

Italian Contributions toward a RISE-2 European Clinical Trial: 1st Organization Meeting, Padua, February 13, 2008

Ugo Carraro

Laboratory of Translational Myology, Interdepartmental Research Institute of Myology of the University of Padua, Italy

Abstract

The persons that were involved in the EU RISE project at Italian Centers for SCI and at Basic Science Institutions are strongly motivated to start the process and design a European Trial extending the inclusion criteria to complete SCI, but incomplete lower motor neuron injury. During the 2001-2006 EU RISE Project, beyond evaluation and follow-up of Italian SCI persons by clinical staffs, the Italian muscle scientists performed all the light and electron microscopy analyses on RISE muscle biopsies harvested before and after two-year FES-training. A unique, world-class SCI Muscle Biopsy Bank is the result of the study, a strong basis, together with sound clinical achievements, to design and implement a RISE-2 European Clinical Trial.

Key Words: RISE, FES, Denervate Muscle, Muscle Morphometry, Histochemistry, Immunohistochemistry, Electron Microscopy, Italy

Basic Applied Myology 18 (2&3): 83-88, 2008.

During the last five years, contrary to general expectations, the European Trial RISE: Use of electrical stimulation to restore standing in paraplegics with long-term denervated degenerated muscles (Contract No: QLG5-CT-2001-02191) demonstrated in a cohort of long-term Spinal Cord Injury (SCI) persons, suffering Conus Cauda Syndrome (that is, with complete injury of low-lumbar sacral spinal cord and nerve roots) that: 1. denervated muscle fibers maintain excitability-contraction much longer (in tens of months) than expected; 2. denervated muscle fibers survive much longer (in years) than expected; 3. denervated muscle tissue shows sustained regenerative myofiber events, maintaining the pool of myogenic stem cells much longer (in tens of years) than expected; 4. Functional Electrical Stimulation (FES) of the denervated muscles by large surface electrodes and purpose-constructed home electrostimulator (delivering pulses 100-1000 time stronger than clinical electrostimulators) substantially restore muscle mass with associated improvements in structure and function, in particular when the daily FES training begins during the first year post-SCI. All these results are soundly based on experimental studies in rat, rabbit, pig, and clinical evidence in humans. Furthermore, structural analyses at light and electron microscopy strongly support the clinical evidence and the conclusions of the study.

A unique Muscle Biopsy-Bank containing hundreds of rare specimens from untrained and trained sportsmen and SCI persons are stored in cirMYO freezers. Of particular value is the collective of vastus lateralis biopsies harvested from upper or lower motor neuron SCI persons before and after FES-training [].

These biopsy evidence correlating the main clinical outcome of the European Trial RISE [the increase in muscle mass and skin condition that decrease pressure sores and leads to a better cosmetic appearance] open a good prospect that commercial (i.e., EU approved) FES stimulators and large surface electrodes will be effective in the much larger cohort of persons suffering from complete lumbar/sacral SCI, but incomplete nerve roots/nerve injury (i.e., incomplete Conus Cauda Lesion), that is, those persons to be recruited in the "EU Trial RISE-2".

Indeed, Italian Scientists and Clinicians designed and are offering to European Colleagues the following Proposal recently discussed during the First Organization Meeting held February 13, 2008 in the University of Padua, Interdepartmental Research Center of Myology (cirMYO) Conference Hall, Padua, Italy. Beside cirMYO members, the Italian participants were Stefano Masiero and colleagues, Rehabilitation and Physical Medicine Unit of the Department of Surgical Specialties, University of Padua, Agostino

TM Focus on Clinical Challenges of FES of Denervated Muscle

Basic Applied Myology 18 (2&3): 83-88, 2008

Zampa and Emiliana Bizzarrini, Istituto di Medicina Fisica e Riabilitazione, SOC MFR - Unità Spinale, Udine, Humberto Cerrel-Bazo, Riabilitazione Specialistica Neuromotoria, Ospedale di Cernusco S/N Milano, Sergio Lotta, Unità Spinale CRRF G. Verdi, Dipartimento della Non Autosufficienza e Riabilitazione, Villanova sull'Arda (Piacenza), Carmelo Chisari (Pisa), Rosa Bellomo (Chieti), Carmelo Chisari, U.O. Neuroriabilitazione, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Cisanello, Pisa, Roul Saggini, Rosa Maria Bellomo, Facoltà di

Scienze dell'Educazione Motoria, C.U.M.S., Chieti and Giorgio Fanò, and Feliciano Protasi, IIM, Interuniversity Institute of Myology, Department of Basic and Applied Medical Science & CeSI Centro Scienze dell'Invecchiamento, University of Chieti.

The following text is the First Proposal for a RISE-2 European Clinical Trial.

New partners are welcome!

08cirMYO 2008-2011 Working Plans

Eu Trial RISE 2 - First Proposal

During the last five years, contrary to general expectations, the European Trial RISE: Use of electrical stimulation to restore standing in paraplegics with long-term denervated degenerated muscles (Contract No: QLG5-CT-2001-02191) demonstrated in a cohort of long-term Spinal Cord Injury (SCI) persons, suffering Conus Cauda Syndrome (that is, with complete injury of low-lumbar sacral spinal cord and nerve roots) that: 1. denervated muscle fibers maintain excitability-contraction much longer (in tens of months) than expected; 2. denervated muscle fibers survive much longer (in years) than expected; 3. denervated muscle tissue shows sustained regenerative myofiber events, maintaining the pool of myogenic stem cells much longer (in tens of years) than expected; 4. Functional Electrical Stimulation (FES) of the denervated muscles by large surface electrodes and purpose-constructed home electrostimulator (delivering pulses 100-1000 time stronger than clinical electrostimulators) substantially restore muscle mass with associated improvements in structure and function, in particular when the daily FES training begins during the first year post-SCI. All these results are soundly based on experimental studies in rat, rabbit, pig, and clinical evidence in humans.

The main clinical outcome of the European Trial RISE [the increase in muscle mass and skin condition that decrease pressure sores and leads to a better cosmetic appearance] open a good prospect that commercial (i.e., EU approved) FES stimulators and large surface electrodes will be effective in the much larger cohort of persons suffering from COMPLETE lumbar/sacral SCI, but INCOMPLETE nerve roots/nerve injury (i.e., incomplete Conus Cauda Lesion), that is, those persons to be recruited in the "EU Trial RISE-2".

In spite of the low contractile force that could be elicited at the "first" admission tests, the combination of clinically-approved FES stimulators and large

surface electrodes applied to the skin over the thigh muscles will also elicit contraction of the pool of denervated muscle fibers by direct excitation. By this approach, in cases where it is necessary to use botulinum toxin to alleviate spasticity, this would not interfere with muscle contraction induced by direct stimulation.

European Trial RISE-2

Short-term Goals:

1. RISE-2 Data Base: 50 subjects 6 to 15 months vs 50 Subjects 3 to 5 years SCI
2. New methods to quantitate residual innervation of the quadriceps muscle in the range of 10 to 30 %
3. New two-phase training protocols, including cardio-respiratory rehabilitation
4. Home-based self-evaluation methods to quantitate recovery of muscle force
5. Portable FES stimulator and surface electrodes for home-based training
6. AngioFES stimulation of partially denervated muscle

Long-term Goals

7. Recovery of the long term denervated degenerated muscle by autologous mesenchymal myogenic stem cells
8. Non-conventional neurotization of denervated muscle by implantation of mesenteric cholinergic ganglia
9. Neurotization of denervated muscle by autologous mesenchymal neurogenic stem cells

The hypothesis to be tested is a progressive FES-training of partially denervated tight muscles by using:
1. FES-induced low force measurements and/or pendulum tests for enrolment of COMPLETE

TM Focus on Clinical Challenges of FES of Denervated Muscle

Basic Applied Myology 18 (2&3): 83-88, 2008

lumbar/sacral SCI, but INCOMPLETE nerve roots/nerve injury persons into two or more groups from 10 to 30% residual innervation;

2. Three to six months FES of residually innervated muscle fibers by standard clinical electrostimulators, followed by three to six months FES of denervated muscle fibers applying the Vienna protocol that is based on large surface electrodes and high power electrical stimulation (from 1 to 300 msec bidirectional impulses, delivered to up +/- 80 V and 250 mA current intensity).

Padova, January 15, 2008.

References

- [1] 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 Muscle Res Cell Motil.* 2007;28(4-5):203-217. Epub 2007 Sep 29.
- [2] 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 Jan;292(1):C440-451.
- [3] Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Unger E, Li F, Mayr W, Kern H, Jarvis JC, Salmons S. Determination of the chronaxie and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. *Artif Organs.* 2005 Mar;29(3):212-215.
- [4] Bijak M, Rakos M, Hofer C, Mayr W, Strohhofer M, Raschka D, Kern H. Stimulation parameter optimization for FES supported standing up and walking in SCI patients. *Artif Organs.* 2005 Mar;29(3):220-223.
- [5] Biral D, Kern H, Adami N, Boncompagni S, Protasi F, Carraro U. Atrophy-resistant fibers in permanent peripheral denervation of human skeletal muscle. *Neurol Res* 2008; 30 (2): 137-144.
- [6] Boncompagni S, Kern H, Rossini K, Hofer C, Mayr W, Carraro U, Protasi F. Structural differentiation of skeletal muscle fibers in the absence of innervation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19339-44. Epub 2007 Nov 27.
- [7] 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 Mar;29(3):187-91.
- [8] Carraro U. Editorial: 2007Spring PaduaMuscleDays: Ernest Gutmann Heritage, 30-year after. *Neurol Res* 2008; 30(2): 115.
- [9] Carraro U. Video-assisted thoracoscopic transplantation of myoblasts into the heart. *Ann Thorac Surg.* 2004 Jul;78(1):14-6.
- [10] Flumerfelt BA, Kiernan JA, Krcek JP, and Sholdice J: Reinnervation of skeletal muscle in the tongue by preganglionic parasympathetic vagal neurons. *J. Anat.* 1986, 146, 117-130.
- [11] Gordon T, Niven Jenkins N, and Vrbova G : Observations on neuromuscular connections between the vagus nerve and skeletal muscle. *Neuroscience*, 1980, 5, 597-610.
- [12] Graupe D, Cerrel-Bazo H, Kern H, Carraro U. Walking performance, medical outcomes and patient training in FES of denervated muscles for ambulation by thoracic-level complete paraplegics. *Neurol Res* 2008; 30 (2): 123-130.
- [13] Hofer C, Forstner C, Mödlin M, Jäger H, Mayr W, Kern H. In vivo assessment of conduction velocity and refractory period of denervated muscle fibers. *Artif Organs.* 2005 Jun;29(6):436-439.
- [14] Hofer C, Mayr W, Stöhr H, Unger E, Kern H. A stimulator for functional activation of denervated muscles. *Artif Organs.* 2002 Mar;26(3):276-279.
- [15] Kern H, Boncompagni S, Rossini K, Mayr W, Fano 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 Sep;63(9):919-931.
- [16] Kern H, Hofer C, Mödlin M, Forstner C, Raschka-Högl D, Mayr W, Stöhr H. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs.* 2002 Mar;26(3):216-218. Review.
- [17] 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.* 2007 Oct 23; [Epub ahead of print]
- [18] Kern H, Rossini K, Carraro U, Mayr W, Vogelauer M, Hoellwarth U, Hofer C. Muscle biopsies show that FES of denervated muscles reverses human muscle degeneration from

TM Focus on Clinical Challenges of FES of Denervated Muscle

Basic Applied Myology 18 (2&3): 83-88, 2008

permanent spinal motoneuron lesion. *J Rehabil Res Dev*. 2005 May-Jun;42(3 Suppl 1):43-53.

- [19] Kern H, Salmons S, Mayr W, Rossini K, Carraro U. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve*. 2005 Jan;31(1):98-101.
- [20] 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 Jul;43(4):535-540.
- [21] Modlin M, Forstner C, Hofer C, Mayr W, Richter W, Carraro U, Protasi F, Kern H. Electrical stimulation of denervated muscles: first results of a clinical study. *Artif Organs*. 2005 Mar;29(3):20320-6.
- [22] Murphy EM., Defondgalland D, Costa M, Brooks SJ, Wattchow DA : Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, cholinacetyltransferase and nitric oxide synthase. *Neugastroentorol Motil* 2007, 19, 126-132.
- [23] Salmons S, Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Li F, Jarvis JC. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. *Artif Organs*. 2005 Mar;29(3):199-202. Review.
- [24] Sieradzan K and G. Vrbova : Replacement of missing motoneurons by embryonic grafts in the rat spinal cord. *Neuroscience* 1989, 31, 115-130.
- [25] Sutherland H, Salmons S, Ramnarine IR, Capoccia M, Walsh AA, Jarvis JC. Adaptive conditioning of skeletal muscle in a large animal model (*Sus domesticus*). *J Anat*. 2006 Aug;209(2):165-177.
- [26] Tew E.M.M, Anderson P.N., Saffrey J.M. and G. Burnstock Transplantation of the postnatal rat myenteric plexus into the adult rat corpus striatum: an electron microscopic study. *Exp. Neurol*. 1994, 129, 120-129.

Primo Incontro organizzativo RISE-2

Padova 13 Febbraio 2008 Ore 15-17,
Aula M-PR Complesso di Biologia "Vallisneri",
Via Ugo Bassi 23, 35100 Padova.

To: stef.masiero@unipd.it, verena.postal@unipd.it,
hcb57@yahoo.com, s.lotta@ausl.pc.it, apat@unipv.it,
caserta.giuseppe@policlinico.mo.it,
landi.antonio@policlinico.mo.it,
pellacani.andrea@policlinico.mo.it,
pneumologia@ulssfeltre.veneto.it,
info@medicoweb.com,
agostino.zampa@ass4.sanita.fvg.it,
biomec.imfr@ass4.sanita.fvg.it, carmelo.chisari@tin.it,
rgbellomo@unich.it, marina.marini@unibo.it

Carissimi,

hanno confermato la presenza all'Incontro del 13 Febbraio a Padova: Stefano Masiero (Padova), Emiliana Bizzarrini (Udine), Humberto Cerrel-Bazo (Piacenza+Milano), Andrea Pellacani (Modena), Carmelo Chisari (Pisa) e Rosa Bellomo (Chieti). Helmut Kern (Vienna) si scusa di non poter essere presente, per precedenti impegni non procrastinabili, e manda i suoi saluti e l'invito ad essere concreti.

Dopo uno scambio di telefonate ed e-mails con alcuni di voi, invio la Traccia dei Lavori aggiornata.

L'Incontro ha lo scopo di concordare la "descrizione di cosa sarà possibile/necessario fare" per:

1. **DEFINIRE** le caratteristiche clinico-funzionali (e miologico-strutturali del muscolo vasto laterale?) delle persone da reclutare, e cioè con LESIONE Spinale lombo-sacrale (ma Humberto propone di estendere il reclutamento anche alle lesioni a livello toracico?) TRASVERSA-COMPLETA (e cioè con assenza completa di sensibilità, per evitare le problematiche del FES-induced pain e di movimenti volontari) accompagnata da INCOMPLETA lesione neuromotoria periferica (lesioni del 2° motoneurone e/o dei suoi assoni) (*Conus Cauda Syndrome*) (vedi punto 3);

2. **FISSARE** la Dead-Line per la trasmissione all'Unità che strutturerà e manterrà il **"Data-Base "08RISE-2 Italy" (Alzati!)"** dell'Elenco delle persone pre-reclutabili (con codice di identificazione anonimo) da parte delle sedi di Padova, Chieti, Modena+Piacenza (+Milano?), Pisa ed Udine;

3. **CONCORDARE** i criteri di inclusione/esclusione e le modalità di classificazione dei soggetti:

3.1 Criteri clinico/diagnostici per assegnare a quattro classi le persone (in base all'entità dell'innervazione periferica RESIDUA bilaterale): 1. 100% di innervazione periferica; 2. 75% di innervazione periferica; 3. 50% di innervazione periferica; 4. 25% di innervazione periferica;

3.2 Fattibilità della DEFINIZIONE della classe: 5. innervazione periferica RESIDUA < al 10%

3.3 Inclusione/Esclusione di persone con GRAVE sbilanciamento dell'innervazione residua nei due arti?

4. **RECUPERARE** ed aggiornare il materiale per le domande ai Comitati Etici (vedi Richieste avanzate a suo tempo per l' "EU Trial RISE" a Vienna (Austria), Hamburg e Munchen (Germany), Reykjavik (Iceland), Villanova sull'Arda (Piacenza, Italy);

5. **DISCUTERE** la disponibilità di elettrodi e di stimolatori adatti all'Home training. Dipendenza da Vienna (Stimolatore Sperimentale Mayr e/o "FES stimulette q2x" della ditta dr. Schuhfried) e/o possibilità di coinvolgere imprese italiane;

6. **FISSARE** i Criteri per la validazione/successo dell'Home training;

7. **DARSI** uno scadenziario delle cose "fattibili".

Spero che l'elenco possa considerarsi completo, ma attendo suggerimenti. Naturalmente tutti coloro che ricevono questo messaggio sono cordialmente invitati ad intervenire ai lavori con collaboratori ed altri Colleghi potenzialmente interessati. Per motivi organizzativi è gradita una risposta Negativa o Positiva.

1° Incontro organizzativo RISE-2 REPORT

Carissimi Stefano Masiero, dr.ssa Carpenedo, dr. Ferraro (Padova), Emiliana Bizzarrini (Udine), Humberto Cerrel-Bazo (Milano+Piacenza), Andrea Pellacani (Modena), Carmelo Chisari (Pisa), Rosa Bellomo (Chieti). Grazie per aver partecipato all'incontro di ieri.

Abbiamo così potuto discutere (animatamente, all'inizio) e decidere in buon accordo di:

TM Focus on Clinical Challenges of FES of Denervated Muscle

Basic Applied Myology 18 (2&3): 83-88, 2008

- Raccogliere entro Pasqua, in base a dati di Cartelle cliniche, un elenco di soggetti con LESIONE TRASVERSA COMPLETA del Midollo Spinale in zona lombo-sacrale (ma anche toracica), se si può ragionevolmente prevedere che in ogni caso esista un'ampia denervazione dei muscoli della coscia da lesione dei loro Motoneuroni Spinali. Bellomo, Bizzarrini, Chisari e Carraro hanno proposto di definire la percentuale di INNERVAZIONE RESIDUA del QUADRICIPITE (dato che è difficile quantificarne in modo POSITIVO la sua denervazione) mediante:
 1. misura della forza tetanica del quadricipite sotto stimolazione elettrica clinica standard per muscoli innervati (resta da decidere come standardizzare il posizionamento degli elettrodi);
 2. misura dell'onda M nell'elettromiogramma;
 3. dolore indotto con elettrodi ad ago
 - Mi pare di aver convinto (quasi) tutti, che dobbiamo concentrarci su UN MUSCOLO (il quadricipite) e sulla DENERVAZIONE PERIFERICA, per poter raccogliere facilmente dati oggettivi di Forza muscolare, Volume totale del muscolo, Qualità strutturale micro- e ultra-microscopica prima e dopo un periodo (diciamo di SEI MESI) di allenamento domiciliare (almeno cinque giorni alla settimana), per non rischiare di ripetere cose già note ed irrilevanti su piano clinico, come credo possa succedere se prendiamo in considerazione i classici "toracici incompleti". Cosa naturalmente diversa è impostare una "ricerca miologica" per i "toracici incompleti", individuando nuovi obiettivi di ricerca clinica.
 - La speranza è quella di trovare un numero sufficiente di soggetti per suddividerli in:
 1. almeno due gruppi in base al "Tempo dalla SCI": 1° Gruppo tra 7 e 12 mesi, 2° Gruppo tra 3 a 6 anni. Il primo gruppo ha SOLO "Atrofia muscolare semplice da denervazione". Il secondo gruppo "degenerazione muscolare", ma con ancora MILIONI di fibre muscolari "severamente atrofiche" (tipo quelle che nella SLA danno i quadri di "morulae" in sezioni muscolari trasverse);
 - 2- almeno tre Gruppi in base alla percentuale di INNERVAZIONE RESIDUA (complementare ovviamente alla Denervazione): Gruppo A, fino al 15%; Gruppo B, fino al 30%; Gruppo C, fino al 60% (quello sopra il 50%, per me NON è distinguibile dai 100% innervati).
 - Abbiamo rimandato TUTTE le altre decisioni a dopo la prima cernita dei soggetti arruolabili, per non fare lavoro inutile. Io conto che possa essere realizzato almeno il confronto tra: quelli FINO AL 30% (con Stimolazione sec. Kern et al. della muscolatura denervata) e quelli SOPRA il 60% di innervazione residua (con stimolazione clinica "classica").
 - Uno dei problemi aperti è dovuto al fatto che i muscoli umani rispondono ancora bene alla stimolazione elettrica ENTRO 9-12 mesi dalla denervazione e quindi la stadiazione dell'INNERVAZIONE RESIDUA, va fatta con molta cura ed APERTURA MENTALE da parte di CHI ESEGUIRÀ LE MISURE. Credo necessario organizzare un INCONTRO per dimostrare, su pazienti BEN CARATTERIZZATI DA ESPERTI (Kern, per esempio), come si deve operare. Naturalmente questo ha il vantaggio di rendere il problema degli ELETTRICISTI PER MUSCOLI DENERVATI meno impegnativo dal punto di vista della potenza da erogare. In tal caso le potenze dovrebbero essere ai limiti di quelli stabiliti dagli standard di sicurezza industriale per apparecchiature biomediche e non clamorosamente OLTRE, come quando si devono reclutare ampie masse muscolari di "vecchi" paraplegici "totalmente e permanentemente flaccidi".
 - PROPONGO aggiornamenti telematici con scadenze bisettimanali ed APPUNTAMENTO OPERATIVO a Montegrotto Terme/Padova per il 13-15 Aprile 2008 in occasione dei 2008Spring PaduaMuscleDays, quando ci saranno certamente Helmut KERN e Winfried Mayr (Vienna) e Thordur Helgason e Paolo Gargiulo (Reykjavik, Islanda). Io propongo di fissare la nostra riunione al TARDO POMERIGGIO di Domenica 13 Aprile, in modo che chi ne avrà la voglia potrà votare nella mattinata di Domenica o di Lunedì (quando però ci saranno le Sessioni del Meeting in Aula Magna dell'Università di Padova con Kern ed Helgason, l'islandese che ha messo a punto assieme a Paolo Gargiulo una tecnica di volumetria muscolare tridimensionale). In alternativa, il nostro Incontro potrà essere fissato Martedì 15 Aprile, sottraendo però tempo al lavoro clinico routinario. Attendo suggerimenti.
- Ugo Carraro,
European Trial RISE-2, Co-Organizzatore per l'Italia
Padova, 15 Febbraio 2008.