l’impianto di canali guida polimerici biodegradabili. In questo studio preliminare, sono state realizzate con un sistema di estrusione a caldo guide in Poliuretano, e, successivamente, sono state riempite con specifiche biomolecole di adesione cellulare (gelatina e polilisina).

Le guide sono state testate in vitro ed in vivo, prendendo soprattutto in considerazione i parametri elettromiografici dei ratti prima dell’espianato ed i risultati istologici dopo l’espianato. Dal confronto con i risultati ottenuti con l’impiego di tubi in Policaprolattone, un polimero biodegradabile approvato dalla FDA ed usato in molti prodotti commerciali, si può evidenziare una buona rigenerazione sia in vitro che in vivo con un discreto recupero della funzione del tessuto nervoso.

Parole chiave: polimeri bioerodibili; rigenerazione nervosa; poliuretano; gelatina; sistema nervoso periferico.

---

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Fabio Carlucci.

<sup>(2)</sup> Collaboratore esterno.

<sup>(3)</sup> Centro Interdipartimentale di Ricerca “E. Piaggio”, Facoltà di Ingegneria.

<sup>(4)</sup> Dipartimento di Ingegneria Chimica, Facoltà di Ingegneria.

<sup>(5)</sup> Titolare di assegno di ricerca, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

<sup>(6)</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

<sup>(7)</sup> Istituto di Fisiologia Clinica, CNR di Pisa.

<sup>(8)</sup> Dipartimento di Meccanica, Politecnico di Torino.

## SUMMARY

Peripheral nerves may be severely compromised as a consequence of mechanical trauma, especially when they present a total resection of the nerve (neurotmesis). The difficulty that we meet during the surgical realignment of the proximal and distal nerve ends are: scar reaction around the nerve, the granulomatous reaction as result of micro-surgically suture, the blood or other material interposition along the nerve in regeneration, a careful alignment of both nerve stumps and the tension at the coaptation site in case of a large gap.

In order to obtain a perfect and functional alignment of neuronal fibres different techniques for bridging defects in peripheral nerve have been developed, in particular the implant of biodegradable polymeric guidance channels has shown considerable results. In this study preliminarily polyurethane-based nerve guide have been realised with an extrusion system and then filled with specific cell adhesion biomolecules (gelatine and polylysine). This guides have been tested *in vitro* and *in vivo*. In particular during *in-vivo* experiments an accurate electromyography on the rat before the explant and histology of explanted tube were performed. These results have been compared with those obtained using polycaprolactone tubes, that is a bioerodable polymer approved by FDA and used in several commercial product. The results have shown a good regeneration either *in vitro* and *in vivo* with an appreciable restore of neural tissue function.

Key Words: biodegradable polymers; nerve regeneration; polyurethane; gelatine; peripheral nervous system.

## INTRODUZIONE

Numerosi tipi di trauma sono spesso complicati da lesioni al sistema nervoso periferico (SNP). Come noto già da tempo, il SNP è capace di rigenerazione post-traumatica. Negli ultimi anni la conoscenza dei fattori che influenzano la rigenerazione nervosa è aumentata, e sono state sviluppate anche nuove tecniche chirurgiche e strumentazioni. Ciononostante la ripresa funzionale dei nervi periferici traumatizzati è spesso disattesa, in quanto la rigenerazione è limitata dal fatto che i neuroni adulti non sono capaci di proliferazione (Fine et al., 2000).

Questo ha spinto numerosi ricercatori a sperimentare tecniche sempre nuove per cercare di ottimizzare l'intervento terapeutico.

Nelle rigenerazioni con buon esito lo sprouting assonale, attraversa il sito di lesione, e dal tessuto nervoso prossimale entra nel tessuto nervoso distale, creando nuove connessioni con le strutture bersaglio. In mancanza di una riconnessione, il recupero delle funzioni del nervo leso è trascurabile.

Questo può essere dovuto ad uno di numerosi fattori quali: 1) il neurone non sopravvive per i gravi effetti retrogradi, particolarmente per la perdita del supporto neurotrofico; 2) il gap che separa i monconi nervosi impedisce allo sprouting assonale di ritrovare il moncone distale; 3) il tessuto cicatriziale diminuisce e il sito di lesione fa da barriera fisica all'allungamento assonale; 4) i pattern fascicolati, prossimali e distali, differiscono così tanto che l'estensione assonale non può trovare un'appropriata strada distale.

Quando si ha neurotmesi (totale resezione del nervo) occorre intraprendere un

riallineamento chirurgico. La prima riunione termino-terminale dei nervi lesi fu attuata da Hueter nel 1873 utilizzando suture nell'epinevrio (Ijkema-Paassen et al., 2004). I fascioli individuali e le loro fasce, comunque, possono essere disorientati e, a sua volta, può risultare un cattivo allineamento dell'assone nel sito di riunione. Quando i singoli fascioli possono essere identificati sono spesso riattaccati singolarmente con un processo chiamato riparazione fascicolare o perineurale. La sutura interfascicolare è indicata nella lesione incompleta e per ottenere un più preciso affrontamento dei fascioli omologhi. La riparazione perineurale, in ogni modo, non da risultati significativamente migliori nel recupero funzionale se comparati con la semplice riparazione epineurale.

Se il gap è troppo ampio, ovvero la retrazione nervosa o la perdita di tessuto nervoso impediscono la riparazione diretta termino-terminale, il gap nervoso deve essere ricostruito con un innesto. La tecnica maggiormente usata per ricostruire i danni nei nervi periferici è l'uso di innesti nervosi perineurali autologhi e non, vascolarizzati e interposti tra i monconi del nervo reciso (Ijkema-Paassen et al., 2004) con lo scopo di guidare meccanicamente la ricrescita assonale verso il moncone distale. L'entità del danno (possibilità di formazione di un neuroma sul nervo donatore), l'architettura fascicolare dell'innesto, il limitato numero di nervi donatori, la necrosi dell'innesto in caso di prelievi di grosso calibro e la necessità di un doppio intervento, sono i problemi più comunemente incontrati che hanno spinto le ricerche verso lo sviluppo di nuove tecniche per la ricostruzione nervosa.

Sono stati effettuati studi per sviluppare tecniche con colla per la riparazione nervosa, in modo tale da diminuire gli svantaggi associati alla sutura (Sunderland, 1991). I vantaggi pratici sono legati alla semplicità di applicazione, rapidità di riparazione, e facilità d'uso anche in punti difficilmente accessibili (Faldini et al, 1984). Le maggiori limitazioni a questa tecnica includono il bisogno di un intervento rapido (cosicché la degenerazione walleriana e la distruzione assonale non abbiano inizio) e il ritrovamento dei monconi che devono essere riavvicinati determinando la minima tensione possibile. Le colle, quindi, non sono utilizzabili nel caso di gap nervosi che non possono essere facilmente riavvicinati.

Negli ultimi 10 anni, i gravi svantaggi degli impianti nervosi hanno portato allo sviluppo di nuove tecniche, fino all'allestimento di condotti per la ricostruzione nervosa a partire dall'uso di vasi (vene regolari, arterie e vene ribaltate) (Carlucci et al., 1984), materiali sintetici (silicone e acido poliglicolico), condotti biologici (collagene) e condotti muscolari (Ijkema-Paassen et al., 2004). Materiali, questi, che permettono la ricostruzione anche di grossi gap. Numerose sono state le esperienze condotte sul possibile impiego, quale costituente dei condotti per la rigenerazione nervosa, di materiali sintetici permanenti i quali hanno, altresì permesso una valutazione della progressione spazio-temporale della rigenerazione nervosa attraverso un gap.

La riparazione con tubi porta numerosi vantaggi; i più importanti includono la prevenzione dell'invasione da parte del tessuto di cicatrizzazione nell'involucro rigenerante, ed il fatto che essi forniscono una guida direzionale per l'allungamento assonale e mantengono in situ fattori trofici e di crescita endogeni. I canali guida sono utili nelle procedure sperimentali di valutazione del processo di rigenerazione

nervosa perché: 1 - il gap tra i monconi nervosi può essere precisamente controllato; 2 - i fluidi e i tessuti all'interno del canale possono essere testati e valutati; 3 - le proprietà del canale possono essere variate; 4 - i canali possono essere riempiti con varie sostanze, gelatine ecc.

Gli svantaggi derivanti dall'impiego di guide sintetiche "permanenti" nella rigenerazione nervosa sono risultati i seguenti: la permanenza nel sito di impianto dopo che la rigenerazione è avvenuta, che può stimolare una risposta infiammatoria cronica con conseguente compressione del nervo rigenerante; le operazioni di rimozione della guida possono determinare nuovi danni sul nervo.

I tentativi di migliorare il tasso di successo e la qualità della rigenerazione nervosa ha portato all'uso di molti altri materiali come canali guida.

La ricerca si è concentrata in particolar modo sull'impiego di materiali "biodegradabili" che promuovessero con successo il recupero funzionale a lungo termine e che fossero di facile impiego, sia dal punto di vista sperimentale che clinico, data la loro caratteristica di degradazione post-neurorigenerazione, mantenendo tutti i vantaggi ottenuti dall'utilizzo di tubi permanenti.

Tutto ciò è reso possibile grazie allo sviluppo nel settore dell'Ingegneria Tissutale, che grazie alla contemporanea applicazione delle conoscenze nel settore della biologia, della chimica e dell'ingegneria, si occupa della progettazione e della realizzazione di organi e impianti tridimensionali (basati su cellule e supporti polimerici) dal punto di vista dell'interazione materiale sintetico / sito biologico con lo scopo di realizzare la rigenerazione del tessuto originario in modo che il supporto bioartificiale (scaffold) si degradi in tempi rapidi, venendo sostituito con un tessuto del tutto simile a quello originale, permettendo così il recupero, il mantenimento o il miglioramento delle funzioni tissutali (Lanza et al., 2000).

Gli studi sull'utilizzo di sistemi guida nervosi mostrano che la degenerazione neurale è influenzata dal sistema polimerico usato e questo non può essere considerato un giocatore passivo. Per esempio, la variazione delle proprietà fisiche come tessitura/microgeometria della superficie (Aebischer et al., 1990) e permeabilità transmurale (Uzman & Villegas, 1993); delle proprietà chimiche, quali il rilascio di fattori neurotrofici; e delle proprietà elettriche dei canali sintetici, permette il controllo della rigenerazione circostante e l'ottimizzazione del processo di rigenerazione (Fine et al., 2000).

Le ricerche condotte hanno valutato con attenzione questi aspetti e preso in esame un'enorme varietà di materiali riassorbibili, incentrando l'attenzione soprattutto sulla loro progettazione e biocompatibilità, fino allo sviluppo di impianti che degradino tanto lentamente da costituire una stabile struttura di supporto per l'intera durata del processo di rigenerazione, senza, però, residuare nell'organismo più a lungo del necessario.

Le guide bioerodibili devono, pertanto, essere progettate tenendo conto di importanti fattori quali: il tempo di rigenerazione che dipende dalla localizzazione del nervo, dal tipo di nervo e dal gap che si è creato; la flessibilità, necessaria per garantire una minor tensione sui siti di innesto epineurale e una minor reazione dei tessuti circostanti il gap; la parete degli impianti, che deve avere uno spessore che permetta la sutura sull'epinevrrio dei monconi nervosi.

I polimeri biodegradabili possono essere naturali o sintetici. Il criterio generale di selezione dei polimeri per le applicazioni biomediche è di unire le proprietà meccaniche ed il tempo di degenerazione alle necessità del tipo di impiego. Il polimero ideale deve: 1) avere proprietà meccaniche che siano compatibili con il tipo di applicazione, restando inalterato per il tempo necessario al tessuto circostante per ripararsi; 2) non evocare una risposta infiammatoria o tossica; 3) essere metabolizzato dal corpo non appena ha raggiunto il suo scopo, senza lasciare traccia; 4) essere facilmente maneggevole per il raggiungimento del prodotto finale; 5) essere facilmente sterilizzabile.

La biodegradabilità può essere facilmente raggiunta utilizzando polimeri sintetici che abbiano, nella loro catena costitutiva, legami idroliticamente instabili.

Il meccanismo con cui si attua la degradazione nel sito di impianto, si basa sulle caratteristiche di instabilità idrolitica della catena polimerica.

Esistono due tipi diversi di degradazione, che si attuano entrambi in due fasi: I FASE - l'acqua penetra nel dispositivo, e converte le lunghe catene polimeriche in piccoli frammenti idrosolubili; II FASE - gli enzimi attaccano e metabolizzano i frammenti formati, determinando una rapida diminuzione della massa del dispositivo.

In conclusione il meccanismo di degradazione/assorbimento è il risultato della correlazione dei seguenti fattori: la stabilità chimica della catena polimerica, la presenza di catalizzatori, additivi ecc., la geometria del dispositivo.

Gli incoraggianti risultati ottenuti dai numerosi studi condotti sulla Nerve Regeneration mediante l'applicazione di microguide in polimeri bioerodibili (Ijkema-Paassen et al., 2004), in particolar modo dall'applicazione di "tunnel" in copolimero di caprolattone (PCL) nella riparazione di gap nervosi (Vozzi et al., 2005), ci ha spinto a rivolgere la nostra attenzione sulla valutazione dei possibili effetti derivanti dall'impiego di altri materiali. Partendo, infatti, dai buoni risultati ottenuti da Vozzi et al. (2005) dall'impiego di tubi in poli-caprolattone, un polimero molto flessibile, autorizzato già da tempo dalla FDA ed utilizzato largamente come componente di suture riassorbibili; abbiamo cercato di valutare gli effetti sulla nerve regeneration del poliuretano, utilizzato come polimero costituente la guida; e della Gelatina e Polilisina quali fattori di crescita con cui le guide sono state riempite prima dell'innesto.

## MATERIALI E METODI

Lo studio sperimentale è stato effettuato in due fasi: la prima ha visto l'impiego di test cellulari in vitro; per la seconda fase, in vivo, sono stati utilizzati ratti Wistar di 6 mesi di età.

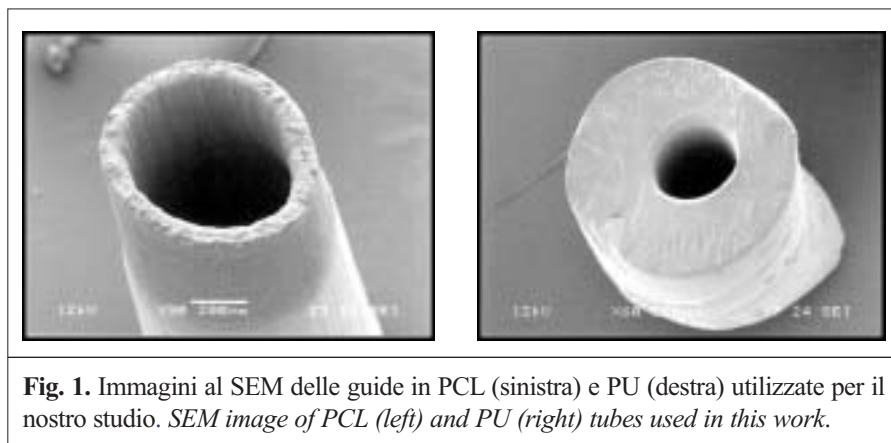
I materiali utilizzati per l'allestimento delle guide nervose sono stati: il *Policaprolattone* (PCL), la cui polimerizzazione ad anello aperto ne aumenta la biocompatibilità e degradabilità, attualmente autorizzato dalla FDA per l'allestimento di alcuni fili di sutura riassorbibili; il *Poliuretano* (PU), che vede l'allestimento di

un pre-polimero dato dalla reazione di un macrodiolo con isocianato e la sua successiva trasformazione, per reazione con un estensore di catena (1,4cicloesandimetanolo, CDM), nel prodotto finale, altamente biocompatibile, bioerodibile e flessibile.

Le guide sono state successivamente riempite con due diversi fattori di adesione cellulare: la *Gelatina*, una proteina pura, ottenuta da materie prime animali che contengono il collagene, che per le sue buone qualità energetiche è idonea per il settore alimentare e, nell'industria farmaceutica, è usata per la fabbricazione di capsule, in quanto impedisce che il farmaco si danneggi una volta esposto all'aria ed alla luce; inoltre, grazie alla sua buona compatibilità con il tessuto umano, è usata in dispositivi di spugna per trattare le ferite e come ricostituente per il plasma sanguigno in soluzione. La *Polilisina*, una sostanza naturale derivata dal metabolismo microbico, ampiamente usata per la conservazione degli alimenti ed in grado di inibire lo sviluppo di batteri Gram(+) e Gram(-); si trova in natura, come materiale prodotto tramite fermentazione microbica del miso (colla della soia), della soia (salsa di soia), e dello yogurt, ed è autorizzata per tale scopo dalla FDA nell'ottobre del 2003, in quanto non nociva per la salute umana perché è automaticamente idrolizzata nell'amminoacido nutritivo che la costituisce: la lisina.

Le guide polimeriche in PCL e poliuretano sono state prodotte utilizzando un estrusore a caldo a singola-vite (Vsf-mac.gi s.r.l.) che ha permesso di modulare le temperature in diversi momenti fino ad ottenere guide con le seguenti caratteristiche: i diametri interni dei tubi ottenuti variano tra 500  $\mu\text{m}$ -3 mm per il PCL e 400-800  $\mu\text{m}$  per il PU, mentre lo spessore della parete è di circa 20-500  $\mu\text{m}$  per il PCL e 300-500  $\mu\text{m}$  per il PU. La Fig. 1 mostra l'immagine al SEM dei tubi di PCL e PU realizzati per il nostro studio.

Per i test in vitro i campioni sono stati preparati attraverso le seguenti fasi: 1 - Sterilizzazione tramite bagno in soluzione di acqua ed etanolo (30/70), esposizione agli UV e bagno in soluzione fisiologica arricchita con antibiotici ed antimicotici; 2



**Fig. 1.** Immagini al SEM delle guide in PCL (sinistra) e PU (destra) utilizzate per il nostro studio. SEM image of PCL (left) and PU (right) tubes used in this work.

- Equilibratura con terreno di coltura; 3 - Riempimento dei tubi con una soluzione geliforme o di gelatina all'1% in PBS o polilisina allo 0,1% in PBS; 4 - Semina con cellule S5Y5 (neuroblastoma cell line) con densità di 100,000 cellule/ml; 5 - Fissaggio colorazione e conta cellulare ad intervalli di tempo regolare a 1, 2, 3 e 7 giorni.

I test in vivo sono stati effettuati per mezzo di impianto microchirurgico sotto microscopio, sul nervo Peroneo comune sinistro (il destro è stato lasciato intatto per le valutazioni di controllo) di ratti Wistar di 6 mesi, mediante exteriorizzazione del nervo e successiva neurotomia un cm sopra la sua penetrazione nel muscolo estensore lungo delle falangi (EDL). I due monconi sono stati mobilizzati ed inseriti alle estremità della guida alla quale sono stati fissati mediante due punti di sutura in Nylon 8/0.

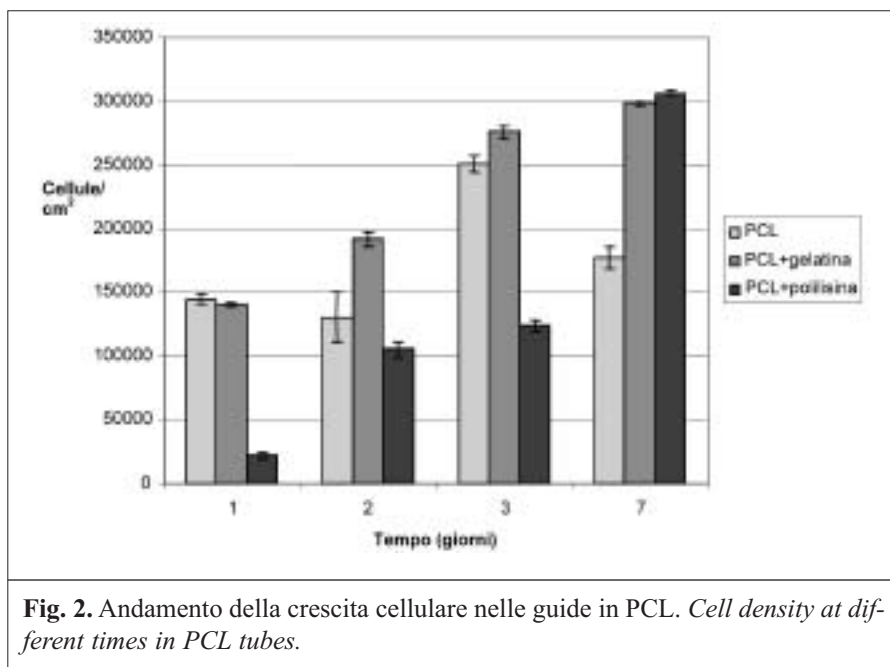
Le successive valutazioni elettromiografiche sono state condotte a 54 giorni dall'impianto mediante un apparecchio elettromiografico (Biopac Student Lab System MP3X) gestito da uno specifico software di acquisizione delle immagini. I morsetti/elettrodi sono stati posti lungo il decorso del nervo peroneo in tre punti diversi. Subito dopo l'elettromiografia sono stati effettuati gli espianati dei nervi neurotomizzati ed inseriti nella guida, ed è stata eseguita una prima fissazione con formalina tamponata al 4%. I campioni sono stati poi inviati presso il laboratorio del Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria per le valutazioni istologiche; sono stati suddivisi in frammenti più piccoli, di circa 2 mm di lunghezza, in modo da poter analizzare con maggior facilità le porzioni distale e prossimale, non incluse nella guida, e la porzione centrale corrispondente alla sede di neurotomia e alloggiata nella guida.

I frammenti sono stati successivamente inclusi in resina di Spurr per mezzo di: una post fissazione in tetrossido di osmio, lavaggi seriali in acetone a concentrazioni crescenti e tramite taglio con ultramicrotomo sono state ottenute sezioni semifini di 1  $\mu$ m di spessore che sono state colorate con blu toluidina e osservate al microscopio ottico a 40x.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dei test cellulari in vitro Fig. 2 e 3 hanno messo in evidenza quanto segue:

- per le guide allestite in PCL (Fig. 2) si è osservata un'adesione cellulare al 1° giorno poco al di sotto delle 15000 cellule per cm<sup>2</sup> sia nelle guide pure che trattate con Gelatina, mentre le guide in PCL e Polilisina presentano un'adesione cellulare al di sotto delle 5000 unità per. Al 2° e 3° giorno l'adesione cellulare è si presenta notevolmente aumentata nelle guide con Gelatina e Polilisina, per avere al 7° giorno una crescita cellulare nelle guide pre-riempite con Polilisina molto maggiore (oltre 300000 cellule/cm<sup>2</sup>) rispetto agli altri due tipi di guide in PCL.
- le guide in PU (Fig. 3) evidenziano invece un diverso andamento dell'adesione cellulare, con crescita al di sotto delle 50000 cellule per cm<sup>2</sup> sia per le guide alle-



site in PU puro che in quelle arricchite con Gelatina fino al 3° giorno, mentre dal 7° le guide in PU+Gelatina presentano una crescita cellulare notevolmente aumentata (oltre 350000 cellule/cm<sup>2</sup>). Le guide allestite, invece, con PU e funzionalizzate con Polilisina presentano una crescita cellulare in vitro molto buona già dal primo giorno di test (poco al di sotto delle 150000 unità/cm<sup>2</sup>) che aumenta notevolmente col passare del tempo per arrivare ad una adesione di oltre 430000 cellule/cm<sup>2</sup> al 7° giorno.

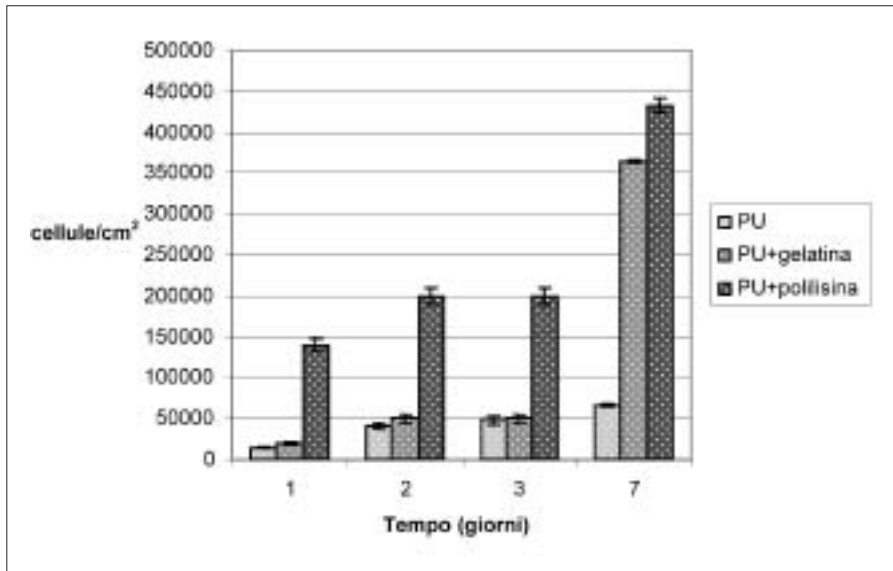
C'è, quindi, nelle prime 24 ore, una buona adesione sia nel caso di PCL puro che trattato con Gelatina, che nel caso di PU trattato con Polilisina, dalle 24 ore in poi la proliferazione tende ad aumentare in tutte le guide testate.

Se andiamo quindi a confrontare i due materiali utilizzati per l'allestimento delle microguide, in entrambi la migliore proliferazione si ha nelle microguide trattate con Gelatina o Polilisina ed in particolare in quelle in PU+Polilisina.

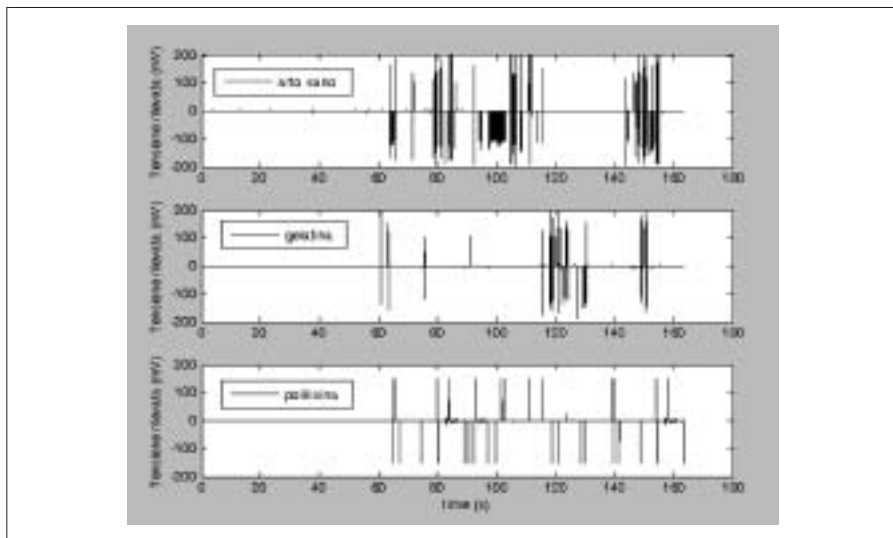
Questo conferma le proprietà della Polilisina quale sequenza aminoacidica di elezione per le colture cellulari neuronali in quanto in grado di attivare in modo specifico e funzionale tutti i processi neuronali. Questo concetto è confermato dai risultati elettromiografici ed istologici.

Le valutazioni effettuate in vivo, mediante indagine elettromiografica a 54 giorni dall'impianto, hanno mostrato i tracciati riportati in Fig. 4 e 5, dai quali si evidenzia che: per le guide in PCL, sia con Gelatina che con Polilisina, la ripresa della funzionalità dell'arto è buona anche se notevolmente minore rispetto all'arto sano, con picchi di tensione rilevata compresi fra i 200 e -200 mV. Nelle guide allestite in

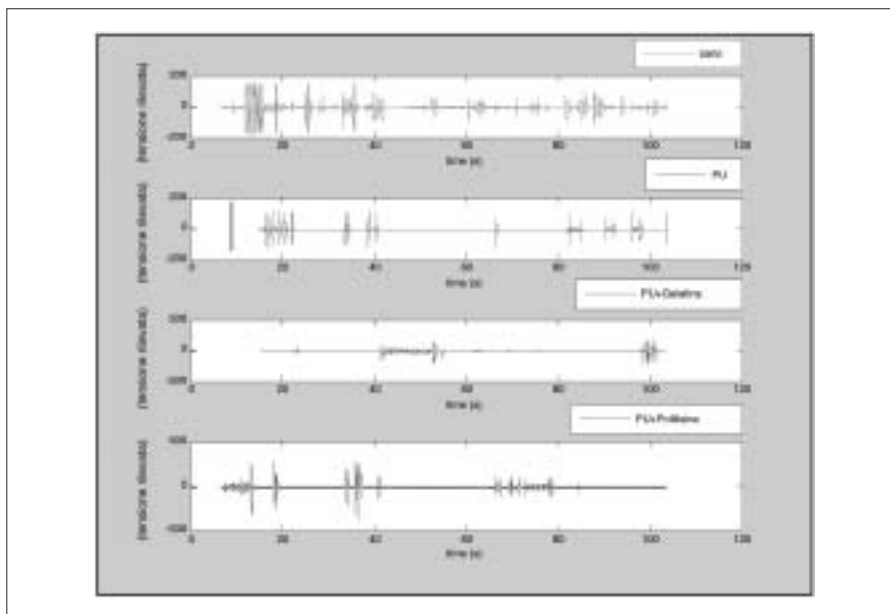




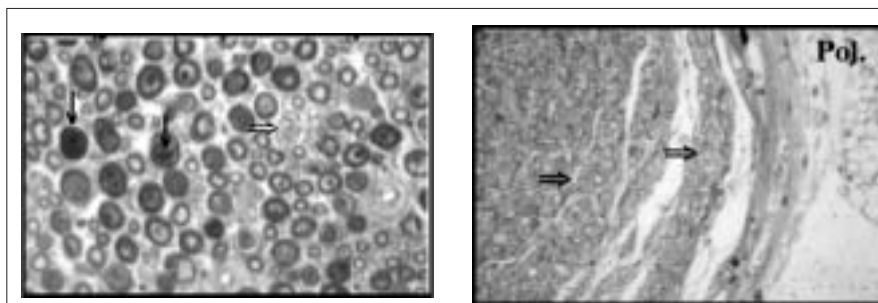
**Fig. 3.** Andamento della crescita cellulare nelle guide in PU. *Cell density at different times in PU tubes.*



**Fig. 4.** Segnali elettromiografici rilevati su arto sano ed impiantato con microguide in PCL e trattate con Gelatina e Polilisina. *Electromyographic signals acquired by healthy arm and by arm implanted with PCL guides treated with Gelatin and Polylysine.*



**Fig. 5.** Segnali elettromiografici rilevati su arto sano ed impiantato con microguide in PU puro e trattate con Gelatina e Polilisina. *Electromyographic signals acquired by healthy arm and by arm implanted with PU guides treated with Gelatin and Polylysine.*

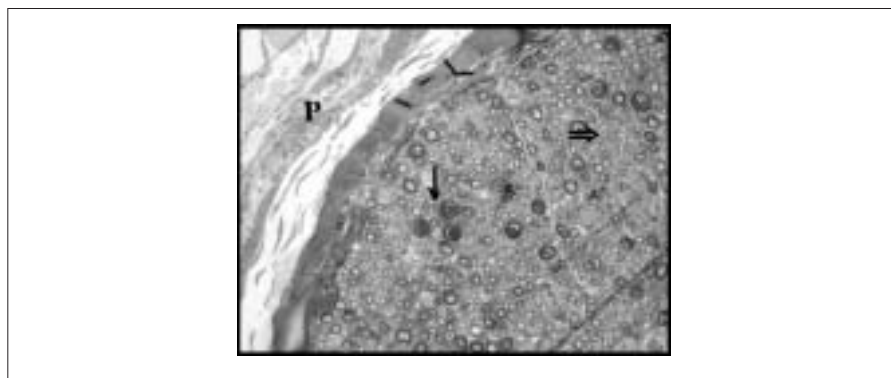


**Fig. 6.** Immagine sezione prossimale e distale (a) e sezione centrale (b) delle guide in PCL con degenerazioni assionali multifocali (Ø) e sprouting assonale (fi). Nella porzione centrale (b) si evidenzia la presenza di un nervo neoformato in avanzata fase di rigenerazione (Pol. = polimero guida). *Picture of Proximal and distal (a) and central (b) section of PCL tube with multifocal axonal degenerations (Ø) and axonal sprouting (fi). In the central part (b) the presence of a new nerve in phase of regeneration is evidenced.*

PU e funzionalizzate con fattori di adesione cellulare, la ripresa della funzionalità si presenta sempre minore rispetto all'arto sano, ma con tensione rilevata compresa tra 500 e -500 mV.

I risultati istologici su PCL rivelano la presenza di una degenerazione assonale, con perdita di fibre mieliniche e quadri di sprouting assonale a livello sia del moncone prossimale che distale (Fig. 6-a); mentre nella porzione centrale si evidenzia la presenza di un nervo neoformato con perinevrio ipercellulare ed endonevrio con numerosi assoni rigeneranti con guaina mielinica sottile (Fig. 6-b).

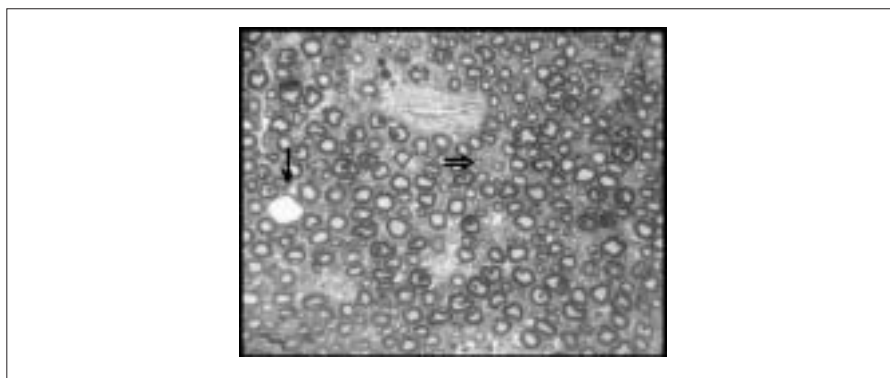
Le guide in poliuretano istologicamente presentano a livello prossimale: degenerazione assonale multifocale con perdita di fibre mieliniche e sprouting assonale (Fig. 7); distalmente si osserva moderata perdita di fibre mieliniche con contemporanea presenza di assoni in rigenerazione ed in degenerazione (Fig. 8).



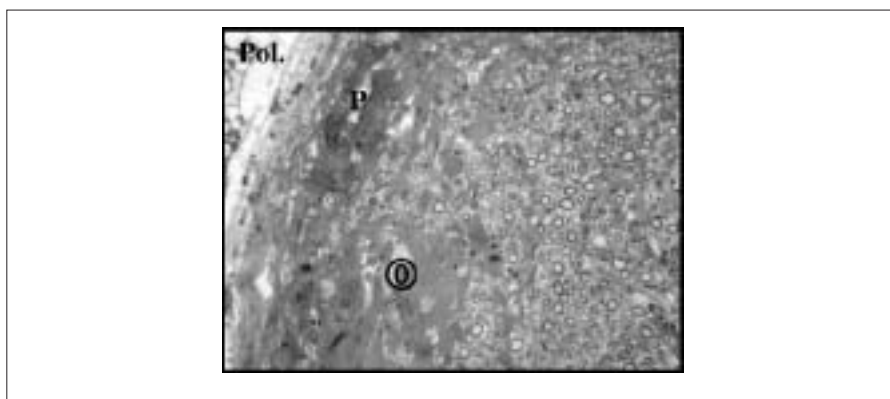
**Fig. 7.** Immagine sezione prossimale del nervo in guide in PU con assoni normali, in degenerazione (Ø) ed in rigenerazione (fi) (P = Perinevrio). *Picture of Proximal section of PU tube with healthy, degenerated (Ø) and regenerated axons (fi) (P= Perinevrium).*

La porzione centrale mostra la presenza di un nervo neoformato ricco di assoni in rigenerazione, accompagnati però dalla presenza di tessuto connettivo soprattutto nella parte più periferica a contatto con il perinevrio (Fig. 9).

Istologicamente, quindi, tutte le guide analizzate mostrano la presenza di un nervo neoformato con perinevrio ipercellulare ed endonevrio con sprouting assonale ma, a differenza di quelle in PCL, nelle guide in PU, notevolmente maggiore è la proliferazione di tessuto connettivale a livello periferico.



**Fig. 8.** Immagine sezione distale del nervo in guide in PU con assoni in degenerazione (Ø) e quadri di sprouting assonale (fi). *Picture of Distal section of nerve in PU tubes with degenerated axons (Ø) and area of axonal sprouting (fi).*



**Fig. 9.** Immagine di sezione centrale delle guide in PU, con fibre in rigenerazione (fi) ed abbondante tessuto connettivo (Ä) nella porzione più a contatto col perinevrio (P). (Pol. = Polimero guida). *Picture of Central section of PU tube with neural regenerated fibres (fi) and rich connective tissue (Ä) in the area close to Perinevrium (P). (Pol= Polymeric tube).*

## CONCLUSIONI

Dalla nostra esperienza non è ancora lecito trarre conclusioni determinanti sulla validità dell'impianto di una microguida realizzata in polimero biocompatibile e bioerodibile riempita di un gel di Polilisina quale dispositivo atto a favorire la rigenerazione nervosa. Fermo restando la validità e la necessaria importanza dell'effett-

to tunnel nella rigenerazione nervosa siamo riusciti a verificare e confermare la validità del Policaprolattone come materiale costituente la guida; inoltre abbiamo scoperto le qualità del Poliuretano che, avvicinandosi notevolmente alle caratteristiche della struttura nervosa, le ha fornito le condizioni migliori, favorendone una rapida degenerazione walleriana e retrograda che ha, dal canto suo, determinato una discreta rigenerazione assonale.

Oltre al materiale costituente la microguida ci siamo interessati anche di fattori di adesione cellulare: la Gelatina, che stipata nel suo interno ha dimostrato una buona qualità nel coadiuvare l'azione dei due polimeri; e la Polilisina che, elettromiograficamente, ha mostrato i migliori risultati sul piano di ripresa della conduzione nervosa.

Gli esami istologici ci hanno, inoltre, dimostrato la presenza costante di un nervo neoformato che ha confermato la validità della tecnica impiegata.

In un prossimo futuro ci impegneremo nella ricerca di materiali ed allestimento di guide polimeriche che presentino le caratteristiche rigenerazionali di entrambi i biopolimeri degradabili impiegati in questo studio sperimentale.

Questi primi risultati, che ci auguriamo di confermare in un prossimo futuro in un numero superiore di ratti, ci spingono a credere in queste strutture che, come già confermato precedentemente in vitro ed attualmente da questi primi studi anche in vivo, ci stanno dando i risultati sperati.

Tutto ciò ci pone in una posizione favorevole nei confronti dello scopo che ci siamo prefissati: poter dare un contributo alla risoluzione delle lesioni con gap di un tronco nervoso periferico.

La strada sarà ancora lunga prima di affinare perfettamente questo protocollo ma, questa "nuova proteina" rappresenterà un fattore così importante sia sui casi clinici dei nostri animali sia, dopo ulteriori sperimentazioni, su quelli dell'uomo, inserendoci a pieno titolo tra coloro che stanno attualmente lavorando con le cellule staminali. Sarà interessante, infatti, in un prossimo futuro poter verificare il loro impiego in questo protocollo mettendole, così, a confronto con l'azione della polilisina che ci auguriamo possa permettere di risolvere lesioni con gap anche maggiori.

#### BIBLIOGRAFIA

- AEBISCHER P., GUÉNARD V., VALENTINI R.F. (1990). The morphology of regeneration peripheral nerve is modulated by the surface microgeometry of polymeric guidance channels. *Brain Res.*, 531: 211-218.
- CARLUCCI F. SORANO V., ARGENTIERO P., MODENATO M. (1984). Prime esperienze di neurorafia con una nuova tecnica microchirurgica. *Atti SISVet.*, 38: 265-267.
- FALDINI A., PUNTONI P., MAGHERINI P.C., LISANTI M., CARLUCCI F., RISALITI R. (1984). Comparative neurophysiological assessment of nerve sutures performed by microsurgical methods ad with fibrin glue: experimental study. *It. J. Orth. Traum.*, 10: 527-532.
- FINE E.G., VALENTINI R.F., AEBISCHER P. (2000). *Principles of Tissue Engineering*, 2nd Edition, Academic Press, 56: 785-797.
- IJKEMA-PAASSEN J., JANSEN K., GRAMSBERGN A., MEKK M.F. (2004). Transection

- of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*, 25: 1583-1592.
- LANZA R., LANGER, R. AND VACANTI, J.P. (2000). *Principles of Tissue Engineering*. 2nd Edition, Academic Press.
- SUNDERLAND S. (1991). *Nerve Injuries and their repair*, Churchill-Livinstone, London.
- UZMAN B., VILLEGAS G.M. (1993). Mouse sciatic nerve regeneration through semipermeable tubes: A quantitative model. *J. Neurosci.*, 9: 325-338.
- VOZZI G., CARLUCCI F., SALVADORI C., DINI F., VOZZI F., DOMINICI C., ARISPICI M., CIARDELLI G., GIUSTI P. (2005). L'uso di microguide bioerodibili nella Nerve Regeneration. *Atti S.I.C.V.*, 12: 213-215.