

Ecomiografia funzionale del muscolo umano denervato: primi risultati

Riccardo Zanato, Leonora Martino, Roberto Stramare

(1) Department of Diagnostics and Special Therapy, University of Padova, Italy

Abstract

Functional Echomyography of the human denervated muscle: first results.

In this study we followed with ultrasound three patients with permanent denervation to evaluate changes in morphology, thickness, contraction and vascularisation of muscles undergoing the home-based electrical stimulation program of the Rise2-Italy project. During a period of 1 year for the first subject, 6 months for the second subject and 3 months for the third subject we studied with ultrasound the denervated muscle comparing it (if possible) to the contralateral normal muscle. We evaluated: 1. Changes in morphology and sonographic structure of the pathologic muscle; 2. Muscular thickness in response to the electrical stimulation therapy; 3. Short-term modifications in muscle perfusion and arterial flow patterns after stimulation; 4. Contraction-relaxation kinetic induced by volitional activity or electrical stimulation. Morphology and ultrasonographic structure of the denervated muscles changed during the period of stimulation from a pattern typical of complete muscular atrophy to a pattern which might be considered "normal" when detected in an old patient. Thickness improved significantly more in the middle third than in the proximal and distal third of the denervated muscle, reaching in the last measurements of the first subject approximately the same thickness as the contralateral normal muscle. In all the measurements done within this study, arterial flow of the denervated muscle showed at rest a low-resistance pattern with Doppler Ultra Sound (US), and a pulsed pattern after electrical stimulation. The stimulation-induced pattern is similar to the trifasic high-resistance pattern of the normal muscle. Contraction- relaxation kinetic, measured by recording the muscular movements during electrical stimulation, showed an abnormal behaviour of the denervated muscle during the relaxation phase, which resulted to be significantly longer than in normal muscle (880 msec in the denervated muscle vs 240 msec in the contralateral normal one). The very high energy needed to stimulate the denervated muscles according to the Vienna home-based Functional Electrical Stimulation (h-b FES) strategy demonstrates that the explored muscles are denervated. This pilot study confirms the usefulness of Functional EchoMyography in the follow-up and the positive effects of h-b FES of denervated/reinnervating muscles.

Key Words: Ultra sound, Functional Echomyography, skeletal muscle, lower motor neuron denervation, h-b FES

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

Riassunto Lo studio pilota descritto in questa tesi si propone di seguire nel tempo tre soggetti affetti da atrofia muscolare in seguito al danno permanente di diversi nervi periferici, valutando ecograficamente i miglioramenti dell'ecostruttura, dello spessore, della contrattilità e della perfusione dei muscoli sottoposti al programma di stimolazione elettrica funzionale domiciliare (FES) nell'ambito del Progetto Rise2-Italy coordinato dal Centro di Ricerca Interdipartimentale di Miologia (cirMYO) dell'Università di Padova.

Gli obiettivi dello studio sono: 1. identificare le caratteristiche ecografiche del muscolo denervato; 2. valutare la contrazione indotta dalla stimolazione elettrica; 3. identificare cambiamenti a breve sulla perfusione muscolare dopo una seduta di elettrostimolazione; 4. valutare la fattibilità di un monitoraggio ecografico. Ciascuno dei tre soggetti è stato sottoposto a tre valutazioni ecomiografiche, la prima tra novembre e dicembre 2008, la seconda ad aprile 2009 e la terza a settembre 2009, in cui sono state acquisite scansioni trasversali dei muscoli

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

denervati e dei contro laterali normali. E' stato effettuato l'eco-Doppler delle arterie perforanti e si sono registrati i filmati della contrazione-rilasciamento indotta dalla corrente sia prima sia dopo stimolazione elettrica.

La tesi è stata organizzata in base ai tre campi esplorabili mediante l'ecografia: 1. ecostruttura e spessori, 2. contrazione, 3. perfusione. In ogni sezione si è cercato di stabilire le caratteristiche del muscolo denervato e i cambiamenti indotti dal Stimolazione Elettrica Funzionale domiciliare (in Inglese: home-based Functional Electrical Stimulation, h-b FES).

Il quadro ecostrutturale è quello dei muscoli atrofici coinvolti in patologie neuromuscolari e presenta nel confronto con i muscoli controlaterali innervati: aumento diffuso dell'ecogenicità; diminuzione dell'eterogeneità dell'ecostruttura; diminuzione degli echi dell'epimisio e dei margini ossei sottostanti. Tra le immagini del primo e dell'ultimo controllo ecografico, si è verificato un netto miglioramento dell'ecostruttura e degli spessori muscolari. La possibilità di visualizzare in tempo reale il movimento muscolare ha permesso l'identificazione di un comportamento anomalo del muscolo denervato in risposta alla stimolazione elettrica, il fatto che il muscolo si rilassa a una velocità minore rispetto al contro laterale innervato, fatto legato probabilmente all'alterazione della capacità della fibra muscolare di controllare l'omeostasi del calcio intracellulare, in particolare la fase di accumulo del calcio nel Reticolo Sarcoplasmatico.

Nei muscoli innervati, i tracciati Doppler delle arterie intramuscolari hanno la tipica forma trifasica che diventa meno pulsante dopo la stimolazione elettrica per effetto della vasodilatazione arteriolare. Invece nel muscolo denervato, a riposo si rileva un flusso continuo a bassa resistenza, mentre dopo stimolazione elettrica, inaspettatamente, il flusso diventa più pulsante. Questo diverso comportamento del flusso sanguigno potrebbe essere l'espressione della perdita del controllo vasomotorio in seguito alla denervazione prolungata.

L'ecografia è la tecnica ideale per il monitoraggio dei muscoli denervati, sia permanentemente, sia nell'attesa di un'auspicabile reinnervazione. In questo studio dimostriamo che l'ecostruttura e gli spessori dei muscoli sottoposti a stimolazione elettrica funzionale domiciliare sono facilmente valutabili tramite l'ecografia e possono essere utilizzati come parametri nel suo monitoraggio.

1 Introduzione

1.1 Tessuto muscolare scheletrico: dipendenza ed indipendenza dall'innervazione

La fibra muscolare scheletrica

Caratteristiche funzionali dei tipi di fibre muscolari

Il muscolo denervato: un motore al minimo

Rigenerazione muscolare

1.2 Stimolazione elettrica funzionale del muscolo denervato

Il progetto europeo "RISE (Alzati!)"

Il Progetto Italiano Rise2-Italy: FES nelle lesioni nervose periferiche incomplete

1.3 Ecomiografia funzionale del muscolo scheletrico

Anatomia macroscopica

Tecnica di esame

Ecostruttura

Contrazione

Perfusione

1.4 Ecomiografia nella patologia neuromuscolare

2 OBIETTIVI

3 MATERIALI E METODI

3 RISULTATI

3.1 Ecostruttura e spessori

3.2 Contrazione

3.3 Perfusione

4 DISCUSSIONE

4.1 Ecostruttura e spessori

4.2 Contrazione

4.3 Perfusione

4.4 Vantaggi dell'ecomiografia dinamica

4.5 Altre considerazioni sul monitoraggio ecografico

5 CONCLUSIONI

6 BIBLIOGRAFIA

1. Introduzione

1.1 Tessuto muscolare scheletrico: dipendenza ed indipendenza dall'innervazione

L'assoluta dipendenza dall'innervazione del tessuto muscolare scheletrico come servo-motore della motilità somatica ha oscurato la sua altrettanto assoluta indipendenza durante lo sviluppo ontogenetico e rigenerativo. Questo secondo aspetto della biologia muscolare è documentato dalle migliaia di "culture muscolari" in vitro, che continuano ad essere giornalmente allestite senza la necessità di cocoltivare motoneuroni.

Le molteplici "funzioni" del tessuto muscolare sono dominate ma non si esauriscono nella "contrattilità". Il tessuto muscolare scheletrico, oltre ad essere il "servomotore" per la ventilazione polmonare e la mobilità di articolazioni e sfinteri viscerali (sono striati oltre ai muscoli della lingua anche quelli della parte superiore e dello sfintere gastrico dell'esofago), è una "pompa" essenziale per il ritorno venoso dagli arti inferiori e un importante "bruciatore" per sostenere la termogenesi normale e patologica. Fondamentale "riserva" di aminoacidi utilizzabili durante il digiuno protratto, le sue masse determinano, assieme ai pannicoli adiposi, le piacevoli rotondità del corpo o le scultoree masse degli atleti di "forza", svolgendo un ruolo cosmetico, che è adeguatamente apprezzato solo quando è perso come nella paraplegia, nella sarcopenia della vecchiaia o nelle forme più gravi di cachessia. Infine esse rappresentano l'ottimale "biopolimero

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

elastico anti-decubito” per il supporto di prominenze ossee, che assieme alla continua mobilità (solo nella fase di sonno profondo e per alcune ore per notte il corpo rimane nei soggetti normali altrettanto immobile di quello delle persone allettate) sono importanti fattori anti-ulcerativi. Tutte queste altre funzioni muscolari spiegano perché, malgrado la grande riserva funzionale di contrattilità, la compromissione del trofismo muscolare sia foriera di complicazioni che deteriorano gravemente la qualità della vita delle persone, anche se solo l'interruzione della funzionalità contrattile del diaframma compromette la sopravvivenza.

I neuroni delle corna anteriori spinali (detti secondi motoneuroni o motoneuroni inferiori), in collegamento sinaptico, oltre che con i neuroni delle aree motorie corticali e della rete degli altri inter-neuroni midollari, con i neuroni sensoriali dell'arco riflesso, conducono tramite i loro assoni mielinizzati lo stimolo attraverso le radici spinali anteriori ed i nervi periferici fino alle sinapsi neuro-muscolari. Il sistema costituito da secondo motoneurone, placche neuromuscolari e popolazione di fibre muscolari contattate compone un'entità funzionale detta unità motoria. L'interruzione della continuità dell'unità motoria provoca paralisi flaccida e atrofia del muscolo scheletrico.

Le contrazioni coordinate dei muscoli scheletrici nel realizzare i movimenti del corpo nello spazio dipendono strettamente dal sistema nervoso centrale e periferico, ma la “contrattilità spontanea” (fibrillazione) è il segno clinico della denervazione del tessuto muscolare scheletrico e le culture in vitro di cellule muscolari si sviluppano e differenziano ben oltre lo stadio di miotubi ed iniziano a contrarsi anche se non sono innervate. Ciò si può documentare anche in vivo nella Rigenerazione muscolare in permanente assenza di innervazione [11,39].

La fibra muscolare scheletrica

La peculiare eccitabilità e contrattilità della fibra muscolare striata è il risultato di un'organizzazione strutturale estremamente ordinata, che si apprezza solo ai forti ingrandimenti resi possibili dalla microscopia elettronica. Minimi cambiamenti nell'organizzazione interna minano il rendimento di questo complesso motore molecolare [14]. Ad esempio, la disconnessione longitudinale della catena dei sarcomeri riduce drasticamente il lavoro esterno ed una diversa distribuzione dei mitocondri e del sistema delle membrane reticolari altera drammaticamente il ciclo di contrazione-rilasciamento regolato dalla variabile concentrazione citoplasmatica degli ioni calcio. In figura 1 i pannelli A e B presentano una visione in sezione longitudinale al microscopio elettronico di una fibra muscolare umana adulta, che si comprende più facilmente nello schema C, in cui sono indicati esplicitamente i diversi componenti strutturali dell'apparato di eccitazione e di contrazione di una fibra muscolare.

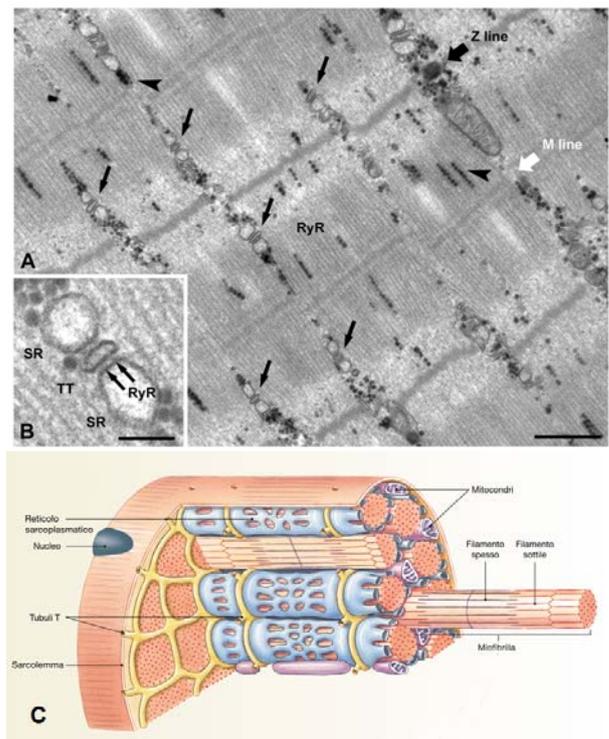


Fig 1 Sezione longitudinale al microscopio elettronico (A e B) e ricostruzione tridimensionale (C) dei componenti strutturali degli apparati di eccitazione e di contrazione delle fibre muscolari

Il segnale elettrico nervoso innesca il potenziale d'azione muscolare a livello della placca neuromuscolare rilasciando acetilcolina. Il sistema di membrane muscolari che permette la traduzione del potenziale d'azione in contrazione (sistema di accoppiamento eccitazione-contrazione) inizia con i Tubuli Trasversi, che derivano da invaginazioni del sarcolemma e contattano il Reticolo Sarcoplasmatico, un sistema di membrane interne accoppiate, ma isolate dai Tubuli Trasversi. In queste strutture il segnale elettrico che si diffonde lungo il sarcolemma è trasformato nel segnale chimico degli ioni calcio che vengono ciclicamente rilasciati da canali e recuperati da pompe ioniche del Reticolo Sarcoplasmatico in prossimità dei filamenti contrattili [33,34]. Altre strutture submicroscopiche fondamentali sono i mitocondri, organelli membranosi dotati di un sistema di creste e ricchi di enzimi del ciclo di Krebs, deputati alla respirazione cellulare per il rifornimento energetico delle attività metaboliche e contrattili della miofibrilla mediante il rilascio di ATP. Il microscopio elettronico evidenzia inoltre le sostanze che forniscono energia alle fibre, il glicogeno e i lipidi, rispettivamente sotto forma di granuli e di materiale accumulato in vacuoli sarcoplasmatici. Sono questi i combustibili cellulari interagenti con l'ossigeno che diffonde dai capillari sanguigni (uno per miofibrilla).

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

Lo studio morfologico del tessuto muscolare scheletrico si effettua in microscopia ottica su sezioni istologiche trasversali rispetto all'asse della fibra, ottenendo così un'immagine rotondeggiante o poligonale della fibra stessa. La sezione trasversale rende possibile e ripetibile la valutazione comparativa del diametro/area delle fibre presenti in una sezione muscolare. Il tessuto muscolare scheletrico è composto da fascicoli di elementi cellulari specializzati allungati, con centinaia di nuclei disposti alla periferia, detti fibre muscolari o miofibre. Le miofibre sono molto grandi rispetto agli altri elementi cellulari dell'organismo ed hanno un diametro medio di 14 micron nell'infanzia e di 60 micron nel giovane adulto. Nell'anziano esse subiscono una progressiva involuzione, legata all'invecchiamento dei tessuti, ma accentuata dalla progressiva sedentarietà degli anziani. Nel loro insieme i fascicoli muscolari sono circondati da setti fibroconnettivali che costituiscono il perimisio. A sua volta ciascuna fibra muscolare è circondata da un esile strato di tessuto fibroso detto endomisio, tra i cui strati si riconoscono i capillari sanguigni. Ciascuna fibra muscolare è rivestita da una membrana cellulare detta sarcolemma. In posizione subsarcolemmale si trovano i nuclei propri della miofibra, caratterizzati da cromatina densa. All'interno del sarcolemma è contenuto il citoplasma cellulare detto sarcoplasma, nel quale sono presenti le strutture contrattili rappresentate dalle miofibrille con le caratteristiche striature trasversali e il sistema di membrane e organuli già descritto.

Nelle fibre muscolari sono inoltre osservabili in microscopia elettronica o marcandole con anticorpi specifici piccole cellule mononucleate miogeniche dette cellule satelliti, che sono localizzate in aree subsarcolemmali, ma separate dal sarcolemma miofibrilare. Esse rappresentano il 2-8% dei nuclei muscolari e si attivano e proliferano nei processi di rigenerazione muscolare, e assai limitatamente nell'ipertrofia massimale, mentre diminuiscono in caso di inattività/ipotrofia estrema.

Caratteristiche funzionali dei tipi di fibre muscolari

Le reazioni istochimiche enzimatiche permettono una differenziazione più netta tra i due principali tipi di fibre: le fibre di tipo I (miofibre a contrazione lenta e resistenti alla fatica) e le fibre di tipo II (miofibre a contrazione rapida e poco resistenti alla fatica, IIA, o pochissimo resistenti, IIB). Ancor più isoforme diverse della miosina sono però distribuite nei tre tipi di fibre muscolari contribuendo all'ampia variabilità delle caratteristiche contrattili delle popolazioni di unità motorie [51]. I diversi tipi di fibre muscolari scheletriche dipendono strettamente dall'attività dei neuroni motori delle corna anteriori, che ne determinano le caratteristiche molecolari, istologiche, biochimiche e fisiologiche, in particolare la velocità di contrazione e rilasciamento e la resistenza alla fatica. Durante lo sviluppo embrionale dei mammiferi e degli

uccelli le fibre muscolari immature cominciano ad esprimere proteine contrattili (di tipo embrionale e poi neonatale) prima di essere innervate. L'innervazione delle fibre muscolari determina e mantiene poi per tutta la vita i diversi tipi di fibre muscolari, condizionando l'espressione genica, la massa ponderale e le caratteristiche funzionali dei diversi isotipi di fibre muscolari (almeno tre tipi: fibre lente/resistenti alla fatica, rapide/resistenti alla fatica e rapide/facilmente affaticabili).

Il motoneurone inferiore influenza il tipo di fibra muscolare dell'unità motoria, tanto che si classificano i motoneuroni di tipo I e II e le relative fibre muscolari di tipo I e II (IIA, IIB, IIX, rispettivamente) in funzione della continuità o discontinuità e frequenza delle scariche di potenziali d'azione (motoneuroni ad attività tonica o fasica). In realtà le isoforme delle proteine contrattili sono più numerose e la loro co-espressione in singole miofibre, ha dimostrato una notevole eterogeneità delle miofibre, in particolare nelle fasi di transizione della plasticità muscolare. Nella stragrande maggioranza dei muscoli umani i due tipi di fibra si alternano (si dice che i muscoli sono misti), con una lieve prevalenza delle miofibre di tipo II. I tipi di fibre sono nei muscoli scheletrici dell'uomo mescolati in modo abbastanza uniforme, formando un mosaico di fibre chiare e scure nei preparati istochimici trattati per l'ATPasi miofibrillare.

Nel caso di fenomeni di denervazione/reinnervazione di miofibre a contrazione lenta (tipo I) da parte di assoni nervosi originariamente diretti ad unità motorie a contrazione rapida (tipo II) e viceversa, si ha la conversione delle caratteristiche fisiologiche e tintoriali. Dato che in tal caso un assone tende a reinnervare più fibre vicine si realizza il caratteristico fenomeno del type-grouping (raggruppamento isotipico, molte fibre vicine hanno le stesse caratteristiche istochimiche).

Il muscolo denervato: un motore al minimo

Il processo di atrofia da denervazione "periferica" permanente è stato studiato sperimentalmente dopo sciectomia nei muscoli degli arti dei roditori (in cui lo stiramento passivo residuo delle miofibre, diminuisce fino a scomparire per la fissazione delle articolazioni conseguente alla fibrosi delle capsule articolari), confrontandolo con quello del diaframma dopo emi-frenicotomia [11]. In questo secondo caso, il cronico stiramento passivo prodotto dall'emidiaframma attivo induce inizialmente una paradossale risposta ipertrofica e poi impedisce la sostituzione lipo-fibrotica delle miofibre severamente atrofiche, che si attua invece nei muscoli degli arti posteriori "denervati e fissati" dei roditori entro l'ottavo-dodicesimo mese dalla sciectomia. Ricordiamo che anche nell'uomo l'atrofia dovuta all'inattività per lesioni del motoneurone centrale, non evolve in lipodistrofia neppure a venti anni dalla mielolesione [27], mentre la

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

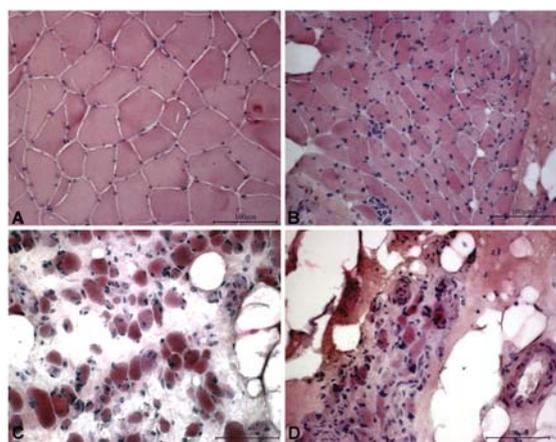


Fig 2 Aspetti istologici a breve, medio e lungo termine. Ematossilina-Eosina. Tessuto muscolare umano. A, normale; B, 0,9 anni di denervazione; C, 3,3 anni di denervazione; D, 8,7 anni di denervazione. Dopo quasi un anno di denervazione il muscolo presenta aspetti di media atrofia. Solo dopo tre anni prevale la sostituzione lipo-fibrotica, molto accentuata dopo circa 10 anni di denervazione flaccida.

denervazione da lesione del motoneurone spinale evolve in lipo-fibrosi muscolare in due-tre anni [24]. Le principali patologie del secondo motoneurone sono di natura genetica, tossica, traumatica e degenerativa e possono insorgere a livello delle cellule delle corna anteriori del midollo spinale, delle radici spinali anteriori e dei nervi periferici. Il sintomo motorio caratteristico è una paralisi flaccida prolungata o permanente che si accompagna a grave atrofia muscolare, reversibile solo se le fibre muscolari vengono reinnervate o sono mantenute attive mediante stimolazione elettrica prolungata nel tempo. L'atrofia coinvolge interi muscoli quando la lesione interviene a livello delle corna anteriori spinali, come nella poliomielite anteriore acuta e nelle atrofie spinali ereditarie, mentre sono coinvolti interi fascicoli muscolari o gruppi più o meno estesi di miofibre nell'ambito dello stesso fascicolo, quando la lesione avviene a livello del nervo periferico, come nelle neuropatie periferiche genetiche, traumatiche, tossiche e metaboliche. Nonostante l'enorme massa di conoscenze, nelle patologie motorie post-traumatiche medici dello sport, ortopedici, chirurghi plastici, fisioterapisti e fisioterapisti si scontrano con difficoltà insormontabili in una percentuale ancora troppo elevata di casi. Nonostante lo sviluppo tumultuoso negli ultimi decenni delle tecniche diagnostiche e degli approcci microchirurgici, un salto qualitativo nel trattamento delle patologie muscolari neurogene può essere atteso solo dall'applicazione in ambito clinico di risultati né programmabili né prevedibili della ricerca neurologica fondamentale. E' anche vero però che,

seppur più raramente, osservazioni della ricerca clinica aprono prospettive inattese di ricerca fondamentale.

Un esempio di trasferimento dei risultati della ricerca libera alla clinica speriamo possa venire dalla validazione di strategie riabilitative del muscolo scheletrico permanentemente denervato. Chiameremo questa condizione "denervazione flaccida", non solo per comodità, ma anche per il ruolo patogenetico dell'assenza di ripetuti eventi di tensione cellulare nella progressione da semplice atrofia a degenerazione del tessuto muscolare denervato perifericamente.

Nel tessuto muscolare normale le fibre hanno profili poligonali separati da poco connettivo lasso endomisiale. Sia nel medio sia nel lungo termine le fibre muscolari di soggetti affetti da paraplegia spastica (cioè da lesione del motoneurone centrale) mostrano invece profili circolari ben separati dall'interstizio (modesta fibrosi/edema). Le miofibre hanno diametri molto più variabili presentando sia fibre ipertrofiche (rigonfie?), che rare miofibre di piccolo o piccolissimo diametro (denervate?). Contemporaneamente aumenta il connettivo lasso, mentre molto rari restano gli adipociti e modesta la franca fibrosi. Nel caso delle paresi spastiche non ci sono differenze significative tra muscoli paralizzati da 4 o 15 anni [27]. Pur essendo molto diversi dai muscoli umani normali non presentano mai la devastante alterazione che interessa quelli di soggetti con paresi flaccida completa, cioè da lesione permanente del motoneurone spinale.

Nelle denervazioni periferiche permanenti per lesioni dei nervi motori o nella paraplegia flaccida dovuta a lesioni traumatiche o ischemiche del soma del motoneurone spinale, l'atrofia progredisce fino ad una completa degenerazione del tessuto muscolare scheletrico, che viene sostituito da tessuto connettivo lasso ed adiposo ed infine dalla fibrosi. In figura 2 si possono apprezzare l'entità dei cambiamenti osservati nei prelievi biopsici eseguiti da soggetti con paraplegia flaccida permanente. Sorprendentemente (in confronto con le informazioni raccolte nei roditori) i muscoli umani a un anno circa dalla lesione spinale presentano fibre muscolari ancora ben conservate, seppure notevolmente atrofiche (B). E' solo dal terzo anno che prevalgono gli aspetti francamente distrofici (C, sostituzione adiposa e fibrosa della popolazione di miofibre denervate). L'analisi istologica ottica non è però completamente rappresentativa del decorso post-lesionale, dato che tra quello che appare ad una osservazione superficiale tessuto connettivo lasso sono invece presenti numerosissime miofibre muscolari "severamente" atrofiche. Esse hanno cioè perso completamente il materiale contrattile e presentano una del tutto peculiare distribuzione a gruppi dei nuclei, separati da tratti di miofibre in cui nuclei e proteine sarcomeriche sono assenti. Le miofibre denervate per lesione del secondo motoneurone sembrano cioè sopravvivere molto più a lungo di quanto generalmente

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

accettato e descritto in letteratura, non solo nei muscoli dei roditori, ma ancor di più in quelli umani.

L'ipotesi che il tessuto muscolare dei grandi mammiferi presenti una differente risposta all'inattività (almeno in confronto ai roditori) è molto rinforzata dai risultati di recupero trofico ed in parte funzionale (la recuperata abilità di sostenere contrazioni tetaniche sotto carico) mediante una strategia riabilitativa di stimolazione elettrica funzionale della muscolatura flaccida (che deve naturalmente essere continuata per tutta la vita, dato che deve supplire all'assenza permanente dell'innervazione). I risultati del Progetto Europeo RISE (ALZATI!) indicano la reversibilità della degenerazione muscolare secondaria a lesioni permanenti del motoneurone spinale ed incoraggiano a riprendere in considerazione strategie di stimolazione elettrica a lungo termine della muscolatura scheletrica nei più complessi casi di trasferimento di lembi muscolari liberi (e cioè denervati) resi possibili dalla microchirurgia vasale. La serie molto numerosa e ben distribuita nel tempo di biopsie di muscoli cronicamente "flaccidi" del Progetto EU RISE ci ha permesso di constatare che, sebbene le miofibre umane perdano in pochi mesi la capacità di contrarsi per stimolazione diretta con gli elettrostimolatori di normale uso clinico a causa della disorganizzazione dei tubuli T e dei sarcomeri, mantengono tuttavia per tempi inaspettatamente lunghi la capacità di controllare il potenziale di membrana a riposo e di condurre potenziali d'azione se stimolate da correnti elettriche di adeguata potenza (Stimolazione Elettrica Funzionale domiciliare per muscoli denervati, h-b FES) [9].

L'apparato di accoppiamento eccitazione-contrazione ha un ruolo nella progressione dall'atrofia alla distrofia del muscolo scheletrico umano denervato per lesioni spinali o periferiche del secondo motoneurone. Già nella fase iniziale di atrofia semplice si attua la dissociazione tra sarcolemma (tubuli T) e reticolo sarcoplasmatico: gli eventuali eventi di fibrillazione, che caratterizzano le fasi acute della denervazione, cessano di produrre effetti meccanici e metabolici importanti a causa del conseguente blocco del rilascio del calcio dalle triadi. Il FES training blocca la degradazione del sistema costituito da tubuli T e Reticolo sarcoplasmatico e ne favorisce la riorganizzazione nelle miofibre severamente atrofiche. Solo molti mesi (nel ratto) o anni (nell'uomo) di denervazione periferica producono nelle miofibre l'incapacità di rispondere anche ad elevate correnti elettriche. La parziale sostituzione del volume muscolare perso con tessuto adiposo e fibroso è un processo relativamente precoce, la progressiva scomparsa delle miofibre (per processi terminali di apoptosi) è un evento che compare nel ratto dopo più di un anno di denervazione (un terzo dell'aspettativa di vita dei ratti di laboratorio) ed è deducibile nel caso di biopsie umane prelevate dopo decenni di denervazione,

come è descritto nelle sequele tardive della poliomielite.

Le caratteristiche morfologiche del tessuto muscolare cronicamente denervato nei roditori suggeriscono che nelle fasi di comparsa di eventi di apoptosi/necrosi delle miofibre questi eventi lesivi vengano seguiti (almeno per una minoranza di casi) da cicli ripetuti di rigenerazione muscolare. Le biopsie umane che sono state studiate nell'ambito del progetto EU RISE presentano tra la maggioranza delle miofibre con caratteristiche tipiche della denervazione (piccole miofibre angolate od appiattite), piccole fibre rotonde e positive con un anticorpo monoclonale contro la miosina embrionale. Poiché l'espressione dei geni embrionali dura nella miogenesi rigenerativa poche settimane anche in assenza della reinnervazione, possiamo concludere che abbiamo prove dirette di eventi rigenerativi in tutte le biopsie muscolari raccolte da soggetti tra 1 e 10 anni dalla lesione spinale irreversibile [12,24,54].

Rigenerazione muscolare

E' dalle Cellule Satelliti, cellule miogeniche residenti, isolate rispetto al sarcolemma della miofibra ma alloggiate sotto una comune membrana basale, che attivate dalla lesione delle miofibre si originano certamente quei mioblasti che moltiplicandosi e fondendo realizzano la rigenerazione delle fibre muscolari. Man mano i mioblasti fondono e si formano i miotubi, cui però si affiancano mioblasti "satelliti" per mantenere nel tempo la potenzialità rigenerativa delle nuove fibre muscolari. Iniziano ad accumularsi le proteine contrattili, prima quelle di tipo embrionale e poi, con il ricontatto sinaptico, quelle dipendenti dalle caratteristiche differenziali dei motoneuroni spinali. Poiché ciò più spesso avviene per elongazione assonica da sinapsi di fibre muscolari vicine, la denervazione/reinnervazione delle miofibre può essere riconosciuta per lungo tempo dalla redistribuzione spaziale dei tipi di fibre. Poiché si perde la distribuzione a scacchiera delle unità motorie dei muscoli umani (generalmente misti), si rende evidente il più sicuro dei marcatori cellulari di reinnervazione, il raggruppamento isotipico (type-grouping). Si completa così la differenziazione delle miofibre per le diverse modalità di contrazione imposte dai motoneuroni ad attività tonica (tipo I) o fasica (tipo II).

Va però segnalato che, anche in assenza permanente del nervo, le miofibre rigeneranti raggiungono, per intrinseca spinta miogenica, una massa di un quarto di quella propria delle miofibre innervate adulte e che vi è una spontanea transizione all'espressione di isomiosine di tipo rapido adulto anche in assenza di innervazione. La popolazione di miofibre rigenerate in assenza dell'innervazione motoria permane a lungo (mesi od anni, a seconda della dimensione/longevità delle specie animali), sicché eventuali eventi di lesione

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

letale/rigenerazione possono contribuire alla massa muscolare permanentemente denervata.

Tutto ciò si ripete a lungo nel tempo: il contributo di questi eventi rigenerativi deve essere pertanto considerato come un meccanismo compensatorio, seppure sub-ottimale, se si vuole dare una più realistica descrizione del processo di involuzione del muscolo scheletrico permanentemente denervato, sia in modelli animali, sia nell'uomo. Solo dopo un anno nei roditori prevale l'involuzione dovuta alla permanente denervazione, mentre le fibre umane (ma anche quelle di coniglio) ad un anno dalla denervazione presentano ancora atrofia semplice. Nei muscoli denervati le fibre muscolari rigenerate possono essere riconosciute almeno per un mese utilizzando anticorpi contro i marcatori molecolari di sviluppo e differenziazione/rigenerazione [14].

1.2 Stimolazione elettrica funzionale del muscolo denervato

Quasi tutte le applicazioni cliniche accettate internazionalmente di Stimolazione Elettrica Funzionale, sono basate sulla eccitazione diretta di strutture nervose e sull'attivazione indiretta del muscolo. Per la riattivazione funzionale di muscoli denervati e specialmente per quelli secondariamente degenerati (in Inglese: degenerated denervated muscle, DDM) le richieste tecniche sono completamente differenti: la pratica corrente di stimolazione elettrica prevede elettrodi troppo piccoli, ampiezze troppo basse e tempi e frequenze di trattamento inadeguate. Questi parametri possono essere efficaci nel trattare lesioni transitorie (se applicati precocemente dopo la lesione spinale), ma sono definitivamente inadatti a impedire la progressione dell'atrofia e la degenerazione del muscolo denervato, se applicati a medio e lungo termine. A causa dell'assenza di giunzioni neuromuscolari e della conseguente disorganizzazione delle unità motorie, contrazioni muscolari massive possono essere prodotte solo depolarizzando direttamente tutte le miofibre interessate. Ci sono solo alcuni studi pubblicati che dimostrano o in animali o nell'uomo che la riattivazione funzionale di muscoli denervati è possibile, mediante stimolazione elettrica funzionale (FES, Functional Electrical Stimulation), utilizzando correnti ad elevata intensità ed elettrodi ad ampia superficie (in teoria anche in casi di grave degenerazione muscolare) [24,28,55,61]. Questo significa che nei DDM rimangono sia importanti strutture muscolari eccitabili, sia una sostenuta capacità rigenerativa, che migliorano a seguito di un'aumentata attività muscolare.

Lomo e coautori [32] hanno dimostrato in uno studio fondamentale nel ratto, che l'elettrostimolazione è capace di ristabilire le proprietà elettriche ed elettrochimiche della membrana muscolare anche dopo vari gradi di atrofia muscolare, e non solo una volta, ma anche ripetutamente se la stimolazione è interrotta

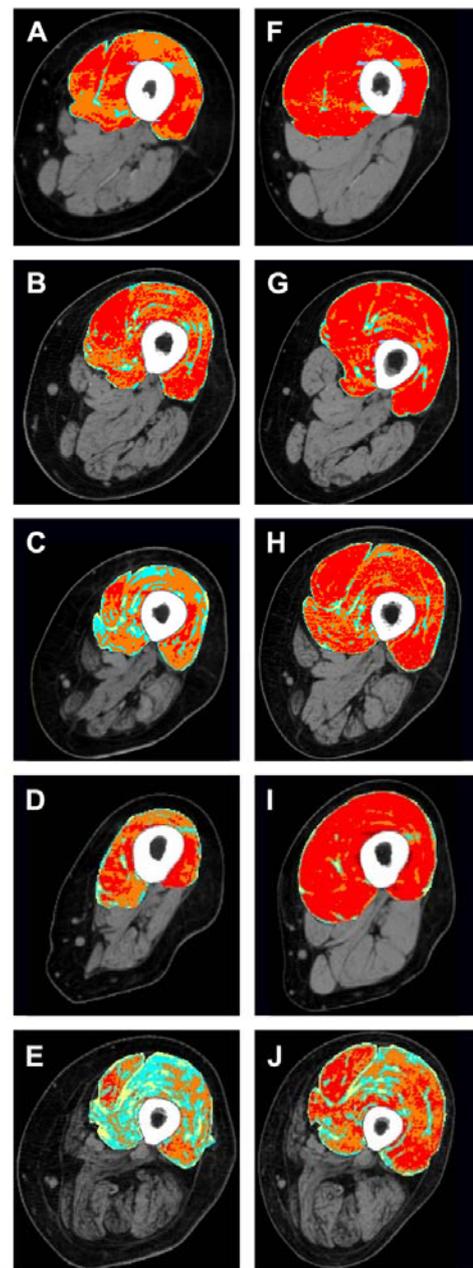


Fig 3 Sezioni Color-TC dei muscoli della coscia prima e dopo due anni di FES. L'area di sezione dei muscoli, nei pazienti che si sono sottoposti al protocollo dopo differenti intervalli di tempo dalla denervazione (A 0.8, B 1.2, C 1.7, D 3.2, E 5.4 anni), aumenta dopo due anni di allenamento domiciliare (F, G, H, I, J). Il tessuto interstiziale che aumenta con il tempo di denervazione (aree gialle, verdi e blu), diminuisce dopo due anni di FES. Il recupero muscolare è tanto più pronunciato quanto minore è il tempo trascorso tra lesione ed inizio h-b FES [25,26].

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

e ripresa per settimane o mesi. Contemporaneamente erano recuperate forza e caratteristiche dinamiche della scossa muscolare. Carraro et.al. [13] hanno dimostrato anche in un altro studio sul ratto una bassa ma duratura capacità rigenerativa a livello cellulare (miogenesi rigenerativa dipendente dalla moltiplicazione delle cellule satelliti) nel muscolo denervato non trattato, ed ancora un sostanziale aumento di questa attività dopo ripetute lesioni muscolari [11,39]. Simili eventi miogenici sono stati osservati da questo gruppo di ricerca in pazienti paraplegici con denervazione periferica degli arti inferiori prima e dopo di aver condotto un intenso programma di h-b FES domiciliare dei muscoli quadricipiti [12].

Il progetto europeo “RISE (Alzati!)”

Tutti questi esperimenti sono prove robuste che la Stimolazione Elettrica Funzionale domiciliare (h-b FES) è uno strumento efficace e potente per mantenere, recuperare funzionalmente e ricostruire il tessuto muscolare denervato. Questa tecnica ha un elevato potenziale nella riabilitazione di pazienti con denervazioni muscolari di varia origine e specialmente dopo traumi al conus midollare spinale e/o alla *cauda equina*. Stabilire su solide basi scientifiche questa metodica è stato l’obbiettivo principale del progetto Europeo “RISE, Use of electrical stimulation to restore standing in paraplegics with long-term denervated degenerated muscles” (ALZATI, Uso della stimolazione elettrica per recuperare la stazione eretta in paraplegici con muscoli degenerati per denervazione cronica). Basato su precedenti premesse scientifiche e rivolto alla risoluzione dei problemi ancora aperti nella FES di muscoli denervati, il progetto RISE è stato accettato e finanziato dall’Unione Europea nell’ambito del 5° Programma Quadro. Il progetto, iniziato l’1 Novembre, 2001 è terminato il 31 Maggio, 2006.

Nell’ambito del progetto RISE è stato sviluppato un nuovo metodo clinico di riabilitazione di pazienti sofferenti da lungo tempo di paraplegia flaccida, e cioè con muscoli denervati-degenerati (DDM, dall’Inglese: Denervated Degenerated Muscle), dopo accertamento dell’impossibilità del recupero funzionale del sistema nervoso. Il protocollo di FES training si è dimostrato in grado di far recuperare alle fibre muscolari della coscia di questi pazienti una massa vicina ai valori di adulti sedentari (Fig. 3) ed una parziale funzione muscolare (contrazioni tetaniche, con sollevamento di pesi) [24].

I soggetti che hanno dimostrato i migliori benefici dopo mesi di FES training sono stati in grado di raggiungere e mantenere la stazione eretta FES-assistita, aggiungendo al FES training domiciliare giornaliero anche l’esercizio di passo simulato (stepping-in-place), utilizzando le barre parallele per sicurezza e per mantenere l’equilibrio con gli arti superiori (Fig. 3).

L’attività fisica, che il soggetto è incoraggiato ad eseguire giornalmente, può contribuire a prevenire le



Fig 4 *Paziente alle parallele durante la stimolazione elettrica. Si notino il sorriso e i larghi elettrodi [25,26].*

ulcere da decubito a lungo termine, ma l’aumento dell’autostima e della qualità della vita sono risultati rapidamente apprezzabili: l’effetto estetico delle accresciute masse muscolari della coscia viene raggiunto abbastanza presto in quasi tutti i soggetti.

La strumentazione necessaria a queste applicazioni (stimolatori elettrici molto potenti ed elettrodi di grande superficie, ottimizzate utilizzando i risultati della sperimentazione animale in ratti conigli e maiali, ed i primi risultati di due trial clinici [24,28]), sono in avanzata fase di sviluppo commerciale. Uno degli scopi principali del Progetto RISE è stato quello di fornire all’industria biomedica Europea una nuova famiglia di prodotti con un ampio ventaglio di applicazioni cliniche ed un metodo per soddisfare i bisogni di circa 20 nuovi pazienti mielolesi per anno per milione di abitanti Europei e non-Europei [36].

Il progetto Rise2-Italy: FES domiciliare nelle lesioni nervose periferiche incomplete

Durante gli ultimi cinque anni, contrariamente alle aspettative generali, il progetto Europeo “RISE (Alzati!): Uso di stimolazione elettrica per raggiungere attivamente la stazione eretta nel paziente paraplegico con muscoli denervati-degenerati”, ha dimostrato in pazienti affetti da lesione completa del conus

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

medullaris e della cauda (cioè con lesione completa del midollo lombo-sacrale e delle emergenti radici nervose) che: 1. Le fibre muscolari denervate mantengono l'eccitabilità-contrattilità più a lungo del previsto (mesi); 2. Le fibre muscolari denervate sopravvivono più a lungo del previsto (anni); 3. Il tessuto muscolare denervato mostra dei prolungati eventi di rigenerazione di cellule muscolari, perché mantiene un gruppo di cellule staminali miogeniche più a lungo del previsto (decine di anni); 4. L'elettrostimolazione funzionale (FES) dei muscoli denervati, mediante elettrodi ad ampia superficie ed elettrostimolatori costruiti appositamente per questo scopo (che producono impulsi 100-1000 volte più intensi rispetto agli apparecchi attualmente impiegati per uso clinico), ripristina sostanzialmente la massa muscolare con un associato miglioramento della struttura e della funzione, in particolare quando l'elettrostimolazione domiciliare giornaliera (h-b FES) è iniziata durante il primo anno dalla lesione spinale. Questi risultati sono sostenuti da studi sperimentali su ratti, conigli, maiali ed evidenze cliniche. Si veda per una recente rassegna e nuovi risultati della sperimentazione animale Squecco et al. [54]. I risultati del Progetto RISE dopo uno e due anni di h-b FES sono documentati da Kern et al. [25,26].

La dimostrazione che un nuovo tipo di elettrostimolatore, associato ad elettrodi ad ampia superficie, è in grado di:

- indurre singole contrazioni o contrazioni sostenute (tetani) in muscoli denervati;
- aumentare la massa muscolare;
- migliorare le condizioni della cute;
- diminuire il rischio di formazione di piaghe da decubito;
- migliorare l'effetto estetico;

apre la possibilità di ottenere effetti trofici e funzionali anche nei muscoli con grave atrofia secondaria a lesioni di nervi periferici, una coorte di soggetti più numerosa: quella dei soggetti affetti da lesioni dei plessi nervosi o di singoli nervi (ad esempio, nervo circonflesso o femorale), che sono i pazienti in via di reclutamento nel progetto Italiano Rise2-Italy.

L'obiettivo del nuovo progetto è di identificare tra i casi clinici della Medicina Fisica e dell'Unità di Riabilitazione dell'Università di Padova, un gruppo di pazienti con lesioni permanenti complete od incomplete dei muscoli degli arti per estendere i risultati del Progetto Europeo RISE. Inoltre il progetto mira ad approfondire le conoscenze fisiopatologiche muscolari utili a sviluppare nuove terapie per il recupero di muscoli cronicamente denervati, anche mediante cellule staminali mesenchimali miogeniche autologhe e la neurotizzazione con impianto di gangli mesenterici colinergici oppure con cellule staminali mesenchimali neurogeniche autologhe [8,45].

1.3 Ecomiografia funzionale del muscolo scheletrico

Anatomia macroscopica

Lo studio ecografico delle strutture muscolari non può prescindere da un'approfondita conoscenza della anatomia umana, pertanto è indispensabile procedere a una breve e rapida descrizione anatomica del tessuto muscolare.

I muscoli volontari sono formati da una parte essenziale, rossa, che è costituita da fasci di fibre muscolari, e da una parte detta accessoria o bianca, che è costituita da fasci di tessuto connettivo denso ed è destinata all'inserzione dei muscoli stessi sullo scheletro. Questa parte viene chiamata rispettivamente tendine quando prende la forma di un cordone o aponeurosi se in forma di lamina. I muscoli prendono inserzione sullo scheletro, di regola mediante due soli capi, capo di origine e capo terminale o d'inserzione; questa definizione è legata all'elemento scheletrico che è mobile rispetto all'altro: con capo di origine si intende l'attacco a livello del punto fisso, con capo d'inserzione si intende l'attacco nel punto mobile. Il peso e il volume dei muscoli variano notevolmente con età, sesso, abitudini di vita e costituzione individuale. Risulta perciò molto utile nelle lesioni nervose unilaterali l'esame comparativo, preferibilmente iniziando dal lato ritenuto normale, al fine di ottenere un'immagine ecografica anatomica, sulla quale regolare la curva di guadagno, da confrontare successivamente con quella controlaterale, onde documentare eventuali differenze di struttura e forma.

I muscoli scheletrici presentano uno schema architettonico comune, indipendentemente dalle dimensioni e dalla forma specifica di ognuno di essi. Una membrana connettivale fibrosa, l'epimisio, invia in profondità robusti setti connettivali, il perimisio, che ramificandosi, suddividono la massa muscolare in fasci via via più minuti; questi si definiscono come fasci primari, secondari e terziari, fino a che ogni fibra muscolare contrattile è isolata, delimitata da un involucro collagene, l'endomisio, costituito da connettivo reticolare mescolato a sostanza fondamentale ricca di mucopolisaccaridi.

L'impalcatura connettivale consente ai fasci il reciproco scorrimento ed eventuali contrazioni parziali e indipendenti; la stessa impalcatura si presenta come un'unità morfo-funzionale capace di trasmettere l'accorciamento delle fibre muscolari alla parte tendinea; infine essa fornisce gli spazi connettivali idonei al il passaggio dei vasi e dei nervi propri del muscolo.

I tendini e le aponeurosi sono costituiti da connettivo denso. Le fibre collagene che costituiscono un tendine, sono riunite in fascetti e questi successivamente in fasci, tra i quali si interpone un connettivo lasso con fibre elastiche, in continuità con la guaina connettiva che riveste perifericamente il tendine. Detti fasci di fibre collagene si continuano con il periostio o con il

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

pericondrio e in gran parte invadono anche la sostanza fondamentale della cartilagine e dell'osso [1,37,59].

Tecnica di esame

L'esame ecografico ha rivoluzionato l'approccio diagnostico nello studio dell'apparato muscolo-tendineo e osteo-articolare, e con la sua continua evoluzione tecnologica, si trova oggi in una posizione di primo piano per quello che concerne l'apparato muscolare e numerosi distretti tendinei, ed è sicuramente l'approccio di primo livello anche nello studio delle articolazioni, ovviamente completato, se necessario, dall'impiego della TC e della risonanza magnetica. La metodica ultrasonografica offre vantaggi non indifferenti quali la non invasività, che consente plurimi monitoraggi, la facilità di approccio, fondamentale spesso negli esami comparativi, e soprattutto la dinamicità, che è tra le metodiche di "imaging" una peculiarità dell'ecomiografia dinamica o funzionale.

Quando si esamina un muscolo, la scelta del trasduttore appropriato dipende da vari fattori, tra cui lo spessore muscolare complessivo, la sua posizione rispetto alla superficie cutanea (profonda o superficiale) e la consistenza dei tessuti sottocutanei. Le sonde ritenute oggi più idonee allo studio dell'apparato muscolo-scheletrico sono quelle di tipo lineare con frequenze variabili dai 7.5 ai 10 Mhz. I trasduttori superiori ai 10 Mhz forniscono un'ottimale definizione delle strutture molto superficiali, quali possono essere tendini e nervi in sede periarticolare, ma, se impiegati singolarmente, possono creare problemi dovuti al campo di visualizzazione estremamente ristretto. In alcune circostanze particolari, possono essere utilizzati trasduttori di frequenza medio-bassa, come ad esempio nello studio delle malattie neuromuscolari, nelle quali la notevole impedenza acustica del fascio ultrasonoro in profondità, limitato dall'iperecogenità del tessuto connettivo muscolare, a contenuto prevalentemente adiposo e fibrotico, non consente un idoneo studio dei tessuti più profondi. Un altro vastissimo campo di applicazione dell'ecografia è lo studio dell'apparato vascolare arterioso e venoso. L'avanzamento tecnologico offre sempre nuove potenzialità, quali l'impiego delle ricostruzioni tridimensionali [15] o l'effettuazione di sezioni di tessuto panoramiche, che permettono di rappresentare in un'unica immagine muscoli lunghi o larghi in modo da misurare lesioni intramuscolari ampie [5].

Le strutture muscolari e tendinee, costituite prevalentemente da fasci fibrillari ad andamento parallelo, esaltano le potenzialità diagnostiche dei trasduttori di tipo lineare. L'approccio con trasduttori di questo tipo, consente una incidenza perpendicolare del fascio acustico, che determina una corretta rappresentazione delle strutture anatomiche esaminate. L'impiego di trasduttori di tipo settoriale o *convex*, se

non in casi selezionati, risulta poco corretto, a causa della divergenza del fascio acustico in profondità, che determina pericolose deformazioni dell'immagine anatomica.

I piani di scansione sono quello sagittale e quello assiale, possibilmente eseguiti comparativamente all'arto controlaterale, per utilizzare un quadro di confronto. Le scansioni devono essere ottimizzate con una incidenza del fascio perpendicolare alla superficie da esaminare: tuttavia in relazione all'esperienza del singolo operatore, possiamo sfruttare le ampie possibilità di angolazione e di incidenza del trasduttore sulla cute, onde verificare la reale presenza di un processo patologico o meno. Queste manovre sono spesso potenziate dall'impiego di scansioni dinamiche con contrazioni attive e passive del muscolo o movimenti in stress di strutture articolari, che consentono una migliore valutazione di eventuali piccole lesioni non facilmente dimostrabili con un esame statico.

Le dimensioni muscolari possono essere facilmente valutate con la scansione di sezioni trasversali, con cui si possono facilmente individuare i muscoli ipotrofici ed ipertrofici. Durante queste misurazioni, è necessario evitare di esercitare qualsiasi pressione che possa alterare l'accuratezza della misurazione e del confronto con il muscolo controlaterale [56]. In conclusione, l'ecografia può essere considerata una valida alternativa alla risonanza magnetica per la valutazione delle sezioni trasversali e degli spessori muscolari, ed è in grado di fornire informazioni sul loro cambiamento in risposta al disuso ed all'allenamento [43].

Ecostruttura

Il primo momento dell'esame ecografico di un muscolo, è basato sulla sua identificazione, sia con scansioni statiche, sia con lo studio dinamico in real-time. Ciò presuppone la conoscenza della sua esatta posizione anatomica e delle sue prestazioni funzionali. È consigliabile iniziare con scansioni assiali, esplorando dal terzo medio del muscolo, seguendone poi i confini sia dal punto di vista craniale che caudale, al fine di isolarlo dai muscoli circostanti.

Il muscolo presenta un'ecostruttura relativamente ordinata, "a denti di pettine", per la regolare alternanza dei fasci terziari (le strutture muscolari più piccole evidenziabili con l'indagine ecografica), relativamente ipoecogeni, e dei setti fibroadiposi del perimisio, a elevata ecogenicità [41]. I tendini e le aponeurosi intramuscolari appaiono come bande iperecogene, valutabili più precisamente con immagini sul piano trasversale del muscolo. Il rapporto tra le componenti ipoecogene ed iperecogene riflette la proporzione tra il tessuto connettivale e i fasci muscolari; è variabile e differisce tra i vari muscoli, per esempio, il tricipite brachiale è meno ecogeno del bicipite brachiale [29]. Nelle scansioni dell'asse corto, la parte carnosa appare con piccoli punti iperecogeni, che rappresentano i setti

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

fibroadiposi, dispersi in un fondo ipoecogeno costituito dai fascicoli muscolari. Sul piano longitudinale, i setti fibroadiposi sono visualizzati come linee dritte, grossolanamente parallele, intervallate dalle linee ipoecogene dei fasci terziari [56]. È fondamentale sottolineare che tale aspetto è ottenibile squisitamente se la sonda è mantenuta rigorosamente perpendicolare al piano muscolare in esame; se il fascio ultrasonoro incide obliquamente alla direzione dei fasci muscolari, si otterranno delle aree fortemente ipoecogene, che possono determinare erronee interpretazioni con eventi patologici muscolari [35]. Questo artefatto è legato all'anisotropia, che è la proprietà di alcune sostanze di variare la loro capacità di riflessione secondo l'angolo d'incidenza dell'onda. La struttura ordinata dei fasci e dei setti fibroadiposi rende i muscoli delle strutture anisotropiche, particolarmente quando sono indagate per piani trasversali. I setti intramuscolari stessi, possono simulare cicatrici fibrose, se presi d'infilata su piani iperecogeni. Per la capacità di rilevare la disposizione dei setti fibroadiposi e dei tendini/aponeurosi interni al parenchima muscolare, l'ecomiografia è in grado di riconoscere la struttura interna, distinguere tra muscoli nastriformi, fusiformi e pennati. La fascia muscolare esterna, l'epimisio, appare come una guaina iperecogena ben delimitata, che circonda il muscolo ipoecogeno. Nei muscoli complessi, la fascia di rivestimento aiuta l'esaminatore a riconoscere ciascun capo muscolare. L'interstizio tra le fasce giustapposte di due muscoli adiacenti appare con una banda ipoecogena che corrisponde a un tessuto connettivo, svincolato da legami con i muscoli, che rappresenta il piano di clivaggio su cui scorrono i muscoli durante le loro fasi di contrazione e di rilassamento. Interruzioni focali della fascia si trovano nei punti in cui nervi, vene e arterie (vasi perforanti) entrano nel muscolo.

Il tendine appare ecograficamente come un'immagine nastriforme, che presenta all'interno media e omogenea ecogenicità, delimitata da due linee ipoecogene sottili, che costituiscono il peritenonio: i fasci di fibre collagene riproducono fini bande longitudinali parallele, alternativamente iper ed ipoecogene, ad aspetto lievemente ondulato, che si distanziano se il tendine è lasso e si fanno più compatte se il tendine è stirato [35]. A tale proposito è bene distinguere le strutture di tendini di ancoraggio quali appunto il tendine di Achille, il tendine quadricipitale e il rotuleo, e i tendini di scorrimento quali i tendini estensori e flessori del polso e del piede; i primi sono costituiti squisitamente dal peritenonio, i secondi, oltre al peritenonio, sono avvolti da una fascia più superficiale che costituisce la guaina sinoviale. All'interno, fra la guaina e il peritenonio, scorre un sottile strato di sinovia, che serve da lubrificante. In condizioni fisiologiche, i tendini di scorrimento e di ancoraggio non sono differenziabili gli uni dagli altri. Una corretta valutazione del tendine, soprattutto ai fini

della sua omogenea ecogenicità, impone che lo studio ecografico venga eseguito con tendine in massima estensione, tale da non costituire zone ipoecogene riferibili ad artefatti. I tendini, al pari delle strutture muscolari, vanno studiati sia con scansioni sagittali sia assiali, lungo il loro decorso e alle inserzioni. Spesso è dirimente l'esame comparativo e con scansioni dinamiche.

Contrazione

I muscoli, nell'atto della contrazione, determinano il movimento delle parti alle quali prendono attacco, contribuiscono inoltre largamente a determinare non solo la conformazione esterna del corpo, ma anche le sue modificazioni, in relazione con i diversi movimenti ed atteggiamenti. L'indagine ecografica non può pertanto prescindere dallo studio della loro dinamica, che è indagata facendo compiere al paziente movimenti di contrazione del muscolo, sia di tipo attivo che di tipo passivo. È possibile controllare le condizioni di integrità dell'epimisio e dei fasci muscolari terziari sotto sforzo, ed apprezzare anomali scorrimenti dei piani di clivaggio tra i muscoli e le strutture adiacenti, quali ossa, masse patologiche, vasi ecc.

Nei piani trasversali, il muscolo contratto appare generalmente ispessito e più ipoecogeno a causa dell'aumento di diametro dei fasci muscolari; nei piani sagittali, soprattutto per quanto riguarda i muscoli pennati, i setti intramuscolari cambiano il loro orientamento per l'azione delle fibre muscolari attaccate ad essi; nel muscolo gastrocnemio mediale, ad esempio, il "pennation angle" aumenta da 15.5° a riposo, a 33.6° durante una contrazione isometrica [40].

Perfusione

Le tecniche color- e power-doppler consentono di valutare la distribuzione e il flusso vascolare nei muscoli e nei tendini. In questo studio, per ora ci siamo limitati a un'analisi qualitativa dello spettro di alcune arterie del polo vascolare dei muscoli esaminati, acquisito in modalità eco-doppler. Lo spettro Doppler contiene le seguenti informazioni sul flusso sanguigno:

- L'asse verticale rappresenta le diverse velocità sottoforma di frequenze (delle onde generate dal calcolo della FFT), che rappresentano la differenza tra la frequenza dell'onda ultrasonora incidente e le frequenze delle onde diffuse dagli eritrociti in movimento;
- L'asse orizzontale rappresenta il tempo trascorso;
- L'intensità del colore dei singoli punti rappresenta il numero di GR in movimento con quella specifica velocità;
- Il flusso verso il trasduttore è rappresentato sopra la linea zero, viceversa il flusso in allontanamento al di sotto.

La forma dello spettro varia secondo la compliance del vaso, del ritmo cardiaco e delle resistenze periferiche

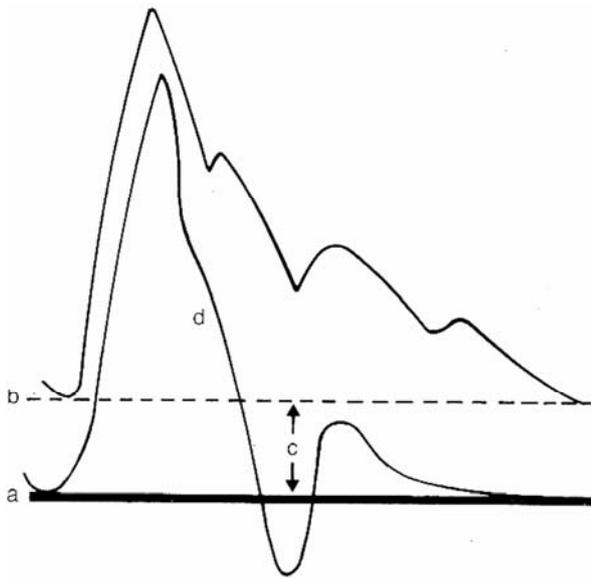


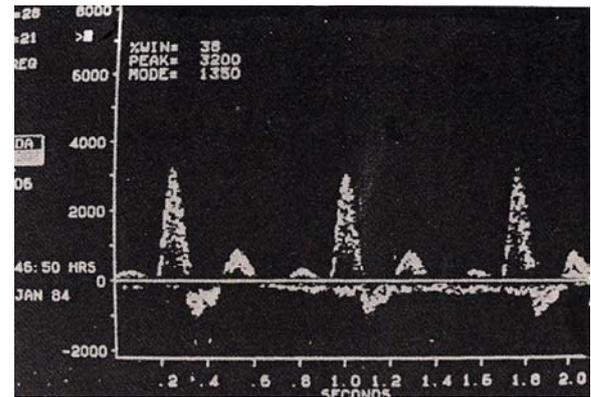
Fig 5 Curva di velocità tipo. La curva superiore si riferisce ad un vaso a bassa resistenza di circolo (a. carotide); quella inferiore ad un vaso con alta resistenza (a. femorale).

del territorio a valle (oltre alle innumerevoli condizioni patologiche), e proprio quest'ultima variabile è stata presa in considerazione nella valutazione del muscolo denervato.

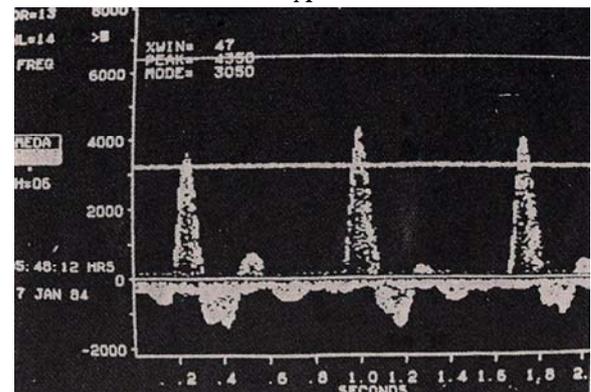
Si distinguono flussi ad alta e bassa resistenza, oppure flussi pulsatili e continui; i parametri che vengono in genere considerati nelle loro variazioni sono (Fig. 5):

- Lo stacco (c) dello zero flow dalla linea 0, dove per zero flow (b) si considera una linea immaginaria che unisce le basi dei vari picchi e per linea zero (a) la linea che si dovrebbe ottenere durante la registrazione di un vaso con velocità di flusso praticamente nulla;
- L'area compresa tra lo zero flow e la linea zero rappresenta il flusso continuo (c), ovvero la velocità di flusso che è sempre presente nella sezione di vaso tributario di organi parenchimatosi quali l'encefalo ed il rene. È indipendente dal ciclo cardiaco: essa è quasi nulla nei vasi ad alte resistenze al deflusso quali i distretti muscolari;
- L'area compresa tra lo zero flow e la curva, costituisce il flusso pulsante (d). Essa rappresenta la velocità di flusso dipendente dalla gittata cardiaca e dalle variazioni in tensione elastica della parete arteriosa [31].

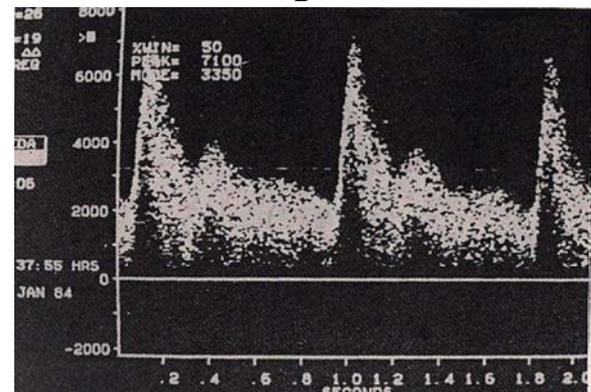
Il flusso è molto pulsatile nelle arterie degli arti a causa dell'alta resistenza a riposo e questo si ripercuote sullo spettro che acquisisce la classica forma trifasica: caratterizzata da una ripida salita durante la fase di accelerazione sistolica, seguita da una rapida decelerazione e un significativo reflusso nella proto-



A



B



C

Fig 6 Analisi spettrale dell'a. brachiale a riposo (A), durante contrazione forzata del pugno con incremento delle resistenze di circolo (B) e dopo rilascio del pugno (C), con incremento del letto vasale concomitante all'iperemia da sforzo. È importante rilevare come non sia più presente durante la contrazione la seconda onda diastolica evidente a riposo. Dopo rilascio scompare l'inversione, tutti i valori di frequenza diventano positivi, con notevole incremento della frequenza

diastole, e da un breve fase di flusso in avanti tra la meso-diastole e la tele-diastole. Flusso nullo si vede tipicamente alla fine della diastole (vedi Fig. 5, tracciato arteria femorale). Il flusso sistolico viene in

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

parte riflesso all'indietro dalle alte resistenze, finché è nuovamente diretto in avanti in seguito all'afflusso di sangue per il successivo ciclo cardiaco. Il risultato dell'alta pressione nelle arteriole degli arti è che il flusso sanguigno in questi vasi avviene significativamente solo durante la sistole, quando la pressione sistemica è più alta della pressione periferica; la pressione durante la diastole è troppo bassa per produrre un flusso consistente verso la periferia. Il flusso ad alta resistenza è tipico delle arterie che riforniscono i muscoli e la cute, le arterie degli arti e la carotide esterna.

Un aumento della richiesta di ossigeno in periferia porta alla dilatazione delle arteriole e la conseguente diminuzione delle resistenze periferiche porta al cambiamento della curva Doppler. Le resistenze periferiche possono diminuire in condizioni normali (attività muscolare) o anormali (infiammazione locale, ischemia postocclusiva, perfusione tumorale) e questo è associato all'aumento della componente diastolica del flusso nel tracciato Doppler (Fig. 6).

Le arterie che riforniscono gli organi parenchimali e il cervello sono caratterizzate da un flusso sanguigno abbastanza continuo, conseguente all'effetto windkessel dei grandi vasi elastici associato alle basse resistenze periferiche; in queste arterie, un aumento sistolico moderato è seguito da un flusso continuo che persiste per tutta la diastole. Questo tipo di flusso è tipico delle arterie renali, epatiche, spleniche, carotidi interne e vertebrali [52].

1.3 Ecomiografia funzionale nella patologia neuromuscolare

Per patologia neuromuscolare s'intende un gruppo di malattie eterogenee per eziologia, ma caratterizzate dalla finale degenerazione della fibra muscolare che è sostituita da tessuto fibro-adiposo. L'esame ecografico è pertanto rivolto allo studio del muscolo anche quando la patologia primaria non è muscolare ma nervosa. La patologia neuromuscolare studia prevalentemente le malattie che colpiscono l'unità motoria; le malattie neuromuscolari sono suddivise in quattro grandi gruppi, definiti dal livello a cui l'unità motoria è colpita. Le malattie differiscono per l'eziologia, l'età di esordio, la presentazione clinica e l'evoluzione.

Il loro andamento è di tipo cronicizzante, per lo più lentamente progressivo. La diagnosi di talune malattie neuromuscolari è estremamente difficile e raramente risulta possibile con i soli dati clinici. È fondamentale per stabilire la natura miogena o neurogena della sofferenza muscolare, l'indagine strumentale mediante elettromiografia e lo studio delle conduzioni nervose e potenziali evocati. Queste indagini però non consentono ancora di definire qualitativamente il processo di tipo degenerativo muscolare che, soprattutto nel campo delle miopatie, può essere talvolta chiarito soltanto da sofisticate analisi biotipiche, completate da esami istochimici e

istoenzimatici (come nel caso delle miopatie metaboliche e mitocondriali) ed ultrastrutturali, mediante microscopie elettroniche (miopatie congenite: centralcore, nemaliniche, ecc.). La diagnosi è generalmente già stata individuata dal neurologo che chiede al radiologo il monitoraggio con le metodiche per imaging durante la terapia. Lo scopo è di evidenziare eventuali alterazioni in senso peggiorativo, o stazionarietà del quadro, od ancora miglioramenti durante le fasi di terapia.

Nelle patologie da denervazione l'atrofia muscolare è la conseguenza della perdita del fattore trofico nervoso che si identifica con la modulazione dei fattori di trascrizione muscolari indotta dalle contrazioni, dato che finora nessuno ha potuto isolare chimicamente tali fattori. L'ecografia evidenzia un'area iperecogena omogenea, a margini talvolta sfumati, corrispondente all'area denervata. Se è interessato tutto un muscolo, esso apparirà ridotto di dimensioni, con margini netti, omogeneamente iperecogeno, con scomparsa della struttura a "pettine". I muscoli limitrofi appariranno del tutto normali. Il reperto era ritenuto statico nel tempo non essendo considerata una patologia evolutiva. Un importante risultato del nostro studio pilota è invece il riconoscimento non solo degli eventi di eventuale reinnervazione spontanea, ma anche la progressione dalla fase atrofica a quella degenerativa. L'esame ecografico presenta una netta peculiarità per questo tipo di controlli, dovuta al fatto di essere un esame non invasivo e dinamico. Il suo basso costo e il facile approccio ai pazienti, rende l'esame ultrasonografico, l'indagine elettiva in questo tipo di malattie. Trattandosi di malattie che insorgono in età diverse, con diverse modalità, con interessamento progressivo di più muscoli, ma non sempre a partenza dallo stesso muscolo, non è possibile codificare delle scansioni ecografiche standard: i vari muscoli vengono esaminati in base alla indicazione clinica del tipo di malattia, della sua fase progressiva e della sintomatologia.

Il quadro ecografico, pur non potendo porre diagnosi differenziale fra le diverse specie di sindromi, evidenzia alcuni parametri che sono tipici di queste malattie.

A) Aumento dell'ecogenicità: si assiste ad un diffuso aumento dell'ecogenicità della massa muscolare, dovuto all'aumento del connettivo inter- e perimuscolare, in seguito ad un processo marcato di fibrosi e sostituzione adiposa. Il processo colpisce diffusamente il muscolo e ne determina un sovvertimento ecostrutturale pressoché totale.

B) Alterazione del rapporto fra il tessuto adiposo e la massa muscolare: mentre nel paziente normale è di 1 a 7, nel muscolo denervato viene completamente alterato, fino ad invertirsi nei casi più gravi, causa l'ingravescente sostituzione di tessuto adiposo nei confronti della massa muscolare. Il quadro ecografico evidenzia pertanto un aumento dei piani adiposi sottocutanei, che appaiono disuniformemente

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

distribuiti, con tralci fibroconnettivali ad andamento disordinato. Il muscolo sottostante diminuisce di spessore, e si presenta, come prima accennato, marcatamente iperecogeno, per processi di sostituzione fibro-adiposa.

C) Perdita della normale eterogeneità con parziale o totale scomparsa degli echi dell'epimisio, dei fasci terziari e dell'osso: il processo patologico rende difficile la distinzione tra setti fibroadiposi, epimisio e fascicoli muscolari, conseguentemente l'immagine diventa, omogeneamente, più ecogena. Più la fibrosi risulta accentuata, maggiore risulta l'impedenza acustica del fascio ultrasonoro in profondità e l'attenuazione della progressione del fascio ultrasonoro rende sempre più difficile il riconoscimento del margine osseo sottostante. Pertanto, il grado di sovvertimento ecostrutturale è in relazione con la gravità del quadro clinico [16,17,19,20,21,38,57]. Per una recente rassegna di interesse pediatrico si veda Pillen et al. [42].

2. Obiettivi

Lo studio ha seguito dal punto di vista ecografico tre pazienti con muscoli atrofici conseguenti al danno di nervi periferici (nervo sciatico o plesso brachiale) o ad una lesione spinale estesa alla cauda equina, durante la stimolazione elettrica domiciliare (h-b FES) nell'ambito del Progetto Rise2-Italy, coordinato dal Centro di Ricerca Interdipartimentale di Miologia (cirMYO) dell'Università di Padova. Gli obiettivi dello studio sono stati:

- identificare le caratteristiche del muscolo denervato, attraverso la metodica ecografica e doppler, con particolare attenzione all'aspetto vascolare, di cui non si trovano riferimenti in letteratura;
- valutare, attraverso brevi filmati, la contrazione muscolare indotta dalla stimolazione elettrica, e comparare, nei due casi in cui era possibile, la cinetica di contrazione-rilassamento del muscolo denervato con quella del muscolo contro laterale normale;
- identificare eventuali cambiamenti a breve termine sulla perfusione muscolare dopo una seduta di elettrostimolazione, nel muscolo denervato e, se possibile, nel muscolo contro laterale normale;
- valutare la fattibilità di un monitoraggio ecografico basato sulle caratteristiche ecostrutturali e sulla misurazione degli spessori e delle caratteristiche della contrazione/rilasciamento muscolari.

La tesi è organizzata in base ai tre campi esplorabili:

- ecostruttura e spessori
- contrazione
- perfusione.

In ciascuna sezione si riferiscono le analisi ecografiche caratterizzanti il muscolo denervato e i cambiamenti indotti dal programma di stimolazione elettrica domiciliare (h-b FES).

3. Materiali e Metodi

I tre soggetti reclutati nello studio sono affetti da atrofia muscolare in seguito al danno di diversi nervi periferici. I muscoli al momento dell'arruolamento nel progetto non rispondevano ai protocolli clinici di stimolazione dei muscoli innervati; usando l'elettrostimolatore sperimentale e gli elettrodi ad ampia superficie sviluppati a Vienna per i muscoli cronicamente denervati hanno dimostrato di essere in grado di produrre singole contrazioni ripetute. Il protocollo sperimentale di stimolazione elettrica (che prevede sessioni di stimolazione 5 volte la settimana) non ha sostituito, ma integrato il protocollo standard dell'Unità di Riabilitazione dell'Università di Padova (mobilitazione attiva e passiva del distretto articolare coinvolto e terapia fisica antalgica).

1) B.N., donna di 46 anni, il 5 ottobre 2006 è stata sottoposta ad exeresi chirurgica di massa pelvica, che in seguito si è dimostrata una metastasi linfonodale da carcinoma squamoso; la massa infiltrava estesamente il nervo sciatico che si è dovuto sacrificare parzialmente durante l'intervento chirurgico.

L'elettromiografia dimostrava: parziale denervazione, di grado lieve-medio, dei muscoli grande e medio gluteo, di grado medio-marcato, dei muscoli posteriori



Fig 7 Aspetto clinico del muscolo tibiale anteriore destro (denervato) e sinistro (innervato). Evidente l'atrofia della gamba destra.

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

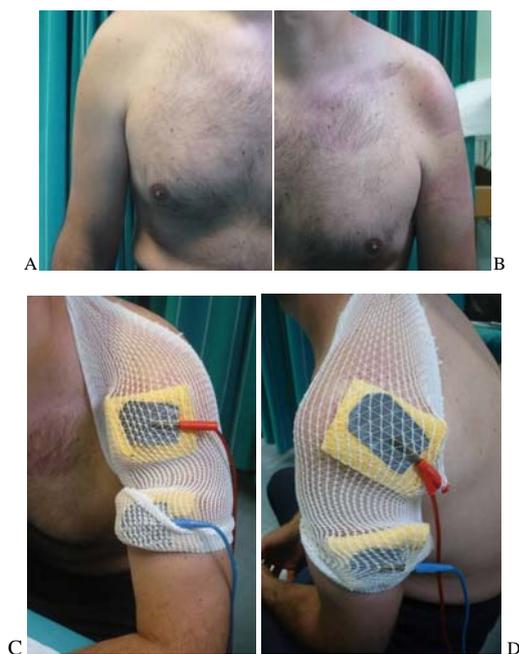


Fig 8 *Aspetto clinico del muscolo deltoide destro innervato (A) e sinistro denervato (B). L'atrofia del muscolo causa una deformazione del profilo del cingolo scapolare sinistro. Nei pannelli C e D l'applicazione degli elettrodi.*

della coscia e denervazione totale dei muscoli della loggia antero-laterale della gamba. La sensibilità ed i movimenti volontari dei muscoli del compartimento antero-laterale (in particolare del tibiale anteriore) erano e sono rimasti assenti dopo un anno dall'intervento chirurgico, nonostante una progressiva reinnervazione della coscia e del gastrocnemio. Nell'ottobre 2007 il soggetto ha iniziato il programma di stimolazione sperimentale del muscolo tibiale anteriore destro, visibilmente atrofico (Fig. 7), e di stimolazione "tradizionale" del muscolo bicipite femorale destro.

2) B.M., maschio di 32 anni, il 16 agosto 2007 ha subito un politraumatismo in seguito ad un incidente stradale, per il quale riportava numerose fratture, tra cui la frattura della clavicola e della scapola sinistra con lesione da stiramento del plesso brachiale omolaterale. L'elettromiografia (EMG) confermava i segni di una denervazione parziale del plesso brachiale sinistro: denervazione totale del muscolo deltoide, parziale di grado severo del muscolo bicipite, tricipite e lungo supinatore, parziale di grado lieve al muscolo estensore comune delle dita, abduktore breve del pollice e primo interosseo dorsale. Una EMG di controllo, effettuata l'anno seguente, dimostrava una denervazione parziale di grado medio a carico del deltoide con segni di attiva rigenerazione assonale. Nel settembre 2008 il soggetto ha iniziato il protocollo di elettrostimolazione sperimentale del muscolo deltoide

sinistro (Fig. 8) e di elettrostimolazione "tradizionale" con correnti Kotz del muscolo piccolo pettorale e trapezio sinistri.

3) M.O., maschio di 25 anni, il 20 dicembre 2007 ha riportato la lesione completa del midollo spinale a livello di L1 a seguito di un politraumatismo stradale. Il soggetto presenta paraplegia flaccida completa con ultimo livello sensitivo-motorio conservato in T11 (Asia classe A - assenza di attività sensitiva e motoria a livello degli sfinteri). Il soggetto ha iniziato nel settembre 2008 il programma riabilitativo, con elettrostimolatore sperimentale, dei muscoli glutei, dei quadricipiti e degli ischio-crurali.

Le caratteristiche ecostrutturali, gli spessori muscolari e i filmati delle contrazioni sono stati valutati con immagini ecografiche in modalità B-mode (MyLab25, Esaote, Genova, Italia; Elegra, Siemens, Erlangen, Germany); i filmati, in formato AVI, sono composti da fotogrammi acquisiti ogni 32 msec. È stata utilizzata una sonda lineare da 7.5-Mhz, posizionata perpendicolarmente alla superficie cutanea in posizioni ben precise e predeterminate, specifiche per ogni soggetto, in modo tale da consentire misurazioni standardizzate confrontabili e ripetibili in tempi diversi. La sonda è stata rivestita con gel ecografico per fornire un contatto acustico senza comprimere la superficie cutanea. Le immagini sono state ottenute mantenendo gli stessi settaggi (profondità, gain, focus) per permettere il confronto tra immagini acquisite in tempi diversi.

Per la valutazione ecostrutturale sono state preferite le immagini dei piani trasversali dei ventri muscolari, mentre, per evidenziare il movimento di contrazione-rilassamento, la sonda veniva posta su un piano longitudinale. Dopo aver individuato e posizionato la sonda sul sito di misurazione, la sonda è stata orientata, ruotandola attorno ai suoi assi, per ottenere lo spessore muscolare minimo visualizzabile in quel punto, altrimenti la misurazione sarebbe risultata sovrastimata; per evidenziare meglio la contrazione, l'orientamento ottimale della sonda è quello che permette la visualizzazione dei fascicoli terziari per tutta la loro lunghezza, questa condizione permette di visualizzare il muscolo in un piano longitudinale più preciso. Durante la registrazione della contrazione passiva del muscolo paralizzato, la sonda è stata posta tra i due elettrodi ad ampia superficie cercando di rispettare le condizioni suddette. Per confrontare la contrazione, indotta dall'elettrostimolatore, del muscolo denervato con quella del muscolo sano controlaterale, ovviamente non è possibile utilizzare lo stesso tipo di corrente (è molto dolorosa se la sensibilità è conservata!); si è utilizzato un tipo di corrente "tradizionale" per la stimolazione di muscoli normalmente innervati.

Con la stessa apparecchiatura ecografica si sono rilevati i tracciati spettrali di arterie perforanti specifiche. Il decorso superficiale delle arterie

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

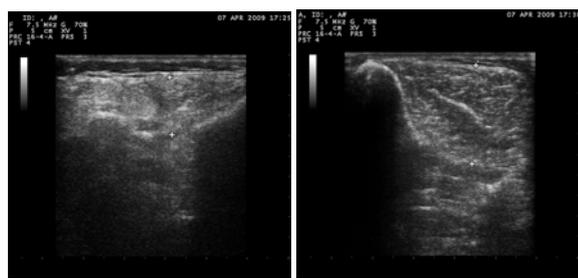


Fig 9 Paziente B.N. Immagini di sezioni al terzo medio del muscolo tibiale anteriore destro denervato (A) e sinistro sano (B). In A si riconoscono le caratteristiche del muscolo denervato: riduzione dello spessore (atrofia); aumento diffuso dell'ecogenicità; diminuzione dell'eterogeneità dell'ecostruttura; diminuzione degli echi dell'epimisio e dei margini ossei sottostanti.

esaminate in questo studio, ha permesso di utilizzare trasduttori ad alta frequenza. L'acquisizione di una corretta analisi spettrale necessita di un attento allineamento del trasduttore con il decorso del vaso. I vasi sono stati visualizzati nei due piani: in un primo momento i vasi sono stati identificati sul piano trasversale in modalità color-Doppler, per poi posizionare sul piano longitudinale, in modalità eco-Doppler, il volume campione all'interno degli stessi per eseguire l'analisi spettrale. I tracciati sono stati acquisiti prima a riposo e poi dopo 10 minuti di elettrostimolazione del muscolo denervato; per poter confrontare le analisi spettrali Doppler rilevate nei muscoli denervati dopo stimolazione elettrica con quelle dei muscoli innervati controlaterali, si è fatto compiere ai soggetti delle contrazioni isometriche sostenute in grado di mimare uno sforzo simile.

Ciascuno dei tre soggetti è stato sottoposto a 3 valutazioni ecomiografiche, la prima tra novembre e dicembre 2008, la seconda ad aprile 2009 e la terza a settembre 2009. Per quanto riguarda il primo soggetto, B.N., si sono studiati i due muscoli tibiali anteriori: sono state acquisite immagini del muscolo al terzo superiore, medio e inferiore; è stato effettuato l'eco-Doppler, sia a riposo, sia dopo stimolazione, della prima arteria perforante che si dirama dall'arteria tibiale anteriore destro (dx) e sinistro (sx); sono stati registrati i filmati della contrazione-rilassamento indotta dalla corrente nel tibiale dx e sx.

Nel secondo soggetto, B.M., si sono acquisite immagini dei muscoli deltoidei, piccolo e grande pettorale, bicipite e tricipite brachiale, sia a sinistra, che a destra; è stato effettuato l'eco-Doppler, sia a riposo, sia dopo stimolazione, di una specifica arteria intramuscolare; sono stati registrati i filmati della contrazione-rilassamento indotta dalla corrente nel deltoidei sx e dx.

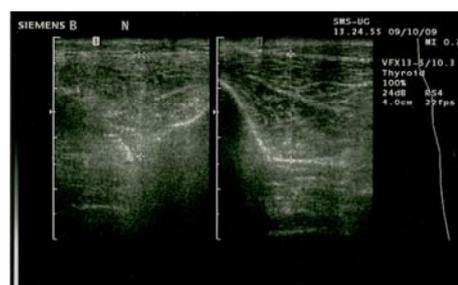


Fig 10 Paziente B.N. Immagini di sezioni al terzo medio del muscolo tibiale anteriore destro denervato (A) e sinistro innervato (B). Controllo successivo (18 mesi di h-b FES). Rispetto al controllo precedente compare una parziale normalizzazione dell'ecostruttura dovuta all'alternarsi di fibre muscolari, ipoecogene, e di setti fibrosi del perimisio, iperecogeni.

Infine, nel terzo soggetto, M.O., sono state prese immagini dei quadricipiti, dei glutei e degli ischio-crurali; è stato eseguito l'eco-Doppler, sia a riposo, sia dopo stimolazione, della prima arteria perforante che si dirama dall'arteria tibiale anteriore; si sono registrati i filmati della contrazione-rilassamento indotta dalla corrente sia sul tibiale destro che su quello sinistro.

4. Risultati

4.1 Ecostruttura e spessori

Le immagini raccolte all'inizio della terapia, riguardanti i muscoli denervati, sono un'ulteriore conferma del loro stato di atrofia muscolare. Il quadro ecografico è quello tipico dei muscoli coinvolti in patologie neuromuscolari, e presenta nel confronto con quello dei muscoli sani:

- aumento diffuso dell'ecogenicità;
- diminuzione dell'eterogeneità dell'ecostruttura;
- diminuzione degli echi dell'epimisio e dei margini ossei sottostanti (Fig. 9).

Si nota un netto miglioramento, tra le immagini del primo e dell'ultimo controllo ecografico, soprattutto a livello del terzo medio dei muscoli monitorati: gli spessori aumentano ed anche l'ecostruttura migliora, aumentando la parte ipoecogena relativa ai fasci muscolari (Fig. 10).

L'esiguo numero di soggetti ha permesso l'utilizzazione, in precedenti lavori nell'ambito del progetto RISE, della tomografia computerizzata per la valutazione degli spessori muscolari; questa metodica è stata preferita per la maggiore panoramicità delle immagini, che risultano più facili da interpretare per i non radiologi (vedi Fig. 3).

Per dimostrare che l'ecografia è una metodica adeguata anche per monitorare gli spessori muscolari ed utilizzabile nel caso in cui la numerosità dello studio

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

dimostrato un comportamento alterato soprattutto nella fase di rilasciamento. Il tempo necessario a completare la fase di rilasciamento, è maggiore nel caso del muscolo denervato e questo fatto è già evidente alla visione del filmato senza particolari metodiche di imaging quantitativa. Con un programma di gestione video, si è misurata la durata del rilasciamento nelle registrazioni ecografiche B-mode. I tempi ottenuti, relativi ai muscoli innervati, si discostano da quelli riportati per le misurazioni della scossa isometrica nei libri di fisiologia muscolare, mentre si avvicinano ai tempi che si rilevano con metodiche meno fini: un muscolo composto prevalentemente da fibre a contrazione rapida, come il muscolo tibiale anteriore, dovrebbe avere una fase di rilasciamento di circa 50 msec, mentre nelle nostre misurazioni è di circa 200 msec, non molto diversa da quelle delle risposte volontarie. E' interessante notare che invece la fase di contrazione, ha valori più vicini a quelli fisiologici. Nonostante la discrepanza tra tempi ottenuti con

metodi diversi, questo procedimento permette il confronto dei tempi di rilasciamento dei muscoli innervati e denervati. Il muscolo tibiale anteriore denervato del soggetto B.N., completa il rilasciamento in circa 800 msec, cioè necessita di un tempo 4 volte superiore a quello necessario al muscolo controlaterale innervato. I tempi di rilasciamento e contrazione non sono variati significativamente durante il periodo di terapia.

4.3 Perfusione

Le arterie esaminate in questo studio, essendo arterie intramuscolari, perfondono un territorio ad alta resistenza a riposo. Infatti, nei muscoli innervati, i tracciati Doppler rilevati hanno la tipica forma trifasica (Fig. 11). L'elettrostimolazione mima uno sforzo fisico, conseguentemente le arteriole si dilatano e il flusso diviene meno pulsatile (Fig. 12). La fase di reflusso diminuisce significativamente, viceversa la fase diastolica aumenta. Le frequenze, che nelle



Figura 13. Tibiale anteriore dx (denervato) a riposo
Si noti il tracciato Doppler a bassa resistenza



Figura 14. Tibiale anteriore sx (innervato) a riposo
Si noti l'attesa curva delle velocità trifasica



Figura 15. Tibiale anteriore dx dopo elettrostimolazione
Si noti che il tracciato Doppler diviene trifasico



Figura 16. Tibiale anteriore sx dopo elettrostimolazione
Come atteso il flusso è divenuto meno pulsatile

Figs 13, 14, 15, 16. Paziente B.N., denervazione monolaterale destra per sciectomia intraoperatoria parziale

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

immagini sono state trasformate in velocità, aumentano in tutte le fasi del circolo. Nel muscolo denervato a riposo non si rileva un flusso ad alta resistenza, mentre dopo stimolazione elettrica, inaspettatamente, il flusso cambia diventando più pulsante. Di seguito è riportato l'esempio del primo soggetto B.N. Nella prima diramazione dell'a. tibiale anteriore destra (Fig. 13), che perfonde il muscolo denervato, si nota un tracciato Doppler a bassa resistenza. Infatti la componente diastolica è ben rappresentata, non c'è la fase con flusso retrogrado e nella tele-diastole il flusso non diventa nullo. Inoltre le pendenze della prima branca ascendente e della prima branca discendente non sono così elevate come nei flussi ad alta resistenza. Esiste, nonostante sia di piccola entità, un flusso continuo indipendente dal ciclo cardiaco.

Nel tratto d'arteria controlaterale (Fig. 14), che irrorava tessuto muscolare normalmente innervato, la curva delle velocità possiede la tipica forma trifasica attesa.

Dopo 10 minuti di elettrostimolazione secondo il protocollo del progetto europeo "RISE (Alzati!)", sorprendentemente, la solita diramazione dell'a. tibiale dx mostra uno spettro diverso (Fig. 15): da tracciato tipico dei territori a bassa resistenza, passa ad una forma più pulsatile simile a quella del muscolo sano a riposo, come se le resistenze fossero aumentate.

Invece l'arteria contro laterale innervata dopo elettrostimolazione si comporta normalmente, cioè le resistenze diminuiscono e il flusso diventa meno pulsatile aumentando la sua componente diastolica (Fig. 16).

5. Discussione

5.1 Ecostruttura e spessori

I pazienti arruolati in questo studio pilota manifestano a livello muscolare gli effetti di una denervazione che si può definire recente. Infatti i muscoli non presentano, nemmeno nei primi controlli ecografici, aspetti francamente distrofici (diffusa sostituzione adiposa e fibrosa della popolazione di miofibre denervate). E' evidente l'aumento del tessuto connettivo e l'atrofia dei fasci muscolari, testimoniati dall'aumento dell'ecogenicità e dalla diminuzione dell'eterogeneità caratteristica del tessuto muscolare normale. Inoltre, l'aumento del segnale del tessuto muscolare, rende più difficile la distinzione dell'epimisio e dei margini ossei, soprattutto in profondità, dove il fascio ultrasonoro risulta maggiormente attenuato. Tuttavia la struttura muscolare rimane conservata, infatti, nelle scansioni longitudinali è ancora visibile la trama a "denti di pettine" generata dalla disposizione del perimisio e non sono presenti le ampie sostituzioni adipose, con modificazione del rapporto tra tessuto adiposo e massa muscolare, dei muscoli distrofici. Queste evidenze, del resto, sono in linea con gli studi condotti sulle biopsie di muscoli denervati umani (Fig. 2), in cui si dimostra

che la degenerazione muscolare compare dopo diversi anni dalla denervazione, mentre i soggetti esaminati in questo studio hanno iniziato il trattamento all'incirca entro un anno dalla paralisi.

La possibilità di confrontare immagini acquisite in tempi diversi permette di notare il miglioramento indotto da h-b FES sull'ecostruttura già dopo pochi mesi di terapia. Nella figura 10, il muscolo tibiale anteriore denervato presenta un'iniziale recupero dell'aspetto normale, tanto che lo stesso muscolo potrebbe essere considerato normale in un soggetto anziano.

Nonostante gli spessori muscolari siano stati rilevati con altre metodiche (TC), la misurazione ecografica degli spessori del muscolo tibiale anteriore dimostra che il monitoraggio ecografico è possibile, veloce e di semplice attuazione. Quando la numerosità aumenterà, questo monitoraggio sarà indispensabile per contenere i tempi e i costi dello studio. E' da segnalare che l'aumento della massa muscolare del tibiale anteriore non è stata uniforme: mentre nel terzo medio lo spessore è aumentato del 60% in un anno di terapia (da 10 a 16.3 mm), lo stesso non si può dire delle altre parti, in cui lo spessore è aumentato solo di pochi mm (vedi Tab. 1). Questo comportamento è stato notato anche in precedenti lavori condotti, con immagini TC, sul muscolo retto femorale [18]. Non è ancora possibile dare una spiegazione fisiopatologica a questa evidenza, anche se, a nostro avviso, la disposizione degli elettrodi per la terapia potrebbe determinare una stimolazione non uniforme del tessuto muscolare, a cui conseguirebbe un effetto trofico eterogeneo. In particolare la parte più prossimale del quadricipite può non essere coinvolta dalla stimolazione, se si ricorda che i muscoli della coscia sono pennati e quindi le fibre muscolari in prossimità dell'anca sono diverse da quelle della parte centrale e distale della coscia.

5.2 Contrazione

La possibilità di visualizzare in tempo reale il movimento muscolare ha permesso l'identificazione di un comportamento anomalo del muscolo denervato in seguito alla stimolazione elettrica: il muscolo si rilassa a una velocità notevolmente minore rispetto al controlaterale innervato. Questa capacità dell'ecografia di raccogliere informazioni con uno strumento ormai ampiamente utilizzato in clinica (anche se meno in neurologia, dove è ancora di uso preminente l'utilissima strumentazione derivata dai classici studi di fisiologia ed elettrofisiologia neuromuscolare), si è rivelata importante anche per ottimizzare la terapia. All'inizio del trattamento si possono ottenere, nei casi più favorevoli, "scosse" muscolari, ma in molti casi nessun evento contrattile è osservabile in risposta a stimolazioni elettriche "massimali"; soltanto dopo mesi di h-b FES domiciliare si sono ottenute contrazioni muscolari tetaniche contro un carico moderato, che consentono di monitorare il recupero come forza

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

muscolare. Nella fase iniziale in cui non sempre le scosse muscolari in risposta alla FES sono palpabili od osservabili, l'esame ecografico è utile all'individuazione delle eventuali "scosse" indotte dalla stimolazione elettrica e alla determinazione della migliore posizione degli elettrodi al fine di generare la stimolazione più efficiente e selettiva.

Per quanto riguarda il prolungamento della fase di rilasciamento del muscolo denervato, le ipotesi fisiopatologiche in grado di spiegare questo fenomeno possono essere ricercate sia nell'aumentata rigidità dovuta alla fibrosi progressiva sia all'alterazione della capacità della fibra muscolare di controllare l'omeostasi del calcio intracellulare. Quest'ultima è ormai più che un'ipotesi sulla base delle osservazioni

di microscopia elettronica delle biopsie muscolari dello studio EU RISE [8,18,42], corroborate dai risultati sull'accoppiamento eccitazione/contrazione dei muscoli di ratti cronicamente sciectomizzati [9] e di conigli cronicamente denervati e stimolati elettricamente [2,3,30,47]. L'analisi al microscopio elettronico delle biopsie prelevate dai muscoli tibiale anteriore, soleo e gastrocnemio dei ratti ha dimostrato: la progressiva distruzione dell'apparato miofibrillare, la scomparsa della maggior parte dei mitocondri già alla trentaseiesima settimana post-intervento, e soprattutto, la dislocazione dei tubuli T e del reticolo sarcoplasmatico (SR) che perdono il loro normale orientamento trasversale, pur mantenendo la connessione con il sarcolemma e l'ambiente extracellulare e quindi la capacità di condurre il potenziale d'azione. Con il passare del tempo, questa disorganizzazione diventa più evidente e le componenti del SR divengono incomplete e assumono forme inusuali e vescicolate (Fig. 17). Questa significativa alterazione del sistema tubulare e sarcoplasmatico, influisce sul normale funzionamento delle Calcium release units (le giunzioni tra tubuli T e SR, solitamente formate da tre elementi e per questo chiamate anche "triadi"); il rilascio del Ca^{2+} dalle cisterne terminali è controllato dall'interazione meccanica tra due complessi proteici (il DHPR, situato sulla membrana del tubulo T, e il canale per il rilascio del calcio RYR-1, situato sulla membrana del SR). Attraverso specifiche metodiche di legame, i ricercatori hanno dimostrato, in questi topi, una diminuzione sia della funzionalità dei canali per il rilascio del Ca^{2+} , sia delle pompe (Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico e la pompa di estrusione del Ca^{2+} del sarcolemma) che hanno il compito di rimuovere lo ione dal sarcoplasma a contrazione avvenuta. Il risultato di tutto ciò è che il rilasciamento di Ca^{2+} è ridotto, ma anche il suo reuptake nel SR; per questo motivo, anche il Ca^{2+} liberato in seguito al potenziale d'azione indotto dalla stimolazione elettrica, sarebbe ripompato con difficoltà nel SR. L'azione delle pompe, unita alla capacità della calsequestrina di legare il calcio all'interno del SR, normalmente provoca la rimozione pressoché totale degli ioni dal sarcoplasma. Una volta che gli ioni calcio sono stati rilasciati dal SR e sono diffusi alle miofibrille, la contrazione muscolare si mantiene finché rimane alta la loro concentrazione nel sarcoplasma. La diminuzione dell'attività delle pompe del calcio si traduce nell'allungamento del processo di ripompaggio del calcio nel SR e quindi con la diminuzione della velocità di rilasciamento muscolare. Un altro meccanismo, che contribuisce alla disfunzione delle pompe del Ca^{2+} (che sono delle ATPasi), è la scarsità di energia in seguito alla riduzione e dislocazione dei mitocondri nella fibra muscolare denervata. Le variazioni transitorie nella $[Ca^{2+}]$ sarcoplasmatica, in seguito agli impulsi nervosi nel muscolo sano e alla stimolazione elettrica nel

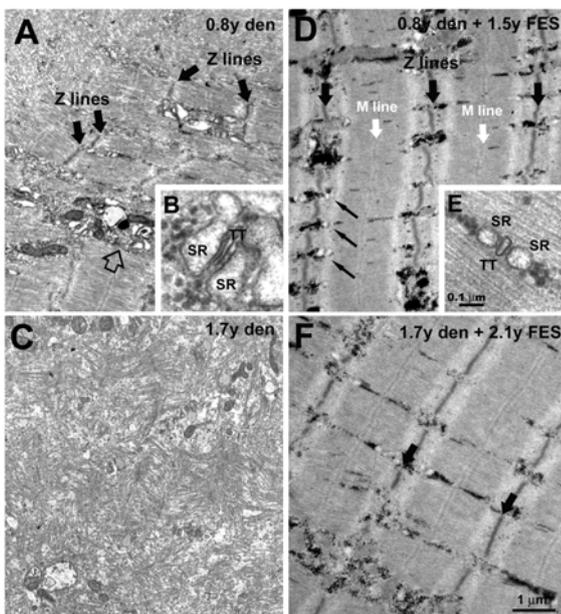
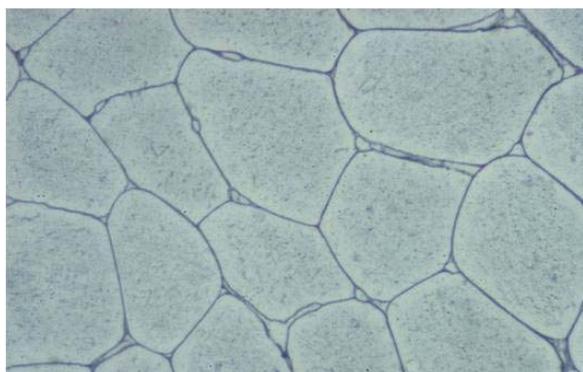


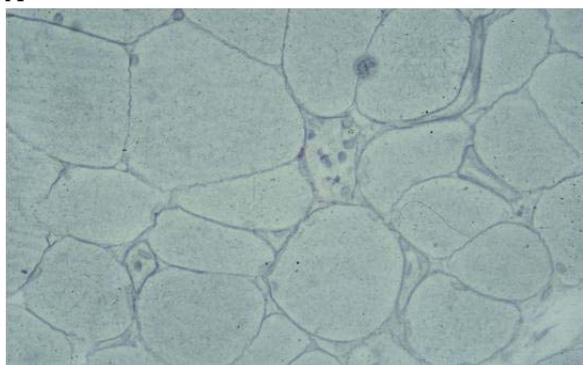
Fig 17 Ripristino della struttura della fibra muscolare indotta da h-b FES. I muscoli di pazienti non trattati mostrano alterazioni dell'apparato contrattile: le miofibrille sono spesso interrotte e/o mancano completamente in diverse aree (A). Più il periodo di denervazione è lungo, più l'apparato contrattile è alterato (C). Il reticolo sarcoplasmatico (SR) è generalmente dilatato e talvolta vescicolato: triadi e diadi, formate dall'associazione tra SR e tubuli T (TT), sono presenti, ma hanno forma alterata (B). Dopo h-b FES, la striatura caratteristica del muscolo scheletrico copre ampie aree delle fibre (D e F). In associazione con il ripristino delle miofibrille, anche il sistema di membrane, importante per il meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione, viene riassembleato (E).

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29



A



B

Fig 18 Impregnazione argentea secondo Gomori di biopsie muscolari in inclusione paraffinica. Muscolo normale (A) e muscolo denervato da circa un anno (B). In B si nota una maggiore variabilità dimensionale delle fibre muscolari in confronto a quelle normali, ma l'atrofia è ancora modesta. I capillari sono invece notevolmente dilatati.

denervato, sono infatti fondamentali per l'attivazione di segnali intracellulari (es. calcineurina) in grado di stimolare l'espressione genica [6,47,48,54]. La mancanza di questi segnali nelle fibre denervate andrebbe a modificare l'espressione di geni correlati con l'organizzazione dei tubuli T e con la formazione delle miofibrille e dei mitocondri. Come già accennato nell'introduzione, h-b FES blocca la degradazione del sistema costituito da tubuli T e reticolo sarcoplasmatico e ne favorisce la riorganizzazione nelle fibre muscolari severamente atrofiche; complessivamente questi risultati supportano l'ipotesi che i cambiamenti transitori della $[Ca^{2+}]$ sarcoplasmatica, indotti dalla stimolazione elettrica, possano mimare l'azione nervosa e giocare un ruolo chiave nell'espressione genica del muscolo denervato. Un trattamento prolungato e intensivo dovrebbe essere in grado di ristabilire la normale funzionalità del sistema tubuli T e SR, e quindi anche la normale cinetica di contrazione-rilassamento; ma nel presente studio non è stato possibile individuare cambiamenti nella tempistica del movimento dall'inizio alla fine del

monitoraggio (durato meno di 1 anno), per cui la continuazione dello studio è necessaria per stabilire se la cinetica di rilascio migliora con un trattamento di maggiore durata e se l'ulteriore miglioramento del rapporto fibre muscolari/interstizio (diminuzione dell'ecogenità) sia sufficiente a modificare il comportamento meccanico dei muscoli cronicamente denervati sottoposti a h-b FES.

5.3 Perfusionione

I tracciati Doppler delle arterie che perfondono muscoli denervati a riposo, hanno mostrato la presenza di flussi continui che erano assenti nelle arterie corrispondenti dei muscoli innervati controlaterali. Questo comportamento paradossale dell'albero arterioso del muscolo coinvolto è un altro segno patognomonico della denervazione muscolare cronica, assieme all'evidente rallentamento del rilascio muscolare precedentemente descritto.

Uno studio precedente [50] ha riferito i risultati degli esami istologici e ultrastrutturali del letto capillare in biopsie del muscolo vasto laterale in due gruppi di soggetti con paralisi flaccida degli arti inferiori, arruolati nel progetto Rise. Le biopsie di 4 soggetti con paralisi flaccida da 9 mesi a 3 anni, non elettrostimolati, mostravano una riduzione del numero di capillari per fibra muscolare (2.0 ± 0.1 SE contro 4.1 ± 0.2 SE del muscolo adulto normale) ed alterazioni dell'endotelio con ispessimento della membrana basale di molti piccoli vasi. In altre 4 biopsie prelevate da 2 soggetti paraplegici, da 9 e 10 anni rispettivamente, che si erano sottoposti a molti anni di elettrostimolazione (7.7 e 9.3 rispettivamente), la rete capillare risultava pressoché normale, sia nel numero dei capillari (3.4 e 3.6), sia nella loro morfologia ultrastrutturale. Questo studio suggerisce che h-b FES sia in grado di migliorare la rete capillare nel muscolo denervato.

Uno studio più recente ha confrontato, con le stesse metodiche del precedente, le biopsie del muscolo vasto laterale di due gruppi di soggetti con sindrome *conus-cauda equina*: il primo composto da tre soggetti a circa un anno dalla denervazione, il secondo composto da quattro soggetti a 3-6 anni dalla denervazione. I soggetti di entrambi i gruppi non si sono mai sottoposti al FES training. Nelle biopsie dei muscoli con denervazione recente, il numero dei capillari per fibra risulta simile a quello dei muscoli normali, la struttura dei vasi non presenta alterazione, ma molti capillari sono dilatati. Al contrario, nella denervazione a lungo termine i capillari mostrano segni di alterazione endoteliale e di ispessimento della membrana basale, il loro lume è ristretto e il numero progressivamente diminuisce in parallelo con la degenerazione muscolare (Fig. 18), confermando così i precedenti risultati.

I soggetti di questo secondo studio si trovano, per quanto riguarda i tempi di denervazione, in una situazione intermedia rispetto a quelli dello studio

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

precedente. La dilatazione dei vasi capillari potrebbe quindi essere l'ovvia spiegazione della diminuzione delle resistenze periferiche e della comparsa del flusso diastolico, nonostante ci possa essere un'iniziale perdita di capillari in seguito al disuso, alla conseguente riduzione del volume muscolare, e, non ultimo, alla predominanza delle fibre di tipo II (rapide), che notoriamente richiedono una minore vascolarizzazione [49].

Più difficile è interpretare il cambiamento delle caratteristiche del flusso dopo la seduta di elettrostimolazione. Possibili fattori che potrebbero "ostacolare" un flusso continuo a maggiore portata (come avviene nel muscolo sano) sono: l'alterazione della compliance vascolare (correlabile alle alterazioni della parete vasale e della matrice extracellulare) e, ancora, la perdita a causa della denervazione "autonoma" della risposta vasale agli stimoli vasocostrittori e vasodilatatori [50]. Questi fattori renderebbero l'aumento del territorio vascolare, in seguito allo sforzo fisico, insufficiente ad accogliere l'aumento del flusso, necessario a soddisfare le aumentate richieste metaboliche del tessuto muscolare. La nostra ipotesi è che questi fattori siano determinanti nel generare una situazione di "ingorgo" e che l'aumento delle resistenze, quindi, sia il risultato dell'incapacità dei vasi a supportare flussi con portata maggiore. In alternativa o concomitantemente, l'improvvisa contrazione delle fibre muscolari, anche solo per scosse muscolari, potrebbe comprimere i capillari senza che venga attivata la risposta vasodilatatoria arteriolare.

Il cambiamento indotto da h-b FES sull'albero capillare a lungo termine [50] dovrebbe indurre il cambiamento del tracciato Doppler, ma non sono rilevabili in questo studio differenze tra gli spettri dei primi e degli ultimi controlli, forse perché la durata del trattamento in questi pazienti non è stata sufficiente per generare variazioni abbastanza consistenti da essere visibili all'analisi qualitativa dello spettro Doppler. Il proseguimento del monitoraggio, speriamo possa fornire ulteriori informazioni, in accordo con quanto descritto dalla casistica viennese, che ha a suo tempo dimostrato, effettuando misurazioni di perfusione per mezzo della scintigrafia con Xenon, un notevole aumento della perfusione muscolare e cutanea durante e dopo una sessione di FES training [50].

Lo studio della perfusione quindi è stato utile per stabilire le caratteristiche di flusso del muscolo denervato e per capire i cambiamenti indotti da una seduta di elettrostimolazione. Alla luce di queste considerazioni, la valutazione Doppler post-elettrostimolazione può essere utilizzata per un altro scopo, più pratico, che riguarda l'ottimizzazione della stimolazione: conoscendo a priori l'effetto ottenibile sul flusso sanguigno, si può andare ad agire sui parametri della corrente elettrica fino a raggiungere i risultati desiderati.

5. 4 Vantaggi dell'ecomiografia dinamica

Nel monitoraggio clinico del progetto Rise si sono utilizzate potenti metodiche di imaging, come la Tomografia Computerizzata per misurare gli effetti del FES training sui muscoli denervati, ma il loro utilizzo è stato limitato a tre analisi (prima e dopo 1 e 2 anni di trattamento) sia dai costi che dall'esposizione ad alte dosi di radiazioni. L'ecografia, anche se non offre tutte le informazioni della TC o della RM, è una delle tecniche di imaging migliori per indagare ripetutamente nel tempo l'apparato muscolo-scheletrico. A differenza delle altre precedenti, ha un basso costo, una risoluzione spaziale elevata ed una grande diffusione negli ospedali. Inoltre, è ben sopportata dai pazienti e non è biologicamente invasiva perché utilizza gli ultrasuoni e non radiazioni ionizzanti, al contrario della radiologia convenzionale e della TC. Queste caratteristiche fanno dell'ecografia la tecnica ideale per il monitoraggio anche dei muscoli denervati, sia permanentemente, sia nell'attesa di un'auspicabile reinnervazione.

TC e RM sono usate frequentemente nella diagnosi dei disordini neuromuscolari, entrambe le tecniche presentano vantaggi e svantaggi se comparate con gli ultrasuoni. Entrambe forniscono immagini panoramiche, con più muscoli visualizzati contemporaneamente, che sono più facili da interpretare da parte dei non-radiologi, ma non migliorano il livello diagnostico. Tuttavia per lo scopo principale dello studio, cioè per il monitoraggio, questo vantaggio non è decisivo: l'esame è condotto da radiologi esperti in grado di eseguire le misurazioni in maniera riproducibile (sfruttando punti di repere prestabiliti) anche in assenza di un'immagine panoramica. La possibilità di ottenere con la TC le ricostruzioni 3D dei singoli muscoli [18] permette una migliore valutazione del volume, della forma e dei rapporti fibre muscolari/ connettivo intramuscolare/ tessuto adiposo, ma la quantità elevata di radiazioni ionizzanti preclude la possibilità di sottoporre i soggetti a controlli frequenti.

In questo studio dimostriamo che lo spessore e la composizione dei muscoli sottoposti a FES training sono facilmente valutabili tramite l'ecografia. L'esame ecografico permette, attraverso rapide scansioni muscolari multiple, una veloce valutazione del grado e della distribuzione dei processi patologici neuromuscolari. Studi precedenti hanno dimostrato che la misurazione degli spessori muscolari è affidabile [5, 23,49] e che non ci sono significative differenze tra le stime dei parametri quantitativi muscolari (area di sezione e diametro) ottenute con US, TC e RM [29,44,46,53].

Oltre a queste considerazioni sulle capacità dell'ecografia nello studio morfologico del tessuto muscolare, è stata decisiva per la scelta di questa metodica, la possibilità di compiere esami dinamici e



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Medico Diagnostiche e Terapie Speciali

Sezione di Radiologia

Direttore: Ch.mo Prof. Giampietro Feltrin

TESI DI LAUREA

**ECOMIOGRAFIA FUNZIONALE DEL MUSCOLO DENERVATO:
RISULTATI PRELIMINARI**

Relatore
Prof. Roberto Stramare

Correlatori
Prof. Ugo Carraro
Dr.ssa Leonora Martino

Laureando
Riccardo Zanato

Anno Accademico
2008 - 2009

Fig 19 Frontespizio della Tesi di Laurea in Medicina e Chirurgia dell'Università di Padova. Anno Accademico 2008 - 2009.

valutazioni del circolo muscolare. Questo ci ha consentito di individuare flussi alterati nei vasi intramuscolari (sia a riposo che dopo stimolazione elettrica) ed anomalie nella cinetica di contrazione-rilasciamento indotta dalla denervazione permanente. Questi aspetti dell'ultrasonografia dinamica muscolare sono il contributo originale della Scuola Miologica Padovana ad una problematica che va considerata una "malattia rara" nel caso della scelta sperimentale di evitare nelle prime fasi di validazione le interazioni nervo-muscolo, che complicano le analisi nei casi di denervazione/reinnervazione parziale. Essi potranno trovare ampie applicazioni in geriatria e nelle sindromi cachettiche dismetaboliche e oncologiche [22].

5.5 Altre considerazioni sul monitoraggio ecografico

In letteratura, sono ritenuti affidabili come parametri di monitoraggio lo spessore muscolare, che è l'indice quantitativo più facilmente ripetibile, e le analisi dinamiche del *pennation angle* nei muscoli pennati normali. Il nostro studio qualitativo dello spettro Doppler e i filmati registrati in modalità B-mode, che pur hanno permesso di individuare segni patognomici della denervazione cronica, non sono

ancora adatti al monitoraggio clinico, soprattutto in intervalli di tempo limitati. Per essere valorizzati clinicamente richiedono lo sviluppo di metodiche computazionali di analisi dell'imaging.

Solo l'applicazione di analisi quantitative allo studio vascolare e dinamico ci permetterà di riconoscere e valutare, con l'ecomiografia, altri parametri potenzialmente utili nel follow-up di h-b FES. Nella successiva fase di questo studio, saranno presi in considerazione: l'indice di resistenza (RI), come indice quantitativo correlato allo stato del circolo muscolare, e il tempo di rilasciamento valutato su registrazioni di tracciati M-mode. Le variazioni di resistenze territoriali sono ben individuate dall'Indice di Resistenza (RI); definendo con A il valore massimo di picco sistolico e con B il valore telediastolico, si ottiene: $IR = (A - B) / A$

Nei vasi con elevate resistenze periferiche, dove lo spettro assume la forma tipica del flusso pulsatile, l'indice sarà elevato, al contrario, se la componente diastolica (flusso continuo) aumenta, l'indice diminuirà. Questo parametro ha il grande vantaggio, rispetto al calcolo di velocità di flusso e portata, di essere indipendente dall'angolo Doppler, fatto di notevole importanza quando si indagano vasi piccoli, con decorso non sempre rettilineo, come i vasi intramuscolari.

Di particolare utilità nello studio del movimento muscolare è l'utilizzo di tracciati ecografici M-mode. Con questa tecnica l'esplorazione è eseguita lungo una sola linea, ogni eco ottenuto è presentato sottoforma di punto luminoso, la cui traccia sullo schermo è assoggettata a uno spostamento orizzontale, in maniera tale che, se l'eco proviene da una struttura in movimento, "disegnerà" verticalmente l'andamento del movimento stesso in funzione del tempo. La durata del movimento può essere determinata con questa tecnica, che è abbastanza sensibile da distinguere le fasi di contrazione e rilassamento in risposta alla stimolazione elettrica.

La principale limitazione dello studio è data dalla ridotta numerosità dei soggetti arruolabili; le lesioni spinali complete del secondo motoneurone sono eventi rari, inoltre non tutti i pazienti sono disposti a seguire questa terapia piuttosto impegnativa. Anche per ovviare a questo problema, partirà a breve uno studio in cui un programma di FES sarà somministrato a conigli sciectomizzati, monitorando i muscoli denervati con ecografia dinamica secondo un protocollo derivato da questo studio pilota.

6. Conclusione

L'ecografia, anche se non offre tutte le informazioni della TC o della RM [9,58], è la tecnica di imaging migliore per indagare ripetutamente nel tempo il muscolo denervato. In questo studio dimostriamo che lo spessore e la composizione dei muscoli sottoposti a h-b FES sono facilmente valutabili tramite

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

l'ecomiografia e possono essere utilizzati come parametri nel monitoraggio della terapia. Inoltre, la capacità di questa metodica di analizzare ambulatorialmente la dinamica della contrazione e di eseguire facilmente indagini della perfusione vascolare grazie all'eco-Doppler, ci ha consentito l'individuazione di anomalie funzionali dei muscoli denervati. In conclusione, questo studio pilota conferma l'utilità della ecomiografia dinamica nel monitoraggio [60] e gli effetti positivi della stimolazione elettrica funzionale domiciliare (h-b FES) dei muscoli denervati [10] e di quelli parzialmente reinnervati.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of MUIR PRIN 2008 - prot. 2008SJ4MRW. Riccardo Zanato è grato alla commissione della tesi di Laurea in Medicina dell'Università di Padova per la vivace discussione e l'approvazione finale (Fig. 19).

Corresponding Author

Riccardo Zanato, MD, Department of Diagnostics and Special Therapy, University of Padova, Via Giustiniani 2, I-35100 Padova, Italy.
E-mail: riccardo_zanato@yahoo.it

References

- [1] A.A.V.V. Apparato locomotore. In: Anatomia Umana 1. Edi-ermes Publ, Milano 2000;39-59.
- [2] Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S, Protasi F, Russold M, Lanmuller H, Mayr W, Sutherland H, Jarvis JC. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. *J Mus Res Cell Motil* 2007;28:203-217.
- [3] Ashley Z, Sutherland H, Lanmüller H, Russold MF, Unger E, Bijak M, Mayr W, Boncompagni S, Protasi F, Salmons S, Jarvis JC. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:440-451.
- [4] Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Lanmüller H, Mayr W, Jarvis JC, Salmons S. Therapeutic stimulation of denervated muscles: the influence of pattern. *Muscle Nerve* 2008;38:875-886.
- [5] Barberie JE, Wong AD, Cooperberg PL, Carson BW. Extended field-of-view sonography in musculoskeletal disorders. *Am J Roentgenol* 1998;171: 751-757.
- [6] Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo, L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C. Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J* 2009;23:3896-3905.
- [7] Boncompagni S, Kern H, Rossini K, Mayr W, Carraro U, Protasi F. Structural differentiation of skeletal muscle fibres in absence of innervation in humans. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007;104: 19339-19344.
- [8] Carraro U. Italian Contributions toward a RISE-2 European Clinical Trial: 1st Organization Meeting, Padua, February 13, 2008. *Basic Appl Myol* 2008;18:83-88.
- [9] Carraro U. Italy-Austria-Iceland Proposals (RFP) on Clinical Criteria for the Diagnosis of Clinically Important Weakness Associated with Low Muscle Mass in Older Adults. BAM on-Line 2009 cirMYO document 9-10. Epub 2009 Sept 8.
- [10] Carraro U, Kern H. Patologia muscolare nella paraplegia da lesione del motoneurone spinale e recupero funzionale con stimolazione elettrica domiciliare. [Muscle pathology in lower motor neuron paraplegia and h-b FES]. *European Journal of Translational Myology/Basic Applied Myology* 2010;20:25-32
- [11] Carraro U, Morale D, Mussini I, Lucke S, Cantini M, Betto R, Catani C, Dalla Libera L, Danieli Betto D, Noventa D. Chronic denervation of rat diaphragm: maintenance of fibre heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms. *J Cell Biol* 1985;100:161-174.
- [12] Carraro U, Rossini K, Mayr W, Kern H. Muscle fiber regeneration in human permanent lower motoneuron denervation: relevance to safety and effectiveness of FES-training, which induces muscle recovery in SCI subjects. *Artif Organs* 2005;29:187-191.
- [13] Carraro U, Rossini K, Zanin ME, Rizzi C, Mayr W, Kern H. Induced myogenesis in long-term permanent denervation: Perspective role in Functional Electrical Stimulation of denervated legs in humans. *Basic Appl Myol* 2002;12:53-63.
- [14] Carraro U, Sandri M, Zampieri S. Patologia generale del tessuto muscolare scheletrico. In: *Patologia Generale*. Pontieri, Russo, Frati eds Piccin Nuova Libreria s.p.a., Padova, Italia; 2010,1523-1542.
- [15] Delcker A, Walker F, Caress J, Hunt C, Tegeler C. In vitro measurement of muscle volume with 3-dimensional ultrasound. *Eur J Ultrasound* 1999;9:185-190.
- [16] Fischer A. Real-time neuromuscular sonography: technique, normals, and pathology. In: *Neurosonology*, 1st ed. Tegeler CH, Babikian VL, Gomez CR eds Mosby-Year-Book Publ, New York 1996;388-396.

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

- [17] Fischer AQ, Carpenter DW, Hartlage PL, Carroll JE, Stephens S. Muscle imaging in neuromuscular disease using computerized real-time sonography. *Muscle Nerve* 1998;11:270–275.
- [18] Gargiulo P, Helgason T, Ingvarsson P, Knútsdóttir S, Gudmundsdóttir V, Yngvason S. Morphological changes in rectus femoris muscle: advanced image processing technique and 3-dimensional visualization to monitor denervated and degenerated muscles treated with functional electrical stimulation. *Basic Applied Myology* 2007;17:133-136.
- [19] Heckmatt JZ, Dubowitz V. Diagnosis of spinal muscular atrophy with pulse echo ultrasound imaging. In: Progressive spinal muscular atropies. Gamstorp I, Sarnat HB eds Raven Publ, New York 1984.
- [20] Heckmatt JZ, Dubowitz V. Diagnostic advantage of needle biopsy in the diagnosis of selective involvement in muscle disease. *J Child Neurol* 1987;2:205–213.
- [21] Heckmatt JZ, Dubowitz V. Realtime ultrasound imaging of muscles. *Muscle Nerve* 1988;11:56–65.
- [22] Hides JA, Richardson CA, Jull GA. Magnetic resonance imaging and ultrasonography of the lumbar multifidus muscle. Comparison of two different modalities. *Spine* 1995; 20: pp 54–58.
- [23] Kern H. Funktionelle Elektrostimulation paraplegischer Patienten. *Österr Z Phys Med* 1995;5: 1-79.
- [24] Kern H, Boncompagni S, Rossini K, Mayr W, Fanò G, Zanin ME, Podhorska-Okolow M, Protasi F, Carraro U. Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus, which is reversible by functional electrical stimulation (FES): a role for myofiber regeneration? *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:919-931.
- [25] Kern H, Carraro U, Adami N, Biral D, Hofer C, Forstner C, Mödlin M, Vogelauer M, Boncompagni S, Paolini C, Mayr W, Protasi F, Zampieri S. Home-based Functional Electrical Stimulation (h-bFES) recovers permanently denervated muscles in paraplegic patients with complete lower motor neuron lesion. *Neurorehab Neur Rep Neurorehab Neur Rep* 2010;24:709-721.
- [26] Kern H, Carraro U, Adami N, Biral D, Hofer H, Loeffler S, Vogelauer M, Mayr W, Rupp R, Zampieri S. One year of home-based Functional Electrical Stimulation (FES) in complete lower motor neuron paraplegia: Recovery of tetanic contractility drives the structural improvements of denervated muscle. *Neurol Res* 2010;32:5-12.
- [27] Kern H, Hofer C, Modlin M, Mayr W, Vindigni V, Zampieri S, Boncompagni S, Protasi F, Carraro U. Stable muscle atrophy in long term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. *Spinal Cord* 2008;46:293-304.
- [28] Kern H, Hofer C, Strohhofer M, Mayr W, Richter W and Stöhr H. Standing up with denervated muscles in humans using functional electrical stimulation. *Artif Organs* 1999;23:447-452.
- [29] Koskelo EK, Kivisaari LM, Saarinen UM, Siimes MA. Quantitation of muscles and fat by ultrasonography: A useful method in the assessment of malnutrition in children. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:682–687.
- [30] Lanmüller H, Ashley Z, Unger E, Sutherland H, Reichel M, Russold M, Jarvis J, Mayr W, Salmons S. Implantable device for long-term electrical stimulation of denervated muscles in rabbits. *Med Biol Eng Comput* 2005;43:535-540.
- [31] Liboni W, Pisani R. Considerazioni di emodinamica e significato del rilievo ultrasonoro di flusso. In: *Ecodoppler vascolare*. Rabbia C, De Lucchi R, Cirillo R eds Edizioni Minerva Medica Publ, Torino 1991;41-73.
- [32] Lomo T, Westgaard RH, Hennig R, Gundersen K. The response of denervated muscle to long-term electrical stimulation. in Carraro U, Angelini C (eds): *Cell Biology and Clinical Management in Functional Electro Stimulation of Neurons and Muscles*. Padova, Italy, CLEUP Editore 1985;81-90.
- [33] Margreth A, Carraro U, Salviati G. Structural membrane proteins and loosely associated proteins of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 1974;139:509-513.
- [34] Margreth A, Salviati G, Carraro U. Neural control on the activity of the calcium-transport system in sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Nature* 1973;241(5387):285-286.
- [35] Martinoli C, Derchi LE, Pastorino C. Analysis of echotexture of tendons with US. *Radiology* 1993;186:839-843.
- [36] Mayr W, Hofer C, Bijak M, Kern H, Lanmüller H, Rafolt D, Sauermaun S, Unger E, Stöhr H. Stimolazione elettrica funzionale (FES) e monitoraggio funzionale di muscoli denervati-degenerati . *Basic Appl Myol* 2007;17:33-36.

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

- [37] Monetti G. Semeiotica della anatomia ecografica. In: *Ecografia muscolo-scheletrica*. Idelson-Gnocchi Publ, Napoli 2000;17-33.
- [38] Monetti G. Muscoli. Malattie neuromuscolari. In: *Ecografia muscolo-scheletrica*. Idelson-Gnocchi Publ, Napoli 2000;87-103.
- [39] Mussini I, Favaro G, Carraro U. Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regenerating in the absence of nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987;46:315-331.
- [40] Narici MV, Binzoni T, Hiltbrand E, Fasel J, Terrier F, Cerretelli P. In vivo human gastrocnemius architecture with changing joint angle at rest and during graded isometric contraction. *J Physiol* 1996;496(Pt1): 287-297.
- [41] Peetrons P. Ultrasound of muscle. *Eur Radiol* 2002;12:35.
- [42] Pillen S. Skeletal muscle ultrasound. *European Journal of Translational Myology/Basic Applied Myology* 2010;20:145-156
- [43] Reeves ND, Maganaris CN, Narici MV. Ultrasonographic assessment of human skeletal muscle size. *Eur J Appl Physiol* 2004;91:116-118.
- [44] Reimers CD, Harder T, Saxe H. Age-related muscle atrophy does not affect all muscles and can partly be compensated by physical activity: an ultrasound study. *J Neurol Sci* 1998;159:60-66.
- [45] Rossato E, Marziali A, Carraro U, Zampieri S, Carniel D, Stramare R, Kern H, Masiero S, Ferraro C. Rise2-Italy Project: Muscle FES after peripheral nerve lesion. *Basic Appl Myol* 2009;19:169-172.
- [46] Sanada K, Kearns CF, Midorikawa T, Abe T. Prediction and validation of total and regional skeletal muscle mass by ultrasound in Japanese adults. *Eur J Appl Physiol* 2006;96:24-31.
- [47] Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology* (Bethesda) 2008;23:160-70.
- [48] Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:1248-1257.
- [49] Scelsi R. Skeletal muscle pathology after Spinal Cord Injury: Our 20 year experience and results on skeletal muscle changes in paraplegics, related to functional rehabilitation. *Basic Appl Myol* 2001;11:75-85.
- [50] Scelsi R, Poggi P, Carraro U, Kern H: Flaccid paraplegia: Improvement of the muscle capillary supply after early-started daily functional electric stimulation (FES) in human permanent lower motoneuron denervation. *Basic Appl Myol* 2006;16:105-107.
- [51] Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996;76:371-423.
- [52] Schäberle W. Fundamental Principles. In: *Ultrasonography in Vascular Diagnosis*. Heilmann U ed Springer Publ, Berlin Heidelberg New York 2005;1-25.
- [53] Sipila S, Suominen H. Muscle ultrasonography and computed tomography in elderly trained and untrained women. *Muscle Nerve* 1993;16:294-300.
- [54] Squecco R, Carraro U, Kern H, Pond A, Adami N, Biral D, Vindigni V, Boncompagni S, Pietrangelo T, Bosco G, Fanò G, Marini M, Abruzzo PM, Germinarolo E, Danieli-Betto D, Protasi F, Francini F, Zampieri S. A sub-population of rat muscle fibers maintains an assessable excitation-contraction coupling mechanism after long-standing denervation, despite lost contractility. *J Neuropath Ex Neurol* 2009;68:1256-1268.
- [55] Valencic V, Vodovnik L, Stefancic M, Jelnikar T. Improved motor response due to chronic electrical stimulation of denervated tibialis anterior muscle in humans. *Muscle Nerve* 1986;9:612-617.
- [56] Walker FO. Normal neuromuscular sonography. In: *Neurosonology*. Mosby-Year-Book Publ, New York 1996;397-405.
- [57] Walker FO, Cartwright MS, Wiesler ER, Caress J. Ultrasound of nerve and muscle. *Clin Neurophysiol* 2004;115:495-507.
- [58] Walton JM, Roberts N, Whitehouse GH. Measurement of the quadriceps femoris muscle using magnetic resonance and ultrasound imaging. *Br J Sports Med* 1997;31 59-64.
- [59] Zamorani MP, Valle N. Muscle and Tendon. In: *Ultrasound of the musculoskeletal system*. Bianchi S, Martinoli C eds Springer Publ, Berlin Heidelberg New York 2007;45-50.
- [60] Zanato R, Martino L, Carraro U, Kern H, Rossato E, Masiero S, Stramare R. Ecomiografica funzionale: analisi di spessore, ecostruttura, contrazione e perfusione del muscolo normale e denervato. [Functional Echomyography: thickness, ecogenicity, contraction and perfusion of the LMN denervated human muscle before and during h-b FES]. *European Journal of Translational Myology/Basic Applied Myology* 2010;20:33-40.

Echomyography in h-b FES of denervated human muscle

European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology 2011; 21: 3-29

- [61] Zrunek M, Bigenzahn W, Mayr W, Unger E, Feldner-Busztin H. A laryngeal pacemaker for inspiration controlled direct electrical stimulation of denervated posterior cricoarytaenoid muscle in sheep. Eur Arch Otorhinolaryngol 1991;248:445-448.