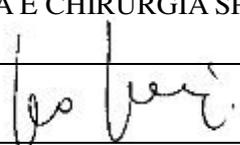


PROGETTO DI RICERCA/RESEARCH PROJECT

COGNOME	LICARI
NOME	LEO
TITOLO PROGETTO	IMPIEGO DI SCAFFOLD SINTETICO MICROPOROSO PER IL TRATTAMENTO E LA PREVENZIONE DEL LAPAROCELE – MODELLO SPERIMENTALE MURINO NELLA CHIRURGIA RIGENERATIVA.
CORSO DI DOTTORATO	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
FIRMA DEL CANDIDATO	

1 - SOMMARIO

Background

L'ernia incisionale o **laparocele** è una delle complicanze postoperatorie più frequenti nella chirurgia addominale, ritenuta responsabile di elevati tassi di morbilità e mortalità [1-3] con notevole impatto sulla qualità di vita (QoL). [4] Si è stimato che l'incidenza globale del laparocele è di circa il 13% [5]; ciò significa che una laparotomia su sette esita nella comparsa del laparocele. In presenza di specifici fattori di rischio - pazienti con aneurisma addominale, obesità o cirrosi – è stata segnalata un'incidenza ben maggiore raggiungendo il 45% circa [4-10]. È intuitivo immaginare l'impegno economico che tale patologia richiede all'interno del sistema sanitario [11].

Proprio a causa della sua elevata incidenza, l'impegno mostrato dalla ricerca scientifica nell'individuare i **fattori di rischio** e i principi della **prevenzione** è stato esemplare, ed in quest'ottica, recentemente, le più importanti società di chirurgia si sono espresse per raccomandare le tecniche di chiusura più idonee per la chiusura delle brecce chirurgiche in regime di elezione. [12,13].

Con l'intento di prevenire la comparsa del laparocele si è ipotizzato di posizionare una protesi dopo la esecuzione di una qualsiasi laparotomia, tecnica nota con il nome di "**mesh augmentation**". Le tecniche di posizionamento e la natura della mesh impiegata sono le più svariate e, fatta eccezione per i tempi operatori di poco differenti in base al tipo di tecnica selezionata per il suo fissaggio, i risultati sono non solo sovrapponibili ma soprattutto promettenti. [14-20] I risultati più sorprendenti derivano da uno studio di Brosi [20] che prevede il posizionamento di una protesi dual mesh intraperitoneale non riassorbibile con tecnica IPOM; il tempo operatorio, per quanto intuitivamente più lungo se messo a confronto con il gruppo che non ne prevede il posizionamento, risulta accettabile e a distanza di 2 anni, il tasso di incidenza di laparocele messo a confronto è del 17% (braccio sperimentale) vs 40%.

La differenza tra i tassi di insorgenza di laparocele è statisticamente significativa e supporta l'ipotesi che una mesh posizionata con tecnica IPOM, con intento profilattico, possa ridurre il rischio di laparocele.

L'obiezione più comunemente mossa contro il posizionamento profilattico della mesh riguarda inevitabilmente la possibile comparsa di complicanze che possono sorgere a seguito del posizionamento di un corpo estraneo quale è la mesh. È noto che il posizionamento intraperitoneale delle mesh può portare a complicanze post operatorie quali la formazione di aderenze visceroviscerali e visceroparietali con evoluzione verso la occlusione intestinale, la migrazione della mesh e la formazione di fistole entero-cutanee [21]. Le aderenze alla mesh intraperitoneale possono anche essere considerate le responsabili di lesioni iatrogene agli organi addominali, durante eventuali re-interventi, nelle fasi di adesiolisi preliminari all'accesso alla cavità peritoneale [22, 23].

Nonostante gli sforzi delle industrie nella progettazione di **protesi "ideali"** [24], ad oggi nessuna mesh ha indicazione all'uso profilattico su larga scala nelle laparotomie. Al contrario, al giorno d'oggi, risultano il

rimedio più idoneo per la riparazione dei difetti della parete addominale nel paziente già affetto da laparocoele e ad essa è affidato il ripristino anatomico-fisiologico della parete addominale.

Cionondimeno le criticità ed i limiti dell'uso della mesh sin ora enunciati sia in prevenzione del laparocoele sia in campo terapeutico, appaiono ben più vincolanti nei casi di chirurgia in campi contaminati o sporco/infetti. In queste circostanze l'uso di una protesi sintetica è largamente sconsigliato e le evidenze suggeriscono l'eventuale uso di una rete biologica, sebbene l'impatto economico risulti sensibilmente maggiore.

Un fattore importante che influisce sul tasso di incidenza del laparocoele e sull'esito del suo trattamento con la mesh è la **infezione** del sito chirurgico, che si verifica fino al 9% dei casi. La presenza della mesh amplifica significativamente il rischio dell'ipotesi infettiva, a fronte di una scarsa attività degli antibiotici nel sito di posizionamento della protesi, raggiungendo questi a fatica le maglie "avascolari" della stessa. A seguito di un'infezione correlata alla mesh, vengono somministrati per via sistemica antibiotici. Se la terapia fallisce, è necessario rimuovere chirurgicamente la mesh infetta per proteggere il paziente da gravi complicanze.

È ormai noto che l'elemento caratterizzante il processo di riparazione tissutale, nonché la integrazione del materiale protesico nel contesto della parete addominale, è la **flogosi**. L'introduzione di un materiale estraneo nel corpo innesca una risposta di guarigione caratterizzata da una delle tre note reazioni stereotipate: (1) distruzione o lisi, (2) inclusione o tolleranza e (3) rifiuto o rimozione.

Nel caso di mesh impiantate, la risposta infiammatoria è rappresentata in quattro fasi che sono correlate sia temporalmente che gerarchicamente. La prima fase è caratterizzata dal rivestimento della protesi da parte di siero-proteine (albumina, fibrinogeno, plasminogeno, fattori del complemento e immunoglobuline). Le piastrine che aderiscono alle proteine si attivano rilasciando mediatori della chemiotassi di polimorfonucleati (PMN), fibroblasti e macrofagi i quali si attiveranno nei confronti del corpo estraneo, seconda fase. Tale fenomeno viene amplificato dai monociti i quali differenziandosi in macrofagi rilasciano ulteriori mediatori della flogosi. Sotto lo stimolo cronico della mesh i macrofagi si organizzano a formare le cellule giganti da corpo estraneo insieme a fibroblasti ed endotelociti – terza fase - per avviare quindi la fase finale della flogosi in cui il risultato è rappresentato dalla restitutio ad integrum mediante la deposizione di matrice extracellulare.

I fibroblasti sono cellule che mediano la fase di guarigione delle ferite. Queste cellule entrano nel sito della ferita da due a cinque giorni dopo la incisione, in genere una volta terminata la fase infiammatoria. I fibroblasti proliferano nel sito della ferita, raggiungendo i livelli massimi dopo una o due settimane. La funzione principale dei fibroblasti è di sintetizzare la matrice extracellulare e il collagene per mantenere l'integrità strutturale dei tessuti connettivi e controbilanciare la risposta umorale infiammatoria; alla fine della prima settimana, queste sono le uniche cellule responsabili della deposizione di collagene. Le cellule coinvolte nella regolazione dell'infiammazione, dell'angiogenesi e della riparazione tissutale, proliferano e si differenziano sulla matrice di collagene sintetizzata dai fibroblasti. La disregolazione nella quantità di fibroblasti richiamati durante il processo infiammatorio è responsabile della mancata integrazione della protesi alla parete addominale o della marcata risposta fibrotica cicatriziale con formazione di aderenze e fistole e persino il rigetto della mesh.[25]

Il processo di riparazione della ferita descritto crea un'integrazione della mesh grazie ai cambiamenti conformazionali delle proteine. Questa integrazione è progressiva, a partire dall'impianto della protesi ed è accompagnato dalla reazione al corpo estraneo seguita dall'inclusione della protesi, che si verifica entro le prime due settimane. Il processo è finalizzato in quanto la forza complessiva aumenta gradualmente nell'arco delle 12 settimane successive traducendosi in ultima analisi in un tessuto la cui elasticità e resistenza è circa il 70-80% rispetto a quello nativo.[25]

Le damage-associated molecular patterns (DAMPs) sembrano essere il trigger della cascata molecolare responsabile della risposta cellulare descritta. Rilasciate dopo un danno meccanico, queste molecole vengono immediatamente riconosciute dalle cellule dell'immunità innata e attraverso NOD-like receptors (NLR) viene attivato il signalling intracellulare che porterà all'attivazione del potenziale genetico per la sintesi di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF-a), che insieme alle

chemiochine sono i regolatori delle molteplici attività cellulari descrivibili nella risposta flogistica. Infine, radicali reattivi dell'ossigeno (ROS), proteinasi, collagenasi e la retrazione delle giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice dell'endotelio vascolare, sono responsabili della formazione dell'essudato sieroso che caratterizza le prime fasi della risposta infiammatoria e che descrive la formazione del sieroma post-operatorio.[26]

2 – DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Obiettivo del progetto

Alla luce di quanto finora esposto ed in base alle considerazioni relative alle criticità evidenziate nella esecuzione della chirurgia protesica di parete, l'ipotesi di lavoro è individuare uno **scaffold** tridimensionale biocompatibile poroso riassorbibile/biodegradabile sulla cui superficie **adsorbire**, attraverso tecniche di bioingegneria, citochine e molecole antibiotiche, da poter posizionare in sede intraperitoneale, e a basso impatto economico, con lo scopo di impiegarlo routinariamente nella chirurgia di parete, prevenire su larga scala la comparsa di laparocele post-laparotomia indicandone l'uso sistematico nelle chiusure delle laparotomie, indirizzarne l'impiego anche in emergenza ed in campi sporco/contaminati, minimizzare/azzerare le complicanze post-operatorie fin ora osservate nella fase post-posizionamento di mesh intraperitoneale in chirurgia open e laparoscopica.

Disegno del progetto

Il progetto si avvale dell'impiego di modelli animali murini (n = 10) sui quali eseguire in corso di anestesia generale una laparotomia e la creazione di un difetto di parete, mediante asportazione di una superficie di 1 cm² del piano muscolo aponeurotico in regione centroaddominale.

1 animale verrà sottoposto a plastica diretta della parete addominale mediante posizionamento di punti di sutura transfasciali e ricostruzione della linea mediana.

1 animale verrà sottoposto a plastica protesica della parete addominale mediante posizionamento intraperitoneale (tecnica IPOM) di mesh in polipropilene composite fissata alla parete addominale mediante dispositivi di fissaggio non riassorbibili. La superficie della mesh sarà di circa 6 cm².

8 animali verranno sottoposti a posizionamento intraddominale (tecnica IPOM) di scaffold composite microporoso – faccia viscerale rivestito di materiale inerte PEGlike e faccia parietale adsorbito di citochine e molecole antibiotiche – fissato alla parete addominale con dispositivi di fissaggio riassorbibili (punti di sutura; absorbatack). La superficie dello scaffold sarà di circa 6 cm².

Le citochine hanno il compito di veicolare le fasi della flogosi verso un più rapido richiamo delle cellule fibroblastiche ed una altrettanto rapida risoluzione delle fasi precoci rappresentate dalla vasodilatazione e dalla formazione dell'essudato sieroso.

È prevista la somministrazione di un'unica dose di antibiotico pre-operatorio a scopo profilattico.

Nel post-operatorio gli animali verranno monitorati clinicamente e mediante esami bioclinico-clinici in terza GPO con lo scopo di valutare i principali indici di flogosi (WBC, PCR).

Il follow-up verrà eseguito a cadenza settimanale per il primo mese, a cadenza mensile per i seguenti cinque mesi e quindi a cadenza semestrale con l'obiettivo di verificare clinicamente – attraverso visita, esame obiettivo ed ETG dell'addome – la possibile comparsa di short term complications – seroma, ematoma, infezione del sito chirurgico – e long term complication – laparocele. Al termine del periodo di follow-up di 18 mesi il modello animale verrà sacrificato con lo scopo di evidenziare la eventuale comparsa di complicanze intraddominali diversamente non diagnosticabili quali la formazione di aderenze visceroviscerali e visceroparietali, la formazione di fistole entero-enteriche od entero-cutanee e quindi osservare l'esito del processo di assorbimento dello scaffold tridimensionale inizialmente posizionato e teoricamente non più descrivibile al termine del periodo di follow-up proposto.

Si preleverà infine un campione tissutale rappresentato da una sezione della parete addominale, nel suo intero spessore, in prossimità dell'area chirurgica trattata, per individuare le principali caratteristiche, in termini di composizione molecolare (immunoistochimica) e cellulare del tessuto di riparazione così formato.

Timeline

Il progetto di ricerca verrà svolto procedendo attraverso la realizzazione di tre fasi sequenziali: la prima caratterizzata dalla preparazione dello scaffold così ideato presso i laboratori del dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo. La seconda fase è rappresentata dalla realizzazione del progetto sul modello animale, seguita dalla analisi immunoistochimica ed anatomopatologica. Infine la terza ed ultima fase caratterizzata dalla elaborazione statistica dei dati provenienti dalla sperimentazione, e quindi stesura della tesi di dottorato.

Risultati attesi dalla sperimentazione

I risultati attesi dalla sperimentazione, alla luce delle modifiche indotte al processo di riparazione tissutale (foreign body reaction FBR) dalla presenza delle citochine infiammatorie adsorbite sulla faccia parietale dello scaffold poroso e delle molecole antibiotiche diffusamente ed omogeneamente rappresentate sulla stessa faccia dello scaffold, sono:

- la **riduzione del tasso di comparsa del laparocele** mediante la modulazione in senso positivo della precoce mobilitazione dei fibroblasti (che naturalmente avviene a partire dalla 2° giornata post-operatoria all'8° circa) a partire dai primi minuti dopo il contatto delle citochine adsorbite con la sierosa peritoneale determinando la più rapida formazione di matrice extracellulare e deposizione di fibre collagene con lo scopo di accelerare il processo di guarigione creando tessuto cicatriziale idoneo alla completa restitutio ad integrum della parete addominale;
- la **riduzione del tasso di comparsa del sieroma e dell'ematoma** post operatorio modulando in senso negativo per tempo ed entità la prima fase della risposta infiammatoria rappresentata dalla vasodilatazione e dalla contrazione delle giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice cui segue la formazione dell'essudato sieroso;
- la **riduzione del tasso di infezione** del sito chirurgico grazie alle molecole antibiotiche adsorbite sulla superficie dello scaffold, apportando la idonea copertura antimicrobica;
- la **creazione di tessuto di riparazione** dalle caratteristiche elastiche e di resistenza analoghe a quelle di origine in assenza di corpi sintetici estranei all'organismo;
- la **riduzione del tasso di long term complications** – retrazione della protesi, formazione di aderenze, formazione di fistole – essendo lo scaffold interamente riassorbibile;
- dimostrare la **fattibilità, efficacia e sicurezza** del posizionamento profilattico di scaffold nelle laparotomie in elezione ed in urgenza in linea con quanto avanzato dalle recenti linee di ricerca con lo scopo di ridurre il tasso di laparocele;
- dimostrare la **superiorità del processo di guarigione** e del ripristino della fisiologia della parete addominale mediato dal sistema di scaffold proposto a confronto con l'attuale posizionamento di un corpo estraneo a cui affidare la restitutio ad integrum della parete addominale.

3 - BIBLIOGRAFIA

1. Adotey JM (2006) Incisional hernia: a review. Niger J Med 15:34–43
2. Bucknall TE, Cox PJ, Ellis H (1982) Burst abdomen and incisional hernia: a prospective study of 1129 major laparotomies. Br Med J (Clin Res Ed) 284:931–933
3. Carlson MA, Ludwig KA, Condon RE (1995) Ventral hernia and other complications of 1,000 midline incisions. South Med J 88:450–453
4. Mudge M, Hughes LE (1985) Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. Br J Surg 72:70–71
5. Bosanquet DC, Ansell J, Abdelrahman T et al (2015) Systematic review and meta-regression of factors affecting midline incisional hernia rates: analysis of 14,618 patients. PLoS ONE 10:e0138745
6. Sugerman HJ, Kellum JM Jr, Reines HD et al (1996) Greater risk of incisional hernia with morbidly obese than steroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh. Am J Surg 171:80–84

7. van't Riet M, De Vos Van Steenwijk PJ, Bonjer HJ et al (2004) Incisional hernia after repair of wound dehiscence: incidence and risk factors. *Am Surg* 70:281–286
8. van't Riet M, Steyerberg EW, Nellensteyn J et al (2002) Metaanalysis of techniques for closure of midline abdominal incisions. *Br J Surg* 89:1350–1356
9. Wissing J, van Vroonhoven TJ, Schattenkerk ME et al (1987) Fascia closure after midline laparotomy: results of a randomized trial. *Br J Surg* 74:738–741
10. Wadstrom J, Gerdin B (1990) Closure of the abdominal wall; how and why? Clinical review. *Acta Chir Scand* 156:75–82
11. Gillion JF, Sanders D, Miserez M et al (2016) The economic burden of incisional ventral hernia repair: a multicentric cost analysis. *Hernia* 20:819–830
12. Diener MK, Voss S, Jensen K et al (2010) Elective midline laparotomy closure: the INLINE systematic review and metaanalysis. *Ann Surg* 251:843–856
13. Muysoms FE, Antoniou SA, Bury K et al (2015) European Hernia Society guidelines on the closure of abdominal wall incisions. *Hernia* 19:1–24
14. Chelala E, Thoma M, Tatete B et al (2007) The suturing concept for laparoscopic mesh fixation in ventral and incisional hernia repair: mid-term analysis of 400 cases. *Surg Endosc* 21:391–395
15. Borab ZM, Shakir S, Lanni MA, et al (2017) Does prophylactic mesh placement in elective, midline laparotomy reduce the incidence of incisional hernia? A systematic review and meta-analysis. *Surgery*. Apr;161(4):1149-1163. doi: 10.1016/j.surg.2016.09.036. Epub 2016 Dec 28.
16. Bhangu A, Fitzgerald JE, Singh P, et al. (2013) Systematic review and meta-analysis of prophylactic mesh placement for prevention of incisional hernia following midline laparotomy. *Hernia*. Aug;17(4):445-55. doi: 10.1007/s10029-013-1119-2. Epub 2013 May 28.
17. Veljkovic R, Protic M, Gluhovic A et al (2010) Prospective clinical trial of factors predicting the early development of incisional hernia after midline laparotomy. *J Am Coll Surg* 210:210–219
18. Bhangu A, Fitzgerald JE, Singh P et al (2013) Systematic review and meta-analysis of prophylactic mesh placement for prevention of incisional hernia following midline laparotomy. *Hernia* 17:445–455
19. Nachiappan S, Markar S, Karthikesalingam A et al (2013) Prophylactic mesh placement in high-risk patients undergoing elective laparotomy: a systematic review. *World J Surg* 37:1861–1871. <https://doi.org/10.1007/s00268-013-2046-1>
20. Brosi P, Glauser PM, Speich B, Kaser SA, Maurer CA (2017) Prophylactic Intraperitoneal Onlay Mesh Reinforcement reduces the risk of incisional hernia, Two-year results of a randomized clinical trial. *World J Surg* <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4363-2>
21. Fortelny RH, Petter-Puchner AH, Glaser KS, Offner F et al (2010) Adverse effects of polyvinylidene fluoride-coated polypropylene mesh used for laparoscopic intraperitoneal onlay repair of incisional hernia. *Br J Surg* 97:7
22. Jenkins ED, Yom V, Melman L, Brunt LM, Eagon JC, Frisella MM, Matthews BD (2010) Prospective evaluation of adhesion characteristics to intraperitoneal mesh and adhesiolysis-related complications during laparoscopic re-exploration after prior ventral hernia repair. *Surg Endosc* 24:3002–3007
23. Halm JA, de Wall LL, Steyerberg EW, Jeekel J, Lange JF (2007) Intraperitoneal polypropylene mesh hernia repair complicates subsequent abdominal surgery. *World J Surg* 31:423–429
24. Mancini GA, Alexander AM (2013) Tissue ingrowth: the meshtissue interface: what do we know so far? In: Jacob BP, Ramshaw B (eds) *The SAGES manual of hernia repair*. Springer, New York
25. Baylón K, Rodríguez-Camarillo P, Elías-Zúñiga A, Díaz-Elizondo JA, Gilkerson R, Lozano K. Past, Present and Future of Surgical Meshes: A Review. *Membranes (Basel)*. 2017 Aug 22;7(3). pii: E47. doi: 10.3390/membranes7030047. Review.
26. Noah T. Ashley, Zachary M. Weil and Randy J. Nelson. Inflammation: Mechanisms, Costs, and natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2012. 43:385–406