

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO

Scienze fisiopatologiche, neuropsicobiologiche e assistenziali del ciclo della vita

DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA MEDICO-CHIRURGICA E DEI TRAPIANTI

CICLO XXV

**RUOLO DEL GEL PIASTRINICO DA SANGUE PLACENTARE
NEI PROCESSI DI RIPARAZIONE PLEURICA**

SSD MED21

Dott. Lorenzo Rosso
Matricola R08788

TUTOR
Prof. Luigi Santambrogio

DIRETTORE DELLA SCUOLA
Prof. Roberto Weinstein

Anno accademico 2011-2012

INDICE

Abstract	I
Introduzione	II
1. Perdite aeree prolungate (PAL) e fattori di rischio	1
2. Tecniche intraoperatorie per la gestione delle perdite aeree	6
2.1. Tecniche chirurgiche	6
2.1.1. Tecniche “fissureless”	6
2.1.2. Suture meccaniche rinforzate (buttress staple).....	11
2.1.3. Pleural tenting	18
2.2. Sostanze sigillanti	23
2.2.1. Fibrin glue	26
2.2.2. Sigillanti vari	32
3. PRP	42
4. Obiettivi dello studio	57
4.1. Studio in vitro	58
4.2. Studio in vivo	63
4.3. Risultati dello studio.....	80
4.4. Conclusioni dello studio	89
5. Discussione	93

Abstract

Background

Le perdite aeree prolungate (PAL) sono la principale causa di morbidità dopo interventi di chirurgia polmonare che si traduce in un prolungamento dei tempi di ospedalizzazione e conseguente incremento della spesa sanitaria.

Differenti tecniche intraoperatorie e sigillanti chirurgici sono stati sviluppati per cercare di prevenire o ridurre l'incidenza delle perdite aeree post-operatorie.

Obiettivi

Questo studio vuole valutare la capacità del gel piastrinico ottenuto da cordone ombelicale di riparare un danno pleurico in un modello in vitro ed in un modello animale.

Metodi

In vitro è stata confrontata la capacità di riparazione del gel piastrinico rispetto alle condizioni standard di cultura di cellule mesoteliali umane dopo scratch assay.

Nel modello in vivo, il gel piastrinico derivante da sangue di cordone ombelicale è stato testato sperimentalmente su 53 ratti Wistar, dopo aver effettuato una lesione standardizzata sul polmone sinistro. Dopo sacrificio degli animali a tempistiche prestabilite sono state valutate alterazioni istologiche ed eventuali complicanze. Inoltre, sono stati analizzati cambiamenti nei fattori solubili dell'infiammazione.

Risultati

In vitro, il gel piastrinico ripara più velocemente il danno delle cellule mesoteliali rispetto ai controlli (24 vs 35 ore). In vivo, la formazione del nuovo tessuto mesoteliale è stata osservata dopo una media di 44 ± 1 ore nel gruppo trattato rispetto a 130 ± 2.5 ore del gruppo di controllo. La guarigione completa dei campioni trattati con gel piastrinico è stata evidenziata dopo 75 ± 1 ore ora rispetto alle 160 ± 6 ore dei casi controllo. Nel 43% dei trattati sono state rilevate aderenze pleuriche mentre solo nel 17% dei controlli. Alcuni fattori dell'infiammazione erano significativamente ridotti negli animali trattati.

Conclusioni

I risultati ottenuti dal nostro studio sembrano promuovere l'utilizzo del gel piastrinico e dei suoi fattori di crescita nei processi riparativi del tessuto pleurico, inoltre sembra stimolare lo sviluppo di aderenze pleuriche, particolarmente utili nella gestione delle perdite prolungate. Ipotezziamo che il gel piastrinico giochi un duplice ruolo rilasciando citochine e fattori di crescita che promuovono un processo riparativo più rapido e di conseguenza riducono la flogosi.

Introduzione

Il tumore del polmone è una delle neoplasie più diagnosticate dal 1985 [Youlden, Cramb, Baade, 2008] e rimane ancora oggi la causa più frequente di morte cancro-correlata nel mondo. Una resezione polmonare anatomica completa continua ad essere il cardine della terapia per il tumore non a piccole cellule.

Perdite aeree prolungate (PAL) sono la più comune complicanza dopo una chirurgia polmonare e sono state riportate con un'incidenza compresa tra il 3-26%, simile sia nelle resezioni polmonari per via toracotomica sia in quelle per via toracoscopica.

Fattori di rischio descritti sono scissure interlobari incomplete, patologie polmonari sottostanti (come enfisema, fibrosi, tubercolosi o neoplasie), aderenze intratoraciche, pazienti anziani (>75 anni) e bassa capacità di diffusione.

Perdite aeree prolungate sono responsabili di un aumento dei tempi di mantenimento dei drenaggi pleurici associata a dolore postoperatorio maggiore, ospedalizzazione prolungata, aumento dei costi sanitari, incrementato rischio di polmoniti ed empiema e diminuzione della mobilità postoperatoria.

Lo sviluppo di strumentazione all'avanguardia e di nuove tecniche chirurgiche (es. tecniche 'fissureless', suturatrici meccaniche rafforzate, tendaggio pleurico) ha contribuito a ridurre l'incidenza di queste complicanze.

Considerando l'alto impatto clinico e socio-economico di queste problematiche, è stata inoltre sviluppata una varietà di complementari naturali e materiali sintetici (es. sigillanti fibrinici, superfici collagene, colle sintetiche) molti utili nella gestione delle perdite aeree.

È stato visto, infatti, che l'utilizzo di sigillanti chirurgici riduce le perdite aeree post-operatorie e il tempo di mantenimento dei drenaggi toracici, anche se non sempre associato ad una diminuzione effettiva dei tempi di degenza.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'efficacia del gel piastrinico e dei fattori di crescita rilasciati dalle piastrine sulla riparazione del tessuto pleurico e sulla prevenzione dello sviluppo delle perdite aeree in seguito lesioni polmonari provocate sperimentalmente in ratti Wistar.

1. Perdite aeree prolungate (PAL) e fattori di rischio

Perdite aeree in seguito ad un intervento chirurgico maggiore polmonare sono ancora un'evenienza frequente, tale da prolungare la degenza ospedaliera e incrementare i costi sanitari.

Inoltre bisogna sempre tenere in considerazione che la persistenza di perdite aeree parenchimali e di spazio pleurico residuo può promuovere lo sviluppo di numerose gravi complicanze, in particolare infezioni pleuro-polmonari.

Non c'è ancora pieno accordo sulla definizione esatta di PAL (prolonged air leak): sono definite come la perdita d'aria da parte del tessuto polmonare residuo dopo la quarta, la quinta, la settima o la decima giornata, a seconda delle varie classificazioni.

L'incidenza, che si aggira intorno al 3-26% [Abolhoda, Liu, Brooks, e Burt, 1998], è stata riportata da numerosi studi in una popolazione eterogenea di pazienti sottoposti a intervento chirurgico toracico per patologie polmonari benigne e maligne.

Considerando che la resezione anatomica radicale polmonare rimane tutt'oggi il cardine della terapia per il tumore non a piccole cellule, lo sviluppo di perdite aeree prolungate è una complicanza molto frequente che il chirurgo toracico si trova a dover affrontare ogni giorno.

Provocano un aumento del tempo di mantenimento di drenaggio pleurico, associato a dolore e immobilizzazione, aumentato rischio di sviluppo di pneumotorace, di infezioni, di fistole broncopleuriche e, conseguentemente, un prolungamento dei tempi di ospedalizzazione, incrementando così i costi sanitari.

Fattori di rischio multipli sono stati descritti, ma predire quali pazienti svilupperanno PAL rimane ancora arduo. Di sicuro determinare la prevalenza delle perdite aeree, identificarne i fattori di rischio, caratterizzare la loro durata e valutarne l'importanza clinica, potrebbe portare ad approcci più selettivi, capaci di diminuire il verificarsi di complicanze.

Le variabili considerate normalmente negli studi sono il sesso, l'età del paziente, toracotomia open vs toracosopia video-assistita, resezioni anatomiche vs resezioni wedge, presenza di aderenze pleuriche, prove di funzionalità respiratoria e l'equipe chirurgica

[Lee, Hanley, Robineau, Sirois, Mulder, e Ferri, 2011; DeCamp, Blackstone, Naunheim, Krasna, Wood, Meli, McKenna, NETT Research Group, 2006].

Per identificare i fattori che possano predire il rischio di PAL, sono state eseguite svariate analisi di queste variabili: si è evidenziato che toracotomie open ($p = 0,082$), resezioni anatomiche ($p < 0,001$), la presenza di aderenze pleuriche al momento dell'intervento ($p = 0,031$), ridotti parametri di FEV₁ ($p < 0,001$) e di D_LCO ($p < 0,001$) sono associati ad un rischio maggiore di sviluppo di perdite aeree prolungate. Cerfolio [2002] aggiunge pure il genere maschile ($p = 0,05$).

Brunelli et al. nel loro "Predictors of prolonged air leak after pulmonary lobectomy" hanno analizzato retrospettivamente 588 pazienti operati di lobectomia polmonare dal gennaio 1995 al giugno 2003. Analisi statistiche approfondite hanno dimostrato che fattori prognostici indipendenti di perdite aeree prolungate sono principalmente un ridotto volume predetto espiratorio forzato al 1 secondo ($p < 0,0001$), la presenza di aderenze pleuriche ($p = 0,003$) e le resezioni polmonari superiori ($p = 0,006$).

Ferguson et al. [Ferguson, Little, Rizzo, Popovich, Glonek, Leff, Manjoney, e Little, 1988] hanno dimostrato, in un campione di 237 soggetti, che la capacità di diffusione di monossido di carbonio del polmone (D_LCO) è uno dei più importanti predictors di morbidità dopo resezione polmonare ($p < 0,01$).

Lo studio prospettico di Stolz [Stolz, Schützner, Lischke, Simonek, e Pafko, 2005] ha coinvolto 134 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare.

Sono state considerate variabili preoperatorie (età, sesso, BMI, FEV₁, FVC, FEV₁/FVC ratio) e variabili post-operatorie (durata dei drenaggi toracici, tipologia di intervento, stato delle scissure polmonari, altre complicanze cardiopolmonari e la durata della degenza).

PAL sono state diagnosticate in 13 pazienti (9,7 %) con una loro durata intorno a $10,4 \pm 3,2$ giorni (range 7-17 giorni).

Rice [Rice, e Kirby, 1992] ha riportato perdite aeree prolungate per più di 7 giorni in 30 pazienti su 197 (15,2 %).

Keagy ha dimostrato perdite aeree prolungate nel 4,3 % su 369 lobectomie, Venuta [Venuta, Rendina, De Giacomo, Flaishman, Guarino, Ciccone, e Ricci, 1998] solo nel 4 % dei casi.

Comparando tutte le resezioni polmonari, non ci sono evidenti differenze tra i vari tipi di lobectomia e lo sviluppo di PAL.

È stato invece dimostrato come pazienti affetti da BPCO abbiamo un rischio maggiore di sviluppo di perdite aeree prolungate, a causa dell'aumentata resistenza al flusso aereo e ai cambiamenti nella citoarchitettura parenchimale.

In Périquet [Périquet, e Poncelet, 2005] e Rice [Rice, Okereke, e Blackstone, 2002] i gruppi sottoposti a rischio maggiore sono le persone anziane, pazienti affetti da BPCO e tutti quelli che hanno fattori di rischio generali come diabete mellito o in terapia con corticosteroidi. È stato inoltre sottolineato il ruolo delle lobectomie polmonari superiori e della lung volume reduction surgery per enfisema a stadio severo nell'incrementare questo rischio.

Abolhoda [Abolhoda, Liu, Brooks, e Burt, 1998] ha condotto uno studio su 100 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare superiore destra e linfadenectomia ilo-mediastinica per tumore non a piccole cellule.

Dati clinici preoperatori, intraoperatori e postoperatori sono stati misurati e analizzati per determinare i fattori associati a sviluppo di perdite aeree prolungate.

PAL sono state la complicanza prevalente (25,5% dei casi) con una media compresa tra $12,1 \pm 5,3$ giorni.

Pazienti con PAL hanno una degenza ospedaliera media significativamente maggiore (11 giorni vs 7 giorni. $p = 0,0001$).

Questo studio ha permesso di confermare che le perdite aeree prolungate nel post operatorio sono una delle complicanze maggiori per la chirurgia polmonare specie in seguito a lobectomia superiore destra. Questo pare determinato dal fatto che le lobectomie superiori spesso portano allo sviluppo di ampi spazi aerei apicali con scarsa apposizione tra pleura parietale e viscerale.

Izbicki ha notato inoltre un aumento dell'incidenza di PAL in pazienti sottoposti a linfadenectomia ilo-mediastinica radicale sistematica.

Noritaka e Isowa hanno studiato retrospettivamente 138 pazienti sottoposti a lobectomia o segmentectomia polmonare per analizzare il significato dei vari fattori di rischio preoperatori. Dividendo in due gruppi i pazienti con PAL (25 pazienti = 18,1 %) da quelli che invece non hanno mostrato perdite aeree (113 pazienti = 81,9%), è stato evidenziato come la maggior parte degli appartenenti al gruppo PAL soffrisse di diabete mellito.

Lo stato nutrizionale preoperatorio è stato associato a complicanze post operatorie [Jagoe, Goodship, e Gibson, 2001].

Storia personale di calo ponderale, il livello di albumina sierica e il BMI mostrano una correlazione stretta con la morbidity in pazienti sottoposti a toracotomia per neoplasia polmonare.

Uno studio italiano condotto all'Istituto Europeo Oncologico da Petrella [Petrella, Rizzo, Radice, Borri, Galetta, Gasparri, Solli, Veronesi, Bellomi, e Spaggiari, 2011] ha scelto di investigare la quantificazione tomografica (TC) dell'enfisema come predittore delle perdite aeree prolungate dopo lobectomia polmonare standard, e di identificare i fattori di rischio preoperatori, per cercare di mettere in atto strategie di valutazione valide prima di un intervento.

La potenziale applicazione clinica potrebbe essere quella di prevenire strategie chirurgiche ed anestesologiche mirate, basate sulla dissezione delicata delle scissure con l'aggiunta di sigillanti profilattici e ventilazione protettiva per evitare possibili barotraumi.

Caratteristiche clinico-patologiche (sesso, età, stato delle perdite aeree, sito chirurgico, T.I.P.O., istologia, staging, grading) sono state analizzate e rapportate alle variabili TC e spirometriche.

La popolazione presa come campione è stata di 121 pazienti. È stato dimostrato che perdite aeree prolungate sono significativamente più frequenti negli uomini ($p = 0,0002$) e significativamente maggiori per gli interventi in emitorace destro ($p = 0,0091$).

Si è visto quindi che il sesso ($OR = 4,95$), il sito chirurgico ($OR = 2,71$) così come l'età ($OR = 1,07$) siano importanti fattori di rischio per PAL.

Il team di fisioterapisti respiratori dovrebbe sviluppare un piano d'intervento specifico dalla prima giornata postoperatoria per ridurre il rischio addizionale di perdite aeree prolungate

utilizzando procedure di incentivamento, evitando di provocare il riflesso tussigeno ed esercizi respiratori forzati.

I risultati dello studio suggeriscono che la stima del grado di enfisema tramite tomografia computerizzata sia un effettivo predittore di perdite aeree prolungate. Indicano anche che i test di funzionalità respiratoria non sono altrettanto accurati nel predire quali pazienti siano ad alto rischio, infatti scansioni TC hanno sensibilità maggiore (84,5 % vs 69 %).

Brunelli [Brunelli, Varela, Refai, Jimenez, Pompili, Sabbatini, e Aranda, 2010, A scoring system to predict the risk of prolonged air leak after lobectomy] ha proposto un sistema a punteggio in grado di predire il rischio incrementato di sviluppo di PAL in seguito a lobectomia polmonare. Questo score potrebbe essere utile nell'identificare i pazienti ad alto rischio nei quali adottare strategie intraoperatorie profilattiche adeguate.

L'incidenza di PAL nella popolazione presa come campione è stato del 13 % (87 casi su 685 totali).

Le variabili predittive e gli score scelti sono i seguenti:

- età > 65 anni (1 punto)
- presenza di aderenze pleuriche (1 punto),
- volume espiratorio forzato al 1° secondo < 80 % (1,5 punti)
- Indice di massa corporea (BMI) < 25,5 kg/m² (2 punti)

I pazienti sono stati divisi in quattro classi a seconda degli score complessivi, che sono significativamente associati all'incremento del rischio di sviluppo di PAL.

2. Tecniche intraoperatorie per la gestione delle perdite aeree

Il dibattito riguardante l'opportunità di utilizzare nuove tecniche intraoperatorie per minimizzare le perdite aeree dopo chirurgia polmonare è diventato nel corso degli anni sempre più acceso: la letteratura accademica analizza questa tematica da parecchio tempo, così che il materiale a disposizione è oggi particolarmente numeroso.

Nel presente capitolo si è deciso di affrontare diversi ambiti d'intervento partendo dalle tecniche operatorie maggiormente utilizzate fino ad arrivare all'uso dei sigillanti; in questo modo è possibile valutare i due principali percorsi da intraprendere all'interno di una sala operatoria per diminuire la comparsa di perdite aeree.

2.1. Tecniche chirurgiche

2.1.1. Tecniche "fissureless"

Nelle lobectomie che vengono effettuate convenzionalmente, l'accesso all'arteria polmonare viene guadagnato attraverso la dissezione delle scissure; questa procedura può incrementare l'incidenza di perdite aeree nel periodo postoperatorio.

Questo evento però può essere influenzato dalle varie tecniche chirurgiche adottate: lobectomie effettuate con tecnica "fissureless" permettono di ovviare il problema della divisione delle scissure utilizzando le suturatrici meccaniche nella divisione dei lobi solo dopo aver sezionato gli elementi vascolari e il bronco.

Nel 2003 Nomori et al. hanno pubblicato un articolo fondamentale per lo sviluppo della tecnica fissureless, descrivendo la procedura per lobectomie in pazienti con scissure incomplete o largamente fuse.

Utilizzando questa tecnica Gómez-Caro [Gómez-Caro, Roca Calvo, Lanzas, Chau, Cascales, e Parrilla, 2007] ha studiato 119 pazienti per valutare il diverso impatto sull'outcome, sulle perdite aeree e sulla durata della degenza ospedaliera, dopo l'utilizzo di suturatrici meccaniche sulle scissure incomplete.

È stato utilizzato un approccio standard tramite toracotomia in quinto spazio intercostale, con risparmio del muscolo dentato anteriore.

I pazienti sono stati separati a seconda della presenza di scissure complete o incomplete; quelli che presentavano scissure fuse o parzialmente fuse sono stati divisi ulteriormente nelle seguenti categorie:

Gruppo A = 32 pazienti sottoposti a resezione polmonare (lobectomia, bilobectomia) con trattamento tradizionale delle scissure, usando l'elettrocoagulatore o dissezione del parenchima per via smussa.

Una volta identificata e legata l'arteria polmonare, viene utilizzata una suturatrice meccanica per dividere le scissure incomplete; il bronco lobare viene diviso per ultimo.

Gruppo B = 31 pazienti sottoposti a tecnica fissureless come descritto da Nomori nel 2003.

Alla fine di ogni intervento è stato posizionato un solo drenaggio da 28 Fr connesso ad una cassetta di raccolta tenuta a bassa aspirazione (15-20 cm H₂O).

Le perdite aeree sono state misurate giornalmente e classificate come:

- nessuna perdita aerea
- perdite in espirazione forzata (sotto i colpi di tosse)
- perdite sotto normale espirazione

L'incidenza di perdite aeree prolungate è risultata significativamente più alta nei pazienti con scissure incomplete, sia gruppo A sia gruppo B ($p < 0,005$).

Inoltre una quota maggiore di perdite aeree è stata riscontrata nei pazienti del gruppo A, cioè quelli trattati con tecnica tradizionale ($p < 0,05$).

Le perdite aeree in prima e seconda giornata post operatoria sono risultate nettamente minori nel gruppo B ($p < 0,05$).

La durata della degenza ospedaliera e la media dei giorni di mantenimento dei drenaggi è risultata lievemente minore nel gruppo B.

Ng [Ng, Ryder, Machan, e Ciuffi, 2010] ha sottoposto a lobectomia polmonare superiore destra 27 pazienti con la tradizionale dissezione delle scissure per esporre l'arteria polmonare (gruppo A) e 66 pazienti tramite la tecnica fissureless anteriore (gruppo B).

Nel gruppo A ha osservato una maggiore incidenza di perdite aeree prolungate (22,2 % = 6/27 contro il 7,60 % = 5/66) $p = 0,047$; un mantenimento dei drenaggi per un tempo superiore (9,7 giorni contro 6,6 giorni) $p = 0,044$; un aumento dei tempi di ospedalizzazione (media di 14,8 giorni rispetto a 8,2 giorni) $p = 0,001$.

	Gruppo A	Gruppo B	p
<i>incidenza di perdite aeree prolungate</i>	22,20% (6/27)	7,60% (5/66)	0.047
<i>giorni di mantenimento drenaggi</i>	9,7 giorni	6,6 giorni	0.044
<i>degenza ospedaliera</i>	14,8 giorni	8,2 giorni	0,001

Un totale di 30 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare per neoplasia polmonare che presentavano scissure lobari assenti o incomplete è stata studiata e randomizzata in tre differenti gruppi da Venuta et al nel 1998:

Nel gruppo A le scissure sono state completate con una suturatrice meccanica GIA rafforzata con pericardio bovino.

Nel gruppo B sono state utilizzate solamente suturatrici TA 55.

Nel gruppo C gli autori hanno usato la tecnica tradizionale con cauterizzazione, clamp e fili di sutura.

In tutti i gruppi l'identificazione dei piani interlobari è avvenuta in modo analogo: le scissure sono state completate dopo l'isolamento dei vasi polmonari lobari e un'iniziale dissezione dei bronchi.

Le perdite aeree postoperatorie sono perdurate per 2 ± 0.94 giorni (gruppo A), 5.3 ± 2 (gruppo B) e 5.3 ± 1.7 (gruppo C).

La media delle giornate di degenza ospedaliera è risultata di 4.4 ± 0.96 giorni (gruppo A), 7.8 ± 2.14 (gruppo B) e 7.2 ± 1.5 (gruppo C).

Nel gruppo A perdite aeree prolungate sono arrivate alla terza giornata post-operatoria; nel gruppo B sono continuate fino al 9° giorno in due pazienti, così come nel terzo gruppo.

Due complicanze relative all'uso del pericardio bovino (infezioni superficiale di ferita) sono state registrate nel primo gruppo.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
<i>perdite aeree postoperatorie</i>	2 ± 0,94	5,3 ± 2	5,3 ± 1,7
<i>degenza ospedaliera</i>	4,4 ± 0,96	7,8 ± 2,14	7,2 ± 1,5
<i>massima durata perdite aeree postoperatorie</i>	max 3 giorni	max 8 giorni	max 8 giorni
<i>Complicanze</i>	infezione di ferita	IVU	

La differenza tra i diversi gruppi è risultata statisticamente significativa ($p = 0,0001$) in termini di durata delle perdite aeree postoperatorie e della degenza ospedaliera.

La durata delle perdite aeree postoperatorie è apparsa diminuita nel gruppo A (gruppo A vs gruppo B: $p = 0,0001$; gruppo A vs gruppo C: $p = 0,0001$).

Inoltre i pazienti del primo gruppo hanno dimostrato anche una degenza ospedaliera minore in termini di durata e quindi di costi (gruppo A vs gruppo B: $p = 0,0001$; gruppo A vs gruppo C: $p = 0,0007$).

Refai [Refai, Brunelli, Salati, Pompili, Xiumè, e Sabbatici, 2011] ha studiato un campione di 206 pazienti sottoposti a lobectomia per neoplasia polmonare primitiva, dividendoli in due gruppi:

- gruppo TR (traditional resection): 146 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare superiore destra utilizzando la tradizionale dissezione dell'arteria polmonare intrascissurale.
- gruppo FL (fissureless): 60 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare superiore destra tramite la tecnica fissureless anteriore.

Tutti gli interventi sono stati eseguiti con un accesso toracotomico laterale, risparmiando il muscolo dentato. I pazienti con scissure complete sono stati esclusi dallo studio.

Non sono stati utilizzati sigillanti, suturatici meccaniche rinforzate o tenting pleurici.

Lo scopo dell'analisi è stato quella di confrontare i pazienti appartenenti ai gruppi TR e FL, secondo le loro caratteristiche principali, e di compararne gli outcome (incidenza di perdite aeree prolungate, la durata delle perdite aeree durante l'intervento, la durata dei drenaggi toracici, la durata dell'intervento, la degenza ospedaliera e i costi).

Per il calcolo statistico sono state tenute in considerazione numerose variabili: età, sesso, volume espiratorio forzato al primo secondo (FEV_1), capacità vitale forzata (FVC), la capacità di diffusione polmonare del monossido di carbonio (D_LCO), volume residuo/capacità polmonare totale (RV/TLC), tensione arteriosa dell'ossigeno (PaO_2), tensione arteriosa dell'anidride carbonica ($PaCO_2$), patologie coronariche (CAD), diabete, indice di massa corporeo (BMI), aderenze intraoperatorie, tipologia e lunghezza delle suturatici meccaniche, fumo e pacchetti/anno, l'American Society of anesthesiologists score (ASA), l'indice di comorbidità di Charlson (CCI), e l'eastern cooperative oncology group score (ECOG).

Un'attenta analisi della letteratura sembra, quindi, promuovere l'uso di tecniche fissureless per dividere il parenchima polmonare ed in modo particolare scissure incomplete o assenti.

Queste risultano ad oggi essere più efficaci nel ridurre le lesioni polmonari, con un vantaggio pratico nel minimizzare l'incidenza di perdite aeree prolungate, senza determinare costi aggiuntivi o conseguenze avverse.

2.1.2. Suture meccaniche rinforzate (*buttress staple*)

Le suture meccaniche offrono un sistema sicuro di approssimazione dei tessuti e sono ampiamente utilizzate per resezioni polmonari atipiche, per divisioni delle scissure polmonari durante una lobectomia e durante le ampie escissioni tissutali richieste per interventi chirurgici di riduzione del volume polmonare (LVRS).

Il rafforzamento (*buttress*) delle suture con vari materiali è una strategia utilizzata con lo scopo di limitare le perdite aeree in pazienti con parenchima polmonare particolarmente fragile.

È stato inoltre calcolato che il costo aggiuntivo del rinforzo della linea di sutura è compensato dall'efficacia nel ridurre le perdite d'aria e conseguentemente dalla riduzione della durata del ricovero.

Il materiale di rinforzo ideale dovrebbe possedere alcune proprietà:

- facilità d'uso
- biocompatibilità
- combinazione di flessibilità e forza
- ermeticità
- buon rapporto costo-efficacia

Diversi materiali sono stati proposti per il rinforzo delle linee di sutura, senza però evidenza di un chiaro vantaggio; i due materiali più comunemente usati per questo rafforzamento sono il pericardio bovino e il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE).

Pericardio bovino e ePTFE hanno caratteristiche simili. Entrambi i materiali sono inerti e non biologici. Non sono stati segnalati aumenti del rischio di infezione pur essendo materiali estranei.

All'analisi istologica a distanza, il pericardio bovino è risultato essere grossolanamente intatto anche se deformato, senza evidenza di degrado o calcificazione delle fibrille di collagene. La capsula fibrosa prodotta è risultata statisticamente più sottile di quella osservata con la ePTFE.

Inoltre nel gruppo trattato con ePTFE si sono registrate aderenze fibrose pleuriche, evento raro con il pericardio bovino.

Nonostante le possibili complicanze messe in evidenza, tutti i risultati della letteratura indagata sembrano raccomandare l'uso routinario di questi dispositivi di rafforzamento delle linee di sutura, in modo particolare sui pazienti considerati a rischio di perdite d'aria post-operatorie.

Già Hazelrigg et al. nel 1997 avevano rilevato che l'utilizzo del pericardio bovino potesse diminuire le perdite aeree: nel loro studio 123 pazienti, sottoposti a riduzione polmonare di volume per via toracoscopia, sono stati randomizzati in un gruppo destinato a ricevere trattamento con suturatrici meccaniche rinforzate con pericardio bovino e in un altro con normali stapler.

I due gruppi erano paragonabili per rischio pre-operatorio e gravità del loro enfisema.

Le complicanze post-operatorie sono risultate identiche nei due gruppi riguardo allo sviluppo di polmonite, empiema ed infezione di ferita; tuttavia c'è stata una differenza significativa nella durata delle perdite aeree.

I pazienti che hanno ricevuto le linee di sutura rinforzate con pericardico hanno rimosso i drenaggi 2,5 giorni dei pazienti sottoposti alle tecniche tradizionali e di conseguenza sono stati dimessi dall'ospedale in media 2,8 giorni prima.

Table 3. . Results

Variable	Bovine	No Bovine	p Value
Ventilator hours	2.1 ± 0.28	0.49 ± 0.06	0.08
Chest tube days	7.9 ± 8.2	10.4 ± 8.9	0.04
Intensive care days	0.69 ± 0.6	0.76 ± 0.1	0.60
Hospital days	8.6 ± 5.2	11.4 ± 8.1	0.03

Le spese ospedaliere totali sono risultate tuttavia paragonabili nei due gruppi dato che la minor durata della degenza ospedaliera è stata compensata dal costo del pericardico bovino (22.108 \$ pericardio bovino vs 22.060 \$ non bovina).

Murray [Murray, Ho, Hsia, e Little, 2002] ha confrontato l'efficacia delle suturatrici con linea semplice rispetto a quelle rinforzate con pericardio bovino o ePTFE nella prevenzione delle perdite aeree, secondo un range definito di pressioni delle vie aeree.

Ci sono stati un totale di 75 "spari" di GI anastomosi (GIA) stapler, divisi equamente in tre gruppi:

gruppo 1 = linea semplice, suturatrice non rinforzata

gruppo 2 = suturatrice rinforzata con pericardio bovino

gruppo 3 = suturatrice rinforzata con ePTFE

Le suturatrici meccaniche sono state applicate e rilasciate con cura al fine di prevenire strappi involontari del parenchima polmonare.

Terminate le suture, il polmone rimanente è stato testato mediante insufflazione d'aria a partire da 15 cm H₂O, con incrementi di 5 cm H₂O fino all'individuazione di perdite d'aria o al raggiungimento di 60 cm H₂O.

Per identificare la perdita d'aria il polmone è stato immerso in soluzione fisiologica utilizzando la prova idropneumatica.

È stato evidenziato un rapporto diretto tra la pressione insufflata nelle vie aeree e lo sviluppo di perdite per entrambe le linee di sutura (semplici e rinforzate): ad una pressione di 15 cm H₂O, non c'era fuoriuscita di aria in nessuno dei gruppi. Tuttavia, nel range da 20 a 55 cm H₂O, è stato registrato un numero sempre crescente di perdite d'aria.

I risultati dello studio indicano, pertanto, che suturatrici meccaniche semplici non portano a perdite aeree con pressioni delle vie aeree < 20 cm H₂O. Tuttavia già con 20 cm H₂O, quasi il 50% delle perdite d'aria, e con 25 cm H₂O, il 76% dei casi, mostrano fuoriuscita d'aria.

Quest'incidenza di perdite aeree può essere ridotta a zero, essenzialmente, utilizzando pericardio bovino o ePTFE come rinforzo di base: i dati indicano infatti che a pressioni delle vie aeree fino a 25 cm H₂O, sia pericardio bovino sia il rafforzamento con ePTFE esercitano lo stesso grado di protezione verso lo sviluppo di perdite aeree lungo la linea di sutura.

In più ePTFE ha dimostrato un vantaggio statisticamente significativo rispetto al pericardio bovino per pressioni > 25 cm H₂O.

Una comparazione tra politetrafluoroetilene espanso e pericardio bovino era già stata presentata da Vaughn et al. all'undicesimo meeting annuale dell'associazione europea di chirurgia cardio-toracica nel 1998.

La loro trattazione parte da un'introduzione sulle caratteristiche dei due dispositivi:

Il pericardio bovino dev'essere immerso in soluzione fisiologica per rimuovere l'ossido di propilene. Le strisce di pericardio bovino vengono successivamente attaccate mediante un gel alle branche della stapler, la quale viene poi tenuta chiusa per almeno due minuti in modo da permettere il giusto accostamento delle superfici.

Solo allora si potranno rimuovere le strisce e la suturatrice rafforzata sarà pronta all'uso.



Per quanto riguarda l'ePTFE, non è necessaria nessuna colla adesiva per far aderire i due lembi; l'eccesso di materiale può essere rimosso con pinze da presa.

Lo studio ha poi preso in considerazione l'utilizzo dei due dispositivi sulla zona apicale di ciascun lobo in 10 soggetti, e testato il risultato insufflando il polmone immerso in soluzione salina.

Le porzioni parenchimali contenenti le suture sono poi state sezionate per gli studi istologici, valutando la risposta tissutale, la presenza di granulomi, di cellule infiammatorie e mineralizzazione, l'evidenza di infezioni.

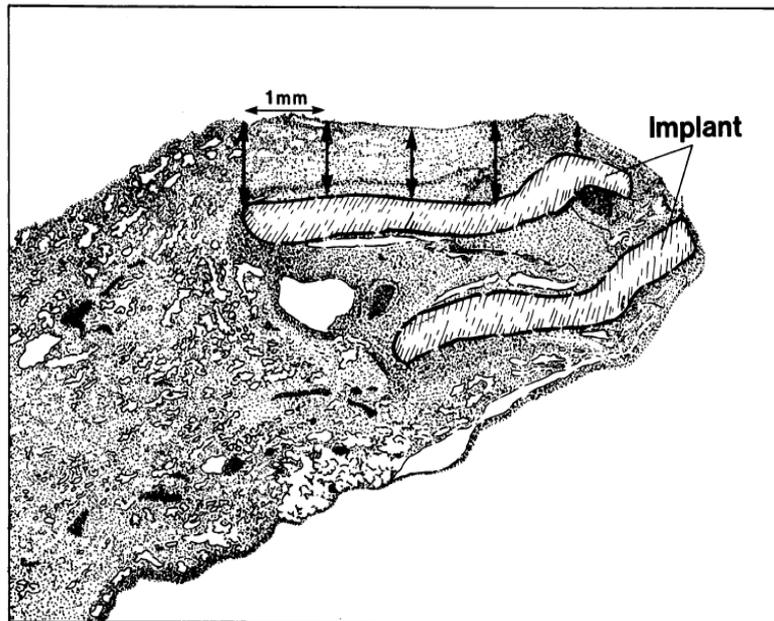


Fig. 1. Drawing of implant site showing the sites of measurement of the thickness of tissue encapsulating the BP and ePTFE staple-line reinforcement materials. The first measurement was always made at the proximal end of the most intact implant strip in the specimen. The other four were done at 1-mm intervals (arrows), as determined with use of the ocular micrometer in the microscope.

Già all'esame macroscopico si è evidenziata moderata fibroplasia lungo la superficie pleurica a ridosso degli impianti.

Il rinforzo con ePTFE in alcuni casi era completamente racchiuso in una capsula di tessuto connettivo fibrovascolare liscio brillante di spessore variabile.

Dopo 30 giorni, gli impianti con pericardio bovino hanno mostrato un sottile strato di copertura con focali aree di lievi-moderati infiltrati infiammatori cronici.

La risposta alle linee di sutura rafforzate con ePTFE erano invece caratterizzate dalla presenza di un connettivo fibrovascolare che si estendeva lungo i bordi prossimali adiacenti al polmone, con una predominanza cellulare di fibroblasti e macrofagi in mono/doppio strato.

Dopo 95 e 167 giorni dall'esperimento, i dispositivi con pericardio bovino hanno mostrato un modesto grado di deformità del materiale, lieve infiltrato cellulare, senza nessuna degradazione delle fibrille collagene bovine. Nelle valutazioni tardive gli infiltrati infiammatori cronici con fibroplasia si erano stabilizzati, dimostrando un reazione tissutale probabilmente diretta nei confronti dei residui di glutaraldeide o dell'ossido di propilene delle fibre di pericardio bovino.

Nel polmone trattato invece con ePTFE la capsula, già presente al 30° giorno, aveva mostrato un ulteriore ispessimento, aumentando ulteriormente la tenuta a livello della sutura.

Un evento avverso dopo l'utilizzo di pericardio bovino, simile alla risposta visualizzata nello studio di Vaughn et al. [1998], è stato individuato da Suemitsu [Suemitsu, Tokito, Ichiki, Takeo, Momosaki, e Furuya, 2011].

L'uso di linee di sutura rafforzate con pericardio bovino ha portato nel tempo ad un'eccessiva reazione tissutale, generando un granuloma; l'infiammazione ha poi invaso la parete toracica, coinvolgendo la pleura e i muscoli intercostali, producendo dolore intenso.

Si tratta però di reazioni avverse piuttosto isolate, dato che i risultati positivi ottenuti con le suture meccaniche rafforzate vengono ampiamente confermati dai numerosi studi presenti in letteratura.

Nel 2000 Stammberger et al. hanno studiato 65 pazienti sottoposti a riduzione di volume polmonare bilaterale per via toracoscopia video-assistita utilizzando suture endoscopiche sia senza (gruppo 1) sia con pericardio bovino (gruppo 2, Peri-Strips secco).

Risultati: Nel gruppo di trattamento (gruppo 2), la durata media più lunga delle perdite aeree è stata di $3,9 \pm 1,25$ giorni rispetto a $7,1 \pm 1,19$ giorni ($p = 0,002$) del gruppo di controllo.

Anche per quanto riguarda i tempi di mantenimento dei drenaggi toracici i pazienti nel gruppo 2 hanno mostrato tempi significativamente più brevi $5,8 \pm 0,74$ giorni rispetto a $8,0 \pm 0,78$ giorni ($p = 0,001$).

Va però sottolineato che la riduzione del tempo di mantenimento dei drenaggi in torace evidenziata dallo studio non si è tradotta poi in una degenza significativamente minore nel gruppo di trattamento.

Stesso risultato è stato dimostrato da Miller et al. nel 2001 su 80 pazienti sottoposti a resezione polmonare, assegnati ad un treatment group (40 pazienti) e ad un gruppo controllo (40 pazienti).

Non sono state evidenziate differenze statistiche nella durata della terapia intensiva postoperatoria (1,5 giorni nel gruppo controllo rispetto a 1,6 giorni del gruppo buttressed). Stessi risultati sono stati registrati per la durata dell'ospedalizzazione, la durata di mantenimento dei drenaggi toracici e durata delle stesse perdite aeree.

La loro conclusione è, appunto, che non ci sia una significatività statistica nei risultati tra il gruppo sottoposto a resezione con linee di sutura rinforzate con pericardio bovino e i

pazienti con suture semplici; la minima riduzione delle perdite aeree e del tempo di mantenimento dei tubi toracici potrebbe portare ad un utilizzo del pericardio bovino probabilmente solo per numeri di pazienti decisamente maggiori rispetto quelli presi in esame.

L'uso di questi dispositivi ha comportato un miglioramento statisticamente significativo nella gestione delle perdite aeree rispetto all'approccio tradizionale.

La revisione della letteratura accademica ci permette di sottolineare i risultati positivi raggiunti nei numerosi trial clinico-sperimentali, nonostante non ci sia ancora uniformità di opinione circa il reale vantaggio economico di tale tecnica.

2.1.3. Pleural tenting

Tutte le resezioni di parenchima polmonare possono provocare potenziali perdite d'aria. Queste si sigillano più rapidamente quando il danno parenchimale a livello della pleura viscerale è portato direttamente in apposizione alla pleura parietale favorendo la chiusura della soluzione di continuo.

Nei pazienti sottoposti a resezione polmonare, specialmente a lobectomia superiore con sviluppo di un ampio spazio aereo pleurico residuo, le due superfici pleuriche non si giustappongono. Ciò porta spesso a frustranti perdite aeree prolungate con aumento della morbilità e dell' durata dell'ospedalizzazione.

Una tecnica semplice, descritta inizialmente nel 1956 [Miscall, Duffy, Nolan, e Klopstock] ed elaborata da Miller, è la creazione di una ribattitura pleurica apicale: la pleura parietale viene scollata dalla fascia endotoracica e adagiata a contatto con il polmone in modo da affrontare le due superfici pleuriche, obliterando quindi lo spazio residuo intrapleurico.



Fig. 1. The parietal pleura was dissected from the endothoracic fascia.



Fig. 2. The free lateral margin of the parietal pleura was sutured very superficially to the fourth intercostal space muscle fibres by three interrupted absorbable sutures to obtain the tent configuration.

Robinson [Robinson, e Presto, 1998] ha deciso di utilizzare questa tecnica su 48 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare per neoplasia, suddividendoli in un gruppo A (lobectomia semplice. n = 20 pazienti) e in gruppo B (lobectomia con pleural tenting. n = 28 pazienti).

Tutte le lobectomie sono state effettuate attraverso un accesso toracotomico in quinto spazio intercostale posterolaterale con tecnica muscle-sparing.

Dispositivi meccanici di sutura sono stati utilizzati per completare scissure fuse e per chiudere il bronco. Al termine della procedura il moncone bronchiale è stato immerso in soluzione salina e sottoposto a 30 cm H₂O di pressione per testare le perdite aeree.

Le caratteristiche dei vari pazienti non mostravano differenze significative.

Nella quasi totalità dei pazienti all'interno dei due gruppi sono state evidenziate falde d'aria libera all'apice a fine intervento, ma nei pazienti sottoposti a pleural tent la durata delle perdite aeree è risultata minore, così come la durata di mantenimento dei drenaggi e della degenza ospedaliera.

Postoperative management data			
Parameter	Tented (n = 28)	Nontented (n = 20)	p Value
<i>Air leak after surgery (days)</i>	1.61 ± 0.3	3.85 ± 1.2	0.02
<i>Total chest tube drainage (ml)</i>	1619.5 ± 95.5	2476.3 ± 346.4	0.009
<i>Total days chest tubes in place</i>	4.0 ± 0.2	6.6 ± 1.0	0.004
<i>Total days in hospital</i>	6.4 ± 0.4	8.6 ± 1.0	0.02

Brunelli et al. [Brunelli, Al Refai, Monteverde, Borri, Salati, Sabbatini, e Fianchini, 2002] hanno voluto verificare l'efficacia del tendaggio pleurico nella riduzione dell'incidenza di perdite aeree.

200 pazienti sottoposti a lobectomia polmonare superiore sono stati randomizzati in due gruppi:

Gruppo 1 = 100 pazienti sottoposti a lobectomia superiore e tendaggio pleurico

Gruppo 2 = 100 pazienti sottoposti a lobectomia tradizionale

Sono state confrontate le caratteristiche pre-operatorie, operatorie e post-operatorie di entrambi i gruppi e i risultati ottenuti sono stati utilizzati per identificare possibili fattori predittivi di perdite aeree prolungate.

Una riduzione significativa si è verificata nel gruppo 1 per quanto riguarda la durata media della perdita di aria nel postoperatorio (2,5 versus 7,2 giorni; $p < 0,0001$), il numero di giorni di mantenimento dei drenaggi (7,0 versus 11,2 giorni, $p < 0,0001$), la durata della degenza ospedaliera (8,2 versus 11,6 giorni; $p < 0,0001$) e il costo d'ospedalizzazione (4.110 dollari versus 5.805 dollari, $p < 0,0001$).

Table 3. Comparison of Postoperative Characteristics Between Patients With Pleural Tent (100 Cases) and Without Pleural Tent (100 Cases)

Variables	Pleural Tent	No Pleural Tent	t Value	p Value
Air leak (days)	2.5 (4.2)	7.2 (8.6)	4.9	< 0.0001
Prolonged air leak (yes/no)	14/86	32/68	9.1 ^a	0.003
Chest tube duration (days)	7 (4)	11.2 (8)	4.7	< 0.0001
Pleural effusion at 48 h (mL)	834.9 (314.5)	829 (394.8)	0.1	0.9
Blood transfusion (units)	0.54 (1.2)	0.38 (0.8)	1.1	0.3
Other complications (yes/no)	13/87	14/86	0.04 ^a	0.8
Postoperative hospital stay (days)	8.2 (3.8)	11.6 (6.3)	4.6	< 0.0001
Hospital costs (\$)	4,110 (3,178)	5,805 (1,889)	4.6	< 0.0001

Lo studio ha mostrato come il pleural tenting durante interventi di resezione polmonare maggiore sia una procedura sicura, molto utile nel ridurre la durata delle perdite d'aria e i costi di degenza.

Il vantaggio di tale procedura è stato raggiunto prima del quarto giorno post-operatorio (vedi tabella 3).

Anche Okur et al. nel 2001 hanno condotto uno studio prospettico randomizzato per valutare l'efficacia del tendaggio pleurico nel prevenire il problema delle perdite aeree prolungate.

Tenting pleurico è stato eseguito dopo lobectomia polmonare superiore o bilobectomia superiore in 20 pazienti (gruppo A); in altri 20 pazienti invece il tendaggio pleurico non è stato eseguito (gruppo B).

Entrambi i gruppi sono stati confrontati rispetto alla durata di mantenimento del drenaggio toracico nel post-operatorio, alla durata dell'ospedalizzazione, all'ammontare totale di liquido drenato e alla necessità di interventi aggiuntivi per controllare le perdite aeree prolungate.

La durata dei tubi di drenaggio toracico è risultata minore nel gruppo in cui era stata eseguito tendaggio pleurico ($4,3 \pm 0,16$ giorni contro $7,40 \pm 0,68$ giorni, $p < 0,0001$).

È stata evidenziata una durata media di degenza minore nel gruppo "tended" ($7,60 \pm 0,4$ giorni contro $9,35 \pm 0,6$ giorni, $p = 0,024$).

Anche se la quantità totale media di liquido pleurico drenato è risultata inferiore nel gruppo sottoposto a pleural tent ($667,5 \pm 57,7$ ml vs $802,5 \pm 83,3$ ml, $p = 0,1911$), la differenza non è stata però statisticamente significativa.

Tre (15%) pazienti del gruppo B hanno avuto bisogno dell'inserimento di un drenaggio toracico apicale nel periodo post-operatorio per perdite aeree prolungate.

I risultati eccellenti dei numerosi studi supportano questa strategia chirurgica come terapia aggiuntiva nel controllo delle perdite aeree peri-operatorie; per cui sulla base delle diverse esperienze clinico-sperimentali i vari autori consigliano l'uso routinario del pleural tent durante resezioni polmonari maggiori in pazienti a rischio, ogni qualvolta ciò sia tecnicamente possibile.

2.2. Sostanze sigillanti

Un'ampia varietà di sigillanti chirurgici sono stati studiati e utilizzati in chirurgia toracica per cercare di ridurre le perdite aeree, per trattare le fistole bronco-pleuriche, per prevenire le fistole esofagee o per controllare il sanguinamento.

Un sigillante ideale dovrebbe incorporare un materiale sintetico, evitando così l'immunogenicità e i rischi di trasmissione di malattie associate all'utilizzo di materiali di origine umana o animale come i prodotti a base di fibrina o collagene.

Dovrebbe anche essere abbastanza forte da rimanere adeso alla superficie e resistere alle pressioni di un polmone insufflato a 30 o 40 cm H₂O.

In ogni caso l'effettiva efficacia dei sigillanti, sintetici (Ita 1989; Nomori 1999; Nomori 2000; Otani 1999; Sabanathan 1993), composti da pool di plasma (Grunenwald 1989), da singolo donatore produttore di plasma (Matar 1990; Matteo 1990), o composti di fibrina insieme a prodotti di sintesi (Miyamoto 2003; Passage 2005; Potaris 2003) non è stata completamente confermata nei pazienti sottoposti a resezione polmonare.

Per valutare nei pazienti sottoposti a chirurgia toracica, se le tecniche standard di chiusura insieme ad un sigillante siano più efficaci delle sole tecniche standard, Belda-Sanchís et al. [Belda-Sanchís, Serra-Mitjans, Iglesias Sentis, e Rami, 2010] hanno pubblicato nel 2010 una review, confrontando l'efficacia dei sigillanti chirurgici maggiormente utilizzati in letteratura. Gli outcome presi in considerazione sono stati la degenza media post-operatoria, morbilità e mortalità post-operatori, e il tempo di mantenimento dei drenaggi toracici.

1642 pazienti sono stati suddivisi, secondo tecniche di chiusura standard o per le stesse tecniche più un sigillante, e sono stati inseriti nell'analisi statistica finale.

La presenza di perdite d'aria è stata valutata durante l'intervento secondo il classificazione di Macchiarini, immergendo il parenchima polmonare in soluzione salina e ventilando il polmone (prova idropneumatica). Nel caso fossero state presenti delle perdite, si sarebbero viste delle bolle d'aria uscire dal polmone.

Nel postoperatorio invece le perdite d'aria sono state viste e misurate mediante camera di drenaggio ad acqua collegata a uno/due tubi toracici o utilizzando un dispositivo digitale collegato alla centralina dell'aspirazione del drenaggio toracico.

I risultati valutati nei diversi trial focalizzano l'attenzione principalmente sulla durata delle perdite aeree postoperatorie, sul giorno di rimozione dei drenaggi toracici e sulla durata della degenza ospedaliera.

In tre studi (Allen 2004; Anegg 2007; Tansley 2006) la durata della degenza ospedaliera è risultata significativamente ridotta nel gruppo di trattamento; i pazienti trattati sono stati dimessi il sesto giorno post-operatorio rispetto al settimo giorno per i pazienti del gruppo di controllo (Allen e Tansley), e al 6,2 giorni per il gruppo di trattamento rispetto a 7,7 giorni nel gruppo di controllo (Anegg). Gli altri studi non hanno trovato differenze statisticamente significative.

In quattro studi clinici, alcuni pazienti hanno sviluppato empiema. In uno di essi (Wong 1997), il 3% dei pazienti nel gruppo di controllo ha sviluppato empiema mentre non è stato evidenziato nessun caso nel gruppo di trattamento. Negli altri tre studi, invece, solo i pazienti nel gruppo di trattamento hanno sviluppato empiema (3,8% Macchiarini; 6,78% Porte; 3% Wain). Non è stata descritta alcuna mortalità correlata all'uso di sigillanti.

Tre studi hanno trovato differenze statisticamente significative tra i pazienti del gruppo di trattamento e i controlli (Anegg 2007; Fabian 2003; Tansley 2006). La durata media per la rimozione del tubo toracico nel gruppo trattato è stata di 3,5 giorni (Fabian), 4 giorni (Tansley) e 5,1 giorni (Anegg) rispetto ai 5 giorni (Fabian e Tansley) e 6,3 giorni (Anegg) del gruppo di controllo.

Gli altri studi non hanno trovato alcuna differenza statisticamente significativa.

La durata media delle perdite aeree misurata in ore è risultata di 33,7 ore (Porte) e 30,9 ore (Wain) rispetto al gruppo controllo (63,22 ore Porte; 52,3 ore Wain). Ragionando in giorni, significa ridurre di quasi due giorni questa complicanza (1,1 giorni vs 3,7 giorni).

Differenze statisticamente significative tra i pazienti sottoposti a trattamento con sigillanti e il gruppo controllo sono risultate in due studi (Anegg 2007; Fabian 2003).

Nel trial condotto da Fabian infatti, le percentuali di pazienti con perdite aeree persistenti sono state di circa il 2% nel gruppo trattato rispetto al 16% del gruppo di controllo.

Anegg invece ha evidenziato dati diversi: le percentuali erano rispettivamente del 24% e 32,46%.

In dodici trial (Allen 2004; Belboul 2004; Droghetti 2008; Fabian 2003; Lang 2003; Macchiarini 1999; Marta 2008; Mouritzen 1993; Porte 2001; Tansley 2006; Wain 2001; Wurtz 1992) una percentuale significativamente superiore di pazienti trattati rispetto ai pazienti del gruppo di controllo ha mostrato netta diminuzione delle perdite aeree durante l'ospedalizzazione, portando ad una minore durata del mantenimento dei drenaggi toracici intercostali e quindi del dolore.

Questa riduzione delle perdite aeree nel postoperatorio non si è tradotta in una reale differenza significativa nella durata della degenza ospedaliera, tranne in tre studi (Allen, Anegg, Tansley), né vi sono state differenze nel tempo di mantenimento del drenaggio toracico, tranne in tre studi (Fabian, Anegg, Tansley).

In sintesi, in dodici trial clinici è stata dimostrata una riduzione delle perdite aeree statisticamente significativa nei soggetti trattati con sigillanti rispetto ai controlli.

Tuttavia, questo beneficio solo ha avuto un effetto sulla riduzione significativa della durata del ricovero ospedaliero in tre di loro (Allen 2004; Anegg 2007; Tansley 2006).

2.2.1. Fibrin glue

L'uso di colla fibrinica in chirurgia toracica è stato sperimentato già dalla metà degli anni '70, come sigillante per perdite aeree polmonari e per il trattamento di pneumotorace ricorrente. L'uso terapeutico di sigillanti di fibrina non si limita alla chirurgia toracica; più specialità chirurgiche lo hanno utilizzato in un modo o nell'altro, sia con tecniche a cielo aperto sia nelle procedure endoscopiche.

La colla di fibrina è un materiale chirurgico emostatico-adesivo, formato dalla combinazione di una soluzione concentrata di fibrinogeno e fattore XIII con una soluzione di trombina e calcio; il fine è quello di formare un coagulo, simulando la fase finale della cascata della coagulazione.

In alcuni preparati può essere presente anche un agente fibrinolitico per evitare la lisi del coagulo.

Sigillanti di fibrina come Tisseel, Beriplast e Biocol sono già in commercio e utilizzati in Europa da parecchi anni. La FDA invece si è sempre dimostrata piuttosto riluttante all'utilizzo di materiali derivanti da pool di plasma umano per cui ha approvato nel 1998 l'uso del solo Tisseel.

La colla di fibrina è formata da due componenti principali: fibrinogeno e trombina.

Questi vengono caricati in un sistema a doppia siringhe con una porta terminale comune.

La trombina, ad una determinata concentrazione, permette la conversione del fibrinogeno in fibrina. Soluzioni più concentrate di trombina producono coaguli di fibrina in circa 10 secondi, mentre per soluzioni più diluite si può arrivare anche a 60 secondi.

In questo modo vengono bypassati sia i meccanismi intrinseci sia estrinseci della cascata, mentre il fattore XIII stabilizza i monomeri di fibrina del coagulo, mantenendo regolare la via fisiologica comune.

Alcune preparazioni contengono aprotinina per ritardare l'azione fibrinolitica della plasmina.

La colla di fibrina viene ottenuta da pool di plasma di donatori ottenuto dalla case produttrici o da alcuni centri regionali di trasfusioni.

I prodotti derivanti da pool di plasma normalmente generano colle ad alto contenuto di fibrinogeno con coaguli molto stabili; questo discorso risulta invece differente nelle colle

derivanti da singolo donatore volontario, dove spesso le concentrazioni di fibrinogeno risultano essere minori.

Nonostante rappresenti il dispositivo più utilizzato negli ultimi 20 anni, si fa sempre più crescente in tutto il mondo la preoccupazione circa l'uso di prodotti derivati dal sangue di donatore a causa del rischio di trasmissione di malattie virali e reazioni immunologiche; ovviamente la fonte autologa esclude ogni possibile rischio di trasmissione.

Un approccio possibile potrebbe essere quello di utilizzare plasma fresco congelato di donatori risultati negativi ai test virologici nei 6 mesi precedenti, in modo da coprire il cosiddetto "periodo finestra".

Fino a poco tempo fa la trombina utilizzata nel composto era di origine bovina, ma alcuni gravi reazioni sistemiche, come anafilassi e coagulopatie per lo sviluppo di autoanticorpi, hanno portato successivamente alla sintesi di fibrin glue con trombina di origine umana.

Considerando l'alto impatto dei sigillanti in chirurgia e dell'efficacia del fibrin glue, non stupisce che la letteratura in merito sia particolarmente ricca.

Fleischer et al. [Fleisher, Evans, Nelems, e Finley, 1990] hanno pubblicato uno dei primi studi randomizzati e controllati sull'uso di questo dispositivo, testando su 28 pazienti l'efficacia della colla di fibrina per ridurre le perdite aeree postoperatorie in seguito a lobectomia polmonare.

Due millilitri di fibrin glue sono stati applicati con un sistema a doppia siringa e spruzzati su ogni superficie parenchimale polmonare suturata.

I pazienti trattati con colla di fibrina (14 pazienti) hanno mostrato una durata delle perdite aeree di circa $2,3 \pm 3,7$ giorni; la durata di mantenimento dei drenaggi toracici e la degenza ospedaliera sono risultati nel gruppo trattato: rispettivamente $6 \pm 4,1$ vs $5,9 \pm 3,9$ giorni e $9,8 \pm 3,1$ vs $11,5 \pm 3,9$ giorni.

I risultati ottenuti non permettono certo di consigliare un uso routinario della colla fibrinica nel ridurre le perdite aeree ma, come già accennato in precedenza, la letteratura è assai nutrita ed è possibile citare numerosi trial in grado di dimostrare l'efficacia del fibrin glue.

Con Mouritzen [Mouritzen, Drömer, e Keinecke, 1993] infatti, 114 pazienti sottoposti a resezione polmonare o pneumonectomia sono stati studiati in due gruppi: la sola chirurgia (59 pazienti) o analogo trattamento chirurgico seguito dall'applicazione di colla di fibrina

(55 pazienti). Durante l'intervento, l'81% dei pazienti con perdite d'aria dopo la sutura tradizionale, ha evidenziato un miglioramento dopo l'applicazione di colla di fibrina.

Il trattamento con fibrin glue ha infatti ridotto l'incidenza di perdite post-operatoria in modo significativo dal 66% nel gruppo di controllo al 39% nel gruppo di trattamento ($p < 0,02$).

È stato pure evidenziato un leggero vantaggio del trattamento con colla di fibrina in merito alla durata della permanenza in ospedale ed al numero delle complicanze.

Fabian et al. [Fabian, Federico, e Ponn, 2003] hanno condotto uno studio su 100 pazienti, randomizzati in due gruppi, al termine di resezione polmonare: il gruppo di controllo non ha ricevuto alcun intervento aggiuntivo, mentre i pazienti del gruppo sperimentale sono stati sottoposti all'applicazione di 5 ml di colla di fibrina tramite un meccanismo spray.

Entrambi i gruppi erano comparabili per quanto riguarda dati demografici, diagnosi e procedure.

Nel gruppo sperimentale è stata trovata una riduzione statisticamente significativa dell'incidenza delle perdite aeree (34% versus 68%, $p = 0,001$), della durata media delle perdite (1,1 vs 3,1 giorni, $p = 0,005$), del tempo medio di rimozione del tubo toracico (3,5 rispetto a 5,0 giorni, $p = 0,02$), e l'incidenza di perdite aeree prolungate (2% versus 16%, $p = 0,015$) come dimostra la tabella seguente:

Table 2. Clinical Outcomes

Outcomes	Control Group n = 50	Experimental Group n = 50	p Value
Incidence of AAL	68% (34)	34% (17)	0.001
Mean duration of AAL	3.1 days	1.1 days	0.005
Mean time to chest tube removal	5.0 days	3.5 days	0.02
Incidence of PAAL	16% (8)	2% (1)	0.015
Mean first 24-hour drainage	485 cc	440 cc	0.362
Patients discharged with valve	16% (8)	2% (1)	0.178
Postoperative length of stay, mean	4.9 days	4.6 days	0.318

AAL = alveolar air leak;

PAAL = prolonged alveolar air leak.

Come già analizzato in precedenza, i sigillanti fibrinici convenzionali utilizzano composti preparati da pool di plasma umano (trombina, fibrinogeno) e, qualche volta, di derivazione animale (trombina o aprotinina bovina). Questi portano ad un potenziale rischio di trasmissione di infezioni (HBV, HCV, HIV-1, CJD, BSE) e aumentano la possibilità di reazioni immunologiche.

Da ciò è sorta la necessità di creare composti di tipo autologo, tra cui il più utilizzato è certamente il sistema Vivostat®.

Belboul et al. [Belboul, Dernevik, Aljassim, Skrbic, Rådberg, e Roberts, 2004] hanno studiato 40 pazienti poi suddivisi in un gruppo controllo e in un gruppo Vivostat; i pazienti assegnati al gruppo di controllo non hanno subito ulteriori interventi. I pazienti nel gruppo Vivostat hanno donato 120 ml di sangue e sono stati trattati con sigillante di fibrina autologo Vivostat, preparato secondo le istruzioni del produttore.

Il Vivostat è stato applicato sull'intera area a rischio di perdite aeree e sanguinamento. Dopo 5 minuti il polmone è stato ventilato e successivamente sono stati fissati due tubi di drenaggio (pressione di 15 cm H₂O).

Sono state misurate e registrate ogni giorno fino alla dimissione le seguenti variabili:

- perdite aeree il giorno dell'operazione e i giorni successivi

- tempo di rimozione dei drenaggi toracici

- volume di liquidi drenati

- durata del trattamento con analgesia epidurale

- durata della degenza postoperatoria

Table 2. Postoperative morbidity variables

Variable	Vivostat group	Control group	P-value
<i>Air leakage</i>			
Volume on day of surgery (L): mean (SD) [Median (quartiles)]	0.15 (0.32) [0 (0,0)]	0.65 (0.64) [0.6 (0,1.0)]	0.014 ^a
Total volume (L): mean (SD) [Median (quartiles)]	0.34 (0.53) [0 (0,0)]	2.9 (6.3) [0.8 (0,2.4)]	0.028 ^a
Number (%) of patients with air leak	8 (40%)	16 (80%)	0.022
<i>Bleeding and drainage</i>			
Blood volume (day 1) (ml): mean (SD)	370 (103)	525 (152)	<0.001
Total drainage volume (ml): mean (SD)	424 (139)	782 (376)	<0.001
Days with drain: median (quartiles)	1 (1.2)	2 (1.4)	0.068 ^a
TEDA: postoperative days: median (quartiles)	2 (2.3)	3 (2.5)	0.068 ^a
Postoperative hospitalisation (days): median (quartiles)	4 (4.5)	4.5 (4.7)	0.121 ^a
Postoperative haemoglobin level (g/l)	116 (9)	109 (10)	0.033
Postoperative leucocyte level ($\times 10^9/l$)	10.7 (3.3)	10.5 (3.0)	0.85
^a Data was not normally distributed and was analysed by non-parametric statistics (Mann-Whitney U-test, exact significance shown).			

In considerazione dei risultati mostrati nella tabella sovrastante (tabella 2) questo studio dimostra che l'uso combinato di sigillante di fibrina autologo Vivostat in seguito a lobectomia polmonare riduce in modo significativo le perdite d'aria postoperatorie (sia in termini di tasso di perdite d'aria per paziente sia in termini di percentuale di pazienti con perdite d'aria) e la quantità di raccolta di fluidi.

La maggior parte dei liquidi di drenaggio, almeno nelle prime 24 ore, sembra dovuto al sanguinamento, e l'uso di Vivostat riduce di molto questo valore, compensando anche la quota di sangue donato da parte del paziente (120 ml) per la preparazione del sigillante di fibrina.

I risultati sono confermati nel trial condotto da Kjaergard nel 2000 [Kjaergard, Pedersen, Krasnik, Weis-Fogh, Fleron, e Griffin, 2000].

Dai dati ottenuti si evince che sigillanti di fibrina sono in grado di ridurre piccole perdite aeree polmonari, se correttamente applicati con un sistema spray su una superficie polmonare asciutta e senza sanguinamento al momento dell'applicazione.

Però un intervento su un paziente con perdite aeree maggiori non può essere trattato solo con sigillanti. L'autore sottolinea infatti il ruolo fondamentale del chirurgo nel ridurre ogni

possibile complicanza mediante l'utilizzo di suturatrici meccaniche, elettrocoagulatori e un'attenta dissezioni dei vari piani.

Già nel 1996 sempre Kjaergard ["Effectiveness of Autologous Fibrin Sealant in Experimental Lung Surgery"] aveva valutato l'efficacia di colla di fibrina autologa. In questo caso, però, era stato deciso di utilizzare un campione di sigillanti di fibrina di origine umana su un campione di 8 maiali.

I risultati ottenuti avevano dimostrato una netta diminuzione delle perdite aeree nei casi trattati con sigillante (16 ml/min nel gruppo trattato rispetto a 213 ml/ml nel gruppo controllo).

All'esame istologico il tappeto di fibrina era risultato fortemente infiltrato da granulociti e macrofagi già al terzo giorno. Proliferazione fibroblastica era presente dopo una settimana, e al ventunesimo giorno poteva già vedersi un sottile strato di cellule umane contenenti macrofagi e pigmenti ematici. Questo risultato conferma maggiormente l'ipotesi di una reazione immunologica dovuta a proteine estranee dei sigillanti non autologhi.

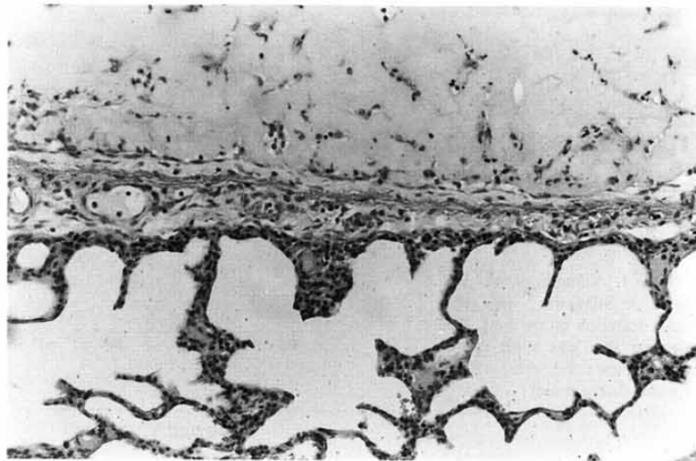


Fig. 2. Photomicrograph of a pig lung 3 days after application of human fibrin glue at the intact pleura. Cellular infiltration is seen in the clot.

2.2.2. Sigillanti vari

Nel corso degli anni molti chirurghi hanno sentito l'esigenza di trovare nuovi materiali che potessero sostituire la colla fibrinica, capaci di ottenere un miglior controllo sulle perdite aeree al termine di un chirurgia maggiore a livello polmonare.

Ne risulta un'ampia letteratura, in cui vengono testati dispositivi qualitativamente diversi, al fine di verificarne la reale efficacia.

Glubran®

È una colla per uso cutaneo, pronta all'uso, sterile, a base di cianoacrilato. A contatto con i tessuti polimerizza rapidamente creando una sottile pellicola impermeabile, elastica e dall'elevata resistenza tensile in modo da garantire una solida adesione ai tessuti.

Nello studio di Petter-Puchner del 2010, 26 conigli bianchi sono stati randomizzati in tre gruppi. In tutti i gruppi, il sigillante di fibrina (Tisseel) è stato utilizzato come controllo e il cianoacrilato (Glubran) come trattamento. Il sito chirurgico è stato valutato macroscopicamente e un'indagine istologica è stata eseguita in tutti gli animali.

In termini di tenuta, FS e CA hanno dimostrato risultati sovrapponibili nei vari campioni.

Dopo 14 giorni sono stati trovati residui di Glubran, mentre il sigillante di fibrina era stato completamente degradato; all'esame istologico il sigillante di cianoacrilato ha mostrato una risposta infiammatoria pronunciata non visibile nel gruppo controllo.

Quindi anche se l'effetto di tenuta ermetica è stato altrettanto soddisfacente, i risultati sottolineano che sigillanti di fibrina sono preferibili al Glubran in virtù della superiore biocompatibilità e degradabilità.

Anche per quanto riguarda Glubran 2, sigillante di cianoacrilato somministrato tramite spray, non sono state evidenziate caratteristiche significativamente migliori rispetto ai sigillanti standard utilizzati.

I risultati ottenuti nello studio di Davoli et al. del 2009 infatti non consentono di supportare un utilizzo esteso di Glubran 2 per minimizzare le perdite aeree dopo resezione polmonare.

Idrogel

Macchiarini et al. nel 1999 hanno investigato l'effetto dei sigillanti nella riduzione delle perdite aeree dopo resezione polmonare.

In un campione di 15 maiali sottoposti a lobectomia polmonare superiore sinistra, le scissure tra i lobi sono state divise con una suturatrice meccanica lineare (TA 55) e l'apporto vascolare legato, in modo da poter dividere successivamente anche il bronco.

A seconda del gruppo di studio, il bronco è stato diviso con una cucitrice meccanica 30 mm (gruppi 1 e 2) o inciso approssimativamente a circa 4 mm dall'origine del lobare (gruppo 3).

Gli animali del Gruppo 1 non hanno ricevuto alcun trattamento supplementare.

Nel Gruppo 2 gli animali hanno ricevuto circa 2-3 ml di sigillante idrogel applicato e polimerizzato sopra la linea di sutura.

Nel Gruppo 3 invece non sono state utilizzate né suture manuali né suture meccaniche e i campioni si presentavano con 4-5 mm di moncone bronchiale aperto, sul quale sono stati applicati 2-3 mL di sigillante idrogel.

Tutte le chiusure bronchiali sono state testate a 40 cm H₂O di pressione d'insufflazione.

Il polmone è stato poi immerso in soluzione salina per verificare la presenza o l'assenza di perdite aeree, permettendo di creare una classificazione successivamente ripresa da molti autori.

Le perdite aeree sono state classificate come:

- grado 0 (nessuna perdita)
- grado 1 (bolle numerabili)
- grado 2 (flusso di bolle)
- grado 3 (bolle coalescenti)

Perdite aeree di grado 3 hanno richiesto un intervento ulteriore con sutura o cucitrice per chiudere la falla o almeno ridurne il grado.

Il sigillante valutato nello studio di Macchiarini è totalmente sintetico e aderisce bene ai tessuti applicati.

L'idrogel è polimerizzato in situ grazie a due componenti, un primer e un sigillante, capaci di formare un rivestimento altamente aderente su qualsiasi spessore desiderato di tessuto: viene utilizzato per fornire una buona aderenza al tessuto (strato primer) e possiede buone proprietà meccaniche (strato sigillante) per sigillare la perdita e mantenere la tenuta durante il movimento del polmone.

In fase preclinica, è risultato in grado di aderire 4 volte di più e di resistere a pressioni 12 volte maggiori rispetto ai materiali di riferimento.

Endoscopicamente a livello del moncone bronchiale gli autori hanno osservato apposizione mucosale senza evidenza di fistole nel gruppo 1 e nel gruppo 2. Nel gruppo 3 invece fino alla quinta giornata era presente il semplice sigillante; formazione di neomucosa con completa ristabilizzazione della continuità muscolare è stata evidenziata al 42° giorno.

Al controllo istologico, il gruppo 1 e 2 hanno mostrato un'unione fibrosa delle pareti bronchiali e una guarigione della mucosa, senza grosse differenze nel grado d'infiammazione o nella qualità del moncone bronchiale.

Nel gruppo 3 sopra il sigillante era presente un processo cicatriziale fibroso che coinvolgeva sia il bronco sia la superficie pleurica; Il sigillante era ancora presente dopo 6 settimane e l'interfaccia con il tessuto ha evidenziato cellule macrofagiche sparse in strati di tessuto fibrovascolare, in assenza di cellule giganti, polimorfonucleati e linfociti.

Non vi era alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi di trattamento e quelli di controllo.

Solo 1 paziente (8%) nel gruppo di trattamento e 2 pazienti (18%) nel gruppo di controllo non hanno avuto perdite d'aria ($p = 0,58$).

Le perdite aeree dalle linee di sutura con stapler (43%) sono state osservate meno frequentemente rispetto alle perdite sulle suture semplici (60%) e alle perdite sulle dissezioni (59%) ($p = 0,22$).

La durata dell'intervento, escluso il tempo di applicazione del sigillante, non è risultato significativamente diverso tra il trattamento e il gruppo di controllo (142 ± 13 minuti contro 114 ± 11 minuti; $p = 0,14$).

Perdite intraoperatorie sono state sigillate nel 100% dei pazienti del gruppo trattamento contro il 18% dei pazienti del gruppo controllo ($p = 0,001$).

Il monitoraggio post-operatorio dei drenaggi ha rivelato che il 77% ($n = 10$) dei pazienti del gruppo trattamento non ha avuto perdite aeree fino alla rimozione del tubo toracico contro il 9% ($n = 1$) dei pazienti del gruppo controllo ($p = 0,001$).

Questi risultati non si associano, però, a diminuzione statisticamente significativa del tempo di mantenimento dei drenaggi toracici e della degenza ospedaliera.

Durante follow-up a lungo termine non sono state segnalate reazioni avverse di tipo radiologico, clinico o biologico.

In questo studio il sigillante sintetico si è rivelato totalmente efficace nell'eliminare le perdite aeree intraoperatorie, facile da usare e applicare in tutte le aree anatomiche, senza creare reazioni visibili nell'ospite.

Durante l'intervento il materiale è rimasto ben aderente, in grado di eliminare tutte le perdite d'aria sul tessuto polmonare normale e malato.

Dopo l'operazione, la percentuale di pazienti senza perdite libere d'aria era significativamente più alta nel gruppo di trattamento, suggerendo come il sigillante abbia mantenuto le sue proprietà adesive nel tempo.

PleuraSeal™

PleuraSeal™ è un sigillante polmonare di nuova generazione, facile da preparare, al 100% sintetico; forma un gel riassorbibile blu che si espande con l'insufflazione polmonare ed è risultato cinque volte più aderente rispetto alla colla fibrinica.

È composto da due componenti liquide che, una volta unite, formano un reticolato cambiando la propria morfologia in pochi secondi fino a diventare un idrogel solido.

Questo idrogel è stato testato nello studio effettuato nel 2010 da Dango et al. per valutare l'outcome postoperatorio, la sicurezza e l'efficacia come sigillante per le perdite alveolari dopo resezione polmonare.

Tutti i pazienti sono stati dimessi dall'ospedale e hanno completato il follow-up senza nessun tipo di complicanza.

La durata della degenza ospedaliera è stata di 9,9 giorni nel gruppo trattato con PleuraSeal rispetto ai 11,7 giorni del gruppo controllo ($p = 0,178$).

Alla fine dell'intervento chirurgico tutti i pazienti trattati con sigillante sintetico PleuraSeal (100%) non hanno presentato perdite aeree rispetto allo 0% dei casi controllo ($p = 0,001$).

Il drenaggio toracico è stato rimosso significativamente prima nei pazienti trattati: dopo 2.1 giorni rispetto a 3.9 giorni dei controlli ($p = 0,03$).

Lo studio dimostra un'efficacia superiore del sigillante testato (PleuraSeal) rispetto ai trattamenti chirurgici standard nella gestione delle perdite aeree in seguito a resezione polmonare.

Bioglue®

Il Bioglue® è un adesivo chirurgico bi-componente costituito da albumina bovina purificata (BSA) e glutaraldeide. Le molecole di glutaraldeide legano in modo covalente (legame) le molecole di BSA tra loro e alle proteine del tessuto riparando il sito durante l'applicazione, creando un sigillo meccanico flessibile indipendente dalla cascata coagulativa del corpo umano.

Uno studio prospettico, randomizzato e controllato, in doppio cieco è stato condotto da Tansley et al. nel 2006, stratificando i pazienti a secondo della gravità delle perdite aeree post operatorie che non potevano essere controllate dalle tecniche chirurgiche convenzionali.

52 pazienti sono stati assegnati a un gruppo di controllo (solo trattamento chirurgico) o ad un gruppo d'intervento (trattamento chirurgico e BioGlue): durata delle perdite aeree, drenaggi intercostali e durata della degenza sono stati utilizzati come end-point primari dello studio.

A favore del BioGlue sono stati osservati una minore durata media di perdite d'aria ($p < 0,001$), di mantenimento del drenaggio toracico intercostale ($p = 0,012$), e della permanenza in ospedale ($p = 0,004$).

I risultati hanno dimostrato un chiaro vantaggio nell'uso intraoperatorio di BioGlue nel ridurre le perdite aeree postoperatorie, la durata dei drenaggi toracici e la degenza dopo toracotomia.

Tutte queste misure di outcome primario dimostrano significatività statistica costantemente a favore del dispositivo usato.

Gli effetti benefici del BioGlue sono già visibili al momento della somministrazione intraoperatoria, visto che la maggiore percentuale di pazienti trattati non mostra perdite aeree rispetto ai casi controllo.

Inoltre, le perdite d'aria evidenziate nei pazienti trattati con BioGlue si sono arrestate molto più velocemente rispetto al ritmo visto nei controlli.

I benefici clinici si sono tradotti in una minore durata del mantenimento dei drenaggi intercostali con una riduzione della degenza di circa 1 giorno ciascuno.

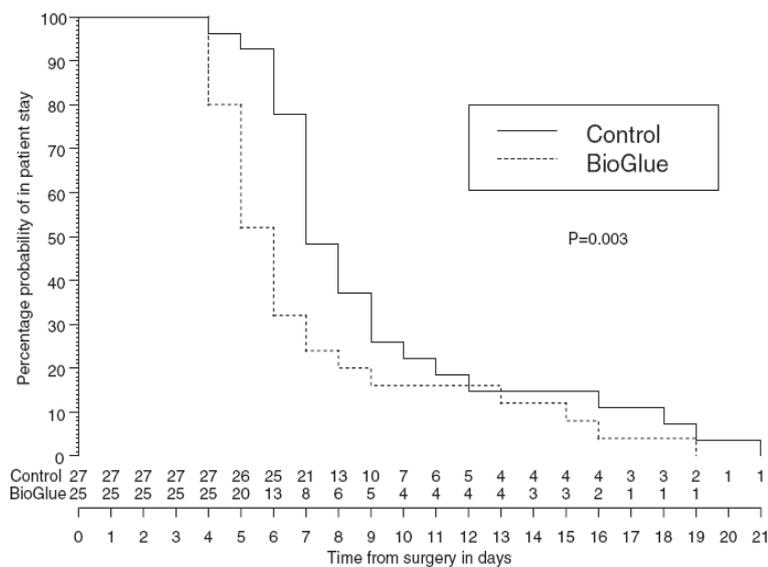


Figure 3. Percentage probability of in-hospital stay after surgery. Recovery room assessment at time point zero. Number of patients at risk at any time are shown above the x-axis.

Lo studio suggerisce, quindi, che l'uso sistematico del BioGlue nel trattamento delle perdite aeree postoperatorie dopo procedure chirurgiche toraciche può essere giustificata per la permanenza di perdite aeree, dopo che tutte le altre misure terapeutiche abbiano fallito.

BioGlue è inoltre stato comparato con VivoStat nel 2010 da Belcher et al. in uno studio randomizzato, controllato, in singolo cieco su 102 pazienti.

Obiettivi primari erano la durata delle perdite d'aria, il tempo per la rimozione del drenaggio intercostale e la durata della degenza ospedaliera.

Obiettivi secondari erano legati invece alle complicanze postoperatorie.

La durata media delle perdite aeree è risultata di 3 giorni nei pazienti trattati con Bioglue rispetto ai 2 del gruppo Vivostat ($p = 0,677$).

Il tempo di rimozione dei drenaggi intercostali è stato di 5 giorni sia nel gruppo BioGlue sia nel gruppo Vivostat.

È stata osservata una degenza media era di 8 giorni contro 7 giorni rispettivamente per il BioGlue rispetto ai pazienti trattati con Vivostat ($p = 0,382$).

CoSeal®

Il Coseal® è un idrogel sintetico con azione sigillante, composto da due polietilenglicoli (PEG) sintetici (una soluzione diluita di cloruro di idrogeno ed una soluzione di fosfato di sodio / carbonato di sodio).

Questa struttura polimerica in spray è indicata come tecnica adiuvante per sigillare le linee di sutura nella ricostruzione vascolare e per prevenire o ridurre l'incidenza, la gravità e l'estensione delle aderenze post-chirurgiche in pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca.

Il meccanismo di base del CoSeal è la rapida formazione di un idrogel biocompatibile in grado di aderire saldamente al tessuto e provvedere alla rapida chiusura del sito di perdita. L'idrogel viene poi riassorbito dal corpo entro 30 giorni dall'applicazione.

Tan et al. nel 2011 hanno progettato uno studio controllato e randomizzato per valutare l'efficacia del CoSeal nella chiusura delle perdite aeree dopo resezione del parenchima polmonare.

Nel gruppo trattato con CoSeal, le perdite aeree si sono arrestate alla prima applicazione in 33/58 (57%) pazienti. Dopo la seconda applicazione di CoSeal in 15/23 casi sono state evidenziate perdite aeree persistenti.

A 24 ore, non c'era alcuna differenza per quanto riguarda le perdite d'aria tra i due gruppi ($p = 0,09$):

Table 3. Outcome data.

	No CoSeal® (n = 60)	CoSeal® (n = 61)
Proportion with persisting air leak at 24 h Kaplan–Meier (approximate 95% CI)	63% (50–75%)	61% (49–73%)
Proportion with persisting air leak at 48 h Kaplan–Meier (approximate 95% CI)	39% (27–51%)	49% (36–62%)
Total fluid accumulation in litres (SD)	1.2 (0.7)	1.4 (0.8)
Median time to drain removal in days (IQR)	3 (2.8–5.0)	4 (2.8–7.2)
Median length of stay in days (IQR)	6 (5.0–9.0)	7 (4.9–9.6)

I risultati finali hanno evidenziato un intervallo di tempo superiore per la cessazione delle perdite d'aria, un tempo maggiore per la rimozione dei drenaggi toracici (4 vs 3 giorni) e un aumento della durata dell'ospedalizzazione (7 vs 6 giorni) tra i pazienti trattati con CoSeal® dopo resezione polmonare.

TachoSil®

TachoSil® è un patch per uso chirurgico che consente di ottenere rapidamente l'emostasi e la tenuta di un tessuto; è composto da un cerotto di spugna rivestito da uno strato secco di fattori coagulativi, fibrinogeno e di trombina di origine umana.

Nel 2009 è stato utilizzato da Rena et al. in un trial sulla gestione delle perdite aeree in pazienti con scissure incomplete e broncopneumopatie ostruttive croniche.

Nel gruppo trattato con TachoSil (gruppo ET), dopo il completamento delle scissure con elettrocoagulazione e legature, le perdite aeree sono state valutate immergendo in soluzione salina il polmone insufflato e classificate seguendo la scala Macchiarini: 0 (nessuna perdita), 1 (bolle singola), 2 (flusso di bolle), 3 (bolle coalescenti).

È stato applicato un patch sterile di collagene rivestito con fibrinogeno e trombina umana, pronto all'uso e completamente riassorbibile (TachoSil®).

Nel gruppo di controllo (ST) i lobi polmonari sono, invece, stati separati secondo procedura di routine.

I due gruppi erano assolutamente simili per quanto concerne sesso, età, esposizione al fumo, funzionalità polmonare preoperatoria, lunghezza delle scissure e durata dell'intervento.

Perdite aeree persistenti (> 7 giorni dopo l'intervento) sono state registrate solo in 1 su 30 pazienti del gruppo di ET rispetto ai 8 su 30 pazienti nel gruppo ST ($p = 0,029$).

Inoltre la durata di mantenimento dei drenaggi toracici e dell'ospedalizzazione è risultata decisamente minore nel gruppo ET.

I risultati dello studio hanno dimostrato, quindi, che l'applicazione di TachoSil dopo dissezione smussa ed elettrocoagulazione delle scissure incomplete, durante l'esecuzione di lobectomia superiore nei pazienti con BPCO, è in grado di ridurre significativamente l'insorgenza post-operatoria e la durata delle perdite aeree, rispetto alle normali procedure; di conseguenza questo si riflette in una minore durata dei tubi di drenaggio, con ridotta incidenza di co-morbilità postoperatoria e durata dell'ospedalizzazione.

I sigillanti chirurgici hanno sicuramente un effetto benefico nel ridurre le perdite aeree post-operatorie, ma l'uso sistematico di sigillanti nella pratica clinica non sembra ancora essere raccomandato.

La sostanza sigillante ideale è quella che possiede numerose proprietà tra cui la possibilità di aderire al tessuto polmonare, in modo da evitare perdite d'aria prolungate e permettere una diminuzione della degenza in ospedale.

Dovrebbe avere una buona biocompatibilità, senza provocare alcuna lesione tissutale o alterare il processo di guarigione. Dovrebbe essere biodegradabile, senza alcun rischio di trasmissione infettiva e non dovrebbe stimolare la formazione di aderenze che renderebbero difficile qualsiasi re-intervento. Infine dovrebbe essere facile da usare.

Test in vitro hanno dimostrato che cianoacrilato (es. *Glubran*) ha probabilmente la maggiore forza adesiva, tuttavia non è biologico e non è assorbibile; costituisce una barriera impenetrabile, rigida e senza elasticità.

Nei vari trial effettuati non ha dimostrato capacità statisticamente significative nel diminuire le perdite aeree postoperatorie per cui un suo utilizzo non dovrebbe essere incoraggiato, almeno in chirurgia polmonare.

A differenza del *TachoSil*, risultati di diversi studi sull'utilizzo del *CoSeal* hanno evidenziato un tempo maggiore per la cessazione delle perdite d'aria, per la rimozione dei drenaggi toracici e un aumento della durata dell'ospedalizzazione, sconsigliando quindi l'utilizzo di questo sigillante in chirurgia toracica.

Il sigillante più utilizzato e testato in chirurgia rimane quindi la colla di fibrina (*fibrin glue*). Numerose pubblicazioni riportano l'efficacia della colla di fibrina nel prevenire o ridurre le perdite aeree in seguito a interventi sul parenchima polmonare, quando è sistematicamente usata.

Tuttavia, la maggior parte degli studi clinici non sono randomizzati e coinvolgono gruppi eterogenei di pazienti.

Inoltre preparati di colla di fibrina provenienti da molteplici donatori sollevano il problema di possibili trasmissioni virali, senza tralasciare i casi di reazione anafilattica già descritti.

Per questo sono state sviluppate tecniche di preparazione autologa per ottenere colla di fibrina da un singolo donatore al fine di ridurre il rischio di contaminazione virale, ma d'altra parte è anche stato dimostrato che preparati industriali siano più efficaci grazie alla maggiore concentrazione di fibrinogeno.

L'utilizzo del fibrin glue ha permesso di ridurre con significatività statistica l'incidenza delle perdite aeree, la durata media delle perdite, il tempo medio di rimozione del tubo toracico e l'incidenza di perdite aeree prolungate.

Gran parte di questi studi però presenta normalmente una coorte di pazienti esigua che non consente conclusioni definitive; questo implica per la ricerca futura la necessità di più grandi studi clinici randomizzati controllati con criteri omogenei sul tipo di sigillante, metodo di formazione sigillante e selezione dei pazienti al fine di produrre dati attendibili.

3. PRP

Le piastrine sono gli unici elementi del sangue ad iniziare l'emostasi e ad essere coinvolti nel processo di guarigione delle ferite. Il potenziale dell'applicazione di gel piastrinico autologo è decisamente ampio e, negli ultimi anni, l'applicazione di fattori di crescita ha acquistato sempre maggior spazio specialmente in chirurgia.

Tramite la loro attivazione e il rilascio di fattori di crescita, le piastrine sono direttamente coinvolte nei meccanismi di riparazione tissutale.

Le piastrine sono essere facilmente isolate dal sangue e concentrate in piccoli volumi di plasma, conosciuto anche come plasma ricco di piastrine (PRP); inoltre dati ottenuti da studi sia umani sia animali forniscono evidenze dirette e indirette dell'importante ruolo svolto dal PDGF nei processi rigenerativi tissutali.

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è definito come quel volume di plasma derivante da sangue autologo, avente una concentrazione di piastrine superiore a 200000 piastrine/ μ L, che possono essere attivate per formare gel piastrinico e rilasciare fattori di crescita a scopo terapeutico; contiene inoltre proteine in grado di agire come molecole di adesione cellulare, matrice ossea, tessuto connettivo e migrazione epiteliale.

La corretta preparazione e l'uso di questa specifica tecnica di gestione del sangue è rimandata ai clinici per valutare adeguatamente i risultati e per evitare outcome inconsistenti; sono stati riportati dati conflittuali nelle ricerche sia cliniche sia sperimentali.

Diventa quindi essenziale essere in possesso dei dettagli della preparazione del PRP e del gel piastrinico: il metodo di estrazione del sangue, la qualità di PRP usata, la conta delle piastrine e dei fattori di crescita, l'attivazione del PRP, se è stato utilizzato PRP da donatore o autologo e la metodologia complessiva.

PRP è preparato con unità di sangue intero mediante precise tecniche di processazione. Nelle preparazioni cliniche standard, il sangue viene prelevato dalla vena basilica media; l'intero sangue viene poi centrifugato, permettendo di separare il plasma povero di piastrine (PPP) dallo strato di buffy-coat ed eritrociti. Poi la centrifugazione viene rallentata per ottenere lo strato buffy-coat formato da PRP e leucociti.

Il PPP ottenuto durante la preparazione viene reinfuso nel paziente, mentre il PRP è utilizzato per la preparazione del gel piastrinico.

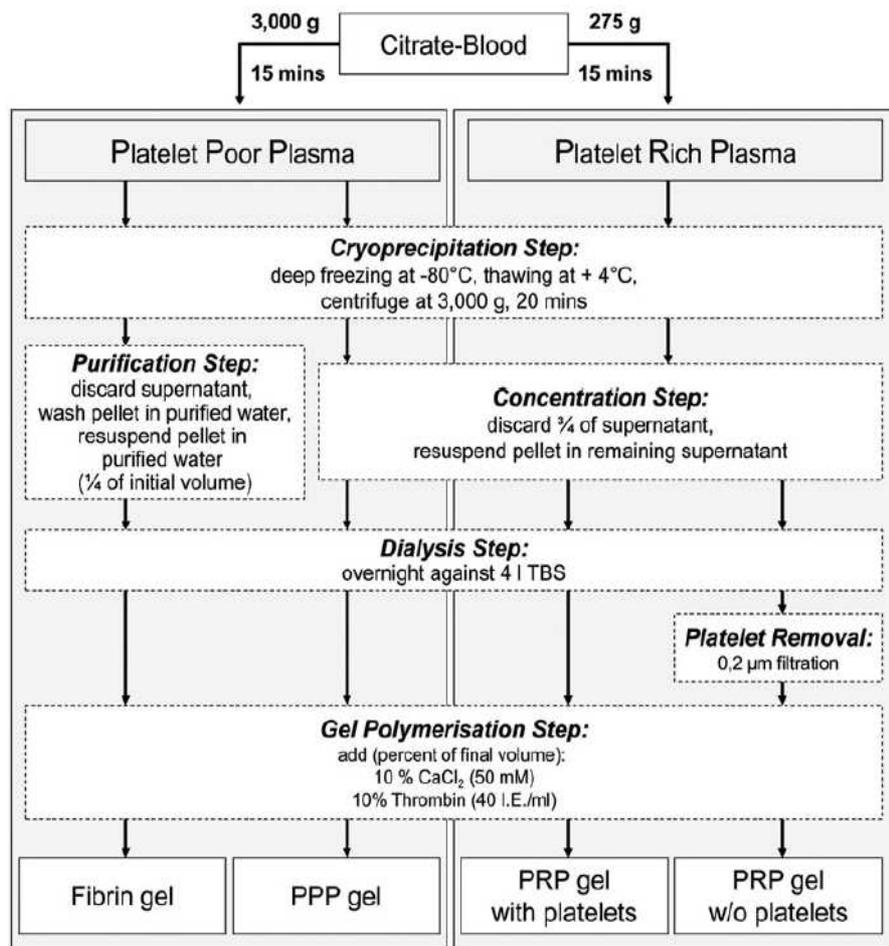


FIG. 1. Steps for the preparation of plasma- and fibrin gels.

Per iniziare a rilasciare i fattori di crescita, le piastrine devono essere attivate. La trombina indurrà immediatamente il rilascio di PDGF dal PRP in modo dose dipendente; la trombina utilizzata potrà essere sia di origine autologa sia di origine bovina.

Unendo la trombina e il calcio cloridrato, per antagonizzare l'effetto anticoagulante del citrato presente dalla donazione di sangue, si otterrà l'attivazione piastrinica con la formazione di una soluzione viscosa di gel piastrinico (PG).

Solo allora sarà possibile applicare generosamente il gel piastrinico, tramite siringa o come sostanza gelatinosa rappresa, su tessuti molli, osso od osso sintetico.

Non tutti i gel piastrinici derivanti da PRP nascono però allo stesso modo. Sono a disposizione diversi dispositivi per preparare plasma ricco in piastrine (PRP) e di conseguenza anche il gel piastrinico.

I dispositivi in commercio per la preparazione di gel piastrinico autologo più utilizzati sono RegenPRP-Kit[®], Fibrinet[®] e il Plateltext[®].

Questi sistemi producono concentrazioni da due a sei volte maggiori di piastrine arricchite con fattori di crescita. La biodisponibilità di fattori di crescita nella guarigione dei tessuti dipende, ovviamente, dalla quantità di fattori di crescita; non tutti tengono in considerazione però che buona parte di questi fattori immagazzinati vengono persi durante la manipolazione delle piastrine, portando a formazione di gel piastrinici molto differenti tra loro in termini di qualità.

In letteratura sono stati riportati pochi dati sulla cinetica di rilascio dei fattori di crescita dal PRP-gel e forse soltanto gli studi effettuati da Mazzucco et al. sembrano andare in questa direzione: oltre ad aver descritto la preparazione di PRP e gel piastrinico utilizzando Plateltext[®], il suo gruppo di lavoro nel 2009 ha valutato il rilascio dei fattori di crescita e la loro biodisponibilità nei tessuti a seconda diversi sistemi di sintesi:

- Regen gel è formato dall'unione di PRP e trombina autologa (rapporto 9:1).
- Fibrinet gel è ottenuto mediante centrifugazione a 1500 g per 15 minuti all'interno in un tubo contenente 0,1 ml di calcio cloridrato.
- Il kit per ottenere gel piastrinico con Plateltext[®] invece comprende una fiala di batroxobina liofilizzata (5BU) da unire con calcio gluconato immediatamente prima dell'uso (rapporto PRP:attivatore = 9:1).

Plateltext[®] ha dimostrato la più alta concentrazione di piastrine, a fronte di una sovrapponibile quantità di fattori di crescita rispetto agli altri sistemi utilizzati.

La figura 1 permette di notare caratteristiche differenti dei vari gel in termini di concentrazioni dei singoli fattori di crescita e di tempi di rilascio (GS).

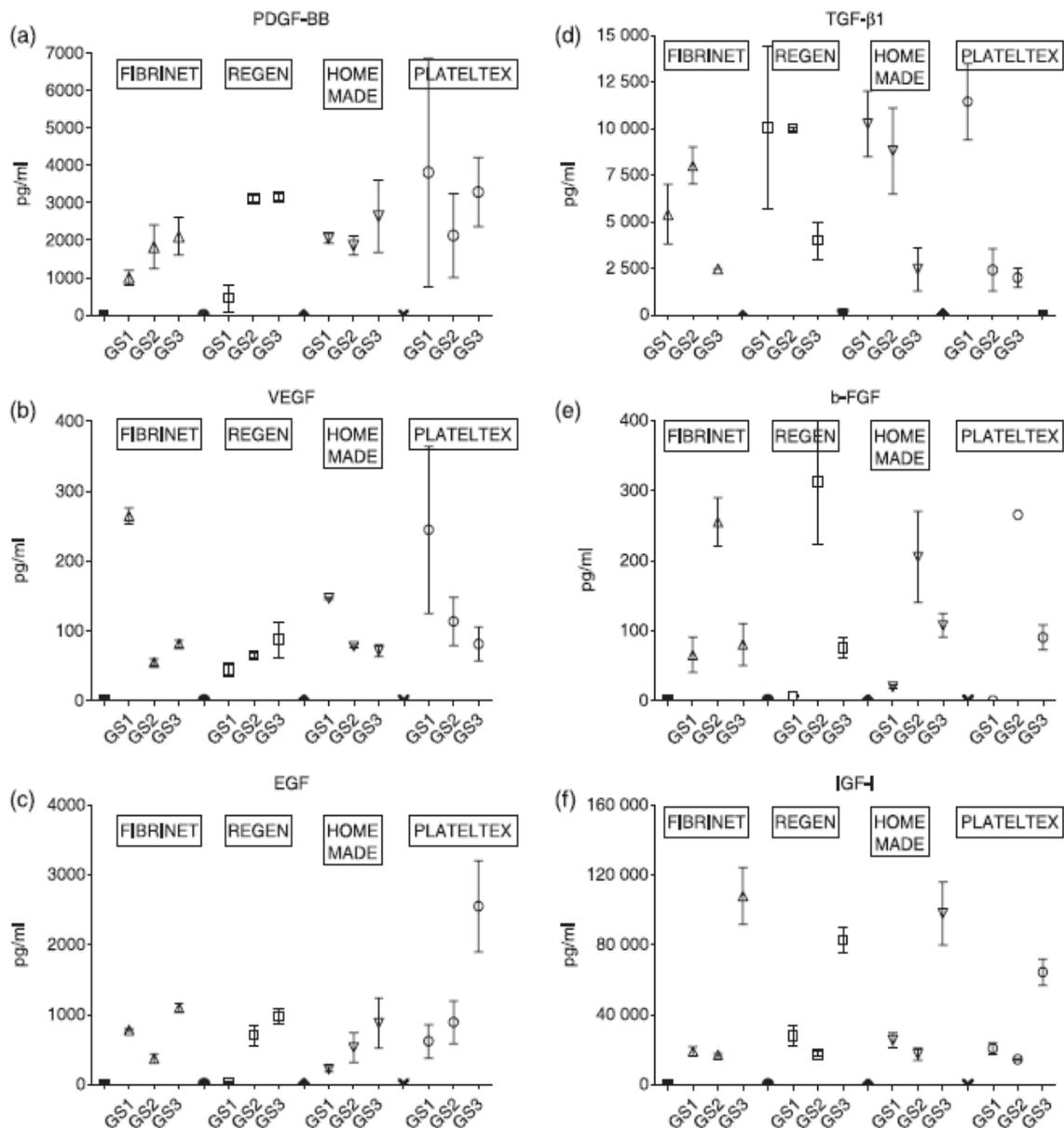


Fig. 1 Kinetics of growth factor release in gel supernatants GS1, GS2 and GS3.

Il gel piastrinico prodotto con Fibrinet® ha mostrato un tempestivo (entro 20 min) rilascio di grandi quantità di VEGF.

Il gel prodotto con RegenLit® ha mostrato un rilascio di PDGF e EGF, ma soltanto in fasi tardive.

Il gel piastrinico derivante dall'uso di Plateltext® ha evidenziato invece un rilascio di notevoli quantità di PDGF e VEGF in fase iniziale, seguito poi dal rilascio di EGF tardivamente.

Il rilascio di diverse concentrazioni dei singoli fattori di crescita e soprattutto la loro cinetica dev'essere tenuto in considerazione dal chirurgo per ottimizzare l'utilizzo del gel a seconda

del tessuto che si vuole trattare e per evitare i risultati inconsistenti. Per questo è importante conoscere il ruolo preciso svolto dai principali fattori di crescita nella differenziazione cellulare.

PDGF è una glicoproteina contenuta negli α -granuli delle piastrine; le sue funzioni più specifiche includono la mitogenesi (l'attrazione di cellule nel sito di ferita), l'angiogenesi, l'attivazione macrofagica e la proliferazione dei fibroblasti. È capace di stimolare la proliferazione di cellule ossee e d'incrementare la rigenerazione ossea attraverso la mitogenesi osteoblastica.

TGF- β ha effetto inibitorio sulla crescita cellulare di molti tessuti, eccetto per le cellule staminali mesenchimali, la cui proliferazione viene invece esaltata; promuove la chemiotassi e la mitogenesi dei fibroblasti e dei precursori osteoblastici, stimolando anche la deposizione di matrice collagene e il differenziamento dei miofibroblasti.

EGF è un fattore di crescita che svolge un ruolo importante nel regolare la crescita, la proliferazione e la differenziazione dell'epidermide, mediante un meccanismo d'azione autocrino.

VEGF è il fattore di crescita dell'endotelio vascolare capace di stimolare la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali, regolando in questo modo anche l'angiogenesi.

Anatomia e funzione delle piastrine:

Le piastrine sono delle cellule del sangue a morfologia discoide di piccole dimensioni (circa 1-3 μm). La conta delle piastrine è racchiusa in un range compreso tra 1,5 e 3,0 $\times 10^5/\text{mL}$ del sangue circolante e la loro emivita fisiologica si aggira intorno ai 7 giorni. Derivano dai megacariociti e sono sintetizzate nel midollo osseo.

Hanno una struttura ad anello con microtubuli contrattili, contenenti actina e miosina. All'interno sono presenti un numero di strutture intracellulari contenenti glicogeno, lisosomi e due tipi di granuli: questi sono conosciuti come *granuli densi*, contenenti ADP, ATP, serotonina e calcio, e come *α -granuli*, che contengono fattori della coagulazione, fattori di crescita e altre proteine.

Fisiologicamente allo stato di riposo, le piastrine non sono trombogeniche e richiedono un attivatore per poter giocare un ruolo attivo nell'emostasi e nella guarigione delle ferite. Dopo la loro attivazione, esse modificano la loro conformazione sviluppando pseudopodi, i

quali promuovono l'aggregazione piastrinica con il conseguente rilascio del contenuto dei granuli attraverso un sistema canalicolare aperto.

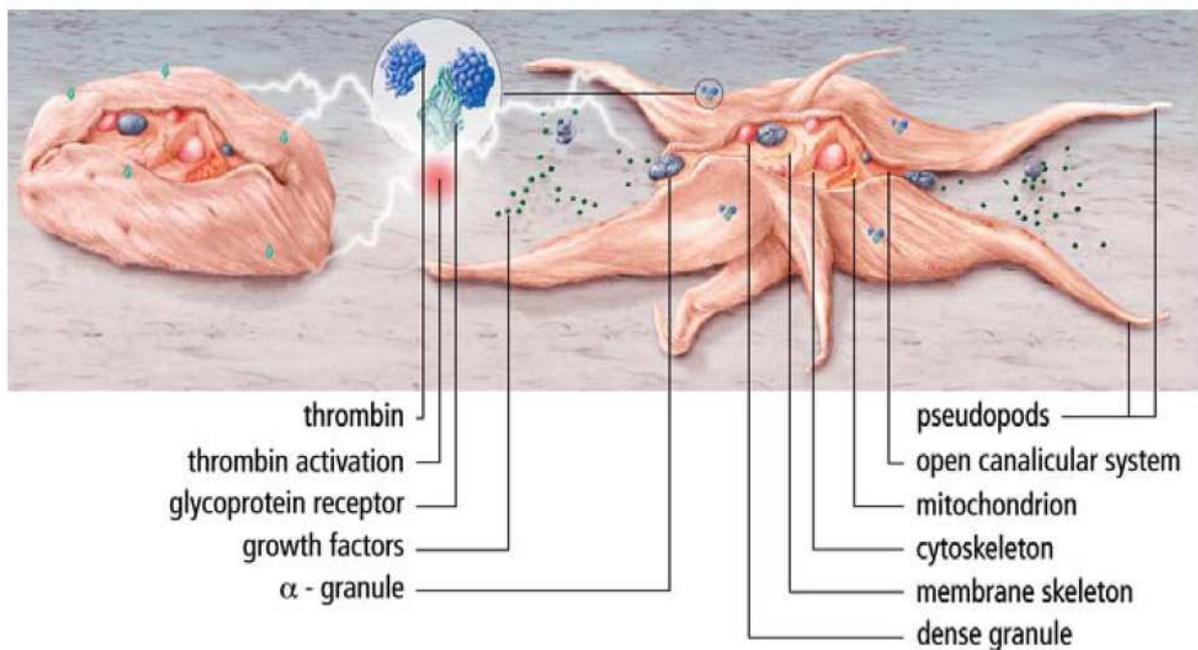


Figure 1. Schematic overview of a resting and activated platelet.

Normally platelets are in a resting, non-activated state. Upon activation (e.g. by thrombin) platelets change their shape with the development of pseudopods to promote platelet aggregation and subsequent release of granule content via the open canalicular system. (α -granule: alpha granule).

Azione delle piastrine:

- Piastrine e gel piastrinico nell'emostasi:

L'emostasi è un'interazione bilanciata di piastrine, componente vascolare, proteine della coagulazione e sostanze a basso peso molecolare.

In seguito ad un danno (es. un trauma chirurgico), la più importante reazione iniziale capace di coagulare immediatamente il sangue è in maggior parte mediata dalle piastrine e dai cambiamenti della parete vasale.

L'esposizione di subendotelio collagenico in un vaso danneggiato, porta all'interazione con fattore di VonWillebrand nel plasma ed a modificazioni strutturali che consentono alle piastrine di aderire alle pareti vasali. Questo processo, conosciuto anche come adesione

piastrinica, agisce attraverso i recettori delle glicoproteine Ib e IIb/IIIa presenti sulla membrana piastrinica.

In seguito a questi eventi, le piastrine vengono attivate e il citoscheletro piastrinico modifica la propria forma da discoide a sferica con pseudopodi estroflessi che si legano al sito di danno, fenomeno chiamato aggregazione.

Dopo l'aggregazione, il contenuto racchiuso nei granuli viene rilasciato: la serotonina secreta contribuisce al processo di vasocostrizione tissutale, l'ADP promuove il rilascio del contenuto dei granuli e molti altri agenti sono in grado di causare aggregazione piastrinica e di attivare anche la fosfolipasi A₂. Come risultato di questi eventi, la membrana fosfolipidica rilascia acido arachidonico che sarà convertito poi in trombossano A₂, il quale è capace di portare non solo ad aggregazione piastrinica ma anche a rilascio di fattori di crescita, come il PDGF.

Indipendentemente dal trombossano e dall'ADP, anche altri meccanismi sono capaci di causare aggregazione piastrinica e rilascio del contenuto dei granuli, come ad esempio la presenza di trombina.

Perciò, tramite questi tre meccanismi di attivazione piastrinica, si può formare il tappo piastrinico capace di arrestare la perdita ematica al vaso danneggiato.

La funzione piastrinica meglio conosciuta, a livello dell'emostasi primaria, è proprio la formazione del tappo piastrinico. Da questo momento in poi può iniziare l'emostasi secondaria con l'attivazione dei fattori della coagulazione e la formazione della rete di fibrina che stabilizza il tappo precedentemente formato.

L'ultimo step è l'attivazione dei leucociti che hanno invaso l'area coinvolta con il rilascio di citochine, che attivano il sistema fibrinolitico portando alla lisi del tappo.

Basandosi sul ruolo fondamentale delle piastrine nell'emostasi, è stato ipotizzato che l'applicazione esogena di gel piastrinico possa contribuire ad una più efficace condizione emostatica sulla superficie di ferita chirurgica. Inoltre in pazienti a rischio di compromissione della guarigione, come ad esempio i pazienti diabetici, e perciò a rischio di complicanze postoperatorie a livello di ferita, una soluzione spray di gel piastrinico può distribuire un'altra concentrazione di PDGF alla ferita, aumentando e supportando il normale processo fisiologico di guarigione.

- Piastrine e gel piastrinico nella guarigione delle ferite:

La guarigione delle ferite è composta da una serie di eventi complessi e ben orchestrati coinvolgenti interazioni cellula-cellula e cellula-matrice ed i fattori di crescita che ne fanno da messaggeri per la regolazione dei vari processi coinvolti.

A livello di ferita, anche quelle da incisione chirurgica, la riparazione comincia con la formazione del tappo piastrinico, l'attivazione della cascata della coagulazione e della degranolazione piastrinica con rilascio dei fattori di crescita.

Durante i primi due giorni un processo infiammatorio è iniziato dalla migrazione di neutrofili e successivamente da macrofagi a livello del sito di danno. A turno, i macrofagi attivati rilasciano fattori di crescita multipli inclusi TGF- α , TGF- β , PDGF, IL-1 e FGF.

L'angiogenesi e la fibroplasia iniziano precocemente a partire dal terzo giorno, seguiti dalla sintesi di collagene tra il 3°-5° giorno.

Questo processo porta ad un iniziale incremento della forza di rottura della ferita, parametro molto importante nel processo di guarigione, seguito poi dall'epitelizzazione e in ultimo da una fase di rimodellamento della ferita.

TGF- β e PDGF rappresentano di sicuro i più importanti fattori di crescita nel sito di ferita all'inizio del processo di guarigione.

Basandosi sull'azione dei vari fattori di crescita durante i diversi stadi del processo di guarigione delle ferite, l'uso di gel piastrinico acquista un interessante profilo. Rispetto ad applicazioni di singoli fattori di crescita ricombinanti, il gel piastrinico ha il vantaggio di offrire fattori di crescita multipli, capaci di agire in modo sinergico nel promuovere la mitogenesi di cellule staminali mesenchimali a livello del sito di ferita.

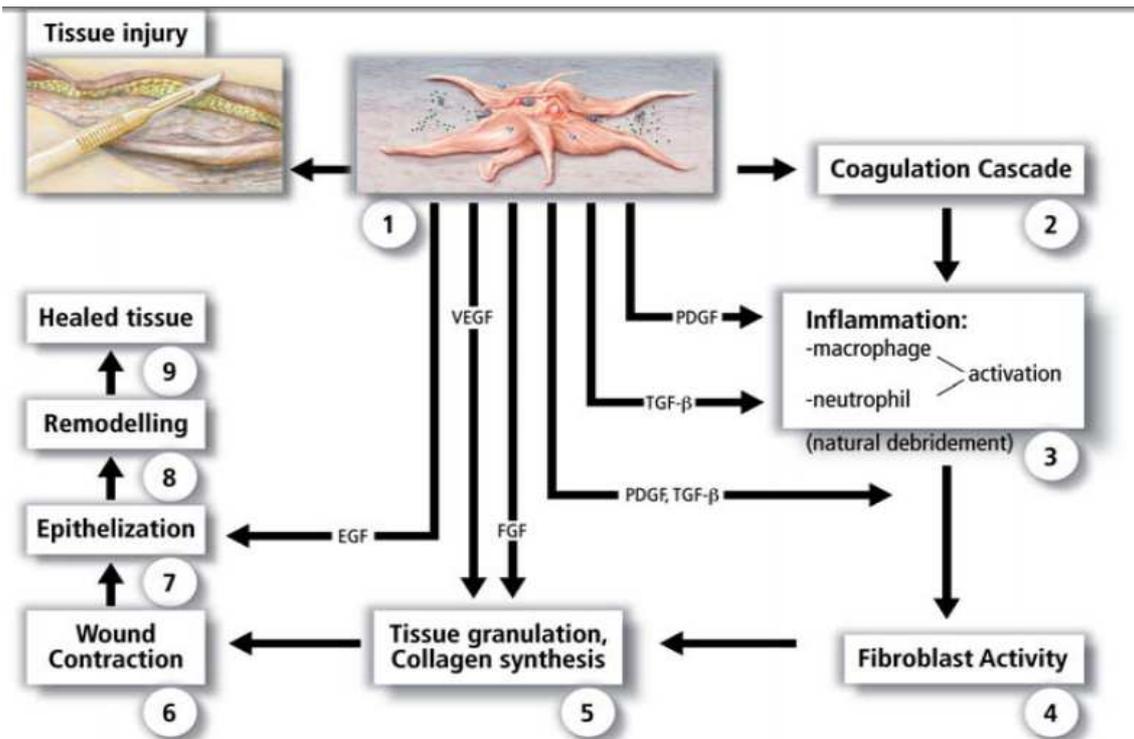


Figure 3. Schematic illustration of the role of platelet derived growth factors (the numbers indicate the sequence of the wound healing actions) during the different stages of the wound healing process.

(EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; PDGF: platelet derived growth factor; TGF- β : transforming growth factor β , VEGF: vascular endothelial growth factor).

Tenendo conto proprio di tutti gli aspetti appena descritti, sono stati eseguiti numerosi studi per valutare empiricamente la reale efficacia del gel piastrinico nei processi di guarigione delle ferite, specialmente in quelle chirurgiche.

Indicazioni promettenti di applicazione topica di gel piastrinico si sono avute nel trattamento di ferite croniche e come supporto dei processi di guarigione dopo incisione chirurgica nei pazienti a rischio di non guarigione (ad esempio i diabetici).

Le ferite sono spesso di tipo multifattoriale, ma si sviluppano in un retroscena di neuropatia periferica e complicanze vascolari. I risultati ottenuti da Margolis et al. nel 2001 provano l'efficacia del gel piastrinico specialmente nei pazienti con ferite severe.

Il successo di questi trattamenti è illustrato da case report europei nei quali l'uso di gel piastrinico, composto da mix di piastrine concentrate e crioprecipitato attivato con batroxobina in presenza di calcio cloridrato, ha ottenuto risultati straordinari nei processi di guarigione su ferite croniche in piede diabetico, permettendo di evitare l'amputazione.

- Piastrine gel piastrinico nella guarigione ossea:

Il processo di guarigione ossea, sia nelle riparazioni dopo frattura sia in modelli di fusione di qualunque tipo, è un delicato equilibrio tra deposizione ossea, riassorbimento e rimodellamento; esso è influenzato da numerosi meccanismi biochimici, biomeccanici, cellulari e patologici.

Nella riparazione dopo frattura e in genere nei processi di guarigione ossea, le piastrine agiscono come una fonte esogena di fattori di crescita capaci di stimolare l'attività delle cellule ossee.

Come succede nella guarigione delle ferite, anche la guarigione dei processi fratturativi ossei è formata dalle tre fasi già descritte: infiammazione, riparazione proliferativa e rimodellamento.

A livello del sito di frattura le piastrine rilasciano PDGF, TGF- β e EGF; TGF- β_1 ha il maggiore potenziale di riparazione ossea perché sia i condrociti sia gli osteoclasti sono ricchi di recettori per TGF- β_1 stesso.

La capacità ripartiva dell'osso si basa, quindi, su tre concetti principali: osteogenesi, osteoinduzione e osteoconduzione.

L'osteogenesi è descritta come la capacità di produrre nuovo tessuto osseo ed è determinata dalla presenza di cellule osteoprogenitrici e precursori osteogenici nell'area colpita.

L'osteoinduzione è definita come la capacità di stimolare le cellule staminali a differenziarsi nella forma matura tramite la stimolazione di fattori di crescita locali come PDGF e TGF- β .

L'osteoconduzione è determinata dalla presenza di ponti che permettono la migrazione vascolare e cellulare; è normalmente ottenuta tramite l'uso di tessuto osseo autologo raccolto (autotrapianto), innesto di materiale omologo (allograpianto) o matrici artificiali come l'osso mineralizzato, l'idrossiapatite, tricalciofosfato e collagene.

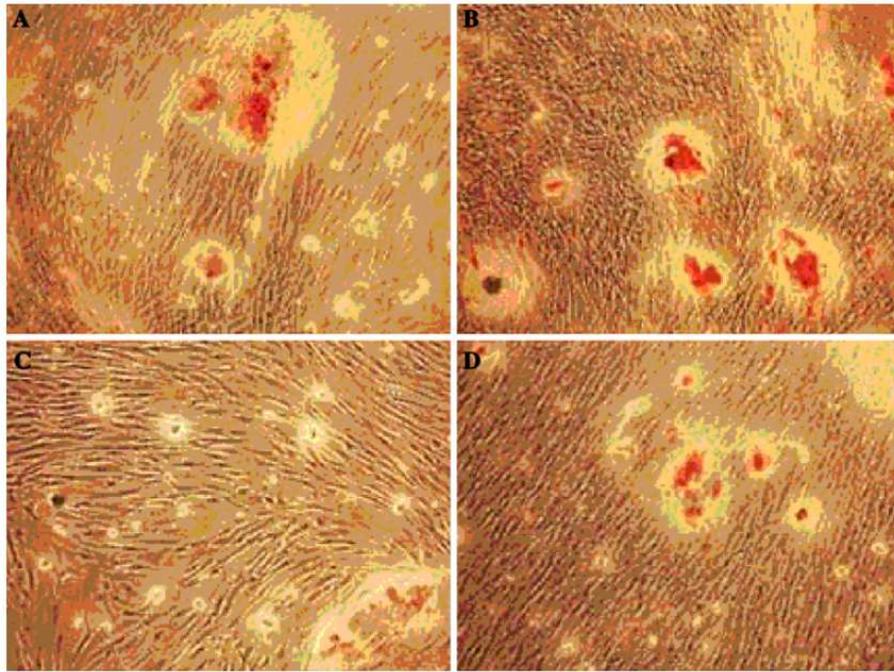


Fig. 1 Calcium deposition in trabecular osteoblast cultures. **a** medium added with foetal calf serum (positive control); **b** serum-free medium (negative control); **c** medium added with plasma without platelets; **d** osteoblast seeded on platelet gel. Alizarin red staining. 10x

È stato ipotizzato che l'unione di PRP e trombina (gel piastrinico), insieme a materiali derivanti da osso autologo raccolto, possano creare innesti di bioingegneria. Il risultato è infatti un innesto osseo, arricchito con un'alta concentrazione di piastrine, rilascianti fattori di crescita.

- Gel piastrinico nella rigenerazione di nervi periferici:

Nonostante la continua introduzione di nuove tecniche microchirurgiche basate sui risultati di studi scientifici, la riparazione di nervi periferici è ancora uno dei compiti più impegnativi in microchirurgia, perché il recupero funzionale di nervi danneggiati è raramente soddisfacente.

L'uso di innesti nervosi autologhi, nonostante tutti gli svantaggi di questa metodica, rimane ancora oggi la prima scelta nella ricostruzione di un'interruzione nervosa.

La tubulizzazione, cioè l'impianto di un tubo di rivestimento attorno alla sutura sul nervo o per colmare un'interruzione nervosa, è una buona alternativa per la ricostruzione di tessuto nervoso periferico. Esistono tre metodi principali di tubulizzazione usati in chirurgia ricostruttiva nervosa: metodi biologici, sintetici e combinati.

L'innesto di vena è senza dubbio il più comune condotto biologico utilizzato, ma è risultato efficace esclusivamente per interruzioni brevi (minori di 30 mm).

Per questo alcuni autori hanno provato ad utilizzare tubi in silicone che potessero portare a rigenerazione nervosa, con risoluzione di gap inferiori soltanto a 5 mm.

Molti studi hanno indagato le proprietà migliorative del gel piastrinico sulla rigenerazione tissutale ossea, cartilaginea, a livello di impianti dentari e a livello di ferita; hanno mostrato che plasma ricco in piastrine (PRP) favorisce la rigenerazione tissutale grazie agli α -granuli contenuti nelle piastrine. La sua efficacia sulla rigenerazione di tessuto nervoso periferico invece è rimasta a lungo non indagata.

Gli studi effettuati da Choi et al. (2005) e da Piskin et al. (2008) vanno proprio in questa direzione, in quanto lo scopo principale è proprio quello di indagare l'effetto di condotti collagenici e gel piastrinico arricchito sulla rigenerazione nervosa periferica, comparandolo ai principali metodi utilizzati comunemente (Sham= chirurgia placebo; CT= tubi di collagene; ANG= innesto nervoso autogenico; PR= riparazione primaria).

Il gruppo Sham (chirurgia placebo) ha evidenziato il minor numero di assoni rispetto agli altri gruppi, subito prima del gruppo trattato proprio con tubo collagene e gel piastrinico.

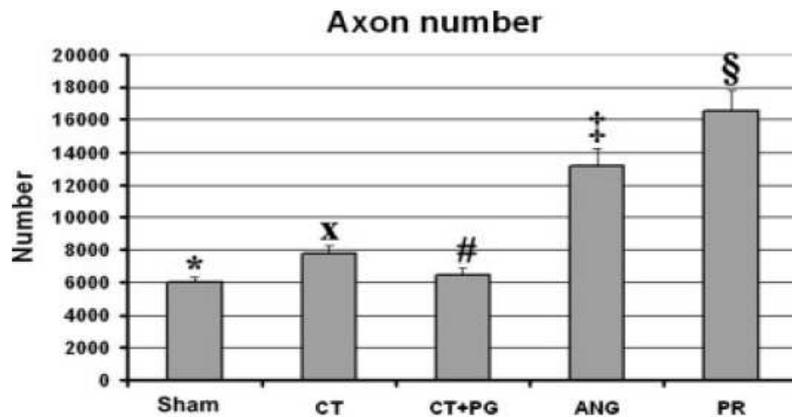


Figure 2. Comparison of myelinated nerve fibers number between the groups shows that (*) Sham operated group was significantly different from all other groups ($P < 0.01$) except CT+PG. (x) The CT group was significantly different from all other groups ($P < 0.01$). (#) CT+PG was significantly different from all other groups ($P < 0.01$) except the sham operated group. (‡) ANG was significantly different from all other groups ($P < 0.001$). (§) The PR group was significantly different from all other groups ($P < 0.001$); There was a significant difference between the ANG and PR groups ($P < 0.05$). Sham, sham operated; CT, collagen tube; CT+PG, collagen tube + platelet gel; ANG, autogenic nerve graft; PR, primary repair groups.

Per quanto riguarda la stima delle sezioni trasversali degli assoni mielinizzati e sulla stima dello spessore della mielina sono state evidenziate differenze significative tra il gruppo Sham (chirurgia placebo) e gli altri gruppi.

Tra di loro, però, tutti gli altri gruppi non hanno mostrato differenze particolari.

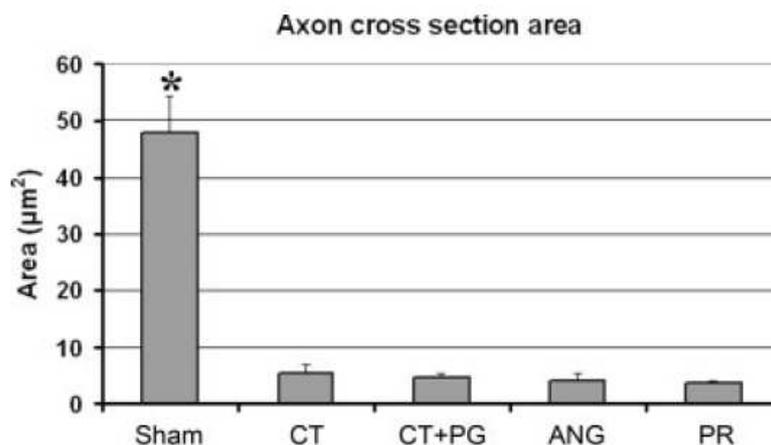


Figure 3. Myelinated axon cross-section area comparisons between the groups show that axonal cross-section area of the sham operated group (*) was significantly higher than for the other groups. Sham, sham operated; CT, collagen tube; CT+PG, collagen tube + platelet gel; PR, primary repair; ANG, autogenic nerve graft.

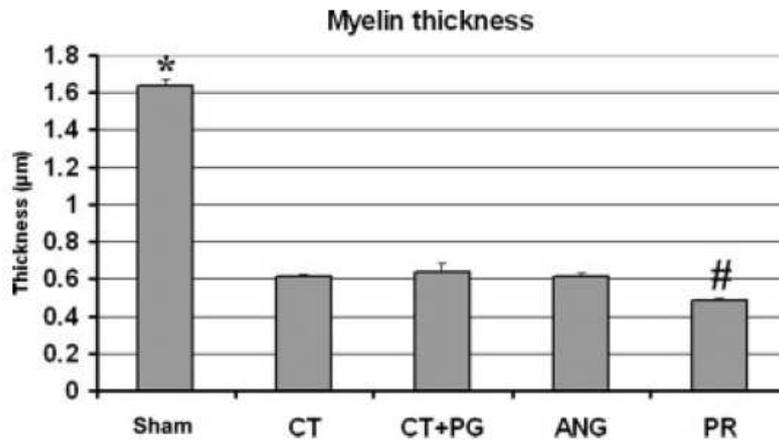


Figure 4. Comparison of myelin sheath thickness between the groups shows that myelin sheath thickness of sham operated group is significantly thicker than the other groups (* $P < 0.001$). The myelin sheath thickness of the PR group is significantly thinner than in other groups (# $P < 0.05$). Sham, sham operated; CT, collagen tube; CT+PG, collagen tube + platelet gel; PR, primary repair; ANG, autogenic nerve graft.

I risultati degli studi mostrano che guide nervose collageniche arricchite con gel piastrinico non incrementano in modo significativo la rigenerazione nervosa periferica.

Questi dati sono sorprendenti, se si considerano i risultati positivi ottenuti dalla somministrazione di gel piastrinici nei vari processi di riparazione tissutale.

Alla luce di questi studi non può essere pertanto raccomandato l'utilizzo del gel piastrinico per la rigenerazione di tessuto nervoso periferico.

Il gel piastrinico è stato valutato in numerosi modelli sperimentali e clinici di chirurgia ortopedica, vascolare, neurologica e plastica, con risultati contraddittori.

L'uso di gel piastrinico appare sicuro e realmente applicabile, avendo dimostrato un significativo potenziale nell'accelerazione dei processi di riparazione ossea e nella guarigione delle ferite, specialmente nelle fasi iniziali.

I risultati visibili in letteratura non raccomandano l'uso del gel piastrinico né per la ricostruzione microchirurgica dei danni nervosi né tantomeno nella riduzione delle complicanze in seguito a chirurgia mammaria oncologica, funzionale o estetica.

L'uso sempre maggiore di gel piastrinico dovrebbe incoraggiare, però, l'introduzione di dispositivi controllati per le procedure di processazione del gel. Questi dispositivi chiusi ridurrebbero le manipolazioni, diminuendo il rischio d'infezione, permettendo una più alta

standardizzazione delle procedure di processazione e facilitando anche l'uso diretto in sala operatoria.

Inoltre uno studio pubblicato da Wirz et al. nel 2011 ha dimostrato che l'uso di PRP, al posto di PPP o soluzioni di fibrinogeno come base per impalcature di gel di fibrina autologo umano, porta ad un maggiore rilascio di PDGF-AB con conseguente effetto positivo sullo sviluppo tissutale.

Da questi presupposti nasce l'esigenza del nostro studio, e cioè quella di testare il gel piastrinico ed i fattori di crescita sulla ricostruzione di danni tissutali pleurici, provocati da chirurgia polmonare maggiore, in grado di minimizzare le perdite aeree.

4. Obiettivi dello studio

Il punto di partenza fondamentale è rappresentato sicuramente dallo studio in vitro, che ha permesso di creare un substrato, come il mesotelio autologo, e di valutarne la risposta proliferativa dopo trattamento con gel piastrinico.

Il protocollo della sperimentazione è stato approvato dall'Istituto Superiore di Sanità presso il Ministero della Salute ed il progetto è stato finanziato dalla Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena come progetto a concorso.

Molti studi hanno indagato gli effetti terapeutici del gel piastrinico sulla rigenerazione tissutale ossea, cartilaginea, a livello di impianti dentari e a livello di ferita: hanno dimostrato che plasma ricco in piastrine (PRP) favorisce la proliferazione dei tessuti principalmente grazie ai fattori di crescita contenuti nelle piastrine.

Il potenziale rigenerativo del gel piastrinico sul parenchima polmonare danneggiato non è però stato provato, né in vitro né in vivo negli studi internazionali presenti in letteratura.

Lo scopo principale di questo studio è stato proprio quello di osservare l'effetto del gel piastrinico e dei suoi fattori di crescita nella riparazione del tessuto pleurico in presenza di un danno, complicanza che può accadere quotidianamente in chirurgia toracica.

4.1. Studio in vitro

Gli studi clinico-sperimentali revisionati nel capitolo precedente dimostrano come i fattori di crescita giochino un ruolo fondamentale nei processi rigenerativi in medicina.

In questo contesto le piastrine possono essere utilizzate come depositi di tali fattori, i quali possono essere rilasciati durante l'attivazione dei granuli piastrinici.

Gel piastrinico proveniente da sangue periferico è ormai correntemente utilizzato per stimolare la guarigione tissutale in ortopedia, chirurgia maxillofaciale e dermatologica; non tutti forse sanno che il sangue da cordone ombelicale può rappresentare un'importante fonte alternativa di cellule staminali emopoietiche da utilizzare, non soltanto nel trattamento di disordini ematologici.

Il cordone ombelicale è anche ricco di cellule staminali mesenchimali umane, le quali sembrano avere proprietà rigenerative e immunosoppressive. Infine è libero da toxoplasma e citomegalovirus, risultando meno immunogenico rispetto al midollo osseo e al tessuto adiposo.

Come già ampiamente descritto nel capitolo precedente, l'azione positiva del gel piastrinico è dovuta principalmente ai fattori di crescita (PDGF, TGF, bFGF, VEGF) contenuti nei granuli, i quali sembrano contribuire alla rigenerazione tissutale.

Il rilascio dei fattori di crescita avviene durante l'attivazione piastrinica, che può essere stimolata da calcio gluconato e trombina umana; più recentemente si è scoperto però che la batroxobina riesce a promuovere in modo migliore sia la degranolazione delle piastrine sia la cascata della coagulazione.

Tutto questo processo termina nella formazione di un prodotto gelatinoso, chiamato gel piastrinico appunto, nel quale le piastrine vengono intrappolate all'interno una rete fibrinica continuando a secernere il loro contenuto insieme a sostanze bioattive.

Per il nostro studio sperimentale abbiamo utilizzato un gel piastrinico ottenuto da sangue proveniente da cordone ombelicale, prodotto dalla Cell Factory "Franco Calori", Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico.

Le unità di sangue sono state raccolte prima e dopo distacco placentare in parti naturali o cesarei, dopo apposito consenso informato, in contenitori di plastica contenenti 29 mL di anticoagulante citrato-fosfato-destrosio (CPD).

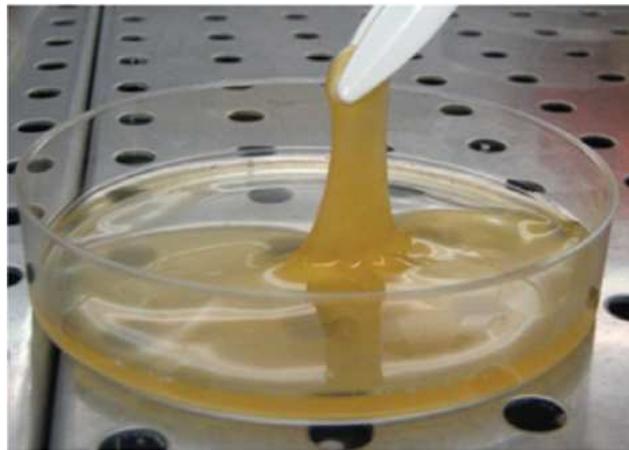
Dopo conservazione a temperatura ambiente, le unità sono state processate entro 24 ± 2 ore dal prelievo.

Il sangue è stato trasferito in tubi e centrifugato a 550 g per 10 minuti a temperatura ambiente ed è stata poi raccolta la frazione di plasma ricco in piastrine (PRP) sulla superficie.

È stata eseguita una conta completa sul PRP utilizzando un analizzatore ematologico automatico: un numero di cellule nucleate superiore a 1×10^5 /mL ha richiesto un'ulteriore centrifuga a 100 g per 10 minuti per ottenere un supernatante di plasma ricco in piastrine.

Poi il PRP è stato centrifugato a 2000 g per 15 minuti e la componente piastrinica sospesa nuovamente in un adeguato volume di supernatante di plasma povero in piastrine (PPP) fino ad ottenere una concentrazione finale di 2×10^6 piastrine/ μ L.

Il PRP è stato fatto riposare a temperatura ambiente per 30 minuti prima di essere finalmente attivato utilizzando calcio gluconato e batroxobina (Plateltex-Act®): il consolidamento del gel piastrinico ha impiegato circa 10 minuti.



I risultati ottenuti hanno mostrato che gel piastrinico ottenuto da cordone ombelicale è ricco di fattori di crescita: in modo particolare sono stati riscontrati alti livelli di VEGF e PDGF-BB.

Table I. PDGF-AB and TGFbeta1 concentrations in PPP and CB PG releasate. Growth factor concentration measured by ELISA assay (pg/mL; $n = 6$; mean \pm SD)

	Growth factors	
	PDGF-AB	TGF beta 1
<i>PPP</i>	14.2 \pm 2.4	830.6 \pm 222.5
<i>PG releasate*</i>	41 \pm 23.3	6865.6 \pm 2668.5

*Value obtained by subtracting PPP from total CB PG releasate.

Table II. PDGF-BB, HGF, bFGF and VEGF concentrations in PPP and CB PG releasate. Growth factor concentration measured by SearchLight assay (pg/mL; $n = 6$; mean \pm SD).

	Growth factors			
	PDGF-BB	HGF	FGFb	VEGF
<i>PPP</i>	323.6 \pm 23	294 \pm 20	2.1 \pm 0.4	363.6 \pm 42
<i>PG releasate*</i>	11083.9 \pm 5443.8	610.7 \pm 254	85.5 \pm 21.4	1803.5 \pm 788.5

*Value obtained by subtracting PPP from total CB PG releasate.

L'analisi del gel piastrinico e della quota di fattori di crescita rilasciati però non basterebbe da sola a giustificare l'obiettivo del nostro studio sperimentale: il nostro scopo è valutare l'efficacia del gel e dei fattori rilasciati sulla riparazione di tessuto pleurico in seguito ad un danno parenchimale.

Per fare questo sono state necessarie ulteriori prove in favore della metodologia scelta e quindi abbiamo deciso di utilizzare lo scratch assay, particolarmente idoneo per studiare gli effetti dell'interazione cellula-cellula e cellula-matrice, la migrazione cellulare e la simulazione della migrazione. Risulta infatti compatibile con le immagini di cellule viventi durante il loro spostamento in modo da monitorare gli eventi intracellulari desiderati.

È basato sull'osservazione che, sulla superficie confluyente di cellule in monostrato, in seguito alla creazione di un graffio/danno artificiale chiamato appunto "scratch", le cellule presenti in periferia si muovono verso l'apertura fino a chiuderla in modo da creare nuovamente un contatto cellula-cellula.

Nel nostro studio abbiamo voluto valutare l'utilizzo di gel piastrinico sulla riparazione di un monostrato di cellule mesoteliali ottenute mediante espansione di 10 campioni di pleura sana raccolti in corso di intervento chirurgico per patologia toracica non neoplastica previa espressione di consenso informato scritto del paziente.

I campioni di tessuto dopo essere stati lavati mediante soluzione salina sterile (PBS; EuroClone S.p.A., Pavia, Italy) e 20% di siero bovino fetale (FBS; Biochrom, AG, Berlin, Germany) sono stati esposti a 1 mg/ml di collagenasi A (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) per 1 ora a 37° C. La digestione viene fermata utilizzando PBS e 20% di FBS e quindi i campioni vengono centrifugati per 10 minuti a 400g per raccogliere le cellule.

Le cellule ottenute vengono messe in coltura in M119 (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) con 20% di FBS e 1% di penicillina/streptomina (P/S; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) a 37° C in ambiente umidificato e a 5% di CO₂.

Dopo 10 giorni di coltura primaria, una volta raggiunto il 70-80% di confluenza, le cellule vengono prelevate mediante tripsina (TryPLE Select, Gibco Life Technologies), analizzate mediante citofluorimetria per valutarne la purezza e quindi utilizzate per lo scratch assay.

L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata su 5×10^5 cellule dopo lavaggio in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente ed incubate al buio con i seguenti anticorpi : CD24 FITC, CD49f FITC, Cytokeratin 18 PE e EpCAM FITC, Cd34 PE, CD 45 PC7, CD146 PE, fattore di von Willebrand FITC. Un minimo di 50.000 eventi sono stati acquisiti mediante fluorocitometro Cytomics FC500 (Beckman Coulter) e le plot sono state generate utilizzando il software CXP. Dopo marcatura, le cellule sono state lavate con PBS. Le cellule mesoteliali mostravano una classica morfologia a ciottolo, assenza di CD24, di marcatori epiteliali/endoteliali come EpCAM, CD146 e fattore di von Willebrand. Sono risultate negative ai marcatori emopoietici come CD34 e CD45, mentre sono risultate positive per cytokeratin 18 e CD49f.

Le cellule mesoteliali cresciute in piastre a sei pozzetti a formare un monostrato confluyente vengono sottoposte a graffiatura lungo una linea retta mediante una punta di pipetta da 200

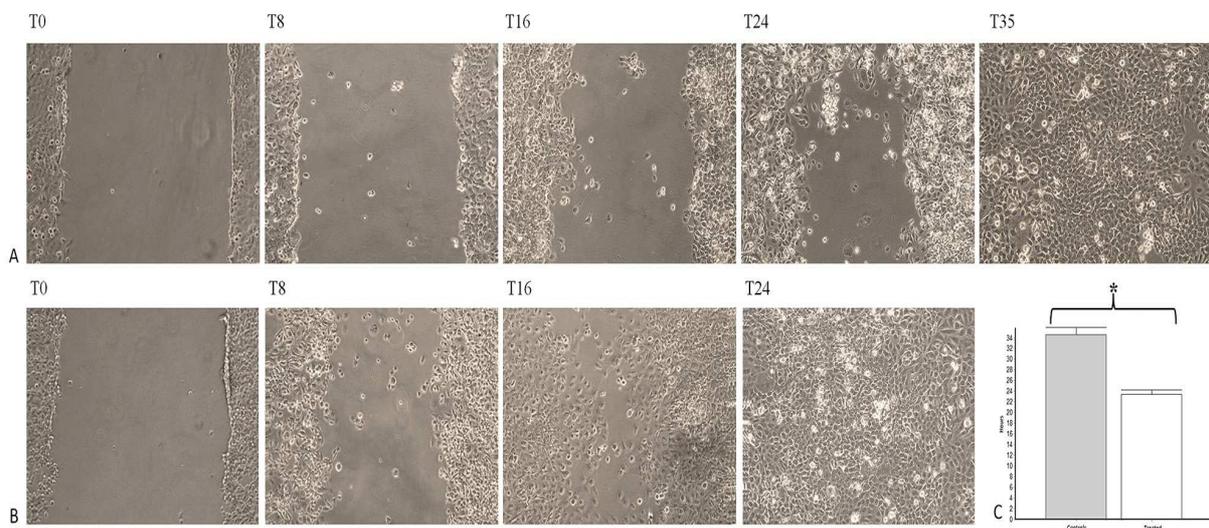
μl. Le cellule lesionate vengono rimosse mediante lavaggio con PBS. Subito dopo le cellule vengono messe in coltura e suddivise in 2 gruppi:

- **CBPG:** con medium M199 e sughetto piastrinico ottenuto da cord blood
- **CTRL:** con medium M199 e siero fetale bovino (FBS)

Gruppo **CBPG:** una volta ottenuto il gel piastrinico da sangue proveniente da cordone ombelicale, il gel è stato centrifugato a 2000 g per 10 minuti in modo da consentire il rilascio immediato dei fattori di crescita contenuti nelle piastrine che vengono uniti al medium di coltura.

Gruppo **CTRL:** è la condizione standard. Le cellule sono state coltivate nel medium di coltura con 20% di siero fetale bovino FBS.

Le piastre appartenenti ai diversi gruppi (CBPG, CTRL) sono state confrontate tra loro mediante microscopio a contrasto di fase. Un'immagine dello scratch è stata acquisita al tempo 0 (T0) quindi i campioni sono stati incubati a 37° C per 35 ore e osservati a 8, 16, 24 e 35 ore osservando le fasi di ricrescita cellulare fino a riempire lo scratch (vedi figura).



* SCRATCH ASSAY A = gruppo CTRL; B=gruppo CBPG

Abbiamo potuto osservare che il completo ripristino della densità di cellule mesoteliali avveniva più velocemente nel gruppo trattato con fattori provenienti da piastrine di cordone ombelicale rispetto al gruppo di controllo. La “ferita” era completamente chiusa a 24 ore nel gruppo CBPG mentre questo avveniva in 35 ore nel gruppo di controllo ($p < 0.0001$).

4.2. Studio in vivo

Per questo studio abbiamo utilizzato 54 ratti maschi Wistar, con un peso compreso tra 200 e 225 g (Charles River Laboratories, Calco, Italia).

Gli animali sono stati sistemati singolarmente in gabbie di plastica ventilate (Tecniplast, Buguggiate, Italia) a 22 ± 1 ° C, a 55 ± 1 % di umidità, con libero accesso a cibo ed acqua.

L'illuminazione artificiale è stata fornita, come sempre accade nel nostro centro sperimentale, con un rapporto di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

Anatomia polmonare del ratto:

Il polmone del ratto appena nato è immaturo, non contenendo alveoli o dotti alveolari.

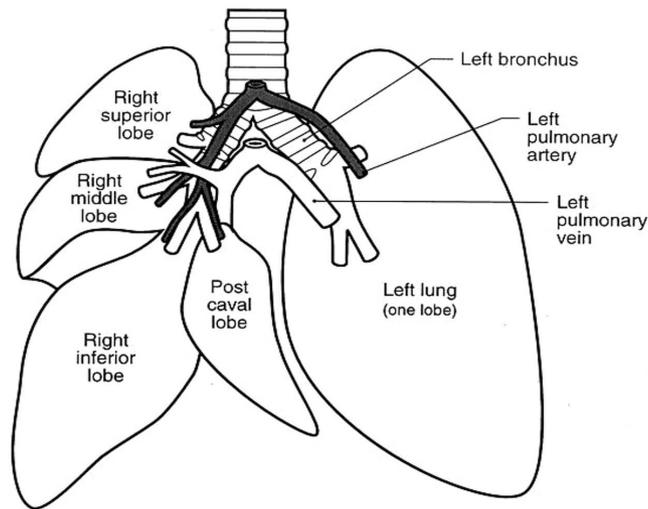
Una volta raggiunti i quattro giorni di vita, comincia una rapida costituzione del parenchima polmonare che raggiunge una morfologia matura già a partire dal settimo giorno.

Il polmone di un ratto adulto medio contiene circa 975.000.000 cellule, di cui il 74% nel tessuto alveolare e il 26% nel tessuto non alveolare.

Gli alveoli sono ricoperti da larghi e piatti pneumociti di tipo I e circondati da pneumociti di tipo II.

Cellule caliciformi, situate invece nell'epitelio di conduzione delle vie aeree, servono come progenitori delle cellule ciliate capaci di aiutare la rimozione del muco e di altri materiali intrappolati.

Nel ratto ci sono cinque lobi polmonari: un lobo a sinistra e quattro lobi a destra (craniale, medio, accessorio e caudale):



I bronchioli respiratori sono relativamente corti e sfociano quasi subito nei dotti alveolari, ognuno dei quali si suddivide quattro o cinque volte; i bronchioli sono ricoperti da uno spesso epitelio cubico semplice sul lato che accompagna le arteriole, mentre diminuisce in altezza dal lato opposto.

La parete alveolare è formata da tre differenti strati: uno strato epiteliale che riveste lo spazio alveolare, una membrana basale e uno strato epiteliale che riveste il lume capillare. Tutti e tre questi strati sono relativamente sottili ed infatti lo spessore della barriera alveolo-capillare risulta di soli 1,5 μm .

Così come accade nell'uomo, lo spazio alveolare è lubrificato dal surfattante, agente lipidico in grado di diminuire la tensione superficiale, utile per impedire il collasso dell'alveolo durante l'espiazione, in accordo con la legge di Laplace.

Il peso del polmone è dipendente dalla taglia corporea, ma la sua superficie si relaziona al consumo di ossigeno; la superficie polmonare totale di un ratto di 400 g è approssimativamente di 7,5 m^2 , rispetto ai 75 m^2 di un uomo di 70 Kg. Questa differenza tiene conto però di vie aeree più ampie e di minori resistenze al flusso presenti nei roditori, i quali riescono a compensare la ridotta superficie polmonare con un semplice aumento della frequenza respiratoria.

Metodologia:

Tutte le procedure sono avvenute in accordo ai Principles of Laboratory Animal Care, elaborati dalla National Society of Medical Research, nonché alla Guide for the Care and Use

of Laboratory Animals, preparata dalla National Academy of Sciences e pubblicata dal National Institutes of Health (NIH pubblicazione no. 86-23, revisione del 1985).

Le procedure chirurgiche sono state effettuate da due soli operatori, in condizioni di asepsi e sotto anestesia.

Le lesioni chirurgiche sono state effettuate sempre sul polmone sinistro, in virtù della presenza di un lobo soltanto.

Gli animali sono stati randomizzati in due gruppi:

- gruppo **GP**: chirurgia e gel piastrinico (gruppo di trattamento)
- gruppo **CTRL**: solo chirurgia (casi controllo)

Abbiamo effettuato la sola chirurgia con danno parenchimale nel gruppo di controllo CTRL (23 campioni), e analogo trattamento chirurgico seguito dall'applicazione di gel piastrinico nel gruppo di trattamento GP (31 campioni).

Il gel, ottenuto a partire da PRP derivante da sangue di cordone ombelicale, è stato preparato dalla Cell Factory.

Per renderlo una soluzione gel, abbiamo prelevato 1 ml di calcio gluconato mediante siringa e l'abbiamo iniettato nella bottiglietta contenente la pastiglia di batroxobina (Plateltex-Act® kit).

Di questo composto sono stati prelevati 42 uL con una pipetta e aggiunti alle provette contenenti 250 uL di PRP, già preparato in monodose: il consolidamento del gel piastrinico ha impiegato circa 7-8 minuti.

Anestesia:

Tutti gli animali sono stati anestetizzati mediante combinazione di ketamina 100 mg/Kg e xilazina 6 mg/Kg iniettata con puntura intraperitoneale.

Abbiamo atteso fino a quando il riflesso di chiusura delle palpebre non si fosse fermato prima di iniziare la procedura chirurgica.

Nella fase del sacrificio, invece, a seguito dell'anestesia generale farmaco indotta, abbiamo reciso i grossi vasi addominali per ottenere l'arresto cardiaco.

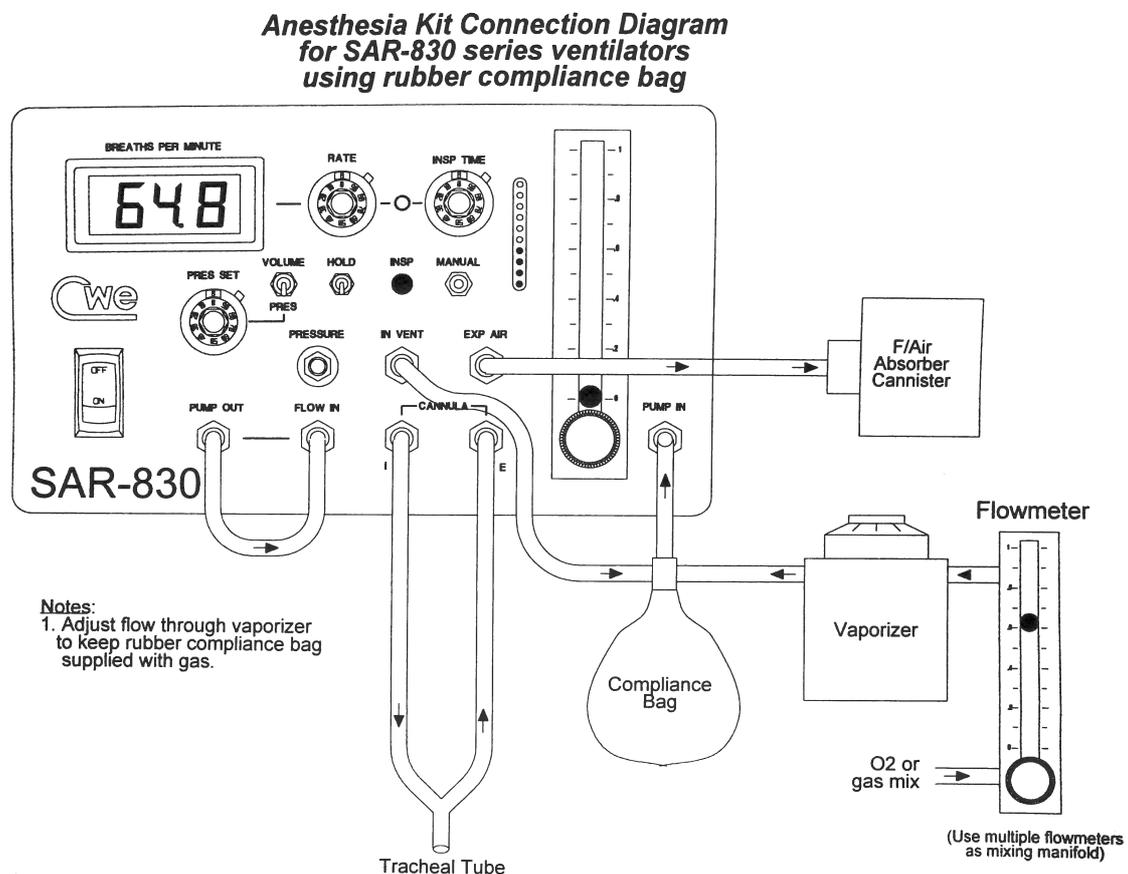
Intubazione:

Nei piccoli animali da laboratorio, come ad esempio i ratti, la conformazione anatomica con un piccolo palato, una cavità orofaringea ristretta e corde vocali che si muovono ad alta frequenza, rendono difficile una corretta gestione delle vie aeree.

Numerose metodologie d'intubazione sono state finora descritte, ma la particolare posizione assunta dal ratto in decubito supino e l'inclinazione del piano di lavoro rendono più facile l'accesso alle vie aeree. Tutti questi motivi ci hanno spinto ad utilizzare una tecnica d'intubazione descritta nel 2004 da alcuni autori tedeschi [Kastl, Kotschenreuther, Hille, Schmidt, Gepp, e Hohenberger, 2004] e da noi in parte modificata.

Per l'intubazione abbiamo usato una tavoletta in sughero (30x30 cm), un otoscopio con speculum di plastica (Heine mini 3000®; Heine, Herrsching, Germany), una guida metallica (lunghezza 22 cm), un catetere endovenoso (Abbocath® 16G; Progressive Medical International, Vista, CA, USA) e Lidocaina cloridrato 10% (Ecocain 10g/100ml spray per mucosa orale).

Per la ventilazione è stato usato un ventilatore per piccoli animali (SAR-830/P, CWE Inc., Ardore, PA, U.S.A):

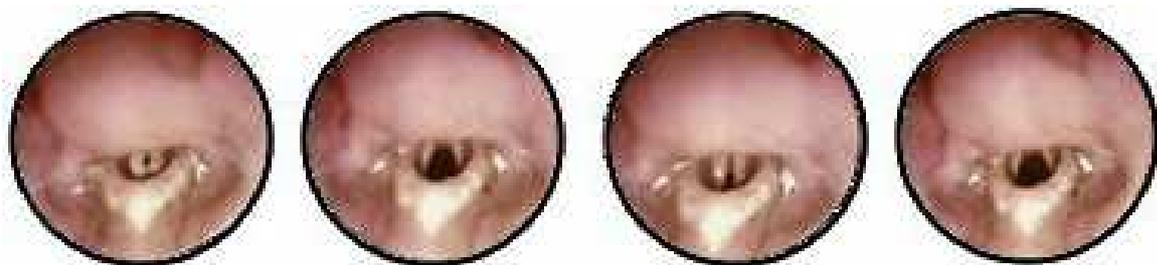
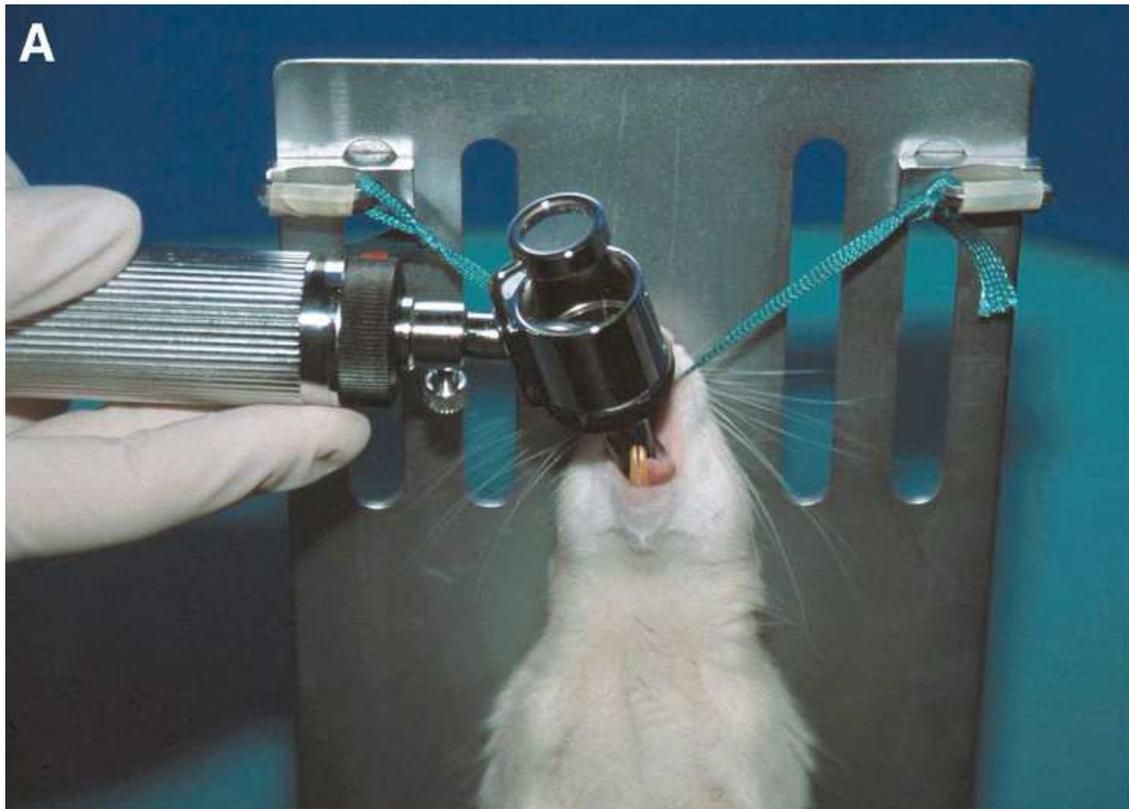


Prima dell'intubazione gli animali sono stati posizionati sulla tavoletta, successivamente inclinata, e sospesi con una fettuccia di tessuto agganciata agli incisivi superiori.



A questo punto abbiamo utilizzato Lidocaina cloridrato spray, per facilitare le operazioni di intubazione riducendo i riflessi laringei.

Le corde vocali sono state visualizzate mediante inserzione di un otoscopio nella cavità orale, spingendo la parte craniale dell'epiglottide in avanti con la punta dell'otoscopio; sotto visione diretta, abbiamo introdotto una guida metallica lunga 22 cm, attraverso le corde vocali tramite il cono dell'otoscopio.



Dopo esserci assicurati della corretta posizione della guida, abbiamo inserito un catetere endovenoso (Abbotcath® 16 G x 1-1/4, Progressive Medical International, Vista, CA, USA) seguendo la tecnica di Seldinger.



La guida può essere così rimossa e il catetere connesso al tubo del respiratore.



I movimenti di espansione e collasso della gabbia toracica, consensuali al respiratore, permettono di confermare la corretta posizione del tubo.

Abbiamo impostato il ventilatore sui seguenti parametri:

frequenza respiratoria 55 atti/minuto

tempo inspiratorio 0,60 s

flusso inspiratorio 170 ml/min

tidal volume 1,70 ml

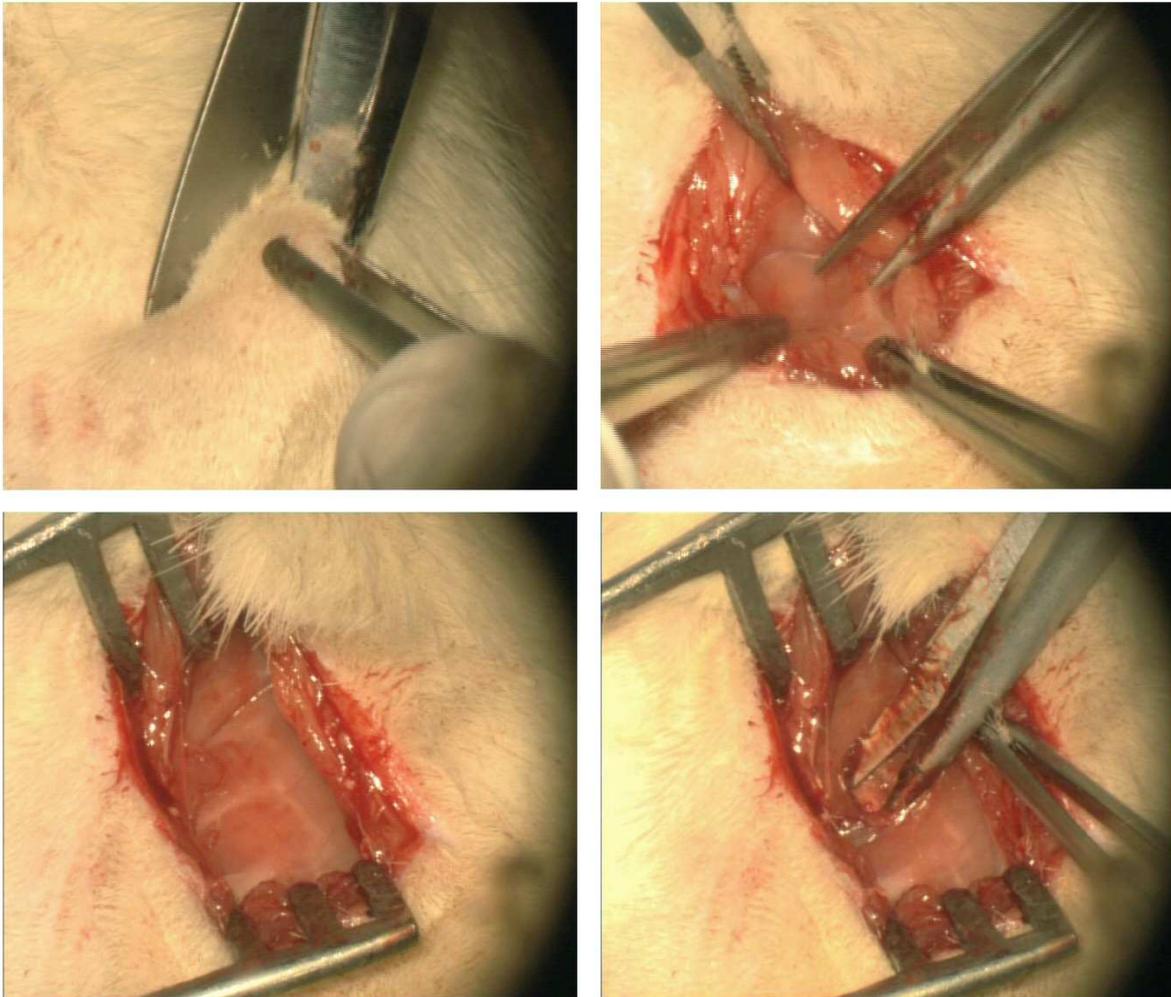
Tecnica microchirurgica:

Previa preparazione del campo operatorio e tricotomia dell'emitorace sinistro, abbiamo posizionato l'animale in decubito laterale destro.

Dopo un'attenta disinfezione cutanea, abbiamo eseguito un'incisione toracotomica in terzo-quarto spazio intercostale sinistro; l'incisione cutanea, eseguita subito al di sotto della punta della scapola, misura circa 2,5 cm in tutti i campioni studiati.

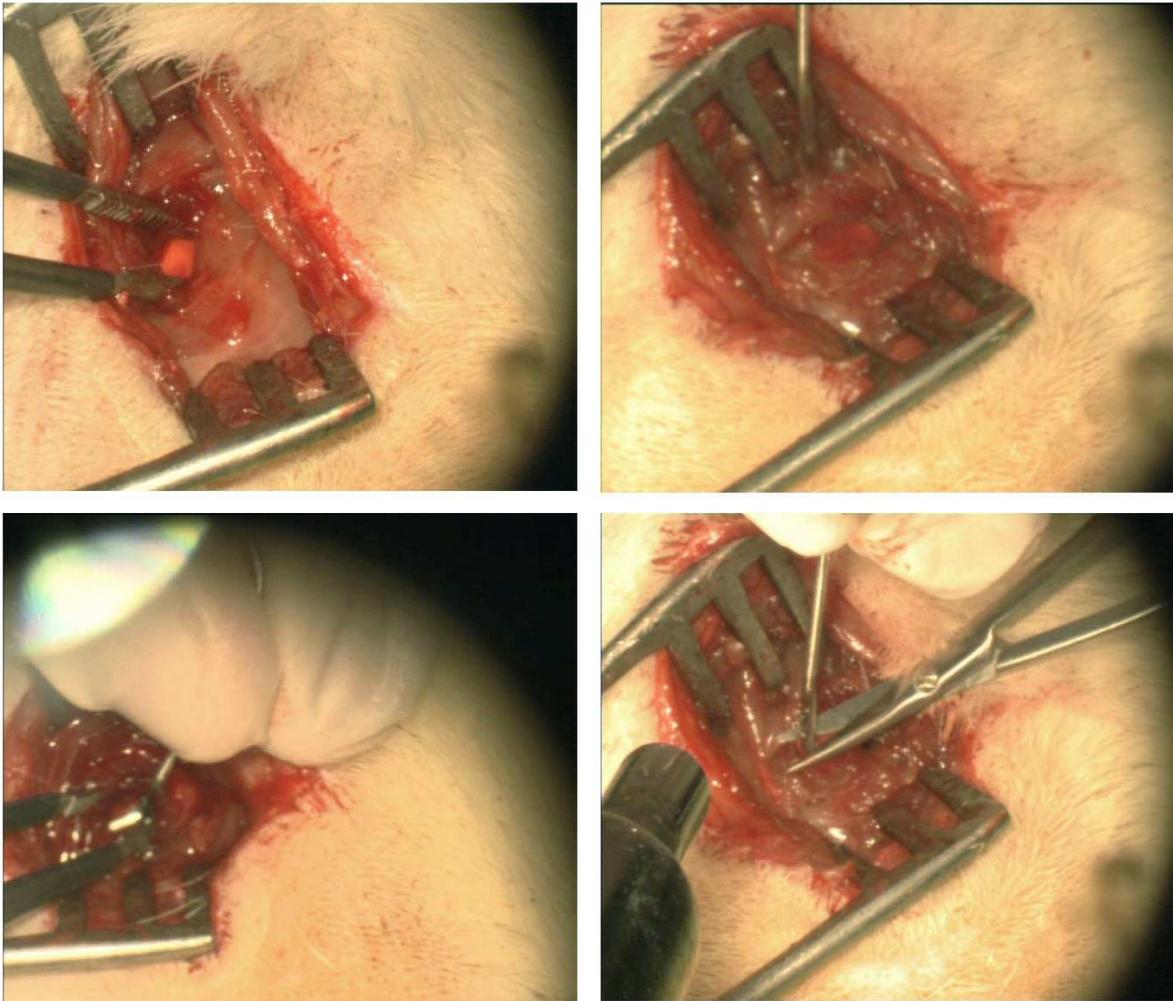
I muscoli più superficiali sono poi stati separati ulteriormente per via smussa fino a raggiungere il piano costale.

Per queste manovre ci siamo avvalsi dell'uso di un divaricatore autostatico di Beckmann.



In questo modo abbiamo raggiunto il cavo pleurico e, sotto visione diretta, abbiamo eseguito una presa con pinza da biopsia endobronchiale pediatrica (FB-56D-1, Olympus America Inc., Center Valley, USA) direttamente sul parenchima del polmone sinistro, aiutandoci con una forbice da microchirurgia.

Questa metodica ci ha permesso infatti di standardizzare la lesione parenchimale, in modo da non creare differenze tra i due gruppi presi in esame.



A seconda che ci si trovasse di fronte ai campioni del gruppo controllo o del gruppo di trattamento, i passaggi da effettuare sono stati differenti.

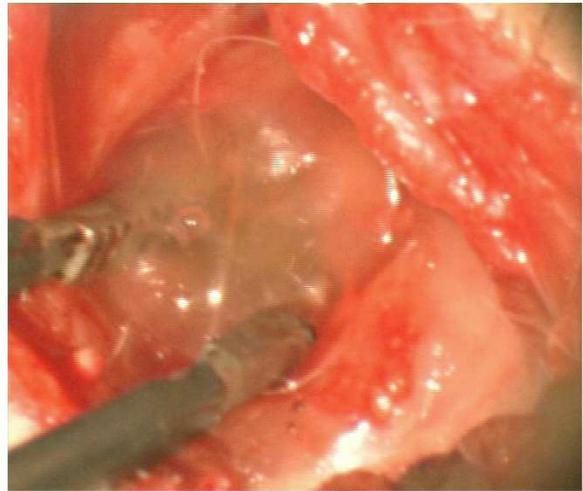
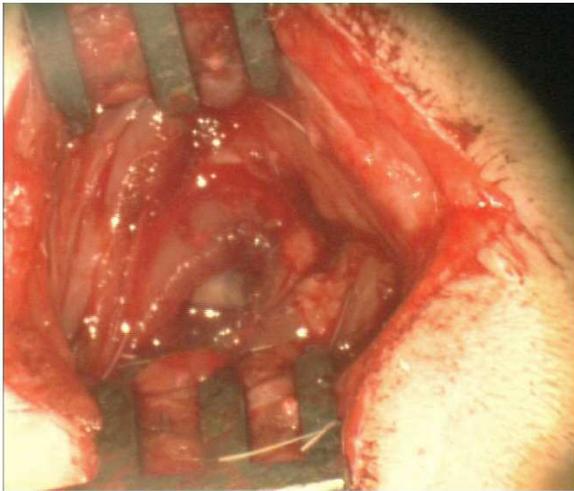
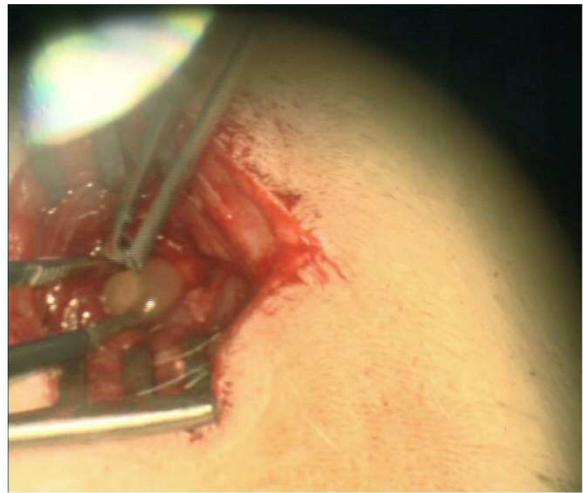
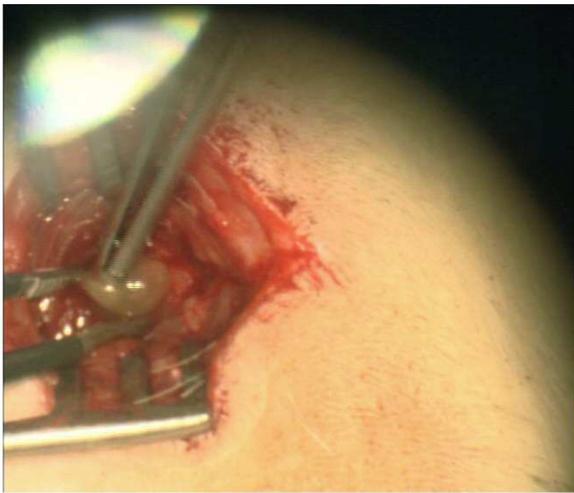
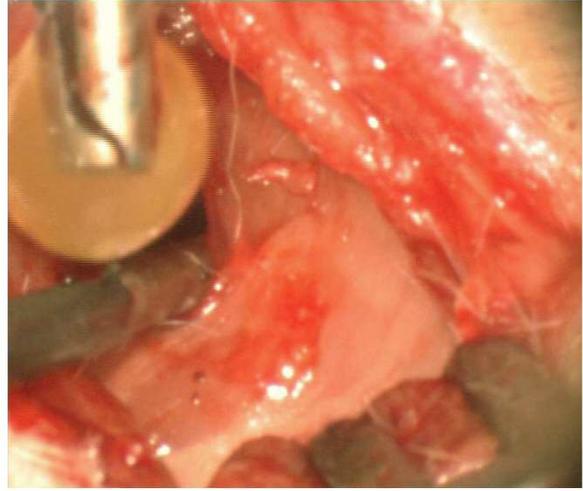
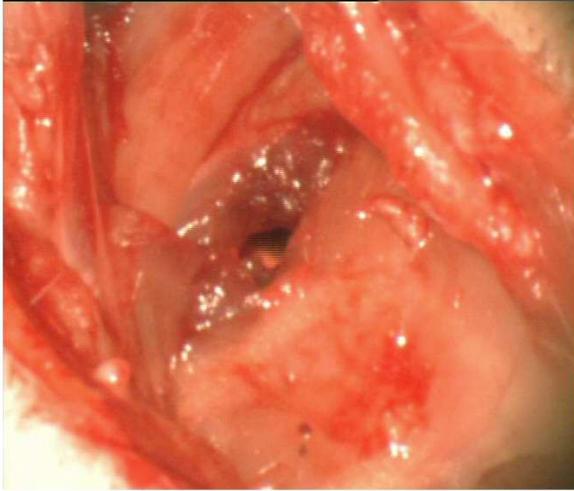
Nel gruppo di controllo (GC), dopo aver completato la lesione parenchimale, è stato posizionato un drenaggio toracico e l'incisione toracotomia è stata suturata.

Diversamente dai casi controllo, invece, nei ratti randomizzati nel gruppo trattato (GPG) la procedura presenta dei passaggi ulteriori.

Raggiunto il piano costale ed effettuata la lesione sul tessuto polmonare con pinza bioptica, così come descritto in precedenza, abbiamo riempito il cavo pleurico con il gel piastrinico ormai formatosi completamente.

Utilizzando una semplice pinza anatomica è stato possibile adagiare l'aliquota di gel piastrinico sopra al danno pleurico in modo che il composto potesse agire creando un tappo piastrinico e rilasciando i fattori di crescita.





In seguito è stato posizionato un drenaggio pleurico, sotto valvola ad acqua, per permettere una corretta riespansione polmonare.



Alla fine della procedura, la chiusura con giustapposizione muscolare è stata effettuata utilizzando punti staccati semplici con fili di sutura monofilamento, non riassorbibili 3/0 (Safil Quick® B. Braun, Melsungen, Germany).



Il tempo impiegato per tutta la procedura è risultato compreso tra 15 e 25 minuti.

Tecnica di gestione postoperatoria:

È stato posizionato un drenaggio pleurico (diametro 16 G) per permettere al polmone di tornare a parete.

Abbiamo effettuato un'aspirazione diretta mediante siringa da 5 mL per aiutare il processo di riespansione, dopodiché è stato mantenuto a caduta sotto valvola ad acqua (2 cm H₂O).



Gli animali sono stati estubati dopo aver ripreso la piena capacità respiratoria spontanea.

A fine procedura i ratti sono stati spostati in una recovery room, per la ripresa delle funzioni vitali e il recupero della coscienza dopo l'anestesia.

Qui siamo stati particolarmente attenti al controllo della temperatura, utilizzando anche lampade rivolte verso l'animale, in modo tale da prevenire gli effetti dell'ipotermia e mantenere la stabilità dei parametri emodinamici.

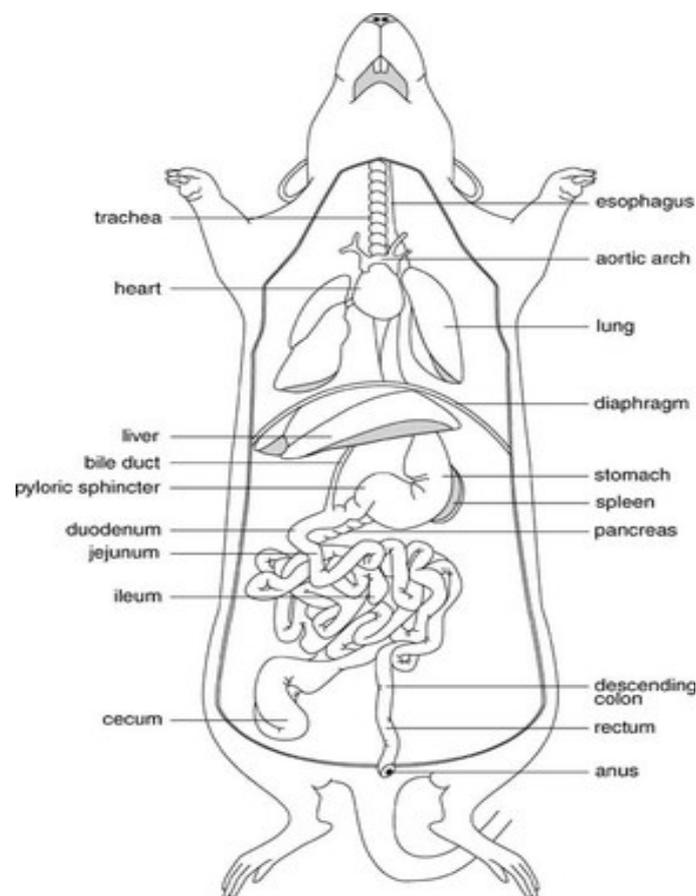
Sacrificio:

In questa fase i ratti appartenenti ad entrambi i gruppi sono stati sottoposti alla stessa identica procedura.

Tutti gli animali sono stati anestetizzati mediante combinazione di ketamina 100 mg/Kg e xilazina 6 mg/Kg iniettata con puntura intraperitoneale.

Nella fase del sacrificio, a seguito dell'anestesia generale farmaco indotta, abbiamo atteso fino a quando il riflesso di chiusura delle palpebre non si fosse fermato.

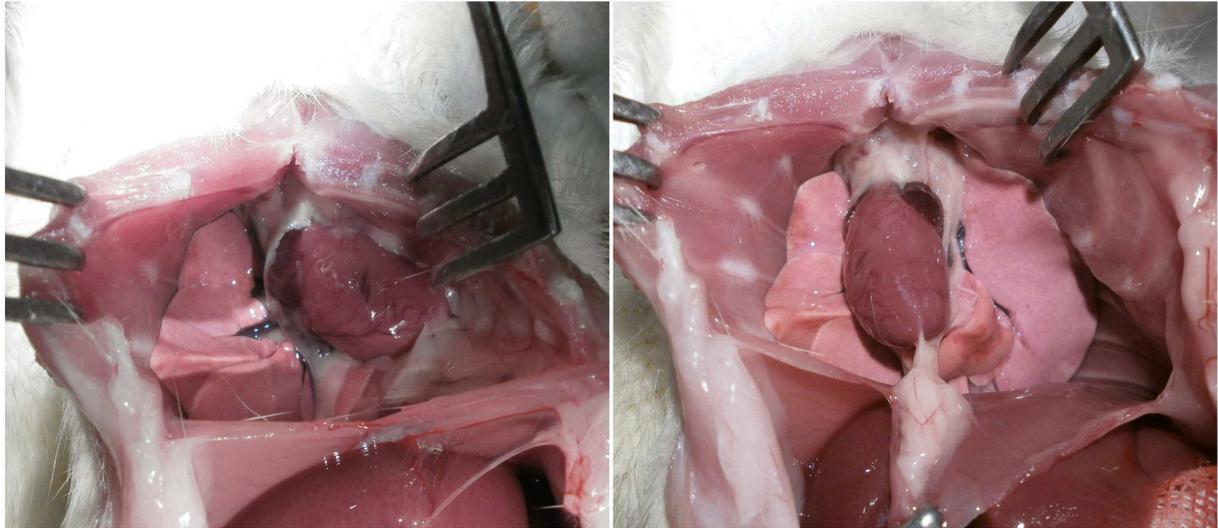
L'animale è stato poi posizionato su una tavoletta di sughero in posizione supina.



Con un'incisione laparotomica mediana è stato possibile mobilizzare i visceri addominali; sotto visione diretta abbiamo continuato recidendo i grandi vasi addominali.

Questo ci ha permesso di diminuire il flusso arterioso a livello toracico e consentito un'osservazione più agevole dell'area di danno e di ipotetiche aderenze in sede di toracotomia.

Abbiamo poi effettuato una sternotomia mediana, accedendo alla cavità pleurica, come dimostrano le immagini seguenti.



Abbiamo osservato attentamente la cavità, controllando l'aspetto macroscopico del polmone, l'eventuale presenza di anomalie, di versamento, di aderenze o altre complicanze. Liberato da ogni contatto con la pleura parietale, con il legamento polmonare e con l'ilo, il polmone sinistro è stato poi asportato in toto avendo particolare attenzione a non danneggiare il parenchima e quindi fissato in formalina.

4.3. Risultati dello studio

In questo studio abbiamo analizzato 53 ratti Wistar, includendo quelli utilizzati negli esperimenti preliminari per decidere la standardizzazione della lesione (3 campioni).

I dati provenienti da un campione soltanto (ratto G24) sono stati scartati a causa di morte accidentale avvenuta verosimilmente per arresto cardiocircolatorio in seguito all'inezione dell'anestetico per via peritoneale.

In nessun animale appartenente ad entrambi i gruppi sono stati necessari ulteriori interventi. Non si sono verificate infezioni durante il periodo di osservazione.

Le immagini radiografiche, effettuate prima della fase del sacrificio, ci confermano una completa riespansione polmonare a dimostrazione della corretta procedura chirurgica e di gestione postoperatoria.

Non abbiamo evidenziato falde di pneumotorace o presenza di cavo residuo nei campioni trattati né tantomeno nel gruppo di controllo.



Fig.1 Radiografia del torace di uno dei campioni studiati (G 10).

Osservazione diretta del cavo pleurico

L'osservazione diretta del cavo pleurico durante la fase del sacrificio ci ha permesso di raccogliere importanti informazioni.

Dopo aver escluso possibili complicanze, quali ad esempio l'emotorace, per prima cosa siamo stati in grado di osservare una corretta espansione polmonare, già peraltro indagata sui campioni in studio mediante imaging radiologico (vedi sopra).

Il parenchima polmonare è risultato ben ventilato, in assenza di aree atelettasiche o disventilate.

In questo modo abbiamo ottenuto conferma del corretto funzionamento delle tecniche di drenaggio messe in atto dopo la lesione polmonare.

Abbiamo valutato inoltre l'area di danno, sia a livello di parete sia sul parenchima polmonare, Più del 43% dei campioni (13/30) appartenenti al gruppo di trattamento GP hanno mostrato aderenze pleuriche in sede di toracotomia (Test di Fisher, $p=0.0505$).

Questa condizione si è presentata in un numero decisamente minore di campioni nel gruppo di controllo (17% = 4/23):

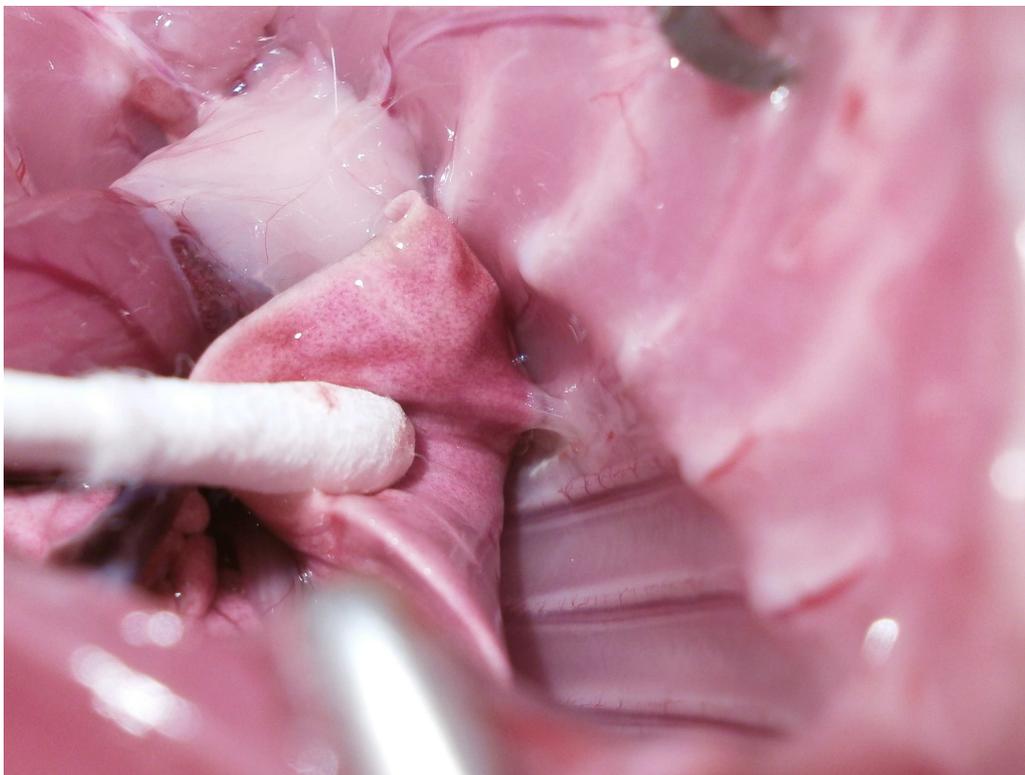


Fig.2 L'immagine mostra l'aderenza in sede di toracotomia in uno dei campioni trattati con gel piastrinico.

Le aderenze di sono dimostrate assai tenaci e, per non rischiare di rovinare il campione da analizzare istologicamente, l'area di espianto è stata allargata anche alla parete toracica contenente l'aderenza.

Sotto visione diretta, abbiamo inoltre controllato macroscopicamente la lesione parenchimale; già a partire dalla 31° ora il danno è risultato decisamente meno visibile rispetto al momento della presa biotica, quasi a significare un parziale, seppure grossolano, processo di riparazione.

In particolare, nei casi trattati è stato possibile individuare una pellicola semitrasparente adagiata proprio in sede di lesione che, con buona verosimiglianza, è da riferirsi alla presenza del gel piastrinico stesso.

Profilo infiammatorio

Prima del sacrificio dei ratti, sono stati prelevati campioni di sangue 75 ore dopo il danno pleurico e dopo trattamento con gel piastrinico. Il siero ottenuto dopo centrifuga a 900 g è stato sottoposto ad analisi del profilo infiammatorio in 4 ratti dopo danno pleurico e in 6 ratti dopo trattamento con gel piastrinico. Mediante multiplexed sandwich ELISA sono state ricercate le seguenti citochine: IL-1alfa; IL-1beta; IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; TNF-alfa; INF-gamma; GM-CSF; i loro limiti inferiori di rilievo sono stati rispettivamente 1.6; 6; 6; 1.6; 6; 0.8; 6; 12; 1.6 pg/ml (SearchLight Rat Cytokine 9-Plex Array, Auson Biosystems, Billerica, MA, USA).

Una riduzione della concentrazione di tutti i fattori dell'infiammazione è stata rilevata negli animali trattati rispetto ai controlli. In particolare IL-2, IFN-gamma e TNF-alfa erano statisticamente significativi, mentre i valori degli altri fattori non raggiungevano la significatività statistica o risultavano al di sotto del limite di rilievo (Figura 3).

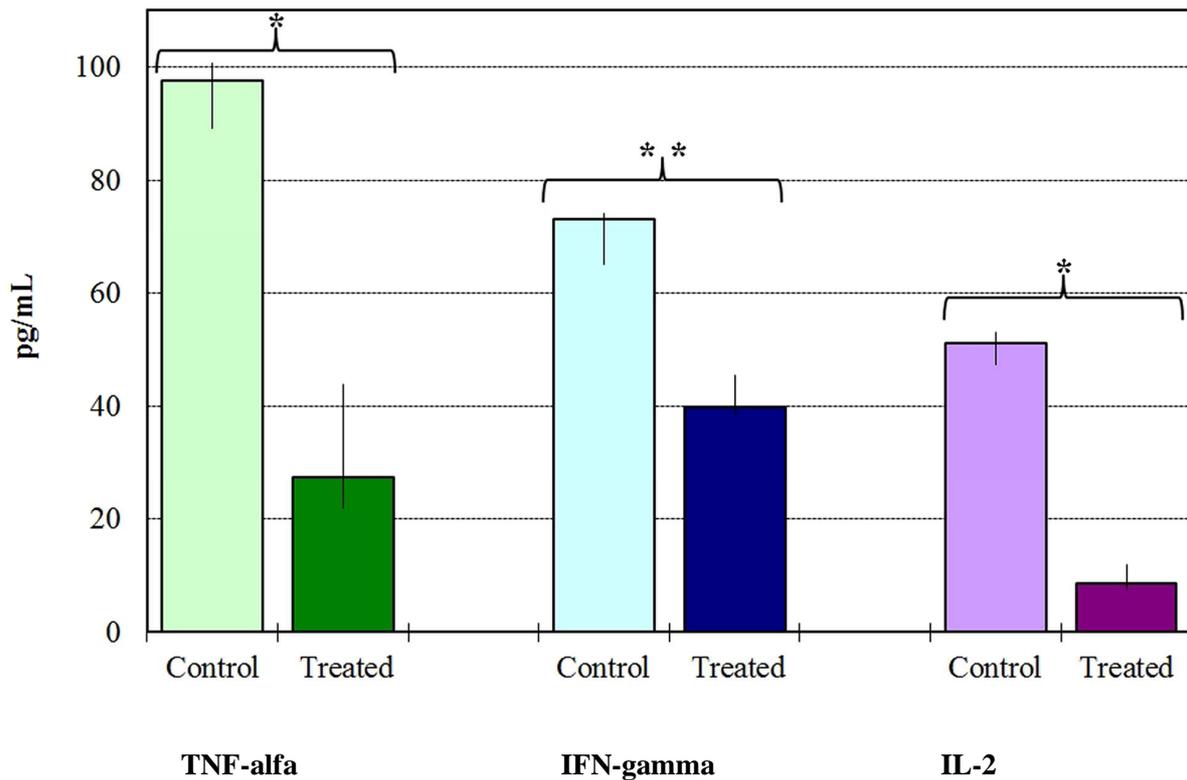


Fig 3. Concentrazione di TNF-alfa, IFN-gamma and IL-2 nel siero dei ratti a 75 hours after pleural damage (CG) e dopo trattamento con CBPG (TG). Fattori dell'inflammatione misurati mediante SearchLight assay (pg/mL; CG n=4, TG n=6; media e range). p ottenuto mediante t test per dati non appaiati. * $p < 0.0001$; ** $p < 0.0003$

Istologia descrittiva

Tutti i pezzi anatomici sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina, le sezioni comprendenti le lesioni parenchimali polmonari sono state valutate in cieco da un unico anatomopatologo..

Da ogni blocco di paraffina sono state eseguite 3 sezioni dello spessore di 4 micron e marcate con Ematossilina Eosina, Alcian blue, Pass e Calretinina.

Gruppo trattamento

L'analisi istologica sui polmoni campionati a livello dell'area di lesione, ha evidenziato i seguenti dati:

- la riparazione pleurica è visibile a 45 ± 1 ore di distanza dall'esecuzione del danno, ed è evidenziata dalla presenza del primo sottile lining mesoteliale di nuova sintesi;

- già dopo 75 ± 1 ore dalla lesione, alcuni campioni hanno mostrato una completa riparazione della superficie pleurica. Non è stato infatti possibile individuare l'area di danno, ma soltanto tessuto di nuova sintesi.
- nei preparati istologici è facilmente evidente la componente amorfa del gel piastrinico. Questa è ampiamente visibile a 45 ore di distanza dalla lesione e tende a rimanere costante con l'aumentare del grado di riparazione della lesione.

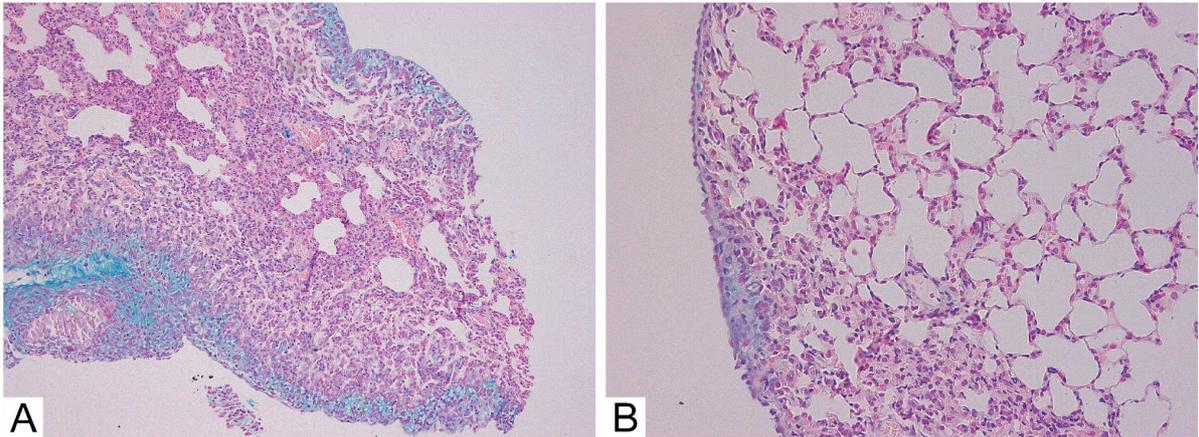


Fig.4 Vetrini colorati con Alcian blue 8GX in grado di evidenziare la presenza del gel piastrinicoA-B. Danno subpleurico tardivo con presenza di evidente materiale debolmente basofilo positivo a colorazione Alcian blue.

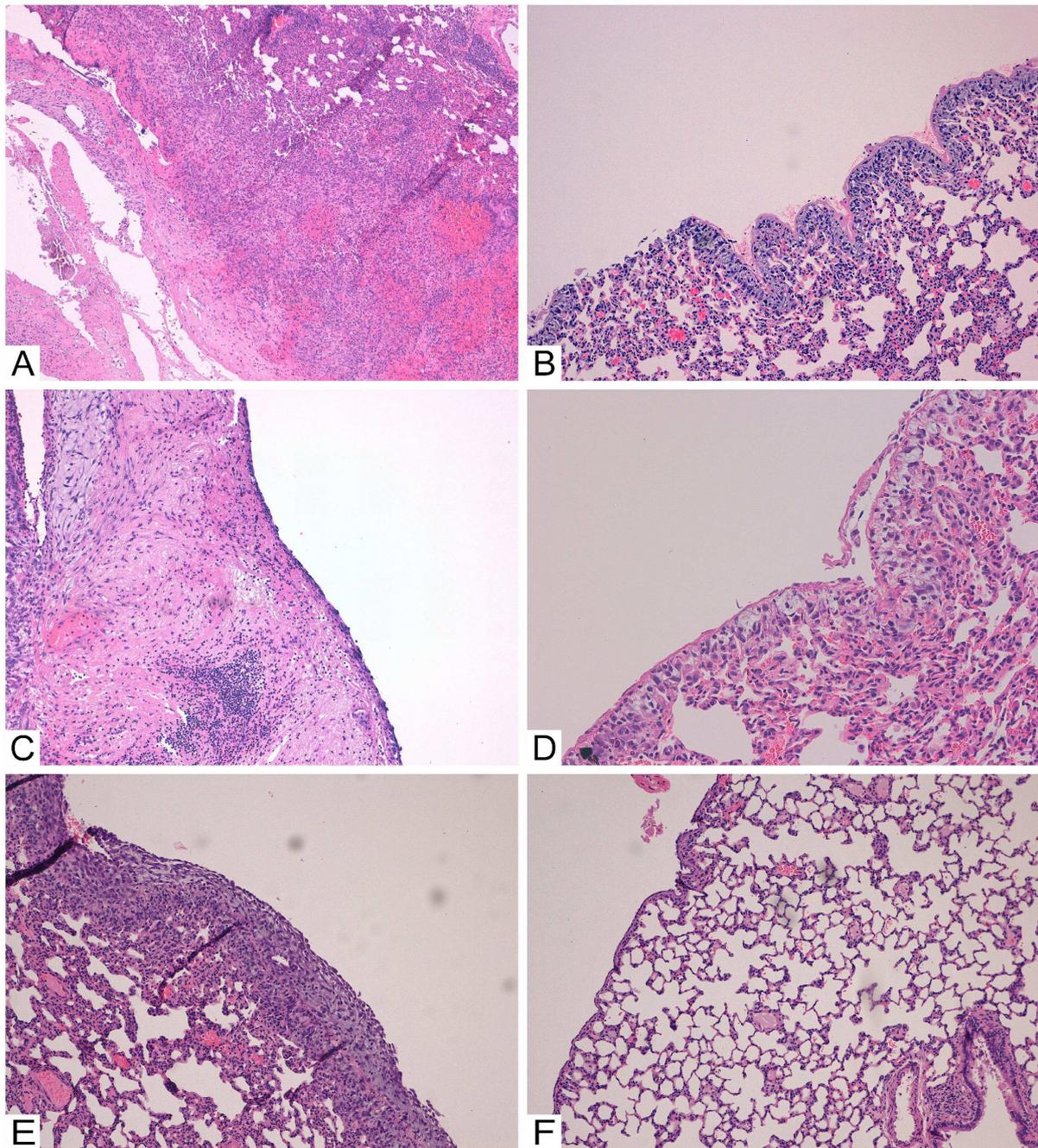


Fig.5 L'intero processo riparativo del danno pleurico nei casi trattati con gel piastrinico.

A. Danno subpleurico recente, caratterizzato da marcati stravasi emorragici, abbondante panno fibrino-emorragico associato a flogosi acuta e cronica e iperplasia fibroblastica.

B. Danno subpleurico, con presenza di evidente materiale debolmente basofilo, in precoce fase di rimesotelizzazione.

C. Danno subpleurico caratterizzato da panno fibrino-leucocitario con infiltrato linfoide associato. Inspessimento del tessuto connettivo subpleurico con proliferazione fibroblastica nel cui contesto si reperta materiale estraneo debolmente basofilo. Presenza di rimesotelizzazione solo focalmente.

D-E. Danno subpleurico, con presenza di evidente materiale debolmente basofilo, in avanzata fase di rimesotelizzazione.

F. Danno subpleurico non più visibile. Riparazione mesoteliale completa.

Gruppo controllo

L'analisi istologica sui polmoni campionati a livello dell'area di lesione, ha evidenziato i seguenti dati:

- abbiamo individuato un iniziale lining mesoteliale dopo circa 130 ± 2.5 ore dall'esecuzione del danno; sotto il nuovo strato cellulare è presente il danno acuto in fase di rimaneggiamento.
- diminuendo il tempo di lesione, oltre a non poter rintracciare nessun lining mesoteliale di nuova sintesi, abbiamo evidenziato il danno in fase più precoce.
- la guarigione completa è stata osservata a distanza di 160 ± 6 ore dalla lesione.

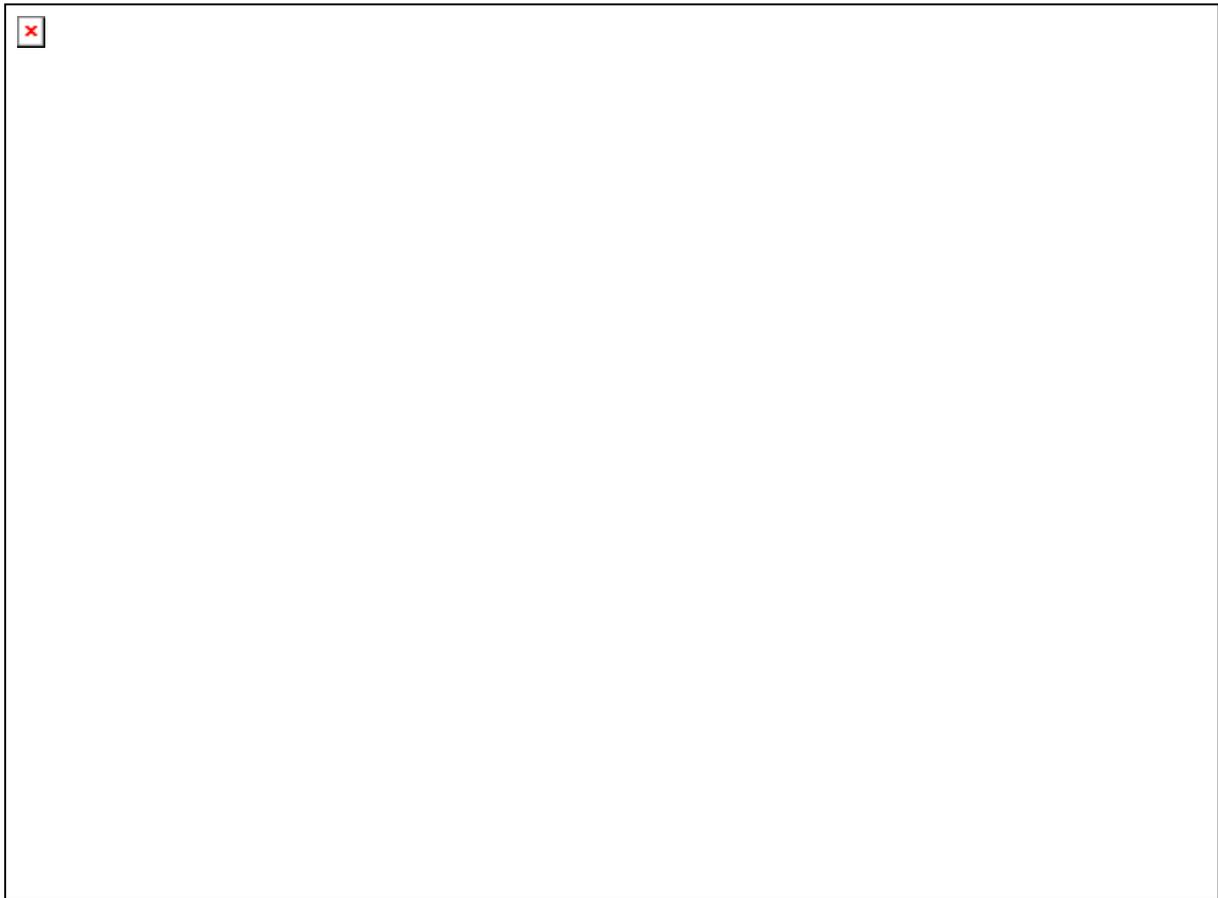


Fig.6 I vetrini mostrano il processo riparativo del danno parenchimale pleurico nei casi controllo.

- A. Danno subpleurico recente, caratterizzato da marcati stravasi emorragici, abbondante panno fibrino-emorragico associato a flogosi acuta e cronica e iperplasia fibroblastica.
- B. Danno subpleurico da panno fibrino-leucocitario associato a sparsa componente cicatriziale. Scarso grado di rimesotelizzazione.
- C. Danno subpleurico, in avanzata fase di rimesotelizzazione.
- D. Danno subpleurico non più visibile. Riparazione mesoteliale completa.

Soltanto tre campioni trattati con gel piastrinico (G1, G2, G3) e sacrificati a circa 90 ore non sono risultati riparati.

La spiegazione più plausibile di questo evento avverso è da imputare all'accidentale rimozione del gel durante le manovre di aspirazione del drenaggio sito nel cavo pleurico; la conferma di questa ipotesi è stata una sua mancata visualizzazione nei preparati istologici .

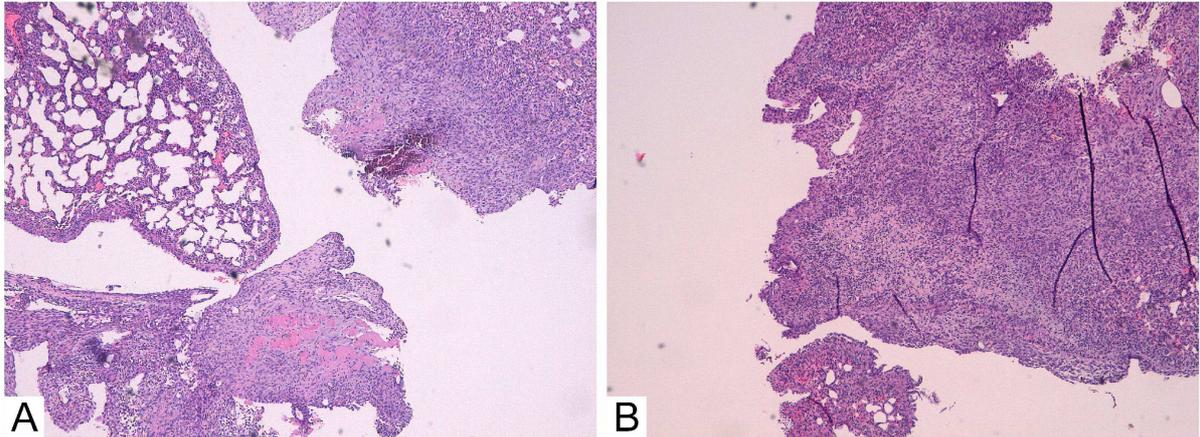


Fig.7 A-B In questo caso oltre a non poter identificare alcun processo riparativo, non è possibile nemmeno individuare il gel piastrinico.

4.4. Conclusioni dello studio

Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare l'effetto del gel piastrinico proveniente da cordone ombelicare, e il rilascio dei suoi fattori di crescita, sul processo di riparazione pleurica in seguito ad un danno parenchimale.

Nell'analisi dei risultati abbiamo incluso 53 ratti Wistar, escludendo i campioni deceduti per arresto cardiocircolatorio da ricollegare verosimilmente all'anestesia per via peritoneale.

Il gel piastrinico è stato valutato in numerosi modelli sperimentali e clinici di chirurgia ortopedica, vascolare e plastica con ottimi risultati; non abbiamo però potuto confrontare gli outcome ottenuti nel nostro lavoro con i dati della letteratura in quanto questo studio rappresenta la prima sperimentazione del gel piastrinico sui processi riparativi pleurici.

Dopo aver creato una lesione iatrogena standardizzata sul polmone sinistro del campione in studio (53 ratti Wistar), abbiamo posizionato il gel piastrinico sulla porzione polmonare lesionata nella coorte dei casi trattati; nei ratti presi come caso controllo invece non è stato posizionato nulla.

Una volta sacrificati i campioni a tempo scadenzato, l'analisi istologica sui vetrini ha evidenziato risultati decisamente promettenti.

L'utilizzo del gel piastrinico sembra ridurre il tempo di riparazione pleurica di quasi 2/3 rispetto ai controlli: il tempo di formazione del primo lining mesoteliale è risultato di 45 ± 1 ore nel gruppo trattato rispetto ad un valore medio di 130 ± 2.5 ore nel gruppo di controllo (HR 0.468; $p=0.0017$).

I ratti sacrificati intorno alle 45 ore hanno mostrato uno strato mesoteliale di nuova sintesi sopra all'area di danno che è rimasta comunque visibile.

A questi stessi orari nel gruppo di controllo non solo era ancora presente un danno in fase acuta, ma per di più non siamo stati in grado di individuare una ripresa di mesotelizzazione, neppure precoce.

Nel gruppo di controllo, infatti, abbiamo dovuto attendere le 130 ± 2.5 ore per poter visualizzare il nuovo strato di cellule. In questo caso il range di riparazione è stato ancora più ampio, fino a raggiungere addirittura le 160 ± 6 ore.

L'utilizzo del piastrinico riduce di circa il 60% il tempo di comparsa del primo strato mesoteliale.

Risulta diminuito anche il tempo totale di completamento del lining mesoteliale, con un guadagno del 41% circa.

Diversamente, nei casi controllo questo stesso risultato è stato raggiunto dopo 166 ore; il miglioramento in percentuale è stato di circa il 57%.

Per interpretare graficamente tutti questi dati abbiamo suddiviso il grado di completamento della riparazione in diversi stadi: lesione (stadio A), lining mesoteliale (stadio B), riparazione in atto (stadio C) e riparazione completa (stadio D).

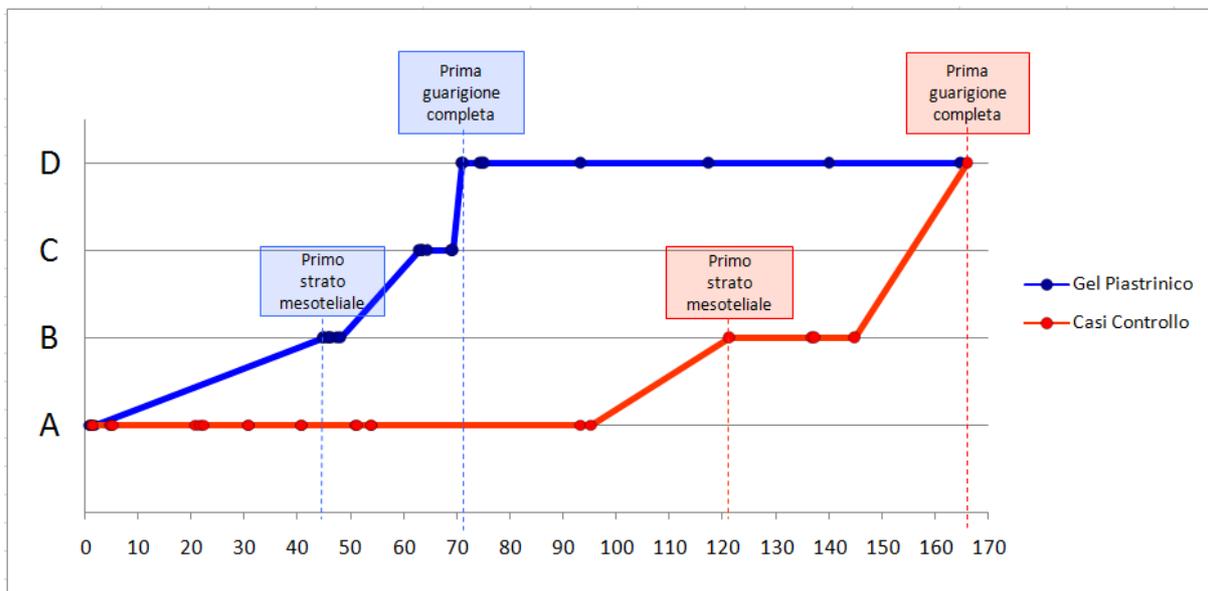
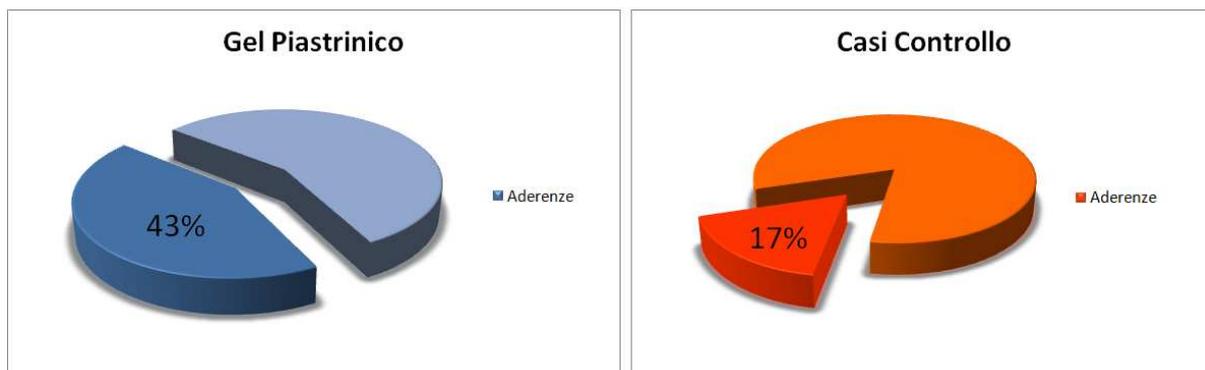


Fig.2 Stadi di riparazione della lesione nei due gruppi studiati, in relazione al tempo. Lungo la curva sono distribuiti tutti i casi studiati.

Legenda: A = lesione, B = lining mesoteliale, C = riparazione in atto, D = guarigione

Tra i risultati più promettenti di questo studio c'è stata l'osservazione diretta di aderenze pleuriche in sede di toracotomia nel 43% dei casi trattati con gel piastrinico rispetto al 17% dei casi controllo.



La presenza di aderenze porta ad una sigillatura del cavo pleurico più rapida, mediante l'ancoraggio del polmone alla parete.

Abbiamo ottenuto così un duplice risultato: da un lato si viene a creare una sorta di "tappo" che impedisce all'aria di uscire dal parenchima lesionato, dall'altra il polmone si vincola alla parete impedendo la possibilità di sviluppare pneumotorace.

In questo modo il gel piastrinico sembra intervenire positivamente nel controllo delle perdite aeree prolungate (PAL), diminuendo ulteriormente il rischio di formazione di cavo pleurico residuo.

L'uso di gel piastrinico non è stato associato allo sviluppo di alcuna complicanza.

In nessuno dei campioni studiati abbiamo avuto evidenza di cavo pleurico residuo o falde di pneumotorace, nemmeno alle immagini radiologiche.

Non sono state osservate complicanze toraciche, quali ad esempio emotorace, durante l'esplorazione del cavo pleurico nè si sono sviluppate infezioni.

Il gel piastrinico non rappresenta un materiale estraneo ed elimina per questo il rischio di fibroplasia, infiltrati infiammatori cronici e reazioni tissutali, come la formazione di granulomi.

Nonostante derivi da donatore, il fatto di utilizzare sangue proveniente da cordone ombelicale rende il gel meno immunogenico rispetto ad altre fonti e libero da toxoplasma e citomegalovirus.

Tutti i risultati ottenuti dal nostro studio sembrano promuovere l'utilizzo del gel piastrinico e dei suoi fattori di crescita nei processi riparativi del tessuto pleurico.

Ha permesso infatti di ridurre significativamente la durata della riparazione parenchimale in seguito a danno e sembra simulare lo sviluppo di aderenze pleuriche, particolarmente utili nella gestione delle perdite prolungate.

Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati mediante Test di Fisher, t-test per dati non appaiati e test di Cox utilizzando JMP software (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA)

Discussione

Perdite aeree prolungate (PAL) in seguito ad un intervento chirurgico polmonare maggiore sono ancora un'evenienza frequente che può allungare la degenza ospedaliera e incrementare i costi sanitari. PAL sono definite come la perdita d'aria da parte del tessuto polmonare residuo dopo la quarta, la quinta, la settima o la decima giornata, a seconda delle varie classificazioni.

L'incidenza, che si aggira intorno al 3-26% [Abolhoda, Liu, Brooks, e Burt, 1998], è stata riportata da numerosi studi in una popolazione eterogenea di pazienti sottoposti a intervento chirurgico per patologie polmonari benigne e maligne.

Considerando che la resezione anatomica radicale polmonare rimane tutt'oggi il cardine della terapia per il tumore non a piccole cellule, lo sviluppo di perdite aeree è una complicanza comune che il chirurgo toracico si trova a dover affrontare ogni giorno.

La persistenza di perdite aeree parenchimali e di spazio pleurico residuo può promuovere lo sviluppo di numerose gravi complicanze: provoca un aumento del tempo di mantenimento di drenaggio pleurico, associato a dolore e immobilizzazione, incrementa il rischio di sviluppo di pneumotorace, di infezioni, di fistole broncopleuriche e, conseguentemente, un prolungamento dei tempi di ospedalizzazione.

Sono stati descritti fattori di rischio multipli, ma predire quali pazienti svilupperanno PAL rimane ancora arduo. Determinare la prevalenza delle perdite aeree, identificarne i fattori di rischio, caratterizzare la loro durata e valutarne l'importanza clinica, potrebbe portare ad approcci più selettivi, capaci di diminuire l'occorrenza delle complicanze.

Per individuare i fattori che possano predire il rischio di PAL, sono state eseguite svariate analisi di alcune variabili: dalla letteratura emergono collegamenti fondamentali tra alcune variabili preoperatorie e lo sviluppo di perdite aeree prolungate nel post-operatorio.

Età superiore a 65 anni, il sesso maschile, presenza di aderenze pleuriche, bassi livelli preoperatori di FEV₁ e DLCO, le resezioni polmonari superiori con linfadenectomia ilo-mediastinica, diabete mellito, BMI e lo stato nutrizionale sono tutte quante condizioni particolarmente associate ad un aumento delle perdite aeree e quindi alle morbidità conseguenti.

I contributi accademici sembrano promuovere lo sviluppo di nuove pratiche intraoperatorie e postoperatorie di gestione del problema in grado di minimizzare l'outcome negativo, specialmente su una coorte di pazienti affetti da comorbidità già particolarmente diffuse nella popolazione generale.

Un'analisi dei fattori di rischio predittivi lo sviluppo di PAL non può però esaurire l'intera trattazione della problematica. In questo contesto infatti diventa particolarmente interessante studiare le metodiche utilizzate oggi per diminuire il verificarsi di questa complicanza.

Il dibattito riguardante l'opportunità di utilizzare nuove tecniche intraoperatorie per minimizzare le perdite aeree dopo chirurgia polmonare è diventato nel corso degli anni sempre più acceso: la letteratura accademica analizza questa tematica da parecchio tempo, così che il materiale a disposizione risulta particolarmente numeroso.

Gli studi condotti da Nomori [2003], Gómez-Caro [2007], Ng [2010], Refai [2011] sembrano tutti promuovere l'uso della tecnica intraoperatoria chiamata "fissureless", che permette di ovviare il problema delle scissure incomplete o addirittura fuse, mediante l'utilizzo di suturatrici meccaniche.

Rispetto ai metodi tradizionali, la tecnica "fissureless" ha dimostrato notevoli vantaggi, sia in termini di diminuzione delle perdite aeree, sia per quanto riguarda la durata della degenza ospedaliera.

Se da un lato è ormai confermato che le stapler forniscano un'emostasi affidabile, dall'altro non sempre riescono ad ottenere una chiusura ermetica tale da impedire delle perdite aeree; il rafforzamento (buttress) delle suturatrici con vari materiali è ormai una strategia utilizzata con lo scopo di diminuire e, forse, eliminare quest'inconveniente.

È stato inoltre calcolato che il costo aggiuntivo del rinforzo della linea di sutura è compensato dall'efficacia nel ridurre le perdite d'aria e conseguentemente dalla riduzione della durata del ricovero.

Diversi materiali sono stati proposti per il rinforzo delle linee di sutura, nonostante non ci sia ancora un'evidenza di un chiaro vantaggio di un dispositivo rispetto agli altri.

I due materiali più comunemente usati per questo rafforzamento sono il pericardio bovino e il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE): hanno caratteristiche simili, entrambi sono inerti e non biologici e soprattutto non sono stati segnalati aumenti del rischio di infezione pur essendo materiali estranei.

Hazelrigg [1997], Vaughn [1998], Stammberger [2000], Murray [2002], Rathinam [2009] hanno condotto studi clinico-sperimentali cardine nella valutazione dell'efficacia dei dispositivi di rafforzamento delle suturatrici meccaniche.

Nei diversi gruppi di trattamento, la durata media delle perdite aeree è risultata minore rispetto ai gruppi di controllo.

Anche per quanto riguarda i tempi di mantenimento dei drenaggi toracici i pazienti trattati hanno mostrato tempi significativamente più brevi.

Tutti i risultati della letteratura indagata sembrano raccomandare l'uso routinario di questi dispositivi di rafforzamento delle linee di sutura, in modo particolare sui pazienti considerati a rischio di perdite d'aria post-operatorie.

Non sempre si tiene conto, però, che l'utilizzo di pericardio bovino incrementa il rischio, seppure ancora soltanto teorico, di encefalopatia spongiforme trasmissibile: l'OMS ha raccomandato di evitare, quando possibile, capi di bestiame per produrre prodotti medici.

Tutte le resezioni polmonari che richiedono dei tagli lungo il parenchima polmonare per liberare le scissure e i vari piani interlobari possono provocare potenziali perdite d'aria.

Queste si sigillano più rapidamente quando il danno parenchimale a livello della pleura viscerale è portato direttamente in apposizione alla pleura parietale, affinché la superficie del polmone venga "tappata" dal contatto stesso con la pleura parietale.

Nei pazienti sottoposti a resezione polmonare, e specialmente a lobectomia superiore con sviluppo di un ampio spazio aereo pleurico residuo, le due superfici pleuriche non si giustappongono. Ciò porta spesso a frustranti perdite aeree prolungate con aumento della morbilità e della durata dell'ospedalizzazione.

Per ovviare a questo problema è stata proposta la tecnica del tendaggio pleurico (pleural tenting): quando la pleura viscerale non si appoggia alla pleura parietale, quest'ultima può essere spostata giù verso il polmone per riapprossimare le due superfici e sigillare le perdite aeree, obliterando quindi lo spazio residuo intrapleurico.

I risultati dei primi studi effettuati da Robinson [1998], successivamente confermati da Okur [2001] e Brunelli [2002], sembrano incoraggiare l'uso routinario del pleural tent durante resezioni polmonari maggiori in pazienti a rischio, ogni qualvolta ciò sia tecnicamente possibile.

Il tendaggio pleurico risulta essere inoltre una procedura semplice, molto veloce da eseguire, e, da quanto appare in questi studi, non associata ad alcuna morbosità.

Una corretta gestione delle perdite aeree però non si basa soltanto sulle tecniche chirurgiche da riprodurre in sala operatoria. Esistono altre metodiche alternative, come ad esempio l'utilizzo di sigillanti chirurgici.

Per l'uso sul tessuto polmonare, il sigillante ideale dovrebbe essere in grado di adattarsi alla particolare superficie dell'organo e quindi essere elastico in modo da consentire la riespansione parenchimale. Dovrebbe avere una buona biocompatibilità, senza provocare alcuna lesione tissutale o alterare il processo di guarigione. Dovrebbe essere biodegradabile, senza alcun rischio di trasmissione infettiva ed infine dovrebbe essere facile da usare.

I trial clinico-sperimentali sull'argomento citano una vastissima gamma di sigillanti chirurgici: Belda-Sanchís [2010] ha pubblicato una review, confrontando l'efficacia dei dispositivi maggiormente utilizzati.

Test in vitro hanno dimostrato che cianoacrilato (es. Glubran®) ha probabilmente la maggiore forza adesiva, tuttavia non è biologico e non è assorbibile; inoltre, costituisce una barriera impenetrabile, rigida e senza elasticità. Pertanto un suo utilizzo non dovrebbe essere incoraggiato, almeno in chirurgia polmonare.

A differenza del TachoSil® che ha dimostrato risultati accettabili, i diversi studi effettuati sul CoSeal® hanno evidenziato un tempo maggiore per la cessazione delle perdite d'aria, per la rimozione dei drenaggi toracici e un aumento della durata dell'ospedalizzazione, sconsigliando quindi l'utilizzo di questo dispositivo in chirurgia toracica.

Il sigillante più utilizzato e testato in chirurgia rimane quindi la colla di fibrina (fibrin glue). Numerose pubblicazioni ne riportano l'efficacia nel prevenire o ridurre le perdite aeree in seguito a interventi sul parenchima polmonare, quando è sistematicamente usata.

Sigillanti fibrinici convenzionali utilizzano composti preparati da pool di plasma umano (trombina, fibrinogeno); qualche volta hanno derivazione animale (trombina o aprotinina bovina), portando ad un potenziale rischio di trasmissione di infezioni (HBV, HCV, HIV-1, CJD, BSE) ed aumentando la possibilità di reazioni immunologiche.

Da ciò è sorta la necessità di creare composti di tipo autologo (es. Vivostat®) ma d'altra parte è anche stato dimostrato che preparati industriali siano più efficaci grazie alla maggiore concentrazione di fibrinogeno.

La review di Belda-Sanchis analizza 16 trial prospettici randomizzati che prendono in esame l'efficacia dei principali sigillanti utilizzati in chirurgia polmonare ed in dodici di questi vi è una differenza statisticamente significativa nella riduzione delle perdite aeree ma solo in tre è evidente un vantaggio in termini di riduzione della degenza ospedaliera.

La maggior parte di questi studi presenta una coorte di pazienti esigua che non consente conclusioni definitive; questo implica per la ricerca futura la necessità di più grandi studi clinici randomizzati controllati con criteri omogenei sul tipo di sigillante, metodi di produzione e selezione dei pazienti al fine di produrre dati attendibili sulla utilità dei sigillanti.

Negli ultimi anni è stata proposta da diversi Centri la pleurodesi con sangue autologo (blood patch) come una tecnica efficace, poco costosa, di pronto impiego e ben tollerata per il trattamento delle PAL. Il blood patch agisce probabilmente mediante due meccanismi: un effetto diretto sulla perdita d'aria grazie alla formazione di coaguli e un effetto di pleurodesi che si verifica in seguito tramite irritazione della pleura e conseguente formazione di aderenze infiammatorie.

Robinson [1987], Dumire, Lang [2004], Droghetti [2006], Shackcloth [2006], Andreetti [2007], Ozpolat [2010] hanno dimostrato negli anni, attraverso i loro trial clinici, ottimi risultati sulla diminuzione delle perdite aeree con questa semplice tecnica. Tuttavia l'utilizzo di questa metodica rimane controversa per la notevole quantità di sangue necessario per ottenere un risultato soddisfacente (150 ml) che di fatto è considerato un ottimo terreno di coltura per i batteri.

L'analisi dei risultati ottenuti dall'utilizzo di queste metodiche portano ad effettuare una considerazione di fondo: gli effetti attesi sono prevalentemente legati alle proprietà meccaniche dei diversi devices ma nessun supporto viene dato al tessuto pleurico danneggiato per favorire la sua rapida guarigione. Infatti nessuno di questi prodotti o procedure prevede l'utilizzo di fattori di crescita, che di fatto promuovono e supportano la rigenerazione tissutale. Proprio in questo contesto un approccio innovativo come il gel piastrinico risulta potenzialmente vincente in quanto combina le proprietà meccaniche delle piastrine con il rilascio di fattori di crescita.

E' ampiamente dimostrato che le piastrine rilasciano diversi fattori di crescita contenuti nei granuli citoplasmatici come PDGF-AB, PDGF-BB, TGF-beta1, bFGF, HGF, VRGF.

In questo studio abbiamo valutato l'utilizzo del gel piastrinico, ottenuto da sangue placentare, nel processo di riparazione del mesotelio perché unisce un ottimale supporto meccanico a una combinazione di fattori di crescita/citochine ideali per la guarigione del danno tissutale.

Il gel piastrinico è già stato valutato in numerosi modelli sperimentali e clinici di chirurgia ortopedica, vascolare, neurologica e plastica, con risultati contraddittori.

Plasma ricco di piastrine (PRP) è definito come il volume di plasma derivante da sangue autologo, avente una concentrazione di piastrine superiore a 200000 piastrine/ μ L, le quali possono essere attivate per formare gel piastrinico e rilasciare fattori di crescita a scopo terapeutico; contiene inoltre proteine in grado di agire come molecole di adesione cellulare, matrice ossea, tessuto connettivo e migrazione epiteliale.

L'uso di gel piastrinico appare sicuro e realmente applicabile, avendo dimostrato un significativo potenziale nell'accelerazione dei processi di riparazione ossea e nella guarigione delle ferite, specialmente nelle fasi iniziali: plasma ricco in piastrine (PRP) favorisce la rigenerazione tissutale grazie agli α -granuli contenuti nelle piastrine.

Il rilascio dei diversi fattori di crescita dai granuli piastrinici (TGF- α , TGF- β , PDGF, IL-1, e FGF) è il promotore di tutta la cascata riparativa.

Rispetto ad applicazioni di singoli fattori di crescita ricombinanti, il gel piastrinico ha il vantaggio di offrire fattori di crescita multipli, capaci di agire in modo sinergico nel promuovere la mitogenesi di cellule staminali.

I brillanti risultati ottenuti però non permettono di giustificare l'utilizzo del gel piastrinico in tutti i campi medici: la letteratura infatti non ne raccomanda l'uso né sulla ricostruzione microchirurgica dei danni nervosi né tantomeno sulla riduzione delle complicanze in seguito a chirurgia mammaria oncologica, funzionale o estetica.

La cinetica di rilascio dei fattori di crescita contenuti nel piastrine e la valutazione empirica ottenuta con il test in vitro dello scratch assay su mesotelio autologo, ha permesso di sottolineare la reale efficacia in laboratorio dell'utilizzo di questo dispositivo nei processi riparativi del danno tissutale pleurico.

È seguita poi la sperimentazione in vivo, nella quale abbiamo messo a punto un modello animale che ha portato ad ottenere l'esecuzione di un danno standardizzato sulla superficie del polmone sinistro facilmente riproducibile sul quale è stato poi applicato il gel piastrinico. Al sacrificio dei campioni a tempistica scadenzata, per confrontare la rigenerazione tissutale rispetto al gruppo di controllo, è seguita l'analisi istologica della porzione polmonare presa in esame, mostrando risultati decisamente promettenti.

L'utilizzo del gel piastrinico, infatti, sembra ridurre il tempo di riparazione pleurica di quasi 2/3 rispetto ai casi controllo, con una diminuzione che si attesta intorno al 60% ($p=0.0017$).

Il lining mesoteliale è stato individuato in diversi gradi di completamento, in un range compreso tra le 45,10 ore e le 48,25 ore.

A questi stessi orari nel gruppo di controllo non solo era ancora presente un danno in fase acuta, ma per di più non siamo stati in grado di individuare ripresa di mesotelizzazione, neppure precoce. Nel gruppo di controllo abbiamo dovuto attendere infatti le 121,45 ore prima di poter visualizzare il nuovo strato cellulare.

Abbiamo osservato una guarigione completa dei campioni trattati con gel piastrinico già a partire dalla 71° ora, con un miglioramento in percentuale del 57% rispetto a quanto accaduto nei controlli, dove lo stesso risultato è stato raggiunto dopo 166 ore.

Tra i risultati più promettenti di questo studio c'è stata l'osservazione diretta di aderenze pleuriche in sede di toracotomia nel 43% dei casi trattati con gel rispetto al 17% ($p=0.0505$) dei casi controllo.

La presenza di aderenze porta ad una sigillatura del cavo pleurico più rapida, mediante l'ancoraggio del polmone alla parete.

Abbiamo ottenuto così un duplice risultato: da un lato si viene a creare una sorta di "tappo" che impedisce all'aria di uscire dal parenchima lesionato, dall'altra il polmone si vincola alla parete impedendo la possibilità di sviluppare pneumotorace.

In questo modo il gel piastrinico sembra intervenire in modo positivo nel controllo delle perdite aeree prolungate (PAL), diminuendo ulteriormente il rischio di formazione di cavo pleurico residuo.

In nessuno dei campioni studiati abbiamo avuto evidenze di cavo pleurico residuo o falde di pneumotorace, nemmeno alle immagini radiologiche. Non sono state osservate complicanze

toraciche, quali ad esempio emotorace, durante l'esplorazione del cavo pleurico né si sono sviluppate infezioni.

Il gel piastrinico non rappresenta un materiale estraneo e per questo elimina il rischio di fibroplasia, infiltrati infiammatori cronici e reazioni tissutali.

Nonostante derivi da donatore, il fatto di utilizzare sangue proveniente da cordone ombelicale rende il gel meno immunogenico rispetto ad altre fonti e libero da toxoplasma e citomegalovirus.

Un altro importante effetto rilevato negli animali trattati con gel piastrinico in questo modello è la riduzione di alcuni fattori dell'infiammazione, quali IL-2, TNF-alfa e INF-gamma. Tali fattori sono coinvolti in modo cruciale nel processo di guarigione di ferita che sappiamo essere legato all'equilibrio fra fattori di crescita e riduzione dei fattori dell'infiammazione.

Tutti i risultati ottenuti dal nostro studio in vitro ed in vivo sembrano promuovere l'utilizzo del gel piastrinico proveniente da sangue di cordone ombelicale e dei suoi fattori di crescita nei processi riparativi del tessuto pleurico.

Utilizzando come basi le informazioni ottenute dal presente lavoro, si pone la necessità futura di continuare la sperimentazione al fine di aumentare la casistica e di consolidare gli ottimi risultati finora ottenuti. Questo studio inoltre apre la strada a trial clinici sull'uomo per confrontare l'efficacia del gel piastrinico nella riparazione del danno pleurico rispetto ai presidi attualmente disponibili nella pratica clinica.

Bibliografia

- 1) Abolhoda A, Liu D, Brooks A, Burt M. Prolonged air leak following radical upper lobectomy: an analysis of incidence and possible risk factors. *Chest* 1998; **113**: 1507-10.
- 2) Varela G, Jiménez MF, Novoa N, Aranda JL. Estimating hospital costs attributable to prolonged air leak in pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; **27**: 329-33.
- 3) Brunelli A, Monteverde M, Borri A, et al. Predictors of prolonged air leak after pulmonary lobectomy. *Ann Thoracic Surg* 2004; **77**: 1205-10.
- 4) Cerfolio RJ, Bass CS, Pask AH, Kartholi CR. Predictors and treatment of persistent air leaks. *Ann Thorac Surg* 2002; **73**: 1727-30.
- 5) Gómez-Caro A, Calvo MJ, Lanzas JT, et al. The approach of fused fissures with fissureless technique decreases the incidence of persistent air leak after lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; **31**: 203-8.
- 6) Refai M, Brunelli A, Salati M, et al. Efficacy of anterior fissureless technique for right upper lobectomies: a case-matched analysis. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2011; **39**: 1043-6.
- 7) Montana M, Tabélé C, Curti C, et al. Organic glues or fibrin glues from pooled plasma: efficacy, safety and potential as scaffold delivery systems. *J Pharm Pharm Sci* 2012; **15**: 124-40.
- 8) Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg* 2001; **182**: 1S-7S.
- 9) Manley K, Coonar A, Wells F, Scarci M. Blood patch for persistent air leak: a review of the current literature. *Curr Opin Pulm Med* 2012; **18**: 333-8.
- 10) Roy S, Driggs J, Elgharably H, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen* 2011; **19**: 753-66.
- 11) Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; **91**: 4-15.
- 12) Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2007; **16**: 156-65.
- 13) Greppi N, Mazzucco L, Galetti G, et al. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals* 2011; **39**: 73-80.
- 14) Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang* 2008; **94**: 202-8.

- 15) Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, et al. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 2012; **28**: 429-39.
- 16) Parazzi V, Lazzari L, Rebulli P. Platelet gel from cord blood: a novel tool for tissue engineering. *Platelets* 2010; **21**: 549-54.
- 17) Borzini P, Mazzucco L, Giampaolo A, et al. Platelet gel - the italian way: a call for procedure standardization and quality control. *Transfus Med* 2006; **16**: 303-4.
- 18) Kastl S, Kotschenreuther U, Hille B, et al. Simplification of rat intubation on inclined metal plate. *Adv Physiol Educ* 2004; **28**: 29-32.
- 19) Belda-Sanchís J, Serra-Mitjans M, Iglesias Sentis M, Rami R. Surgical sealant for preventing air leaks after pulmonary resections in patients with lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010; **20**: CD003051.
- 20) Wirz S, Dietrich M, Flanagan TC, et al. Influence of Platelet-derived growth factor-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels. *Tissue Eng* 2011; **17**: 1891-9.
- 21) Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010; **5**: e9016.
- 22) Brunetti ND, Munno I, Pellegrino PL, et al. Inflammatory cytokines imbalance in the very early phase of acute coronary syndrome: correlations with angiographic findings and in-hospital events. *Inflammation* 2011; **34**: 58-66.
- 23) Kobayashi H, Sekine T, Nakamura T, Shimizu Y. In vivo evaluation of a new sealant material on a rat lung air leak model. *J Biomed Mater Res* 2001; **58**: 658-65.

