

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Nuove tecniche e tecnologie (open, videoassistite e robotiche) in chirurgia epato-bilio-pancreatica e gastroenterologica avanzata.

XXII Ciclo

**Sviluppo di una protesi biocompatibile
per la sostituzione del coledoco: studio
pre-clinico sul suino.
Fattibilità chirurgica e biocompatibilità.**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Mario Sianesi

Tutor:
Chiar.mo Prof. Paolo Soliani

Dottorando: Dr.ssa Sara Gobbi

Ringrazio Antonello Romani per l'indispensabile aiuto prestato per la compilazione di questa tesi.

INTRODUZIONE

Gruppo di ricerca

Questo studio fa parte di un progetto di ricerca triennale sulla medicina rigenerativa, condotto dal Dipartimento Chirurgico dell'Università di Parma, in collaborazione con i Dipartimenti di Medicina Sperimentale, Farmaceutica e di Salute Animale, dal titolo: “*NEOPLASTIC, TRAUMATIC AND DEGENERATIVE/FLOGISTIC DISEASES OF BILIARY TRACT: NEOBILIARY DUCT DEVELOPMENT*”. In particolare, questa tesi analizza i risultati del secondo anno del progetto.

Il gruppo di ricerca, interdisciplinare, ha coinvolto:

1. *Prof. Mario Sianesi e Paolo Soliani, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Sezione di Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo*
2. *Prof. Pellegrino Crafa, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Anatomia e Istologia Patologica*
3. *Prof. Ruggero Bettini, Dipartimento Farmaceutico*
4. *Prof. Angelo Borghetti, Dipartimento di Medicina Sperimentale*
5. *Prof. Paolo Botti, Dipartimento di Salute Animale*

Scopo del progetto

Lo scopo del progetto era quello di sviluppare e rigenerare parti della vie biliare principale, per riparare danni iatrogeni, traumatici o per ricostruire la via biliare dopo resezione per neoplasia. In particolare, in questa fase, è stata valutata la fattibilità chirurgica e la biocompatibilità della sostituzione protesica del coledoco, impiantando una protesi riassorbibile dopo resezione della via biliare principale (VBP) nel maiale. Il razionale era quello di trovare un sistema di riparazione della VBP che ricostituisse l'anatomia e che riducesse le complicanze infettive e ostruttive che gravano l'intervento di epatico-digiunostomia. Le attuali opzioni terapeutiche in caso di lesione del coledoco nell'uomo infatti sono: la sutura diretta, non sempre possibile per ragioni anatomiche e di vascolarizzazione, o le anastomosi tra via biliare e intestino tenue (principalmente l'epatico-digiunostomia). Le anastomosi bilio-digestive tuttavia sono gravate da un alto tasso di complicanze precoci e tardive, come la stenosi e le colangiti, che le rendono una soluzione tutt'altro che ottimale.

Il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Parma ha sintetizzato una protesi biocompatibile, apirogena, con struttura, consistenza e porosità ottimale, per essere utilizzata come valido sostituto dell'epatico-digiunostomia. Durante la fase del progetto oggetto di questa tesi, la protesi è stata testata in vivo sui maiali, per valutare la fattibilità chirurgica, la biocompatibilità e il tasso in complicanze, in previsione di test sull'uomo e successiva produzione della protesi su scala industriale.

Le protesi biologiche - Cenni di ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale rappresenta una branca della medicina rigenerativa ed è attualmente considerata un'importante strategia terapeutica per il trattamento delle patologie degenerative tissutali e delle insufficienze d'organo. Si tratta di una scienza multidisciplinare, che applica ed integra i principi ed i metodi propri dell'ingegneria e della biologia molecolare allo scopo di sviluppare, a partire da componenti sia sintetici che naturali, sostituti biologici capaci di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di tessuti ed organi danneggiati. L'approccio più comune per l'ingegnerizzazione di sostituti biologici si basa sulla combinazione di biomateriali, cellule e molecole bioattive. Si definiscono biomateriali i materiali concepiti e sviluppati per interfacciarsi con i sistemi biologici per supportare o sostituire un tessuto, organo o funzione del corpo.

Le cellule forniscono la matrice biologica su cui si svilupperà il tessuto che si intende sostituire, e nel contempo saranno esse stesse componenti del tessuto neoformato. Il biomateriale fornirà l'impalcatura (tridimensionale) necessaria ad un corretto sviluppo del tessuto da sostituire, nonché un solido supporto su cui le cellule potranno aderire, proliferare e differenziarsi. Le molecole bioattive, rilasciate dallo scaffold (piattaforma tridimensionale), sostengono e promuovono sia la proliferazione che il differenziamento delle cellule. Nell'ottica di questo approccio integrato il biomateriale non solo fornisce una temporanea piattaforma tridimensionale funzionale allo sviluppo del neo-tessuto ma anche un sistema di rilascio controllato per un'ottimale presentazione, concentrazione e distribuzione delle molecole bioattive.

Per venire incontro a questa funzionalità, la piattaforma tridimensionale, o scaffold, dovrebbe possedere i seguenti requisiti:

1. biocompatibilità con i tessuti con i quali viene a contatto, ovvero la capacità di determinare nei tessuti circostanti una risposta favorevole alla sua presenza
2. biodegradabilità (e/o bioassorbibilità), ovvero velocità di degradazione comparabile alla velocità di formazione del nuovo tessuto
3. non-tossicità e scarsa o nulla immunogenicità
4. biofunzionalità, ovvero la proprietà di riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico
5. adeguata porosità e microstruttura tridimensionale per un efficace ed efficiente trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e molecole bioattive tra l'ambiente esterno e lo scaffold, e viceversa

Le insufficienze d'organo o tissutali sono responsabili di quasi la metà delle spese sanitarie sostenute dalla maggior parte dei Paesi occidentali. Traumi e malattie di varia natura possono coinvolgere tessuti come la pelle o il midollo osseo, o colpire organi complessi quali i reni, il fegato o il cuore. Le opzioni terapeutiche a disposizione per malattie di tipo organico sono rappresentate dalla terapia medica, dalla chirurgia riparativa o ricostruttiva, dai supporti protesici o meccanici e, in ultima analisi, dal trapianto. L'uso di supporti protesici o meccanici non determina, nella maggior parte dei casi, una completa "restitutio ad integrum" delle funzioni dell'organo o del tessuto danneggiato ed è gravata da numerose complicanze, in particolare può essere veicolo di infezioni sistemiche.

Dagli anni '60, grazie allo sviluppo di nuovi polimeri sintetici, sono state sviluppate ed utilizzate nell'uomo protesi eterologhe per la sostituzione o riparazione di organi cavi. Attualmente sono disponibili protesi a base di polimeri sintetici biodegradabili come poliesteri appartenenti alla famiglia dell'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) o il policaprolattone (PCL). Alcune protesi costruiti con questi materiali sono commercialmente disponibili. La peculiarità di questi polimeri è rappresentata dalla loro scarsa immunogenicità che rende queste protesi tollerabili dall'organismo, associata ad una relativa assenza di effetti collaterali. Lo svantaggio principale di queste protesi eterologhe sintetiche è rappresentato dalla loro bassa capacità di integrazione biologica, che ne determina un'utilizzo temporaneo. Inoltre le protesi eterologhe sintetiche sono esposte a rischio di infezione batterica, e perdono gradualmente nel tempo le loro proprietà meccaniche.

Occorre ricordare che, dal punto di vista biologico le protesi sintetiche sono inerti, incapaci quindi di produrre una risposta biologica che porti ad una progressiva integrazione e successiva sostituzione con tessuto biologico. Questa relativa inerzia è dovuta principalmente all'assenza di biomimetismo.

Negli ultimi anni le applicazioni di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa hanno guardato con particolare attenzione i polimeri naturali, in particolare quelli su base polisaccaridica. Il chitosano è un derivato parzialmente deacetilato della chitina, ad alto peso molecolare ed è il secondo polimero naturale più abbondante. È un polisaccaride lineare composto da *N*-acetil-glucosamina e glucosamina legate mediante legame $\beta(1-4)$ glicosidico. Il rapporto tra le unità di glucosamina e *N*-acetil-glucosamina viene definito come grado di deacetilazione. Il peso molecolare può variare tra 300 a oltre 2000 kD, mentre il grado di deacetilazione può variare tra il 30% ed il 98%. La natura cationica del chitosano è responsabile delle interazioni elettrostatiche con molecole cariche negativamente quali i glicosamminoglicani anionici e proteoglicani.

Razionale e potenziale terapeutico

Le lesioni del Coledoco o via biliare principale (VBP) sono associate con la maggior parte degli interventi chirurgici dell'addome superiore, in particolare quelle che coinvolgono le vie biliari; la maggior parte delle lesioni descritte in Letteratura riguardano complicanze della colecistectomia laparoscopica (VLC)¹. Le lesioni della VBP correlate a VLC sono considerate un vero disastro sanitario e finanziario², poiché la loro riparazione può richiedere da 4.5 a 26 volte i costi di una procedura non complicata, ma soprattutto sono gravate da una mortalità significativa.

L'incidenza di lesioni iatrogene della VBP in Letteratura si colloca intorno allo 0.5-0.6%; uno studio su 56.591 pazienti sottoposti a VLC tra gennaio 1998 e dicembre 2000, in 184 Ospedali in Italia, riporta un'incidenza di lesioni della VBP dell' 0.42%³.

Per quanto riguarda il colangiocarcinoma extraepatico, i dati del National Cancer Institute di Bethesda (USA) indicano che l'incidenza rimane costante attorno all'1% negli ultimi 30 anni. Inoltre una recente pubblicazione⁴ le complicanze biliari in 517 pazienti sottoposti a trapianto di fegato erano: 13.3% di fistole biliari, 6.6% di stenosi anastomotica e 10% di peritoniti biliari. Il trattamento standard delle patologie neoplastiche, degenerative o flogistiche delle vie biliari che causano stenosi della VBP consiste nella resezione del dotto biliare extraepatico e

nel confezionamento di anastomosi tension-free tra il moncone biliare e l'intestino (epatico-digiunostomia su ansa ad Y). Spesso tale trattamento è gravato da complicanze settiche (colangiti) e/o stenosi anastomotiche: le colangiti postoperatorie riguardano l'8-22% dei pazienti sottoposti ad epatico-digiunostomia⁵ dopo ricostruzione della VBP, e più del 50% dei pazienti pediatrici dopo intervento di Kasai per atresia biliare⁶, risultando una delle complicanze più comuni della chirurgia epato-biliare.

Il trattamento delle patologie neoplastiche o flogistiche, che causano stenosi della via biliare principale, attualmente consiste nella resezione del dotto biliare extra-epatico e nell'anastomosi tra il moncone del dotto biliare e l'intestino (epatico-digiunostomia su ansa ad Y sec. Roux).

Questo intervento è gravato da frequenti complicanze settiche (colangiti) e da stenosi anastomotica. La mortalità delle colangiti non trattate si avvicina al 100%, si riduce con trattamento appropriato ma rimane intorno al 20-25%. Complicanze simili avvengono nel rigetto cronico di allotrapianto di fegato.

L'obiettivo di questo studio è quello di riparare la VBP ricostruendone l'anatomia e riducendo le complicanze infettive e ostruttive che gravano l'intervento di epatico-digiunostomia. Una protesi apirogena, biocompatibile è stata testata sui maiali per valutare la fattibilità chirurgica ed il tasso di complicanze, in previsione di test clinici sull'uomo e la successiva produzione della protesi su scala industriale.

METODI

Sviluppo, validazione e caratteristiche fisico-chimiche della protesi tubulare

Lo scaffold polimerico tubulare è stato prodotto versando una soluzione di chitosano, preparata secondo le indicazioni già descritte nel brevetto WO2008/077949^{13,14}, in uno stampo appositamente costruito. La soluzione è stata gelificata in accordo a quanto descritto nel brevetto sopracitato. La riproducibilità del metodo di costruzione della protesi è stata valutata testando la costanza delle caratteristiche fisiche della protesi, quali: idrofilia, grado di cristallinità, porosità e rugosità della superficie. Inoltre sono stati condotti esperimenti di permeabilità utilizzando celle di Franz¹³ nel cui compartimento donatore veniva versata una soluzione di bile concentrata. Ogni 12 ore è stato effettuato un prelievo di soluzione nel compartimento ricevente e misurata la quantità di bile e/o acidi biliari presenti in essa. La quantificazione dei sali biliari presenti nel prelievo è stata effettuata con un metodo colorimetrico; è stata inoltre valutata la permeabilità dello scaffold a nutrienti quali aminoacidi, zuccheri, nucleosidi e fattori di crescita. Sono state valutate le caratteristiche strutturali della protesi mediante misure del modulo elastico e di allungamento alla rottura (prove di stress meccanico).

Citotossicità in vitro della protesi

Il test di citotossicità è stato condotto secondo le indicazioni descritte nelle norme ISO10993, allegato 5. Questo test determina la reattività biologica di una coltura di cellule di mammifero (fibroblasti), valutando la loro crescita in piastre di Petri, in presenza della protesi, mediante test diretto, indiretto e estrazione. Le cellule saranno valutate mediante un punteggio relativo a proliferazione, vitalità ed effetti citopatici quali l'apoptosi e la necrosi.

Test non funzionali in vivo

I test non-funzionali in vivo sono stati condotti secondo le indicazioni descritte nelle norme ISO10993, allegato 6. Gli effetti locali della protesi sono stati testati mediante impianto della protesi tra i fasci muscolari dorsali paramediani di coniglio. I parametri macroscopici e microscopici che sono stati verificati sono: presenza di fibrosi, degenerazione, presenza di cellule fagocitiche, necrosi, infiltrazione adiposa e presenza di frammenti della protesi.

Test Funzionali in vivo

Selezione degli animali e preparazione all'intervento

Gli esperimenti sull'animale sono stati condotti in accordo con la Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio (NIH Pubblicazione 85-23, revisione 1996) e approvati dal Comitato etico veterinario locale.

Presso il Dipartimento di Chirurgia della Facoltà di Veterinaria di Parma sono stati stabulati 21 suini di sesso femminile, di 30±10 Kg e 3 mesi di età, vaccinati. Gli animali sono stati stabulati per un periodo di acclimatamento di circa 20 giorni, in box singoli con contatto

visivo, a temperatura ambiente regolata a 21-22°C. Durante questo periodo gli animali, gestiti da personale autorizzato e munito di idonei dispositivi, sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario con ivermectina 1 ml, sono stati alimentati con mangime medicato in pellet fino a raggiungere un peso di circa 40 kg. Abbiamo eseguito coprocolture e rilievo quotidiano della temperatura rettale. 1 maiale è deceduto 48 ore dopo l'arrivo nello stabulario, per cause ignote. Gli altri 20 maiali sono stati arruolati e operati tra gennaio e novembre 2010, divisi in 2 gruppi: il gruppo 1 comprende 10 animali che erano destinati ad essere sacrificati a 1 mese dall'intervento, mentre gli 10 animali del gruppo erano destinati ad essere sacrificati a 6 mesi.

Le procedure anestesilogiche sono state gestite da un medico veterinario specializzato in anestesia animale, gli animali candidati ad intervento erano a digiuno da cibi solidi dalla notte precedente l'intervento; il protocollo è di seguito descritto.

- Preanestesia (nel box) con azaperone 1 mg/Kg + ketamina 10-15 mg/Kg im
- trasporto in sala preparazione
- posizionamento di catetere venoso in vena auricolare marginale
- prelievo ematico per profilo biochimico, emocromocitometrico e VES
- Ringer lattato 5-10 ml/Kg/h ev
- profilassi antibiotica: ceftiofur 5 mg/Kg im
- acido tolfenamico 2 mg/Kg im
- epatoprotezione: TAD6000 1 f e Dobetin 2-4 ml ev
- gastroprotezione: ranitidina 0,5 mg/Kg ev
- detersione dell'animale e tricotomia dell'addome
- induzione: propofol 2 mg/Kg ev
- intubazione orotracheale con tubo di Magill
- trasporto in sala operatoria e decubito su pad termico
- posizionamento di sonda oro-gastrica
- mantenimento: isofluorano vaporizzato in O₂ 100%, circuito a ri-respirazione, ventilazione meccanica (IPPV e PEEP)
- monitoraggi: capnografia, rilevamento parametri cardiocircolatori, temperatura (con sonda esofagea)
- analgesia intraoperatoria: fentanyl 2 µg/Kg ev in bolo
- analgesia postoperatoria: buprenorfina 10 µg/Kg ev
- estubazione e rimozione del catetere venoso
- recupero della stazione quadrupedale in box
- alimentazione dopo 4 ore

Tecnica chirurgica

Resezione subtotale del coledoco, associata a colecistectomia, ed impianto di protesi sostitutiva bilio-biliare retroperitoneale (con conservazione della continenza papillare).

Laparotomia mediana xifo-ombelicale. Previa apertura del foglietto glissoniano del ligamento epato-duodenale, isolamento in toto della via biliare principale che viene circondata con tourniquet avendo cura di riconoscere e conservare i peduncoli vascolari, superiore ed inferiore diretti alle porzioni distale e prossimale della VBP. Parziale mobilizzazione del

complesso duodeno-pancreatico nel quale viene individuato esattamente, nella seconda porzione duodenale lo sbocco del coledoco. Legatura/sezione dei vasi cistici, previa apertura del loro foglietto peritoneale con distacco della cistifellea dal letto epatico mediante elettrocauterio, senza tuttavia sezionare il dotto cistico che rimane così coerente con la via biliare principale (VBP). Emostasi locale per elettrocoagulazione. Duplice sezione della VBP, al di sopra del cistico nell'immediata prossimità dell'ilo epatico e distalmente a livello del coledoco terminale avendo cura di far cadere la sezione biliare 0.5 cm al di sopra dello sbocco del coledoco in papilla. Rimozione "en bloc" del dotto epatico comune, del dotto cistico, della colecisti e dei due terzi del coledoco distale. Detensione gastrica mediante svuotamento dello stomaco per aspirazione tramite sonda endogastrica. Prima dell'impianto della protesi vengono prelevati: 1 campione di bile dalla colecisti, 1 campione di tessuto del coledoco, 1 campione di materiale della protesi, tutti inviati per analisi microbiologica. Posizionamento di endoprotesi sostitutiva biliare tipo Bioskipper-Short (lunghezza 4 cm; diametro 0.5 cm) mediante confezione di duplice anastomosi, rispettivamente bilio-protesi termino-terminale e protesico-biliare termino-terminale, con duplice emi-sutura continua, anteriore e posteriore, in Maxon® 6.0. Sintesi con soprappiglio continuo in Maxon 6.0 del foglietto glissoniano precedentemente aperto con ripristino della normale anatomia del legamento epato-duodenale e conseguente posizionamento retroperitoneale dell'impianto protesico biliare. Ripetuti lavaggi della cavità addominale con soluzione antisettica e sintesi parietale a strati.

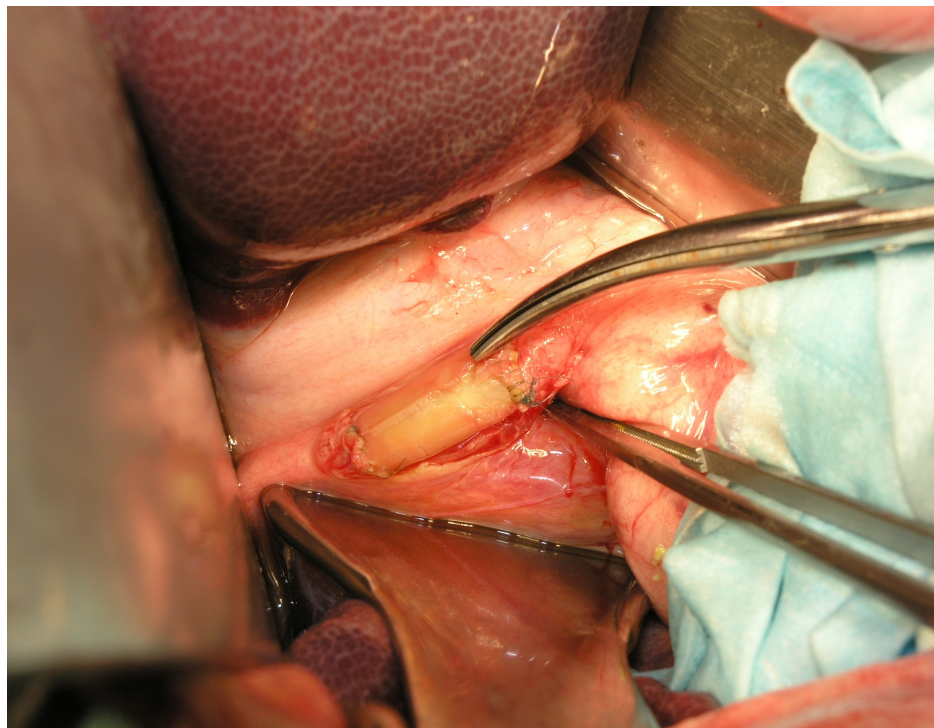


Figura 1: Epatico-protesi-coledoco anastomosi

Protocollo di gestione postoperatoria:

Da gennaio 2010 il maiale veniva trattato con prosecuzione della terapia antibiotica descritta in profilassi, protratta per 72 ore, e ripresa dell'alimentazione solida dopo 12 ore dall'intervento. In presenza di rialzo termico veniva prolungata o ripresa la somministrazione di antibiotici. A partire da maggio 2010, con la consulenza della Dr.ssa Cabassi (Chirurgia Veterinaria) e di un tecnologo veterinario, è stato introdotto un protocollo di gestione postoperatoria dei maiali più standardizzato, redatto secondo le indicazioni di un tecnologo veterinario esperto di zootecnia dei suini. Tale protocollo prevedeva:

- Tramadolo cloridrato 1mg/Kg/die per os
- Ceftiofur 5 mg/Kg im ogni 5 giorni, per 2 volte
- Metamizolo sodico 2 g ogni 48 ore per os
- Complesso vitaminico B (Stimulfos®) 1 cp/10Kg/die per os
- Lansoprazolo 30 mg/die per os
- Paracetamolo 30 mg/kg 2 v/die
- se astenia/anoressia: desametazone 1-2 mg/Kg im, acido tolfenamico 2 mg/Kg im, cianocobalamina 2-4 ml im
- controllo quotidiano di sensorio e temperatura
- terapie orali con miele miscelato al pellet
- se melena: Antiemor K® 10 ml im 1-2 v/die, coprocoltura

Questo protocollo veniva mantenuto per 4 settimane nel postoperatorio, a partire dalla quinta settimana, per gli animali del gruppo 2, il protocollo prevedeva l'utilizzo solo di paracetamolo, lansoprazolo e complesso vitaminico. Per evitare di indurre situazioni di stress nell'animale, tali da influenzare negativamente il decorso postoperatorio si è deciso di evitare i prelievi ematici seriatati nel postoperatorio.

Indagine microbiologica

L'esame batteriologico è stato condotto su prelievo intra-operatorio di bile e su un frammento di protesi. I materiali sono stati seminati in doppio inizialmente su terreno liquido di arricchimento Brain Heart Infusion Broth (BHI, DIFCO- USA) ed incubati alla temperatura di 37°C in aerobiosi ed anaerobiosi. Successivamente, 0.2 ml di tale coltura sono stati trapiantati su terreni solidi, nutritivo (agar sangue addizionato con 5% di globuli rossi di bovino) e selettivo-differenziale (agar McConkey) ed incubati a 37°C in aerobiosi ed anaerobiosi.

L'identificazione batterica è stata condotta fino a livello di specie in base a test diversi, quali colorazione di Gram, prova della catalasi e della coagulasi, e a prove biochimico-metaboliche (API System- Biomerieux, Marcy l'Etoile - France).

Sacrificio dell'animale e indagine autoptica

Gli animali sono stati sacrificati in accordo con le linee Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio¹⁴. Il sacrificio ha previsto una priva fase di induzione di anestesia profonda mediante somministrazione di ketamina e xylazina im. Dopo circa 30 minuti dall'induzione si

praticava un'iniezione intra-cardiaca di soluzione satura di cloruro di potassio (Tanax 0,3 ml/Kg) e si valutava l'avvenuto decesso con assenza dei parametri vitali.

Esame macroscopico

Si procedeva all'indagine autoptica mediante toracotomia destra e accesso trans-diaframmatico alla cavità addominale. Dopo indagine macroscopica degli organi della cavità addominale e toracica si procedeva alla valutazione dell'area di intervento con espianto “*en bloc*” di fegato, stomaco e duodeno fino alla prima ansa digiunale, comprendente il neo-coledoco. Vengono prelevati multipli campioni di tessuto epatico di aree dell'organo adiacenti all'ilo e periferici, e valutata macroscopicamente la eventuale presenza di stasi biliare e/o colangite. Dopo l'apertura dello stomaco viene valutata la presenza di eventuali alterazioni della mucosa o ulcere. Per quanto riguarda il blocco anastomotico vengono valutati: la presenza della protesi e la sua corretta collocazione, la sua eventuale sostituzione con tessuto biologico neoformato, e la pervietà sia della protesi che del dotto neoformato.

Esame microscopico

I campioni prelevati in sede autoptica sono stati inviati presso l'Anatomia e istologia Patologica dell'Università di Parma e processati per la successiva indagine microscopica. I campioni sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 4 micron e analizzati al microscopio ottico. I parametri valutati sono stati: lo stato di conservazione della protesi, la colonizzazione cellulare e, in presenza di un dotto neoformato, eventuali stenosi/substenosi e la presenza di epitelizzazione endoluminale.

RISULTATI

Mortalità e morbilità: 10 animali sono stati sacrificati a 1 mese, 1 a 4 mesi, 5 a 6 mesi, 3 animali sono deceduti a: 4 giorni, 19 giorni, 10 mesi, 1 animale è in vita a 6 mesi. Le complicanze sono riassunte in tabella, l'incidenza globale è stata del 65% (13/20). Le più frequenti sono state quelle gastrointestinali emorragiche, gastrite o ulcera peptica (9/20); sono state eseguite 6 eutanasi a 1 mese per sofferenza dell'animale.

In tabella è riassunto l'outcome dei 20 animali oggetto dello studio, in ordine cronologico secondo la data dell'intervento.

SUINI	EUTANASI A	REFERTO AUTOPSIA	COMPLICANZE
1	19 giorni [§]	protesi in sede, ascessi epatici, colangite, ulcera gastrica	colangite, polmonite, ulcera gastrica
2	1 mese	protesi in sede pervia	
3	4 mesi	neodotto, protesi in sede pervia	enterite emorragica
4	1 mese	protesi in sede pervia	laparocele, gastrite
5	1 mese	protesi in sede pervia	
6	10 mesi [§]	neodotto, protesi sostituita, stenosi anastomosi prossimale	subittero
7	1 mese	protesi fluttuante, dilatazione vie biliari	gastrite emorragica
8	6 mesi	neodotto, protesi pervia in sede	enterite emorragica
9	4 giorni [§]	protesi in sede pervia	duodenite emorragica
10	1 mese*	protesi in sede, dilatazione vie biliari	anemia
11	1 mese*	protesi in sede pervia	ulcera duodenale perforata
12	6 mesi	neodotto, protesi sostituita	
13	1 mese*	protesi in sede pervia	gastrite emorragica
14	6 mesi	“neodotto”, ma protesi fluttuante	
15	1 mese*	protesi fluttuante, dilatazione vie biliari	gastrite emorragica
16	6 mesi	“neodotto”, ma protesi fluttuante	
17	6 mesi	neodotto, protesi sostituita	
18	6 mesi	in vita a 6 mesi, nulla da segnalare	
19	1 mese*	protesi in sede, stenosi anastomosi prossimale	colangite
20	4 giorni	protesi in sede pervia	Versamento biliare e infarto intestinale

§ morte improvvisa

**eutanasia eseguita per sofferenza dell'animale*

Risultati a 1 mese: in 6 su 10 animali in cui è stata eseguita l'autopsia ad 1 mese, la protesi era presente nella sede di impianto e pervia, senza complicanze locali, in 2 animali la protesi era in sede, funzionante, ma presentava stenosi dell'anastomosi prossimale, con dilatazione delle vie biliari a monte; in 2 animali la protesi veniva repertata nella sede di intervento ma fluttuante, cioè non correttamente ancorata. In queste situazioni la protesi risulta essere completamente acellulata (azione citotossica della bile), e si comporta come uno stent inerte. La protesi si presenta integra, senza segni di dissecazione dei vari layer costituenti la protesi stessa. Di particolare importanza, risulta essere il margine della protesi liscio ed uniforme, senza frastagliature. Questo quadro potrebbe essere compatibile con una dissoluzione del filo di sutura. L'affondamento retroperitoneale, concorre alla formazione di un canale che evita perdite biliari.

Da un punto di vista istologico, negli animali sacrificati ad un mese e con protesi in sede si osserva l'iniziale sostituzione biologica della protesi. Il tessuto infiammatorio che circonda la protesi che infila il layer più esterno comincia ad organizzarsi in un tessuto di granulazione/connettivo lasso ricco in lacune ematiche e diversi capillari. La sostituzione del layer più esterno si completa attorno al 40-45 giorno.

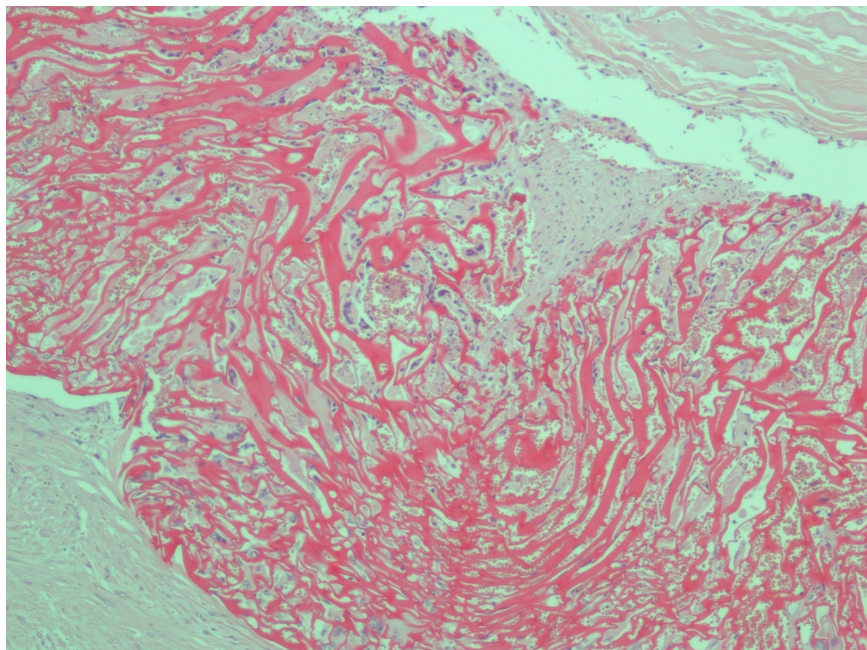


Figura 2. Iniziale sostituzione del layer più esterno della protesi (scaffold tridimensionale). Si nota la presenza di una popolazione mista costituita da cellule infiammatorie croniche (cellule gigantomultinucleate e macrofagi), fibroblasti giovani (nucleo rotondeggiante). Il tessuto connettivo neoformato lambisce lo strato intermedio di collagene e in alcuni punti viene infiltrato. (Ingrandimento 100x)

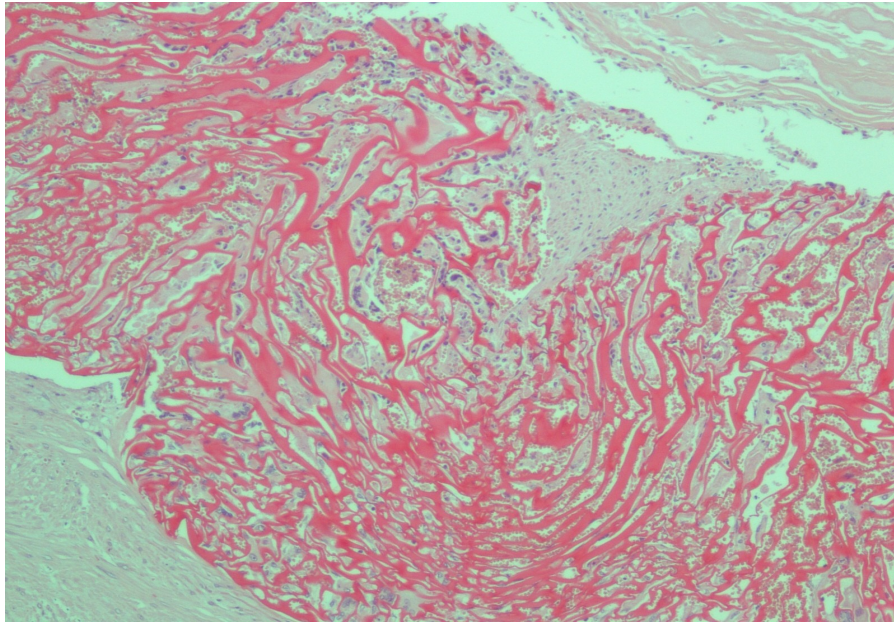


Figura 3. Completa infiltrazione del layer più esterno della protesi (scaffold tridimensionale). Si nota la presenza di una popolazione mista prevalentemente da cellule infiammatorie croniche (cellule gigantomitotiche e macrofagi), fibroblasti giovani (nucleo rotondeggiante) (Ingrandimento 100 x).

Risultati a 6 mesi: 5 animali sono stati sacrificati a 6 mesi, 1 a 4 mesi, 1 animale è vivo e in buona salute a 6 mesi, 1 animale è deceduto a 10 mesi. Tutti gli animali che hanno raggiunto i 6 mesi avevano all'autopsia una sorta di neodotto al posto della VBP. In 2 casi non era più rintracciabile la protesi, che era stata completamente degradata, e il neodotto all'esame microscopico era costituito da cellule compatibili con epitelio di via biliare. In altri 2 casi il neodotto coesisteva con la protesi, che fluttuava all'interno in 2 casi (a 4 e a 6 mesi) coesistevano neodotto e protesi pervia, in sede e funzionante.

Da un punto di vista istologico, negli animali sacrificati a 6 mesi si osserva almeno nei casi di completa sostituzione biologica della protesi. Il tessuto infiammatorio che circonda la protesi che infiltrava si è organizzato in un tessuto fibrovascolare caratterizzato da una estesa microvascolarizzazione, scarse o nulle cellule infiammatorie e cellule muscolari lisce organizzate in corti fasci o aggregati. Di particolare importanza è la presenza, nella compagine di questo tessuto neofornato, di cellule epiteliali di tipo verosimilmente biliare sparse o organizzate a formare strutture tubulari. È possibile inoltre, apprezzare una “risalita” di queste strutture e/o cellule epiteliali verso il versante luminale del dotto neofornato. La presenza di queste cellule epiteliali di tipo biliare all'interno del tessuto connettivo fibrovascolare può essere spiegata da un differenziamento di precursori circolanti che arrivano nel tessuto e si differenziano in senso epiteliale biliare da pressioni del microambiente. Ulteriori studi sono in fase di attuazione per confermare questa ipotesi. Analogamente a quanto descritto per gli animali sacrificati a un mese la protesi risulta essere integra, con margini lisci, completamente acellulata (azione citotossica della bile), e si comporta come uno stent inerte. L'affondamento retroperitoneale, concorre alla formazione di un canale che evita perdite biliari.



Figura 4. Ecografia a 7 giorni: protesi in sede, pervia.



Figura 5. Autopsia a 1 mese: protesi in sede, parenchima epatico normale.

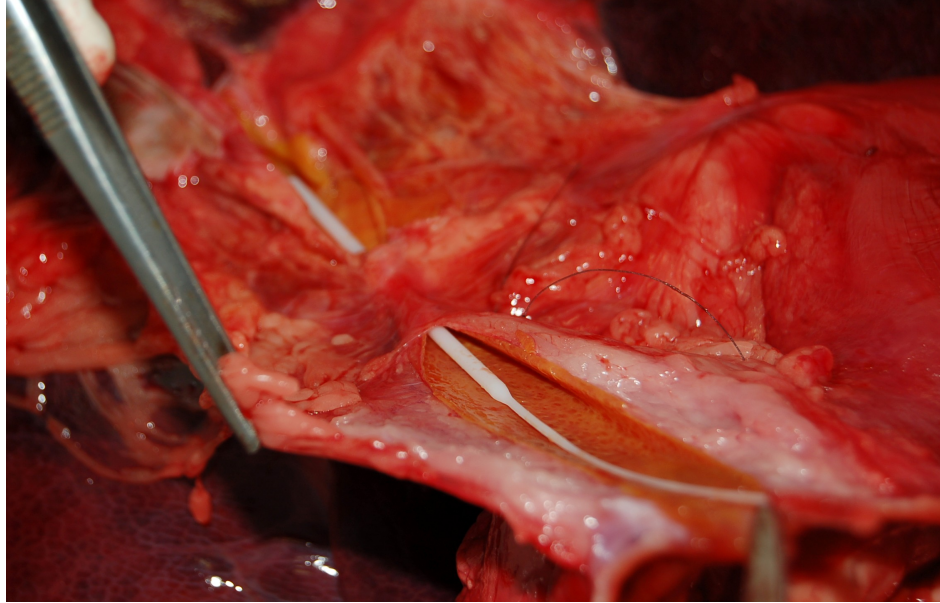


Figura 6. Autopsia a 6 mesi: neocoledoco, protesi riassorbita

DISCUSSIONE

Gli animali hanno avuto un decorso clinico diverso nelle fasi iniziale e avanzata dello studio: le complicanze, soprattutto emorragie digestive, sono state registrate quasi esclusivamente nei primi 11 animali, mentre il decorso dei successivi è stato soddisfacente, verosimilmente dovuto ad una rimodulazione del protocollo postoperatorio (da maggio 2010), che prevedeva terapia con analgesici e gastroprotettori somministrati in modo più sistematico e prolungato.

Le complicanze più frequenti sono state la gastrite e/o l'ulcera gastroduodenale emorragica, nei primi casi; con l'introduzione del nuovo protocollo terapeutico il problema è praticamente scomparso.

Considerazioni sull'evoluzione della protesi in vivo: durante la prima settimana il tessuto infiammatorio infiltra il layer più esterno della protesi (scaffold poroso), in 2 settimane si completa la trasformazione di un tessuto infiammatorio/di granulazione in un tessuto connettivo lasso caratterizzato dalla presenza di fibroblasti giovani (nucleo rotondeggiante) e lacune ematiche. Entro il primo mese si completa la trasformazione del layer più esterno della protesi in un tessuto connettivo lasso caratterizzato dalla presenza di una popolazione mista di fibroblasti e iniziale comparsa di capillari. Sono visibili piccole aree di trasformazione dei fibroblasti in cellule muscolari lisce. Si rileva inoltre l'iniziale colonizzazione dello strato intermedio della protesi. Questo è il "punto di non ritorno", ovvero, se la protesi si stacca precocemente per dissoluzione dei fili di sutura è libera di fluttuare e viene completamente sterilizzata dalla bile che la permea, a questo punto la protesi si comporta come uno stent, cioè la bile non degrada la protesi, ma distrugge solo le cellule che l'hanno rivestita. In questo caso la protesi rimane così com'è per i mesi successivi, non viene degradata né rivestita, poiché è l'azione litica di enzimi rilasciati dalle cellule infiammatorie che è in grado di degradare e sostituire la protesi, e queste cellule infiammatorie non riescono a raggiungere la protesi se non è contatto con il tessuto nativo perché non possono "saltare" la bile.

Pertanto gli animali sacrificati a 6 mesi nei quali la protesi era ancora in sede, sono da considerare un risultato solo parzialmente positivo (i fili si sono riassorbiti, ma la protesi ancora no), benché non si siano registrate complicanze infettive in tali casi. Il riassorbimento dei fili di sutura ha determinato un distacco della protesi dalla zona di anastomosi e una sua fluttuazione all'interno del "neodotto", che in realtà è composto da peritoneo, il problema è che, se la protesi si stacca e fluttua, non viene ricoperta di cellule.

Questi reperti ci hanno obbligato ad una riflessione anche sul tipo di filo di sutura che abbiamo utilizzato: il Maxon® infatti, in genere usato per le suture delle vie biliari nell'uomo, ha un tempo di riassorbimento medio-rapido, con perdita quasi completa della sua forza tensile a 2 mesi; nella fase successiva del progetto (è previsto uno studio preclinico caso-controllo, sempre sul suino), saranno utilizzati fili di sutura diversi, eventualmente non riassorbibili, per verificare questa ipotesi.

Negli animali lungo-sopravvivenenti in cui la protesi è stata correttamente sostituita da tessuto biologico neoformato, al contrario, si assiste alla comparsa di strutture tubulari del tessuto fibrovascolare costituente un vero e proprio neodotto. Questa fase è caratterizzata dalla presenza di numerose "ghiandole" o cripte nella parete del neodotto, verosimilmente costituite da cellule tipo epitelio biliare (il nucleo di queste cellule ha le caratteristiche tipiche delle cellule biliari), diffuse in tutto il neodotto, con preponderanza nel versante prossimale. Queste strutture potrebbero derivare da una differenziazione indotta dal microambiente di precursori circolanti che arrivano in sede attraverso la rete microvascolare neoformata. In questo i nostri

risultati sembrano concordare con quanto precedentemente osservato da uno studio giapponese che, nel 2007, riguardava la sostituzione del coledoco nel maiale con protesi biocompatibile di polilattico/caprolattone interposta tra coledoco e duodeno¹⁵, anche se con risultati fin troppo perfetti, cioè nessuna complicanza che invece noi abbiamo riscontrato.

In conclusione: i nostri risultati dimostrano che la protesi oggetto dello studio è impiantabile in vivo e biocompatibile; se la protesi è correttamente fissata, nel giro di 6 mesi viene completamente degradata e sostituita con un neodotto biliare con caratteristiche simili a quelle dei dotti nativi. Escludendo le complicanze postoperatorie sistemiche, peraltro concentrate nel primo periodo postoperatorio e drasticamente ridotte dall'introduzione di un idoneo protocollo terapeutico, l'outcome dell'intervento di sostituzione protesica è più che accettabile, e verosimilmente vantaggioso nel lungo termine (ridotte complicanze infettive e stenotiche). Prevediamo di verificare questa tesi nella prossima fase del progetto, che sarà uno studio caso-controllo protesi versus epatico-digiunostomia,

BIBLIOGRAFIA

1. Soderlund C, Frozanpor F, Linder S. Bile duct injuries at laparoscopic cholecystectomy: a single-institution prospective study. Acute cholecystitis indicates an increased risk. *World J Surg* 2005;29(8):987-93.
2. Savader SJ, Lillemoie KD, Prescott CA, Winick AB, Venbrux AC, Lund GB, et al. Laparoscopic cholecystectomy-related bile duct injuries: a health and financial disaster. *Ann Surg* 1997;225(3):268-73.
3. Nuzzo G, Giuliani F, Giovannini I, Ardito F, D'Acapito F, Vellone M, et al. Bile duct injury during laparoscopic cholecystectomy: results of an Italian national survey on 56 591 cholecystectomies. *Arch Surg* 2005;140(10):986-92.
4. Valera-Sanchez Z, Flores-Cortes M, Romero-Vargas ME, Gomez-Bravo MA, Pareja-Ciuro F, Lopez-Bernal F, et al. Biliodigestive anastomosis in liver transplantation: review of 13 years. *Transplant Proc* 2006;38(8):2471-2.
5. Tocchi A, Mazzoni G, Liotta G, Lepre L, Cassini D, Miccini M. Late development of bile duct cancer in patients who had biliary-enteric drainage for benign disease: a follow-up study of more than 1,000 patients. *Ann Surg* 2001;234(2):210-4.
6. Selvalingam S, Mahmud MN, Thambidorai CR, Zakaria Z, Mohan N, Isa, et al. Jaundice clearance and cholangitis in the first year following portoenterostomy for biliary atresia. *Med J Malaysia* 2002;57(1):92-6.
7. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997;34(1):21-8.
8. Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res* 2005;49:93-135.
9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
10. Hodde J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng* 2002;8(2):295-308.
11. Hodde J, Record R, Tullius R, Badylak S. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 2002;23(8):1841-8.
12. Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium* 2001;8(1):11-24.
13. Bettini R, Romani A, Morganti M, Borghetti A: Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(1):74-81. Epub 2007 Jul 18.
14. Cytocompatible stable gel compositions as supports for cell growth A Romani, A Borghetti, R. Bettini-WO Patent WO/2008/077,949, 2008 – wipo.int
15. NIH Pubblicazione 85-23, revisione 1996
16. Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Okada K, Koyama I, Ikada Y. A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* 2005;5(6):1541-7.