

Nostra esperienza sullo studio dell'osteosintesi nel trapianto pluritissutale nel ratto[°]

Our experience about the osteosynthesis in rat composite tissue allograft

MONTELEONE G., FORCONI F., FERNICOLA A., NICOLETTI S., SICA G., MANZELLI A., VENANZI R., MAURIELLO A.**, GASPARI A.L.*, MONTELEONE M.

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" - Dipartimento di Chirurgia - I Sezione di Ortopedia.

Direttore: Prof. MAURIZIO MONTELEONE

* *Dipartimento di Chirurgia - Cattedra di Chirurgia Generale*

Direttore: Prof. ACHILLE LUCIO GASPARI

** *Dipartimento di Biopatologia - Sezione di Anatomia Patologica*

Riassunto

Sono stati eseguiti 10 interventi di osteotomia femorale su ratti Lewis seguiti da successiva osteosintesi (in nove casi accompagnati da neurtomia e conseguente neurrafia con nylon 10-0); 4 reimpianti e 2 trapianti di arto inferiore (ricevente Lewis e donatore Brown-Norway). La necessità di ottenere una osteosintesi estremamente salda deriva dalla difficoltà di immobilizzare il ratto operato. A tale scopo si sono sperimentate varie metodiche. Esami radiografici ed istologici sono stati eseguiti a scadenze stabilite.

Parole chiave: trapianto di arto nel ratto-reimpianto – osteosintesi.

Summary

In ten Lewis rats a femur osteotomy with subsequent osteosynthesis was made. In nine of them the sciatic nerve was transected and sutured with 10-0 nylon. Four limb replantations and two limb transplantations were also performed (Lewis, Brown-Norway). Due to the impossibility to immobilize the rat's limb, in this sort of experimentation is mandatory to obtain an effective synthesis. Different techniques of osteosynthesis were executed. Radiographic and histological examinations were performed.

Key words: rat's limb transplantation – replantation – osteosynthesis.

Lo studio del trapianto pluritissutale nel ratto nasce da una chiara esigenza etica a tradurre e approfondire in termini di ricerca laboratoristica un argomento, il trapianto pluritissutale da cadavere, che comprende in se numerose applicazioni, come ad esempio il trapianto di mano, e che finora ha avuto ragion d'essere solo nelle vesti di una avventurosa, e a volte

purtroppo fallimentare, sperimentazione clinica. Tale esigenza si rende doverosa per la ragione che il particolare tipo di trapianto in questione comprende diversi tessuti come l'osso, il muscolo, le strutture vasculo-nervose e la cute in grado di stimolare dissimili meccanismi di rigetto responsabili, in ultima analisi, della maggior parte delle complicazioni post opera-

[°] Cofinanziamento progr: ricerca 1999

torie dei pazienti sottoposti a trapianto di arto (Monteleone et al., 2001).

La vastità della sua natura impegna e fa proprie diverse tra le più moderne e attuali aree di interesse scientifico come la microchirurgia e l'immunologia applicata alla finalizzazione di una efficace tollerabilità del trapianto sia come sperimentazione di protocolli terapeutici applicabili e adeguati al caso specifico, sia con l'approfondimento di nuovi campi di indagine come il microchimerismo ovvero l'ottenimento di chimere midollari che, una volta stabilite, esprimono e riconoscono come propri sia gli antigeni dell'ospite che quelli del donatore presentando una sorprendente tolleranza del trapianto (Adams et al., 1997). Per quel che riguarda i protocolli terapeutici: i due farmaci che più spesso sono stati impiegati negli studi presenti in letteratura sono senz'altro la ciclosporina e il tacrolimus, entrambi in grado di prevenire a breve e a lungo termine il rigetto dei tessuti trapiantati a prezzo purtroppo di una serie di effetti collaterali diretti e di una immunodepressione generalizzata del ricevente, che può provocare una tossicità significativa e aumentare il rischio di tumori e infezioni (Ami, Hotokebuchi et al., 1989; Fritz et al., 1984; Durlík et al., 1997).

L'attenzione principale, comunque, da parte del nostro gruppo di ricerca, è stata posta in modo particolare sulla metodica chirurgica e alle tecniche di osteosintesi che, sebbene, di non facile attuazione, sono spesso sistematicamente soltanto brevemente accennate dalle pubblicazioni attinenti a questo campo d'indagine.

Fisiologia del callo osseo nel ratto

La frattura dell'osso causa una emorragia locale e una distruzione tissutale. I primi eventi riparativi, nei primi sette giorni, riguardano il tessuto molle: fibroblasti

proliferanti e neoformazioni capillari crescono nel coagulo ematico e nell'area traumatizzata; degranulazione di neutrofili e basofili tissutali; comparsa di macrofagi attivati e osteoclasti. I fibroblasti iniziano un'intensa produzione di collagene. Dal 14° giorno aumenta la produzione di collagene da parte degli osteoblasti (pacchetti di fibrille collagene nel citoplasma vacuolato). L'osteogenesi post-traumatica è completata tra il 28° e il 42° giorno, con la sostituzione del tessuto cartilagineo neoformato, e sarà seguita da rimodellamenti che porteranno alla formazione del callo definitivo (Khussar et al., 2001).

Metodica chirurgica del trapianto

I tempi principali dell'intervento sono tre: 1) preparazione del donatore; 2) preparazione del ricevente e 3) trapianto.

Preparazione del donatore (Brown-Norway): incisione circolare all'altezza del terzo medio del femore. Sezione dei muscoli per strati fino a raggiungere il piano osseo. Sezione netta mediante seghetto a mano a livello del terzo medio del femore.

Ricerca del nervo sciatico e sua sezione prima del suo sfioccamento nei rami periferici.

Preparazione accurata dei vasi femorali e del nervo femorale appena distalmente al legamento inguinale. Clampaggio e sezione vasi femorali. Dilatazione della sezione di taglio dei vasi suddetti e rimozione dell'avventizia. Perfusioni dell'arto con una soluzione eparinata al 2%. Conservazione dell'arto a circa 0-4 gradi.

Preparazione del ricevente (Lewis): stesso procedimento del donatore fino alla preparazione dei vasi femorali ai quali vengono applicati due angiostati tipo doppio Ackland.

Trapianto dell'arto: sintesi del femore.

Si applicano alcuni punti di sutura per avvicinare i muscoli e prevenire tensioni. Anastomosi dei vasi con l'ausilio del microscopio chirurgico che permette ingrandimenti da 5 a 20 x.

Declampaggio. Controllo della pervietà del circolo. Sutura del nervo femorale e del nervo sciatico con nylon 10-0. Completamento della sutura dei muscoli per strati. Sutura della cute (Fig. 1).



FIGURA 1
Prima ispezione a intervento concluso.

Molta della nostra attenzione è stata orientata sulla non facile risoluzione del problema di ottenere una efficace osteosintesi, capace di permettere la formazione del callo osseo, in considerazione della impossibilità a immobilizzare l'animale operato.

Materiale e metodi

Sono stati eseguiti 10 interventi di osteotomia femorale su ratti Lewis femmine del peso variabile tra i 250 gr e i 300 gr seguiti da successiva osteosintesi (in nove casi accompagnati da neurotomia e conseguente neuroraffia); 4 reimpianti; 2 trapianti di arto inferiore (rice-

vente Lewis e donatore Brown-Norway sempre di sesso femminile e del peso variabile tra i 250 gr e i 300 gr).

Sono stati impiegati fili di Kirschner di spessore quanto più vicino possibile al diametro del canale midollare femorale (di norma 1mm) e di lunghezza dai 2.5 cm ai 3.5 cm cercando di porre gli estremi del mezzo di sintesi stesso il più possibile equidistanti dal margine di frattura.

Il ricorrente riscontro di mobilitazione del mezzo di sintesi, al trentesimo giorno dopo l'intervento, con conseguente diastasi degli estremi di frattura e sviluppo di pseudoartrosi è stato superato con l'utilizzo di fili di cerchiaggio da 0,4 mm di diametro. Partendo da questa metodica si è sostituito il mezzo di sintesi. L'utilizzo di un ago da 18 (Lipson et al., 1982) ha dato buon esito in un solo caso.

Sono stati artigianalmente elaborati i mezzi di sintesi, utilizzando fili di Kirschner intrecciati a due o tre maglie, per ottenere una migliore duttilità all'inserimento nel canale midollare e una migliore stabilità degli stessi.

Infine abbiamo sperimentato l'inserimento del mezzo di sintesi per l'intera lunghezza della diafisi femorale secondo Grundness (Fig. 2), combinato o meno all'utilizzo del cerchiaggio: inizialmente abbiamo inserito il filo di Kirschner nel canale midollare del frammento prossimale fino a raggiungere e superare il grande trocantere, quindi, una volta accostati i margini di frattura, il filo è stato spinto distalmente a occupare il canale midollare del frammento distale per tutta la sua lunghezza. Il filo in eccesso fuoriuscente dal grande trocantere è stato rimosso e infine è stato apposto il cerchiaggio inizialmente preparato forando la diafisi femorale a pochi millimetri prossimalmente e distalmente alla rima di frattura.

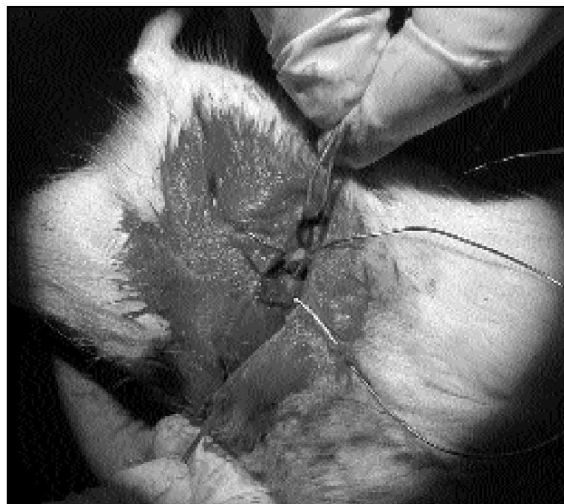


FIGURA 2
*Inserimento del mezzo di sintesi per l'intera
lunghezza del femore.*

su ratti Lewis, ed è stata somministrata una dose giornaliera di ciclosporina s.c., sono state rilevate rare manifestazioni infettive circoscritte (raccolte purulente saccate superficiali o in corrispondenza del focolaio di frattura) occasionalmente identificate durante il prelievo dei campioni di tessuto nel momento della soppressione dell'animale alle scadenze stabilite. Si trattava di infezioni di lieve entità, quindi mai mortali, che hanno consentito ai vari soggetti di sopravvivere per mesi.

Resta da considerare una forma di rigetto iperacuto istologicamente caratterizzato da scarsi o assenti infiltrati linfocitari.

Complicazioni post-chirurgiche

Nel gruppo dell'osteosintesi si è riscontrato un caso con una raccolta purulenta superficiale a 60 gg dall'intervento e un caso con granuloma saccato intramuscolare a 35 gg dall'intervento.

Nel gruppo dei reimpianti si è evidenziata una raccolta purulenta intorno al focolaio di frattura a 90 gg dall'intervento.

Nei ratti trapiantati si è verificata una complicazione non riportata in letteratura (se non forse tra le cause ignote di decesso postchirurgico che Ferreira et al. riportano al 10,42%, Hotokebuchi et al. al 24,24%, Goldberg et al. al 10,52%): un processo necrotico cutaneo che dall'arto trapiantato si diffonde alla cute dell'animale ricevente intorno al 5-6 giorno post-operatorio.

L'ipotesi di sviluppo di un agente infettivo letale è scarsamente convincente per il fatto che durante il completamento delle fasi iniziali del programma di ricerca nelle quali sono stati eseguiti reimpianti di arti

Risultati

Il riscontro di callo osseo a 60 gg dall'intervento è stato rilevato in un caso di reimpianto: il mezzo di sintesi impiegato (ago da 18) (Lipson et al., 1982) ha consentito, nel caso specifico, l'immobilizzazione e il duraturo contatto degli estremi di frattura (probabilmente per una particolarmente adeguata coincidenza tra ampiezza del canale midollare e diametro del mezzo di sintesi) (Fig. 3a, 3b).

La tecnica di sintesi transtrocanterica è l'unica ad aver consentito un'osteosintesi abbastanza serrata da impedire la mobilitazione dei margini di frattura (l'arto dell'animale non è stato immobilizzato dopo l'intervento), non si sono rilevate fratture secondarie (come riscontrato con l'impiego di mezzi di sintesi di lunghezza minore) ed è stato possibile ottenere in due casi il riscontro istologico (Fig. 4a, 4b) e radiografico di una iniziale ma chiara formazione di callo osseo già a trenta giorni dall'intervento (Fig. 5).

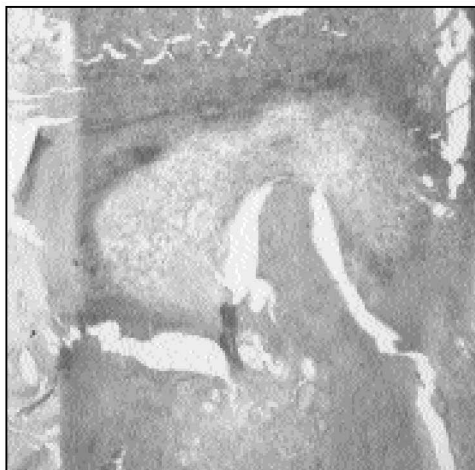


FIGURA 3A

Sezione istologica (ematossilina-eosina) del callo osseo prodotto dalla sintesi con ago (60 gg). Si apprezza la fase cartilaginea di avanzata formazione del callo (30X).

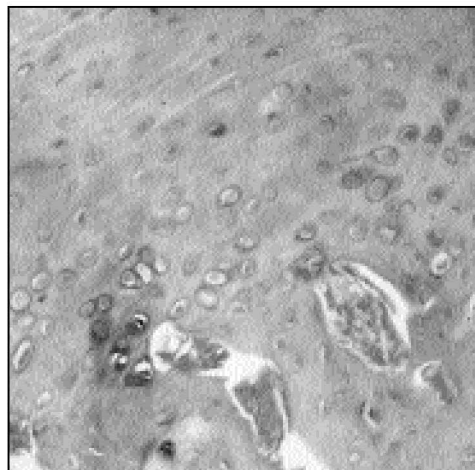


FIGURA 3B

Stessa immagine a maggior ingrandimento (100X).

Considerazioni conclusive

Alla luce della sperimentazione effet-

tuata, nonostante si renda doveroso un ulteriore approfondimento della stessa per trarre conclusioni più certe, appare

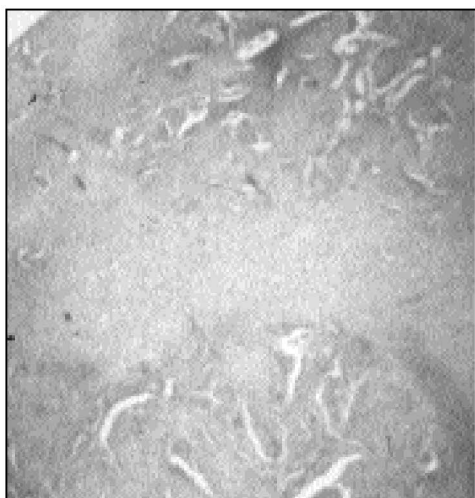


FIGURA 4A

Sezione istologica (ematossilina-eosina) del callo osseo prodotto dalla sintesi con filo di Kirschner a 30 gg (30X).

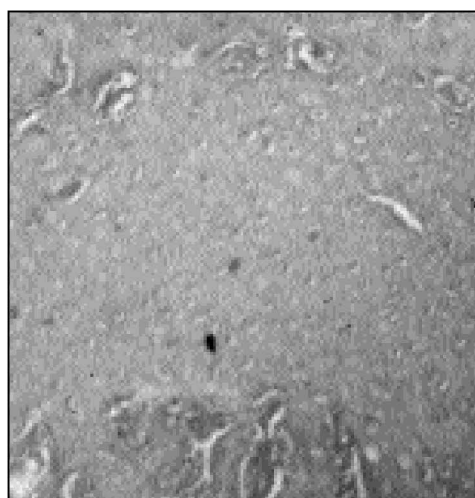


FIGURA 4B

Stessa immagine a maggior ingrandimento (50X).

chiaro da questi primi riscontri la superiore efficacia della tecnica di osteosintesi transtrocanterica rispetto alle altre metodiche applicate.

Nel nostro percorso di ricerca ci siamo imbattuti in problemi di natura tecnico chirurgica a volte di non facile risoluzione e comunque difficilmente prevedibili che hanno richiesto notevole impegno per poter essere risolti nonostante la presenza di una buona quantità di lavori presenti sull'argomento, anche se a volte non completamente esaustivi nel trattamento degli aspetti più squisitamente tecnici. Questo conferma ancor più quanto sia opportuno e indispensabile, per rendere attuabile il trapianto, un approfondimento dell'argomento nelle vesti di una ricerca indiscutibilmente laboratoristica, in vitro e sul modello animale.



FIGURA 5
*Sintesi con filo di Kirschner (30 gg).
Si apprezza iniziale callo osseo subperiostale.*

Si ringrazia per la collaborazione il tecnico istologo Sig. Gabriele Rossi.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS DH, HUTCHINSON IV: *Microchimerism and graft tolerance: cause or effect?* Lancet, 349, 1336-1337, 1997.
- AMI K, HOTOKEBUCHI T, MIYAHARA H, ARITA C, MOHTAI M, SUGIOKA Y, KAIBARA N: *Limb allografts in rats immunosuppressed with FK 506*. Transplantation, 48, 782-786, 1989.
- DURLIK M, LUKOMSKA B, NAMYSLOWSKI A, JANCZEWSKA S, CYBULSKA E, OLZEWSKI WL: *Long term survival of limb allografts after weaning of cyclosporine: possible role of microchimerism*. Elsevier. Science Inc., 96, 1226-1227, 1997.
- FERREIRA LM, ANTHONY JP, MATHES S, ANDREWS JM, LAREDO FI LHO J: *Complicações em transplante alógeno microcirúrgico de membro (tecido composto), em ratos*. Rev Ass Med Brasil, 41, 213-218, 1995.
- FRITZ WD, SWARTZ WM, ROSE S, FUTRELL JW, KLEIN E: *Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A*. Ann Surg 199, 211-215, 1984.
- GOLDBERG VM, PORTER BB, LANCE EM: *Transplantation of the canine knee joint on a vascular pedicle*. J Bone Joint Surg 62A: 414-24, 1988.
- HOTOKEBUCHI T, ARAI K, TAKAGISHI K, ARITA C, SUGIOKA Y, KAIBARA N: *Limb allografts in rats immunodepressed with cyclosporine: as a whole-joint allograft*. Plastic and Reconstructive Surgery, 48, 1027-1036, 1989.
- KHUSSAR PLU, PIIRSOO AO: *Post-traumatic repair of the tibia in rats*. Morfologia, 120, 84-91, 2001.
- LIPSON RA, KAWANO H, HALLORAN PF, MC KEE NH, PRITZKER K, LANGER F: *Vascularized Limb Transplantation in the rat*. Transplantation, 35, 293-297, 1982.
- MONTELEONE G, MARSICO S, VIGILANTE M: *Human hand allograft: consideration and revision of literature*. Progress report, 13, 5-10, 2001.