

## **TITOLO DEL PROGETTO:**

**Allo-innesti nervosi decellularizzati nelle perdite di sostanza nervose: studio sperimentale**

### **RAZIONALE**

Le lesioni nervose periferiche costituiscono un serio problema per la società. Esse infatti causano deficit motori e sensitivi, spesso permanenti, che compromettono la qualità di vita dei pazienti e determinano una perdita di produttività pari a 4.916.000 giorni solo negli Stati Uniti in un anno.

L'attuale 'gold standard' per il trattamento di lesioni nervose periferiche in cui non sia possibile riaccostare direttamente i monconi nervosi, è l'autoinnesto di nervo. Questa tecnica presenta una serie di svantaggi legati principalmente alla morbidità del sito donatore dell'innesto (infezioni, dolore, cicatrici, neuromi, perdita di sensibilità), e alla necessità di un'ulteriore chirurgia che allunga i tempi operatori. Per piccole perdite di sostanza, in nervi sensitivi, i "tubuli" sintetici o biologici sono largamente impiegati.

Non vi è però al momento una soluzione alternativa per perdite di sostanza superiori ai 2-3 cm e, soprattutto per quanto riguarda i nervi misti, quando le perdite di sostanza sono così ampie da non permettere un sufficiente apporto autologo.

Questi fattori hanno motivato i ricercatori a trovare valide alternative all'autoinnesto di nervo e nelle ultime due decadi sono stati sviluppati diversi biomateriali, col fine di non sacrificare nervi sani del paziente e allo stesso tempo di dare risultati sovrapponibili all'impiego di innesti autologhi. Tuttavia, come detto, i livelli di rigenerazione assonale ottenuti con gli autoinnesti rimangono ancora impareggiabili, in particolare nei gap nervosi superiori ai 2 cm. Gli innesti nervosi allogenici (alloinnesti) costituiscono un'alternativa potenzialmente ideale agli autoinnesti. Essi potrebbero essere immediatamente disponibili nelle banche dei tessuti e presentano una componente cellulare e strutturale simili agli autoinnesti. Richiederebbero però una terapia immunosoppressiva per circa 18 mesi che esporrebbe il paziente al rischio di infezioni e tumori.

Per queste ragioni gli alloinnesti nervosi decellularizzati potrebbero dare una componente strutturale simile agli innesti tradizionali permettendo una rigenerazione per distanze più lunghe. Questi frammenti nervosi presentano intatte la lamina basale e le proteine della matrice extracellulare, le quali supportano la rigenerazione nervosa. Tuttavia attraverso la decellularizzazione del nervo le componenti cellulari vengono eliminate, eliminando quindi il problema dell' antigenicità e quindi della risposta immunitaria, data principalmente dalle cellule di Schwann.

Il concetto di nervo decellularizzato e i primi studi sperimentali risalgono a qualche decennio fa, tuttavia negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi più efficaci per la decellularizzazione, e sono comparse alcune casistiche cliniche che utilizzano un prodotto commerciale, AxoGen®, che presenta elevati costi e l'impossibilità di una commercializzazione in Italia per la legislazione attuale (impossibilità di acquistare tessuti umani da aziende profit).

La dimostrazione, attraverso studi sperimentali e clinici, che l'utilizzo dell'alloinnesto nervoso decellularizzato prelevato da cadavere, consente di ottenere risultati uguali o superiori, in termini di rigenerazione nervosa e di ripresa funzionale, dell'autoinnesto nervoso, potrebbe garantire una valida terapia chirurgica per le lesioni nervose, abolendo le complicanze legate al prelievo di un nervo sano dal paziente stesso, nonché fornire un tessuto a basso costo e facilmente reperibile.

## OBIETTIVI SPECIFICI

Obiettivo 1: Valutare con l'aiuto dell'istologia la qualità della rigenerazione nervosa e la risposta immunitaria nel ratto e attraverso test comportamentali il recupero funzionale nel ratto in seguito a diversi tipi di riparazione nervosa: alloinnesto nervoso decellularizzato con la tecnica del freeze-thaw (1) e con l'utilizzo del detergente di Hudson (2)

Obiettivo 2: Confrontare la tecnica che garantisce il miglior risultato con dei gruppi di controllo negativi (alloinnesto non trattato) e positivi (innesto autologo tradizionale).

Obiettivo 3: Confrontare l'istologia del nervo decellularizzato del ratto con l'istologia di nervo decellularizzato umano (prelievo, previa richiesta al comitato etico, da parti amputate o dopo prelievi d'organo). Confronto ulteriore tra questi due e il nervo decellularizzato presente sul mercato (AxoGen®).

## METODOLOGIA

40 ratti Lewis (10/gruppo) verranno sottoposti a neurotmesi del nervo mediano.

I ratti dei gruppi di studio verranno sottoposti a riparazione nervosa con alloinnesti di nervi prelevati da ratti Lewis-Brown Norway, e decellularizzati con la tecnica freeze and thaw (Gruppo 1) e con l'utilizzo del detergente di Hudson (Gruppo 2)

I ratti dei gruppi di controllo verranno trattati con autoinnesti nervosi (Gruppo 3) e con alloinnesti nervosi non trattati (Gruppo 4).

La lunghezza degli innesti nervosi sarà di 1 e 3 cm per ciascun gruppo e sarà impiegato il modello arto anteriore/nervo mediano del ratto che prevede come test funzionale il grasping test.

- Gruppo 1: Alloinnesti nervosi decellularizzati (Freeze-thaw)
- Gruppo 2: Alloinnesti nervosi decellularizzati (Detergente di Hudson)
- Gruppo 3: Autoinnesti nervosi
- Gruppo 4: Alloinnesti nervosi non trattati

Gli animali saranno valutati clinicamente a 4, 8, 12 e 16 settimane dall'intervento mediante Grasping test.

A 16 settimane gli animali saranno sacrificati e verrà prelevato il moncone nervoso comprendente l'innesto, al fine di valutare la rigenerazione nervosa attraverso i parametri morfologici e morfometrici (microscopia ottica ed elettronica), verranno valutati inoltre la risposta immunitaria ed i muscoli flessori dell'avambraccio.

## RISULTATI ATTESI

### Obiettivo 1:

- La valutazione dei risultati dei gruppi di decellularizzazione consentirà di identificare la migliore tra le tecniche di decellularizzazione, sia in termini di rigenerazione nervosa/recupero funzionale, sia in termini di annullamento dell'immunogenicità dell'alloinnesto, sia in termini di facilità tecnica.
- L'utilizzo di alloinnesti di lunghezza differente consentirà di dire se una delle due tecniche risulta più efficace con innesti più lunghi o più corti

### Obiettivo 2:

- Valutare le differenze tra allo innesti decellularizzati e non decellularizzati confrontati con il gold standars , l'innesto nervoso tradizionale.
- Ci aspettiamo che il gruppo trattato con alloinnesti non decellularizzati (4) riporti, all'esame istologico, segni di una elevata risposta anticorpale e un peggiore recupero funzionale.

### Obiettivo 3:

- Valutare differenze e similitudini tra nervo di ratto e nervo umano decellularizzato mediante il confronto dei parametri morfologici, morfometrici e della RT-PCR
- Confrontare i prodotti a disposizione del mercato con un prodotto nuovo che tutte le banche dei tessuti possono “produrre”.

### BIBLIOGRAFIA

- Mark Szytkaruk, B.E.Sc., Stephen W.P. Kemp, Ph.D., Matthew D. Wood, Ph.D., Tessa Gordon, Ph.D., and Gregory H. Borschel, M.D. Experimental and Clinical Evidence for Use of Decellularized Nerve Allografts in Peripheral Nerve Gap Reconstruction. *Tissue Engineering* 10.1089/ten.teb.2012.0275
- Giovanna Squintani, M.D., Bruno Bonetti, M.D., Ph.D., aDolfo Paolin, M.D., Daniela vici, Ph.D., eliSa coGliati, Ph.D., Bruno Murer, M.D., anD GiorGio Stevanato, M.D.. Nerve regeneration across cryopreserved allografts from cadaveric donors: a novel approach for peripheral nerve reconstruction. *J Neurosurg* 119:907–913, 2013
- Rukmani Sridharan, Richard B. Reilly, Conor T. Buckley. Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 41 (2015), 124-135
- Srikanth Vasudevan, PhD, Jiying Huang, BS Barry Botterman, PhD, Hani S. Matloub, MD, FACS, Edward Keefer, PhD Jonathan Cheng, MD, FACS. Detergent-free Decellularized Nerve Grafts for Long-gap Peripheral Nerve Reconstruction. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014 Sep 8;2(8):e201
- Qingbo Wang, Chunlei Zhang, Luping Zhang, Wei Guo, Guoying Feng, Shuai Zhou, Yuqiang Zhang, Ting Tian, Zefu Li, Fei Huang. The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Dec;102(12):4301-8
- Furkan E. Karabekmez & Ahmet Duymaz & Steven L. Moran. Early Clinical Outcomes with the Use of Decellularized Nerve Allograft for Repair of Sensory Defects Within the Hand. *Hand* (2009) 4:245–249
- Ilker Yazici, M.D. Sakir Unal, M.D. Maria Siemionow, M.D., Ph.D., D.Sc. Composite Hemiface/Calvaria Transplantation Model in Rats. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Nov;118(6):1321-7.

- Yavuz Demir, M.D., Selahattin Ozmen, M.D., Aleksandra Klimczak, Ph.D., Abir Lal Mukherjee, M.D., and Maria Siemionow, M.D., Ph.D. Tolerance Induction in Composite Facial Allograft Transplantation in the Rat Model. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Dec;114(7):1790-801.
- Betul G. Ulusal, M.D., Ali E. Ulusal, M.D., Selahattin Ozmen, M.D., James E. Zins, M.D., and Maria Z. Siemionow, M.D., Ph.D. A New Composite Facial and Scalp Transplantation Model in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Oct;112(5):1302-11.
- Jun Yang, M.D. Detlev Erdmann, M.D., Ph.D., M.H.Sc. J. C. Chang, M.D. Issei Komatsu, M.D. YiXin Zhang, M.D. DanRu Wang, M.D. Michael S. Hodavance, B.S. Scott T. Hollenbeck, M.D. Howard Levinson, M.D. Bruce Klitzman, Ph.D. L. S. Levin, M.D. A Model of Sequential Heart and Composite Tissue Allotransplant in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Jul;126(1):80-6