

Università degli Studi di Milano  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Corso di dottorato in Scienze dello Sviluppo Prenatale, Diagnosi e  
Terapia Fetale  
Settore Disciplinare Med 40  
Ciclo XXIII



VALUTAZIONE DI UNA NUOVA TECNICA CHIRURGICA PER  
LA CORREZIONE IN UTERO DELL'ERNIA DIAFRAMMATICA  
IN UN MODELLO ANIMALE: RISULTATI PRELIMINARI

Tesi di Dottorato del Dott.: Giovanni Tremolada  
Matricola: R 07598

Coordinatore del corso: Chiar.mo Prof. Enrico Ferrazzi

Tutor: Chiar.mo Prof. Irene Cetin; Dott. Fabio Acocella

Anni Accademici 2009-2010

# INDICE

1. Introduzione.....	3
1.1 Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo della donna.....	5
1.2 Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo della pecora.....	8
1.3 Cenni di embriologia e anatomia dell'apparato respiratorio di uomo .....	12
1.4 Cenni di embriologia e anatomia dell'apparato respiratorio di pecora.....	13
1.5 Sintomatologia clinica nei pazienti affetti da CDH.....	15
1.6 Revisione della letteratura sulla CDH.....	16
1.7 Ultime esperienze cliniche nella correzione in utero della CDH, risultati e criteri di inclusione	20
2. Scopo del lavoro.....	24
3. Materiali e metodi.....	25
3.1 Studio dell'anatomia tracheale, sviluppo del catetere per l'occlusione bronchiale e anatomia endoscopica delle base vie aree in feti di pecora .....	25
3.2 Selezione e preparazione degli animali.....	29
3.3 Protocollo anestesilogico.....	30
3.4 Protocollo chirurgico.....	31
3.5 Analisi dei dati ottenuti.....	36
3.6 Analisi statistica.....	37
4. Risultati.....	38
4.1 Risultati dello studio dell'anatomia tracheale, sviluppo del catetere per l'occlusione bronchiale e anatomia endoscopica delle base vie aree in feti di pecora .....	38
4.2 Risultati degli interventi chirurgici e complicanze riscontrate.....	42
4.3 Risultati comparazione Lung Weigth/Body Weight.....	45
4.4 Risultati comparazione numero di pneumociti di II tipo.....	46
4.5 Risultati valori dello spessore della parete, della tonaca muscolare e dell'avventizia delle arteriole polmonari.....	49
5. Discussione e Conclusioni.....	54
6. Bibliografia.....	63

# 1. INTRODUZIONE

L'ernia diaframmatica congenita (CDH) è una grave patologia che, secondo le statistiche americane, ha un'incidenza di circa un caso su 2400 gravidanze <sup>1</sup>. Studi successivi di altri autori riportano una variabilità nell'incidenza di un nato ogni 2000-5000 <sup>2</sup>. La prima descrizione documentata di questa malformazione è attribuibile ad una autopsia eseguita da Lazzaro Riverio nel 1672; solo molto più tardi (1847) sarà presentata presso la Boston Society of Medical Observation, la prima serie di pazienti affetti da questa malattia <sup>3</sup>.

La classificazione della CDH è solitamente basata sulla topografia del difetto diaframmatico.

Possiamo così suddividere i vari tipi di ernie in: posterolaterali o di Bochdalek (circa il 70% dei casi), in ernie anteriori o di Morgagni (27% dei casi), in ernie centrali o ernie del setto trasverso (2-3% dei casi).

L'85% percento delle ernie coinvolge il compartimento sinistro del diaframma, il 13% la porzione destra e solo il 2% sono ernie bilaterali <sup>4</sup>. L'eziologia è attribuibile ad uno sviluppo anomalo del setto trasverso e ad una incompleta fusione del canale pleuro-peritoneale <sup>3</sup>. La patogenesi invece non è stata ancora chiarita. Una delle teorie più accreditate ipotizza che l'erniazione dei visceri attraverso la breccia diaframmatica vada a comprimere gli organi toracici causando meccanicamente un iposviluppo dei polmoni. Contemporaneamente la loro presenza in torace impedisce i normali movimenti di respirazione fetale necessari alla crescita polmonare, inibendo ancor di più il loro sviluppo. In questo modo il feto, al momento della nascita, non possiede polmoni in grado di consentirgli i normali scambi ventilatori.

Oltre che macroscopicamente iposviluppati i polmoni dei pazienti affetti da CDH presentano alterazioni a livello microscopico. Si può infatti riscontrare un ispessimento dei setti alveolari e un aumento sia dello spessore dell'avventizia che della tonaca muscolare delle arteriole preacinari. La severità di queste alterazioni è influenzata da vari fattori come: il volume degli

organi erniati, l'età di diagnosi della malattia (più grave se diagnosticata prima delle 24 settimane) e la presenza intra-toracica di fegato e stomaco<sup>5-15</sup>.

Le diverse possibilità terapeutiche offerte ad oggi a madri di feti affetti da CDH sono:

l'intervento di occlusione tracheale in utero; la correzione chirurgica post natale del difetto diaframmatico o la terminazione della gravidanza.

Nonostante lo sviluppo negli anni di tecniche per la correzione in utero della patologia sempre più raffinate e mini-invasive e il notevole progresso della terapia intensiva neonatale, il tasso di mortalità rimane elevato. Studi di diversi gruppi hanno riportato tassi di sopravvivenza variabili dal 40% fino ad oltre 70% a seconda delle tecniche di supporto respiratorio utilizzate e della severità della patologia<sup>16-19</sup>.

Per cercare di migliorare i risultati ottenuti in clinica gli sforzi si sono concentrati su molti studi sperimentali che hanno visto l'utilizzo di differenti modelli animali<sup>20</sup>. I risultati ottenuti sono stati d'ausilio sia per la comprensione della patogenesi della CDH che per valutare diverse strategie terapeutiche plausibili.

Gli animali maggiormente utilizzati nelle sperimentazioni sono stati: il ratto il coniglio e la pecora. Ogni specie ha presentato vantaggi e svantaggi. L'utilizzo dei ratti trova la sua motivazione nel costo contenuto di questi animali e nell'ottima conoscenza del loro genoma, con la possibilità di svolgere studi molecolari. Lo svantaggio nel loro uso sta nella grande fragilità dei polmoni fetali che impone la correzione della patologia tardi durante la gestazione. Inoltre, l'utilizzo di Nitrofen (un erbicida) per indurre la patologia può portare a risultati discutibili dato che è stato dimostrato come questa molecola possa causare da sola ipoplasia polmonare in assenza di CDH<sup>20</sup>.

Il coniglio presenta il vantaggio di disporre di feti di taglia maggiore rispetto al ratto, un minor costo d'acquisto e di gestione rispetto al grosso animale e quello di possedere un processo di

alveolarizzazione del polmone che comincia prima della nascita, proprio come nei primati. Lo svantaggio principale è attribuibile alla scarsa conoscenza del genoma di questi animali.

Uno dei maggiori vantaggi che riguarda l'utilizzo della pecora come modello animale è dato dal possedere feti di dimensioni paragonabili a quelli umani. In questo modo l'esecuzione degli interventi rispecchia più fedelmente l'intervento che si dovrà affrontare in campo clinico. Inoltre l'utilizzo della pecora permette di effettuare una chirurgia fetale "aperta", cioè mediante isterotomia, data la minore reattività dell'utero all'insulto chirurgico rispetto alla donna. Tra gli svantaggi del modello dobbiamo annoverare l'elevato costo sia di acquisto che di gestione degli animali, la necessità di poter disporre di locali adatti alla loro stabulazione, i tempi lunghi di chirurgia che limitano il numero di interventi eseguibili in una giornata e la stagionalità del periodo riproduttivo<sup>21</sup>. Infatti questi animali possono rimanere gravidi soltanto quando aumentano le ore di buio delle giornate, cioè nei mesi compresi tra Agosto e Gennaio quando la produzione di melatonina permette il rilascio di GnRH da parte dell'ipofisi.

Nel nostro studio abbiamo scelto come modello animale la pecora, in quanto è da tempo il modello di grosso animale maggiormente utilizzato in chirurgia fetale. I primi esperimenti concernenti la correzione in utero dell'ernia diaframmatica risalgono al 1967<sup>22</sup>.

### 1.1 Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo della donna.

#### Anatomia:

L'apparato riproduttivo femminile è composto dalle ovaie, l'utero, la vagina e i genitali esterni.

Le ovaie sono due organi pari poste nella porzione più superiore della cavità pelvica. Sono preposte alla produzione di oociti e degli ormoni sessuali femminili: estrogeni e progesterone. Le loro dimensioni sono di circa 3 cm di lunghezza, 2 cm in larghezza e 1 cm in spessore. Sono tenute in sede dal legamento largo, da quello ovarico e da quello sospensore. In sezione trasversa è possibile riconoscere una porzione esterna detta corticale, all'interno della quale sono contenuti nei follicoli gli oociti immaturi, e una interna detta midollare. Alla nascita una donna possiede

all'incirca 2 milioni di follicoli, che all'età della pubertà si riducono a 300-400 mila. Di questi solo una piccola parte maturerà dato che, solitamente, durante tutto il periodo fertile la donna produce un uovo al mese. A differenza della pecora e di altri mammiferi non è presente una stagionalità nella comparsa dell'estro una volta raggiunta la maturità sessuale. Gli oociti che vengono portati al termine del periodo di maturazione sono cellule che possiedono 23 cromosomi e solo al momento della fecondazione con uno spermatozoo arrivano ad avere un corredo genetico di 46 cromosomi.

Una volta che dal follicolo viene prodotto un'oocita maturo questo, in condizioni fisiologiche, viene accolto nelle tube uterine (o di Fallopio). Queste strutture, che si estendono dall'utero alle ovaie, possiedono al loro interno delle cilia deputate al trasporto dell'oocita all'interno del corpo dell'utero. La fecondazione degli oociti avviene nel primo terzo delle tube e solo nel giro di alcuni giorni arriverà nel corpo uterino per l'impianto dell'embrione.

L'utero è un organo dotato di una spessa parete muscolare, delle dimensioni e della forma di una pera rovesciata. La sua posizione anatomica normale è al di sopra della vescica. E' composto da tre porzioni distinte, il fondo, costituito dalla porzione di utero posto al di sopra dello sbocco delle tube uterine, il corpo, che ne costituisce la parte maggiore, e la cervice, che costituisce il suo ultimo tratto, che arriva in contatto con la vagina. Quest'organo è dotato di una notevole capacità elastica basti pensare che è in grado di passare da dimensioni di 5 cm a 30 cm per permettere lo sviluppo del feto. Il pavimento dell'utero, detto endometrio, partecipa alla formazione della placenta, l'organo preposto alla diffusione dei nutrienti necessari allo sviluppo dell'embrione e del feto.

La vagina è un organo dotato di una cavità virtuale inclinata di 45° gradi rispetto alla schiena. E' facilmente distendibile permettendo così il transito del neonato durante il parto.

La vulva fa parte dei genitali esterni. E' composta da due ampie pliche cutanee denominate grandi labbra e da due pliche meno sviluppate, denominate piccole labbra. Nella porzione

craniale della vagina è situato il clitoride, un piccolo organo omologo al pene, dotato di tessuto erettile. La fessura che è presente tra le piccole labbra, denominato vestibolo, è il punto di sbocco dell'uretra e l'ingresso alla vagina. Nelle donne vergini la vagina può essere parzialmente chiusa da un anello di tessuto denominato imene. A differenza che nel maschio l'apparato riproduttivo ed urinario sono completamente separati.

Fisiologia:

Al momento della pubertà, l'ipotalamo aumenta la secrezione di GnRH e l'adeno ipofisi inizia a secernere quote più elevate di gonadotropine, FSH e LH. Questi ormoni stimolano le ovaie a produrre oociti e aumentano anche i livelli di estrogeni e progesterone circolanti. Gli estrogeni stimolano la crescita dell'utero e della vagina. Sono anche indispensabili per l'inizio del ciclo mestruale e dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari. Il ciclo mestruale è dato da una serie di eventi che si compiono mensilmente che coinvolgono gli ormoni sopra citati, le ovaie e l'utero. Il ciclo è solitamente di circa 28 giorni, ma può variare dai 18 ai 40 giorni. Questo ciclo può essere diviso in due fasi differenti: una pre-ovulatoria e una post-ovulatoria. Nella fase pre-ovulatoria, sotto l'effetto dell'ormone follicolo stimolante (FSH) un pool di oociti va incontro al fenomeno di maturazione. Questo fenomeno, che va dal 1° al 14° giorno del ciclo, prende il nome di fase follicolare. Del pool di follicoli che iniziano a svilupparsi, solo uno arriverà a termine continuando a secernere quantità sempre maggiori di estrogeni, e diventando sempre più sensibile all'azione del LH e del FSH. Infine la secrezione di alti livelli di estrogeni va ad esercitare un feedback positivo a livello ipotalamico in maniera da stimolare una maggiore produzione di GnRH. Questo ormone fa sì che ci sia una quantità maggiore di LH e FSH circolanti, dando vita al picco di concentrazione di LH responsabile del fenomeno di ovulazione. Mentre l'ovaio va incontro alla fase follicolare, a livello uterino si succedono prima la fase mestruale e poi quella proliferativa. Durante le mestruazioni un basso livello di ormoni sessuali femminili, è responsabile dello sfaldamento dell'endometrio. Questo materiale viene poi espulso insieme a del sangue attraverso la vagina. Successivamente, sotto l'influenza degli estrogeni

rilasciati dal nuovo follicolo, l'endometrio si ispessisce, diventa maggiormente vascolarizzato e con un numero maggiore di ghiandole. E' questa la fase proliferativa, che termina al momento dell'ovulazione.

Il periodo post-ovulatorio è caratterizzato dalla formazione del corpo luteo. E' un periodo che va dal 15° al 28° giorno del ciclo mestruale e viene anche definito fase luteinica. Il corpo luteo produce principalmente progesterone e solo in piccole quantità estrogeni. Con l'innalzarsi della concentrazione ematica di progesterone si ha un feedback negativo sulla produzione di LH in modo tale da ottenere la degenerazione del corpo luteo ovarico. Solo nel caso in cui l'ovocita venga fecondato il corpo luteo non va incontro a regressione ma viene mantenuto grazie alla secrezione da parte della placenta del Human Chorionic Gonadotropine (HCG). Nel caso in cui non si abbia l'impianto dell'embrione, il corpo luteo va incontro a regressione e si hanno le mestruazioni. Per permettere lo sviluppo dell'embrione durante la gravidanza all'interno dell'utero si sviluppa la placenta. Questo è un organo a forma di focaccia delle dimensioni di circa 15-20 cm e dello spessore di 2,5 cm. E' costituita da due porzioni, una sul versante fetale data da tessuto di origine del corion e una su quello materno data da tessuto uterino. La porzione derivante dal corion è ricoperta da villi che sono avvolti dal sangue materno. E' qui che, attraverso la membrana placentare, avvengono gli scambi di nutrienti e la rimozione delle molecole di scarto. La durata della gravidanza nella donna è calcolata aggiungendo 280 giorni alla data dell'ultima mestruazione, anche se con questo metodo solo il 5% dei bambini nasce nella data prevista.

## 1.2 Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo della pecora

### Anatomia:

L'apparato riproduttivo della pecora è simile a quello di tutti gli animali domestici. E' composto dai genitali esterni (vulva, clitoride), dalla vagina, dalla cervice, dall'utero, dagli ovidotti e dalle ovaie. La vulva è composta da due labbra, costituite da tessuto adiposo e da una porzione del

muscolo costrittore della vulva. Esternamente è ricoperta da cute ed è delimitata da una commessura dorsale e una ventrale. Separando le labbra vulvari è facilmente visualizzabile la loro superficie interna. Il clitoride, situato a livello della commessura ventrale delle labbra, è una struttura erettile omologa al pene delle dimensioni di 1 cm circa. Il vestibolo della vagina è posizionato cranialmente al clitoride ed è rivestito da un epitelio squamoso stratificato, ricco in ghiandole mucipare. La porzione tubulare dell'apparato riproduttore (vagina, cervice, utero e ovidotti) ha una struttura formata da una sierosa, un doppio strato di tessuto muscolare, una sottomucosa e infine da uno strato mucosale. La vagina è posizionata cranialmente al suo vestibolo; in condizioni normali le sue pareti sono costituite da pieghe di tessuto che vanno a creare una cavità virtuale. L'epitelio che riveste la vagina è di tipo squamoso pluristratificato. La cervice è situata all'estremità più craniale della vagina e viene a trovarsi all'interno di una piccola depressione del suo pavimento. Nella pecora il canale della cervice presenta 5 o 6 anelli che si sovrappongono l'uno con l'altro. Questo tragitto stretto e tortuoso fa sì che ci siano grosse difficoltà tecniche nel praticare la fecondazione artificiale trans-cervicale. In questa specie la cervice, a differenza della vagina, è difficilmente dilatabile. Proseguendo cranialmente alla cervice, si incontra l'utero. Questo è composto a sua volta da un corpo corto e da due corna, che in condizioni non gravidiche sono avvolte su se stesse con una forma simile alle corna dell'ariete. L'utero non gravidico giace per la sua interezza sul pavimento del bacino. La superficie sierosa dell'utero è connessa alla cavità addominale mediante il legamento largo. I due ovidotti uniscono i corni uterini alla borsa ovarica. Le ovaie sono due strutture ovali e di piccole dimensioni (circa 1,5-2 cm) in parte ricoperte dalla borsa ovarica. La loro superficie è solitamente rugosa. Durante il periodo riproduttivo o in gravidanza possono essere presenti due o più corpi lutei che secernono progesterone.

### Fisiologia

L'età, lo stato nutrizionale e la stagione dell'anno giocano un ruolo importante nel raggiungimento della maturità sessuale nella pecora<sup>23-26</sup>. Questi animali sono definiti poli estrali

stagionali con foto periodismo negativo, dato che la stagione in cui iniziano a ciclare è quella dove si ha un aumento della durata della notte (da Agosto fino a Gennaio)<sup>27</sup>. Gli animali che vivono nelle vicinanze dell'equatore non sono sensibili all'influenza delle stagioni. La stagionalità è controllata dalla percezione da parte dell'occhio della luce. Gli impulsi ottenuti vengono trasmessi dal ganglio cervicale superiore all'epifisi che è in grado di secernere durante la notte melatonina che a sua volta va a stimolare l'ipotalamo per la secrezione di GnRH<sup>28</sup>. L'ipotalamo modifica la sua risposta inibitoria agli estrogeni prodotti dai follicoli in via di sviluppo in una risposta positiva. Questo aumento nella secrezione di GnRH sembra responsabile della comparsa dell'estro durante la stagione riproduttiva. Per questo motivo è possibile cercare di ottenere l'attività ovarica anche al di fuori della stagione normale, sottoponendolo l'animale a cicli alternati di luce e buio artificiale in modo da mimare l'accorciamento delle giornate o impiantando nel sottocute dell'animale dei dispositivi in grado di rilasciare melatonina e far partire in questo modo la secrezione di GnRH.

Il raggiungimento della maturità sessuale dipende dalle interazioni dell'ipotalamo giovanile, dell'ipofisi anteriore e dell'ovaio. L'estradiolo prodotto dai follicoli in via di sviluppo ha un feedback negativo sulla secrezione di LH. Con l'inizio della pubertà questa influenza diventa sempre meno importante, il GnRH viene prodotto dall'ipotalamo e conseguentemente l'ipofisi rilascia più frequentemente LH. Questo permette lo sviluppo di nuovi follicoli che producono sempre maggiore estradiolo fino al raggiungimento di una soglia che provoca un feedback positivo sulla secrezione di LH. Il raggiungimento del picco di LH induce l'ovulazione e la conseguente luteinizzazione del corpo luteo. La durata del corpo luteo è di solito minore di quella del ciclo estrale successivo. Questa prima ovulazione solitamente non produce i cambiamenti comportamentali attribuibili all'estro per questo motivo il primo estro in questi animali è considerato silente.

L'estro nella pecora dura tra le 15 e le 50 ore (media 30); l'intervallo tra un estro ed il successivo è di 14-19 giorni (media 17). Le agnelle e gli animali indotti a ciclare al di fuori della

stagione riproduttiva hanno una minore durata dell'estro. Questi animali tendono ad ovulare verso la fine del periodo estrale o in alcuni casi dopo la comparsa delle sue manifestazioni comportamentali (edema vulvare, produzione di muco dalla vagina e anoressia).

Successivamente all'ovulazione il follicolo inizia a trasformarsi in corpo luteo e secerne progesterone. In caso di mancato concepimento dopo 12-13 giorni le ovaie producono ossitocina e l'endometrio uterino  $\text{PGF}_{2\alpha}$  che vengono trasportate a livello di arterie ovariche causando una regressione del tessuto luteale e della concentrazione di progesterone; permettendo in questo modo lo sviluppo di un nuovo follicolo.

Il trasporto dell'oocita all'interno dell'utero della pecora dura circa 2-4 giorni. In caso di sua fecondazione l'endometrio invia segnali all'ovaio per prevenire la lisi del corpo luteo e mantenere costante la produzione di progesterone.

La gestazione della pecora è di  $145 \pm 5$  giorni. Sono animali dotati di una placenta epiteliochoriale con cotiledoni. Il cotiledone placentare e la caruncola materna danno vita al placentoma cioè l'unità di scambio tra la circolazione materna e quella fetale. Nella pecora gravida dispersi sulla membrana corionica ci sono circa 90-100 cotiledoni. Attorno al 16° giorno di gestazione, il corion inizia a stringere contatti con le caruncole uterine. Questo tipo di placenta non permette il passaggio degli anticorpi dalla madre al feto rendendo necessaria l'ingestione del colostro (il secreto dei primi giorni delle ghiandole mammarie dell'animale) da parte dell'agnello per il trasferimento dell'immunità materna. Un'altra particolarità della placenta degli ovini è che questa è in grado, a partire dal 75° giorno, di produrre progesterone. Per questo motivo la somministrazione di agenti luteolitici dopo questo periodo di gestazione non garantisce l'aborto.

Il parto di questi animale è il risultato di complesse interazioni tra il feto ed il miometrio. Una volta sviluppatosi l'ipotalamo fetale viene prodotto CRH, che a sua volta stimola l'ipotalamo a rilasciare ormone corticotropo in maniera da far produrre dalle ghiandole surrenali del feto il cortisolo. Il cortisolo endogeno scatena a sua volta un aumento di concentrazione di estradiolo,

PGF<sub>2α</sub> e PGE<sub>2</sub>. In questo modo si ottiene una diminuita produzione di progesterone e il rilassamento della cervice. La responsività del miometrio all'ossitocina è aumentata grazie alla capacità stessa degli estrogeni di attivare questi recettori. Il parto in questi animali avviene normalmente in un periodo di 3-8 ore. La secondazione della placenta avviene solitamente entro 8 ore dal parto.

### 1.3 Cenni di embriologia e anatomia dell'apparato respiratorio di uomo

Anatomicamente l'apparato respiratorio dell'uomo comprende le vie aeree superiori ed inferiori (le narici, il faringe, il laringe, la trachea, i bronchi, i bronchioli) dove l'aria viene filtrata riscaldata ed umidificata ed i polmoni, dove, a livello alveolare, avvengono gli scambi gassosi necessari alla vita. Nell'embrione umano lo sviluppo dei polmoni inizia già a tre settimane di vita. Tradizionalmente sono state identificate 5 fasi di sviluppo intrauterino del polmone: quella embrionale, quella canalicolare, quella pseudoghiandolare, quella sacculare e quella alveolare.

La fase embrionale va dal concepimento fino alla 7° settimana di vita del feto. In questo periodo i polmoni si sviluppano dal solco laringo-tracheale e la trachea si divide nei due bronchi principali. I bronchi lobari e segmentali compaiono circa alla 5° settimana<sup>29</sup>, mentre dalla 6° è possibile individuare gli abbozzi delle arterie polmonari<sup>30</sup>. E' in questa prima fase di sviluppo del polmone che si possono verificare malformazioni tali da determinare la mortalità o la morbilità del feto. La fase pseudoghiandolare si estende dalla 7° fino alla 17° settimana di gestazione. In questo periodo si ha un sempre maggiore sviluppo dell'albero bronchiale e dello sviluppo della rete vascolare polmonare. Si verifica anche la differenziazione delle cellule epiteliali in tessuto cartilagineo, ghiandole sottomucosali, cellule muscolari lisce. Dalla 14° settimana circa il 70% delle vie respiratorie che saranno presenti alla nascita sono formate<sup>28</sup>. Con il progredire di questa fase, l'iniziale epitelio pseudostratificato è progressivamente sostituito prossimalmente da cellule colonnari e distalmente da cellule cuboidali. Le cellule cuboidali, ricche in glicogeno, rappresentano i pneumociti di II tipo immaturi. Nella fase

canalicolare, che va dalla 17° alla 27° settimana, si formano le strutture acinari tra cui i bronchioli respiratori, i dotti alveolari e gli alveoli primordiali. In questo periodo si verificano due importanti fenomeni: la differenziazione dei pneumociti di I e II ordine e lo sviluppo della barriera alveolo capillare<sup>30,31</sup>. Il surfattante inizia ad essere prodotto dalla 24° settimana di gestazione. La produzione di questo tensioattivo permette agli alveoli, al momento della nascita, di rimanere pervi, consentendo gli scambi gassosi e facendo sì che da questo momento in poi, grazie allo sviluppo della medicina perinatale, ci possa essere un aumento della sopravvivenza dei neonati prematuri. In caso di parti avvenuti durante questa fase è comunque inevitabile che il feto soffra di grave distress respiratorio. Durante la fase sacculare che perdura dalla 28° alla 36° settimana di gestazione, lo sviluppo delle vie respiratorie è quasi completata. Si ha la dilatazione dei tubuli acinari con la formazione dei sacculi e l'assottigliamento delle pareti delle vie respiratorie per aumentare la superficie per gli scambi gassosi. Contemporaneamente si ha una differenziazione dei pneumociti di II tipo in quelli di I tipo e un aumento della produzione di surfattante. L'ultima fase, quella alveolare, va dalla 36° settimana di gestazione fino ai due anni di vita del neonato. In questo periodo si formano i setti nelle vie respiratorie terminali e gli alveoli cominciano ad assumere la loro forma a coppa. Al momento della nascita si stima che il numero degli alveoli possa variare dai 20 ai 50 milioni<sup>31</sup>. Questo numero aumenta con la crescita dell'individuo fino ad arrivare, nell'adulto, ad un numero complessivo di 300-800 milioni, con soggetti di sesso maschile dotati di un numero maggiore di alveoli rispetto a quelli femminile<sup>32</sup>.

#### 1.4 Cenni di embriologia e anatomia dell'apparato respiratorio di pecora

Come tutti i mammiferi l'apparato respiratorio comprende in successione le narici, le cavità nasali, i seni paranasali, il faringe, il laringe, la trachea, i bronchi e i bronchioli. Le strutture coinvolte negli scambi gassosi comprendono i bronchi respiratori, i dotti alveolari, i sacchi alveolari e gli alveoli. La nostra attenzione sarà posta in particolare sullo sviluppo delle vie aeree inferiori. L'abbozzo respiratorio di queste si sviluppa come una doccia ventrale dell'intestino

anteriore a livello del quarto arco faringeo. La doccia laringo-tracheale forma un ispessimento allungato che si estende caudalmente. La successiva formazione di due docce laterali tracheo-esofagee, che si incontrano e si fondono in un setto tracheo-esofageo, separa la porzione distale dell'intestino anteriore (l'esofago primordiale) dalla porzione ventrale (l'abbozzo del tubo laringo-tracheale). Il tubo laringo tracheale, rivestito internamente di endoderma ed esternamente da mesoderma splancnico, si allunga e si biforca all'estremità chiusa del tubo andando a formare il primordio dei due bronchi principali. I bronchi si allungano in direzione caudale tra l'esofago ed il cuore. Nei mammiferi domestici il bronco principale destro si divide in quattro bronchi secondari o lobari, che andranno a formare i bronchi dei lobi craniale, medio, accessorio e caudale; il bronco principale di sinistra forma due bronchi lobari che saranno poi quelli di pertinenza del lobo craniale e caudale. A differenza di tutti gli altri Mammiferi domestici, nei ruminanti si stacca prima della biforcazione tracheale il bronco tracheale, che andrà a ventilare il lobo craniale destro. Dai bronchi lobari andranno poi a biforcarsi i bronchi terziari fino a quelli respiratori la cui parete forma i sacchi alveolari, dove avverranno gli scambi respiratori.

Lo sviluppo dei polmoni procede in parallelo alla ramificazione dell'albero bronchiale. Può essere diviso in base alle sue caratteristiche istologiche in cinque stadi. Lo stadio embrionale, pseudoghiandolare, canalicolare, del sacco terminale ed alveolare. Nel periodo embrionale, compreso tra la formazione del diverticolo laringo-tracheale e la divisione dei bronchi segmentali, i polmoni crescono nella cavità pleuro-pericardica e vengono circondati dalla pleura viscerale. Nello stadio pseudoghiandolare (75°-80° giorno di gravidanza) i polmoni si ramificano nel mesenchima come ghiandole esocrine. Inoltre a livello bronchiale si ha un processo di differenziazione cellulare che porta alla formazione di cellule epiteliali, ghiandole sottomucose, cartilagine e muscoli lisci; comincia anche la vascolarizzazione del tessuto polmonare. In questo stesso periodo si ha la fusione del canale pleuroperitoneale che dà vita al diaframma. Una mancata fusione di questo porta alla comparsa dell'ernia diaframmatica congenita (CDH) <sup>33</sup>. Nello stadio canalicolare il lume dei bronchi e dei bronchioli si dilata e si vengono a formare i

bronchioli respiratori; contemporaneamente aumenta la vascolarizzazione con la formazione di una rete capillare in diretto contatto con l'epitelio. Nello stadio del sacco terminale i bronchioli respiratori formano un gran numero di sacchi terminali, rivestiti da epitelio cubico, corrispondenti agli alveoli primitivi. L'epitelio di questi alveoli si differenzia da due tipi di cellule: cellule pavimentose alveolari di tipo I coinvolte negli scambi gassosi dopo la nascita e cellule alveolari di tipo II secernenti surfattante che riducono la tensione superficiale e prevengono l'adesione della parete alveolare durante lo sviluppo. E' in questa fase di sviluppo polmonare che viene eseguita nella pecora la correzione in utero della CDH <sup>34</sup>(125°-127° giorno di gestazione). Nello stadio alveolare, con le prime ispirazioni, si ha la dilatazione alveolare. In questo modo l'epitelio alveolare si distende notevolmente fino ad assumere un aspetto appiattito. Contemporaneamente i capillari posti attorno ai sacchi terminali stringono contatti intimi con le cellule alveolari e rimangono separate solo dalla fusione della lamina basale dell'alveolo e del capillare. Lo sviluppo alveolare continua per qualche tempo dopo la nascita con la formazione di bronchioli respiratori addizionali e con la suddivisione degli alveoli pre-esistenti.

### 1.5 Sintomatologia clinica nei pazienti affetti da CDH

I neonati affetti da CDH mostrano principalmente sintomi riferibili a patologie del sistema respiratorio. Questi possono variare dal riscontro di un lieve sforzo inspiratorio fino ad arrivare ad insufficienza respiratoria. La causa della sintomatologia sembra essere attribuibile sia all'ipoplasia del parenchima polmonare, che si viene a creare per la presenza dei visceri addominali all'interno del torace, che alle alterazioni presenti a livello di arteriole preacinari. Oltre ai sintomi riferibili al distress respiratorio, questi neonati possono presentarsi con l'addome notevolmente incavato e con sintomatologia gastro-intestinale. La sintomatologia può essere acuta, nel caso in cui si sia verificata un'incarcerazione di un'ansa intestinale, o più subdola, come la presenza di dolore addominale ricorrente o la comparsa di vomito, nel caso in cui l'occlusione al transito intestinale sia solo transitoria.

## 1.6 Revisione della letteratura sulla CDH

Il razionale quale punto di partenza per la risoluzione in utero della patologia è che l'ipoplasia polmonare, riscontrata in corso di CDH, sia un processo reversibile. Questa reversibilità è possibile nel caso in cui gli organi erniati vengano riposizionati in addome. La dimostrazione di quanto affermato è stata possibile grazie ad uno studio di Harrison<sup>35</sup> del 1980 in cui, simulando l'ernia diaframmatica, grazie alla presenza di un palloncino all'interno del torace di feti di pecora, e simulando la correzione della patologia sgonfiandolo al centoventesimo giorno di gestazione, i polmoni risultavano essere di dimensioni normali. Il razionale di Harrison derivava da precedenti studi di Haller in cui si simulava l'ernia diaframmatica, ottenendo ipoplasia polmonare, lasciando il palloncino gonfiato all'interno del torace per tutta la gravidanza<sup>36</sup>.

La prima e più semplice tecnica sviluppata per la risoluzione della CDH in utero, nella donna, prevedeva di intervenire sul feto per ridurre i visceri erniati e occludere il difetto diaframmatico. I visceri in questo modo erano riposizionati in addome, ma il notevole aumento di pressione endoaddominale portava a morte il feto. Infatti, a causa dell'ostruzione del ritorno venoso del cordone ombelicale, si sviluppava una imponente ascite. Questa eventualità si verificava soprattutto nei casi in cui il fegato era erniato in cavità toracica. Un'altra complicanza che si verificava frequentemente, e che poteva essere responsabile della morte del feto, era l'induzione prematura del parto.

Dati questi risvolti negativi la metodica venne presto abbandonata, vennero studiate nuove tecniche su diversi modelli animali, fino a svilupparne una che permettesse la possibilità di indurre artificialmente la crescita dei polmoni. Questa crescita si otteneva impedendo al liquido polmonare, normalmente prodotto durante la vita fetale, di fuoriuscire dalla trachea. Il razionale di questa tecnica derivava dalla constatazione che, durante l'autopsia di soggetti affetti da atresia laringea, i polmoni si presentavano di dimensioni maggiori rispetto a quelli normali.

Il motivo per cui questo accumulo di liquido induca la crescita del parenchima polmonare non è ancora ben nota, ma si pensa che sia attribuibile sia ad uno stimolo meccanico che porta ad una

distensione dei tessuti, sia ad una maggiore interazione tra i fattori di crescita presenti nel liquido polmonare e i recettori dell'epitelio polmonare.

A supporto della tesi che sia una maggiore interazione tra fattori di crescita e tessuto polmonare ad essere responsabile della loro iperplasia c'è lo studio di Papadakis in cui si è dimostrato che, sostituendo giornalmente con soluzione fisiologica il liquido prodotto dai polmoni di feti di pecora con trachea occlusa e comparandoli a quelli in cui il liquido veniva lasciato accumulare, si ottenevano polmoni di dimensioni significativamente minori<sup>37</sup>.

Una volta individuata la tecnica per far sviluppare il polmone il nuovo scoglio era trovare come occludere la trachea senza danneggiarla. Per ottenere una corretta chiusura del lume tracheale sono state proposte diverse metodiche tra cui: l'utilizzo di cateteri oro-tracheali cuffiati, clip vascolari da posizionare esternamente alla trachea, tappi costituiti da un polimero non riassorbibile in grado di espandersi a contatto con il liquido polmonare o di un palloncino in silicone da posizionare nel lume della trachea. La valutazione di tutte queste tecniche è stata effettuata su feti di pecora. Il metodo risultato meno efficace è stato quello che utilizzava cateteri oro-tracheali cuffiati, dato che questi non erano in grado di occludere completamente il lume della trachea impedendo in questo modo lo sviluppo dell'iperplasia polmonare. L'utilizzo di clip vascolari ha permesso una totale occlusione della trachea causando minimi danni all'organo, ma ha provocato, in alcuni casi, lesioni all'innervazione laringea. In più avrebbe costretto il neonato ad essere sottoposto, durante il parto cesareo, ad un intervento chirurgico per la rimozione del dispositivo stesso.

L'utilizzo di un tappo costituito di un polimero sintetico da posizionare nel lume della trachea permetteva anche in questo caso una sua valida chiusura, ma determinava un certo grado di tracheomalacia per la pressione che questo esercitava sulla parete dell'organo<sup>38</sup>.

L'ultimo metodo, quello che prevedeva l'utilizzo di un palloncino da posizionare nella trachea, si è rivelato il migliore poiché riusciva ad occludere correttamente il lume dell'organo senza indurre gravi danni al tessuto ed era facilmente asportabile dalle vie aeree al momento del parto.

La complicità di questa tecnica era riuscire a stabilire correttamente il diametro del palloncino da inserire nella trachea <sup>39</sup>.

I polmoni ottenuti con la metodica dell'occlusione tracheale appaiono sì di dimensioni maggiori, con una vascolarizzazione migliore <sup>40</sup> e con un maggior numero di alveoli rispetto a quelli di soggetti affetti da CDH, ma se analizzati microscopicamente, sono evidenziabili difetti di maturazione. Si assiste ad una insufficiente produzione di surfattante dovuta sia a una diminuzione del numero dei pneumociti di II ordine sia ad una loro immaturità dimostrata dalla presenza di molti granuli di glicogeno all'interno di queste cellule <sup>41</sup>. E' descritto inoltre, un minore livello di enzimi antiossidanti (catalasi, glutatione perossidasi) in grado di difendere le cellule polmonari dalla tossicità dell'ossigeno <sup>42</sup>. Il riscontro di queste complicanze ha fatto sì che nuove terapie venissero sperimentate per riuscire ad ottenere polmoni più maturi nei feti trattati con questa tecnica.

Per ovviare al problema della ridotta produzione di surfattante si è pensato alla sua instillazione intratracheale al momento della nascita o alla somministrazione alla madre di glucocorticoidi pre-natali per stimolarne la produzione da parte del feto.

Alcuni studi sembrano confermare l'utilità di queste metodiche<sup>43</sup>, altri sembrano escluderne ogni vantaggio <sup>44,45</sup>. Queste tecniche sono state anche proposte da alcuni autori<sup>46</sup> come terapie sostitutive alla legatura della trachea per migliorare le condizioni dei polmoni. Tuttavia uno studio del 2007 ha comparato i livelli di surfattante prodotti in feti umani della stessa età, affetti o meno da CDH ha stabilito l'assenza di differenze significative tra i due gruppi. La conclusione a cui giungono gli autori è che il distress respiratorio presente alla nascita in questi soggetti non sia unicamente attribuibile alla carenza di surfattante <sup>47</sup>.

Negli ultimi anni sono state studiate anche le interazioni tra alcuni fattori di crescita (la loro presenza o assenza) e un corretto sviluppo del polmone. Si è visto come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) giochi un ruolo importante nel corretto sviluppo del letto vascolare polmonare, come questo venga prodotto maggiormente se l'endotelio dei vasi polmonari è

sottoposto a distensione e come questo sviluppo sia direttamente correlato a quello alveolare (come nel caso dell'occlusione tracheale)<sup>48</sup>. Uno studio di Nobuhara<sup>49</sup> ha dimostrato come, in un modello animale dove è stata accelerata la crescita polmonare mediante legatura della trachea, si sia riscontrato un aumento del fattore di crescita Insuline Growth Factor-I (IGF-I) rispetto ai soggetti con ernia diaframmatica senza legatura. L'aumento della presenza di questa molecola può essere anche in questo caso attribuibile alla sovra distensione meccanica del polmone. Un altro studio di Li del 2004<sup>50</sup> ha valutato come la somministrazione pre natale di Endotelial Growth Factor (EGF) riduca l'ipoplasia polmonare in topi con ernia diaframmatica indotta mediante la somministrazione alla madre di Nitrofen (un erbicida), e come questo promuova la differenziazione e la maturazione di pneumociti di II ordine permettendo di migliorare la produzione di surfattante. E' stato anche dimostrato che il Keratocyte Growth Factor (KGF), diminuito in animali affetti da CDH, venga riportato a livelli normali grazie all'occlusione della trachea<sup>51</sup> e che una somministrazione intra-tracheale di questo fattore di crescita permetta un aumento dose dipendente dei pneumociti di II ordine nei ratti<sup>41</sup>.

L'aver scoperto come tutti questi fattori concorrano ad un sviluppo corretto del polmone può far presupporre che in futuro si potrà tentare di correggere l'ipoplasia polmonare indotta da CDH agendo direttamente su di essi, anche se ad oggi i dati, pur promettenti, necessitano di ulteriori conferme sperimentali.

Anche la terapia genica è stata sperimentata per correggere l'ipoplasia polmonare in utero. Un lavoro di Larson del 2006, in cui veniva inoculato all'interno dell'utero di ratti con CDH un virus contenente il gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)<sup>52</sup>, ha dimostrato un miglioramento nello sviluppo del polmone grazie ad un aumento del numero degli alveoli e della loro superficie utile per gli scambi gassosi.

Recentemente una nuova tecnica chirurgica sperimentale, proposta da Biard nel 2008, prevedeva di correggere la CDH mediante legatura del solo bronco principale del polmone omolaterale alla lesione diaframmatica<sup>53</sup>. Il risultato ottenuto però non ha dimostrato alcun beneficio,

dimostrando anzi un iposviluppo del polmone non occluso e non ottenendo una riduzione dei visceri erniati in torace. Bisogna però notare come questo studio non vada a comparare i risultati ottenuti da questa tecnica con quelli di soggetti sottoposti a legatura della trachea, ma solo con i soggetti sani e come non siano state valute le variazioni dello spessore dell'avventizia e della tonaca muscolare delle arteriole polmonari .

1.7 Ultime esperienze cliniche nella correzione in utero della CDH, risultati e criteri di inclusione.

Nonostante i notevoli sviluppi sia nelle tecniche chirurgiche, sempre più raffinate e mininvasive, che della terapia intensiva neonatale, il tasso di mortalità nei soggetti gravemente affetti da CDH continua a rimanere elevato <sup>54</sup>. La tecnica chirurgica più recente, utilizzata per la correzione della patologia, è la Fetoscopic Tracheal Occlusion (FETO). Viene offerta dal 2001, solo in centri specializzati, a feti con una bassa possibilità di sopravvivenza stimata in base al Lung to Head Ratio (LHR). Questo parametro è il fattore prognostico riconosciuto come più affidabile per la stima del tasso di sopravvivenza in questa patologia. Si ottiene dal rapporto tra l'area del polmone controlaterale alla lesione e la circonferenza della testa. Criterio di inclusione al programma di correzione della CDH con questa tecnica è la presenza di fegato erniato ed un LHR <1. Il motivo della scelta di questo valore come cut-off è rappresentato dal fatto che si è notato, dall'analisi dei dati presenti in letteratura, come feti con fegato non erniato e un valore di LHR >1, abbiano in genere una buona prognosi con terapia conservativa, pur richiedendo cure intensive neonatali. Al contrario feti con erniazione del fegato e un valore di LHR <1, sono caratterizzati da una prognosi infausta, con probabilità di sopravvivenza  $\leq 15-10\%$  dopo la

nascita se non si interviene sul feto in utero. (Tab 1.1)

Degree of pulmonary hypoplasia	LHR	O/E LHR <sup>a</sup>	N	Expectant management (Jani <i>et al.</i> , 2006b)	N	TO (Jani <i>et al.</i> , 2006a)
Extreme	0.4–0.5	15–19	2	0 (0%)	6	1 (16.7%)
Severe	0.6–0.7	20–23	6	0 (0%)	13	8 (61.5%)
	0.8–0.9	24–27	19	3 (15.8%)	9	7 (77.8%)
Moderate	<i>LHR &lt; 1.0</i>	15–27	27	3 (11.1%)	28	16 (57.1%)
	1.0–1.1	28–31	23	14 (60.9%)		n a
	1.2–1.3	32–35	19	13 (68.4%)		n a
Mild	1.4–1.5	36–39	11	8 (72.7%)		n a
	≥1.6	≥41	6	5 (83.3%)		n a
	<i>Total</i>		86	43 (50%)		

n.a., not applicable since these fetuses were not eligible for FETO in current protocols.

<sup>a</sup>% and conversion rounded up to 0.55 of LHR.

Tab.1.1 Relazione tra tasso di sopravvivenza neonatale e ipoplasia polmonare in feti affetti da CDH sottoposti a terapia conservativa o occlusione tracheale <sup>19</sup>

Altri criteri di inclusione per la correzione in utero della patologia sono riportati in tabella 1.2

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
Diagnosi di CDH con erniazione intratoracica del fegato o di una sua parte	Anomalie cromosomiche o genetiche
LHR <1.0	Altre anomalie fetali
Nessuna anomalia cromosomica o genetica rilevata all'amniocentesi o villocentesi	Controindicazioni materne all'anestesia
Nessuna altra anomalia fetale rilevata ecograficamente	Placenta previa
Epoca gestazionale:26-28 settimane	Obesita' materna severa (BMI > 35)
	Anomalie uterine
	Fattori di rischi per parto prematuro

Tab1.2 Alcuni criteri di inclusione per eseguire la tecnica FETENDO in soggetti affetti da CDH.

La tecnica chirurgica può essere così riassunta. Prima di iniziare l'intervento viene effettuata una ecografia alla madre in modo da identificare sia la posizione della placenta che quella del feto;

questa prima indagine permette di selezionare il punto più adatto per l'inserzione del trocar all'interno dell'utero e, nel caso in cui il feto risulti posizionato in maniera tale da rendere difficile l'accesso alla trachea, permette di spostarlo grazie a manipolazioni dall'esterno. Dopo la preparazione chirurgica dell'addome della madre, viene introdotta una cannula contenente un trocar delle dimensioni di 3,3 mm in direzione della bocca del feto. Il trocar viene poi rimosso e all'interno della camicia vengono inserite un'ottica del diametro di 1,2 mm con angolo di visione di 0° e un catetere con un palloncino gonfiabile all'estremità in posizione co-assiale. Questo tipo di catetere ha la peculiarità di poter disconnettere la sua estremità una volta gonfiata in modo da lasciare solo questa all'interno della trachea del feto. Una volta introdotto l'endoscopio all'interno della bocca del feto questo viene sospinto nella trachea fino alla sua biforcazione. A questo punto viene leggermente retratto e si posiziona il catetere circa 2 cm cranialmente alla biforcazione. Il palloncino viene poi riempito con soluzione fisiologica e, nelle settimane successive all'intervento, se ne controlla ecograficamente il corretto posizionamento. La procedura può essere svolta sia in anestesia generale che tramite tecniche loco regionali. Data la necessità di uno stretto monitoraggio del paziente, del costo dell'apparecchiature per svolgere la tecnica e della presenza di personale dotato di esperienza nell'eseguire la procedura, solo pochi centri in Europa sono in grado di offrire questa possibilità terapeutica<sup>55</sup>. Da uno studio multicentrico del 2009 eseguito su 210 pazienti affetti da CDH, in assenza di altre malformazioni concomitanti, solo 98 pazienti sono sopravvissuti dopo la correzione della patologia. Le morti sono avvenute in 4 casi in maniera inspiegabile dopo l'intervento di FETO, in 2 casi per la decisione della madre di interrompere la gravidanza per complicanze intercorse e in 106 casi dopo la nascita per problemi nella rimozione del palloncino (n=10), per il riscontro di anomalie nel cariotipo del neonato (n=2) e per problemi correlati ad ipoplasia polmonare, ipertensione polmonare o ad una eccessiva prematurità (n=94)<sup>54</sup>.

Bisogna inoltre ricordare che spesso i pazienti che sopravvivono alla correzione in utero della patologia presentano una notevole morbilità dovuta allo sviluppo di patologie polmonari,

patologie cardiache, patologie gastro-enteriche, deficit neurologici e malformazioni muscolo-scheletriche <sup>5,56</sup> dovute alle cure intensive, come la ventilazione meccanica o alla extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), istituite nei primi giorni di vita di questi pazienti <sup>57</sup>.

Anche se i risultati ottenuti sono sicuramente migliorati negli anni, la CDH continua a rimanere una patologia non completamente conosciuta che richiede ancora lo sviluppo di numerosi studi sperimentali per poter abbattere in maniera ancora più significativa il suo tasso di morbilità e mortalità.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro si prefigge di valutare una nuova tecnica chirurgica per la correzione in utero dell'ernia diaframmatica congenita sinistra, tramite l'occlusione selettiva del bronco omolaterale alla lesione mediante catetere. Il razionale di questa sperimentazione si basa sul fatto che il polmone omolaterale alla lesione diaframmatica è in genere il più severamente affetto da ipoplasia. Procedendo con l'occlusione del bronco principale di sinistra si pensa di riuscire ad ottenere un polmone sinistro iperplastico, in grado nel contempo di permettere il corretto sviluppo del polmone di destra, riuscendo in questo modo a ridurre il distress respiratorio del neonato. Per questo scopo alcuni organi isolati (n=4), derivanti da esperimenti precedenti e conservati, sono stati sottoposti ad analisi morfometrica. I dati ottenuti sono poi stati utilizzati per la progettazione del catetere endobronchiale. Ulteriori organi (n=4) sono stati utilizzati per l'analisi ex vivo dell'anatomia endoscopica dell'albero bronchiale in feti di età predeterminata (dati non presenti in letteratura), per la scelta di punti di reperi utili in fase operatoria e per il riscontro di eventuali alterazioni anatomiche conseguenti ai possibili differenti posizionamenti del feto all'interno degli involucri fetali. Successivamente a queste fasi, si procederà alla valutazione delle tecniche di occlusione endoluminale del bronco. L'introduzione del catetere sarà eseguita sia senza l'ausilio di tecniche che consentano la visione del dispositivo, "alla cieca", sia sotto visione ecografica o endoscopica. Inoltre alcuni soggetti verranno sottoposti alla sola creazione del difetto diaframmatico per valutare l'efficacia delle tecniche di creazione della patologia e relativa curva di apprendimento.

Tutti i feti saranno sottoposti a necropsia per confermare la presenza del difetto diaframmatico. I polmoni verranno successivamente prelevati e sottoposti ad indagini istologiche e immunoistochimiche. I risultati ottenuti verranno confrontati tra soggetti affetti da CDH, soggetti in cui la correzione della patologia avverrà mediante legatura della trachea e con animali sani.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Studio dell'anatomia tracheale, sviluppo del catetere per l'occlusione bronchiale e anatomia endoscopica delle base vie aree in feti di pecora

Nella fase iniziale della sperimentazione sono state misurate, in quattro feti di circa 126 giorni, la lunghezza della trachea dalla glottide alla biforcazione tracheale, il diametro tracheale, la lunghezza del bronco di sinistra fino alla sua prima biforcazione, il suo diametro e l'angolazione del bronco rispetto ad un piano perpendicolare all'asse maggiore della trachea. Tutti i dati sono stati misurati mediante l'uso di un calibro e sono stati registrati per progettare differenti cateteri in grado di occludere il bronco principale di sinistra. Questi dispositivi erano in polivinilcloruro (PVC) e lunghi 50 cm, in modo da rendere agevole la procedura di introduzione in trachea e da poter essere accorciati a piacimento del chirurgo una volta posizionati nel bronco, diminuendo così il rischio di dislocazione del catetere all'interno della trachea dovuto ai movimenti fetali. Tutti i cateteri possedevano un diametro esterno di 2 mm ed uno interno di 1mm. Erano cavi internamente per poter inserire una guida metallica, in modo da facilitare la loro introduzione in trachea e renderli maggiormente visibili ecograficamente. Possedevano inoltre la porzione terminale angolata di 35°-40° a sinistra (Fig 3.1). In uno solo modello era presente, al livello del punto di flessione una goccia in silicone, per visualizzare ecograficamente dove iniziava la parte terminale. La superficie di tutti i dispositivi è stata marcata ogni 10 cm. La marcatura è stata effettuata in maniera tale da renderla visualizzabile solo quando i cateteri presentavano la parte terminale angolata a sinistra.

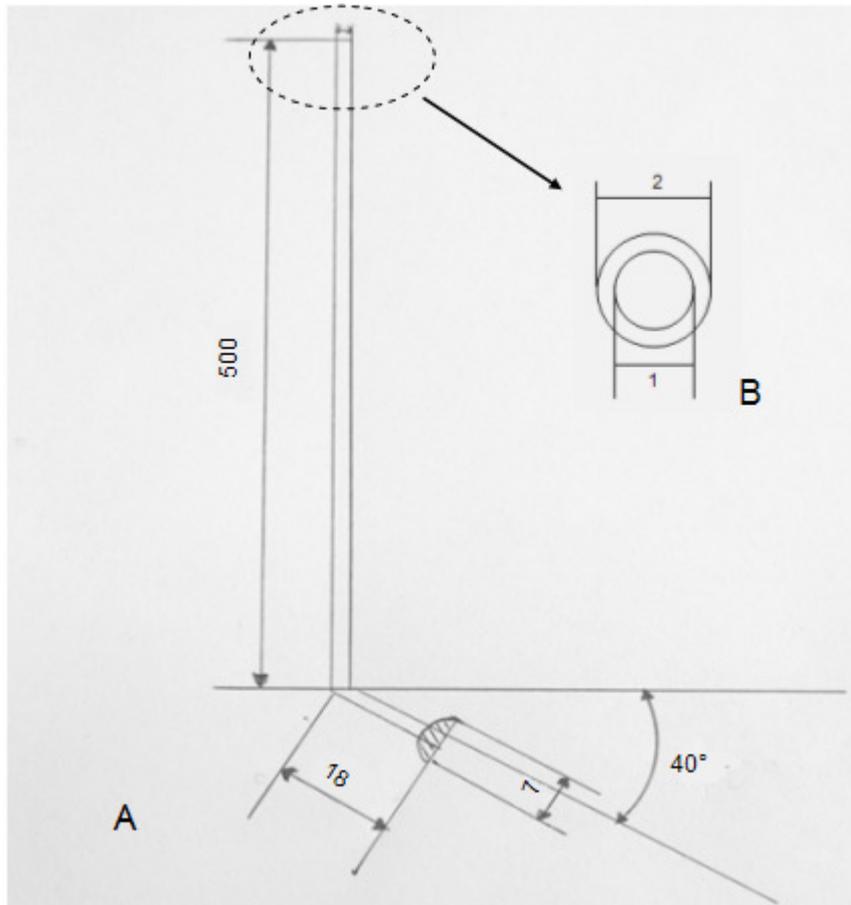


Fig 3.1 Schema per la realizzazione di un catetere per l'occlusione del bronco principale di sinistra; le misure si intendono in millimetri. A) proiezione ortogonale; B) Particolare della sezione trasversa

Sono stati prodotti inizialmente tre diversi prototipi di occlusore bronchiale che differivano tra loro principalmente per la porzione terminale. Un quarto è stato progettato dopo la prima prova sperimentale su un animale (Fig 3.2) Lo sviluppo di tutti questi dispositivi è avvenuto grazie alla collaborazione con la ditta BEL Laboratories di Cantù, Italia.



Fig 3.2 Particolare dell'estremità dei vari cateteri sviluppati.

Il catetere 1 possedeva una porzione angolata di  $35^\circ$  a 2 cm dal termine. Nel suo ultimo tratto era presente una sottile membrana a forma di coppa in grado di occludere il bronco grazie alla sua capacità di dilatarsi dovuta alla produzione del liquido polmonare.

La porzione terminale del catetere 2 era angolata di  $40^\circ$  e dotata di un'emisfera di silicone morbido di 7 mm di diametro in grado di accomodarsi all'interno del bronco. A livello del punto di flessione il catetere presentava una goccia di silicone per rendere ecograficamente riconoscibile l'ultimo tratto.

Il catetere 3 presentava nell'ultimo tratto un cono in silicone più rigido la cui base veniva introdotta nel lume del bronco di sinistra.

Il catetere 4 ricalcava il precedente tranne per il fatto che il cono terminale era applicato in maniera opposta, mimando una struttura ad "albero di natale".

Una volta ottenuti, i prototipi sono stati testati su un preparato anatomico al fine di valutare la loro capacità di occludere stabilmente il bronco di sinistra. Per valutare la tenuta dei diversi dispositivi all'interno del bronco è stata incannulata la porzione distale al punto in cui era posizionato il catetere, e si è proceduti all'iniezione di soluzione fisiologica fino a raggiungere una pressione di 300 mmHg. Per conoscere la pressione con cui veniva iniettata la soluzione fisiologica è stato creato un circuito collegato ad un manometro (Fig 3.2).



Fig 3.2 Studio dell'anatomia delle vie aeree di agnello e prove di valutazione dei cateteri sviluppati.

Per valutare l'anatomia endoscopica delle vie aeree distali del feto a seconda della sua posizione nell'utero, e individuare dei punti di repere che facilitassero il riconoscimento del bronco principale di sinistra, sono state eseguite endoscopie su polmoni e trachea di quattro agnelli simulando di posizionare l'animale in differenti decubiti : prono, supino, laterale destro e sinistro, supino con torsione destra e sinistra, prono con torsione destra e sinistra. Per ottenere le

immagini è stato utilizzato un broncoscopio rigido con grado di visione di 0° del diametro di 2,7 mm (Storz-Italia) collegato ad una telecamera 3CCD (Storz-Italia). Durante l'esecuzione delle endoscopie le immagini ottenute sono state registrate su supporti digitali, al fine di creare un atlante endoscopico della albero tracheo-bronchiale.

### 3.2 Selezione e preparazione degli animali:

Per lo studio sono state arruolate 16 agnelle con data di concepimento nota grazie alla sincronizzazione degli estri. Il protocollo di sincronizzazione prevedeva una doppia ecografia agli animali, al tempo 0 e dopo 40 giorni, con sonda trans-rettale da 7,5 MHz per accertarsi che questi non fossero già gravidi. Una volta eseguita la seconda ecografia si procedeva con l'introduzione intravaginale di spugnette impregnate con 20 mg di Cronolone, lasciate in sede 12 o 14 giorni a seconda che gli animali fossero o meno nella stagione riproduttiva. Al momento dell'estrazione delle spugnette venivano iniettati per via intramuscolare 500 U.I. capo di Pregnat Mare Serum Gonadotropine (PMSG) (ormone prodotto dalle coppe endometriali della cavalla) in modo da indurre lo sviluppo dei follicoli e l'ovulazione. A 48 ore dalla rimozione dei dispositivi veniva introdotto per 24 ore nel gregge un ariete per la fecondazione naturale delle agnelle. Trascorsi 40 giorni dal momento dell'accoppiamento veniva eseguita su tutti gli animali potenzialmente gravidi una nuova ecografia trans-rettale con una sonda lineare da 7,5 MHz per confermare l'avvenuta fecondazione.

Giorno 0	Giorno 40	Giorno 52	Giorno 54
Diagnosi ecografica assenza di gravidanza	Conferma della diagnosi posta e introduzione spugnette con impregnato Cronolone	Rimozione delle spugnette con impregnato Cronolone e somministrazione 500 U.I. PMSG	Fecondazione naturale

Tab 3.1 Protocollo di sincronizzazione degli estri (PMSG=Pregnant mare serum gonadotropine).

Gli animali gravidi erano poi suddivisi in maniera casuale in 4 gruppi (A,B,C,D). I soggetti del gruppo A erano quelli ai quali veniva creata l'ernia diaframmatica sinistra, ma non si procedeva a nessuna correzione chirurgica della patologia indotta (CDH). I soggetti del gruppo B erano

quelli in cui veniva creata l'ernia diaframmatica e in cui si procedeva alla correzione mediante legatura della trachea (TL). I soggetti del gruppo C erano quelli in cui veniva creata l'ernia diaframmatica e si procedeva alla sua correzione mediante l'occlusione selettiva del bronco principale di sinistra (LMBO). Infine i soggetti del gruppo D erano gli animali controllo cioè i feti non operati appartenenti a gravidanze gemellari (CTRL).

Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D
Animali CDH	Animali TL	Animali LMBO	Animali CTRL

Tab 3.2 Appartenenza degli animali ai diversi gruppi (CDH= ernia diaframmatica; TL= legatura trachea; LMBO= occlusione bronco principale sinistra; CTRL= controllo)

Gli animali dei gruppi A,B,C sono stati operati al 80° giorno di gravidanza per la creazione a sinistra dell'ernia di Bochdalek secondo la metodica proposta da Soper<sup>59</sup>. Successivamente sugli animali dei gruppi B,C è stata eseguita, al 126° giorno, la correzione mediante legatura della trachea o occlusione del bronco di sinistra. Tutti gli animali sono stati sottoposti al 140° giorno a parto cesareo. L'eutanasia degli agnelli è stata eseguita, con l'animale ancora in anestesia, mediante iniezione endovenosa di 20 mEq di KCl iniettati nel cordone ombelicale.

80° giorno di gravidanza	126° giorno di gravidanza	140° giorno di gravidanza
Creazione ernia diaframmatica	Correzione della patologia indotta tramite legatura della trachea o occlusione del bronco sinistro	Taglio cesareo, necropsia degli agnelli e prelievo polmoni per indagini istologiche

Tab 3.3 Schema degli interventi eseguiti sugli animali durante la sperimentazione

### 3.3 Protocollo anestesilogico:

Il protocollo anestesilogico delle le agnelle è stato lo stesso per tutti gli animali. Questo prevedeva una premedicazione dei soggetti mediante l'iniezione endovenosa di Diazepam (0,25 mg/kg) e Ketamina (5 mg/kg). L'induzione in anestesia avveniva con la somministrazione di isofluorano al 4% in ossigeno mediante maschera facciale fino alla perdita del riflesso laringeo; a questo punto gli animali venivano intubati mediante catetere oro-tracheale dal diametro interno

di 8 mm e mantenuti in anestesia generale per via inalatoria con isofluorano al 2%. Una volta posto l'animale in decubito dorsale sul tavolo operatorio, veniva introdotta in esofago una sonda per minimizzare il rischio di bronco-inalazione del contenuto ruminale. A tutti gli animali era cateterizzata la vena marginale dell'orecchio con un catetere da 20 G per la somministrazione di Ringer lattato alla velocità di 10 ml/kg/h, Cefazolina (1Gr/capo) e di Tramadolo (2 mg/kg). Allo stesso modo era cateterizzata anche l'arteria auricolare per valutare la pressione sistolica, diastolica e media in maniera invasiva durante la procedura. La pressione arteriosa media degli animali era mantenuta al di sopra di 80 mmHg mediante l'infusione ad effetto di efedrina al fine di assicurare una perfusione adeguata al feto. Tutti gli animali venivano posti in ventilazione controllata ad una frequenza di 12-14 atti respiratori al minuto, a seconda della loro taglia. In tre casi appartenenti al gruppo C, l'anestesia del feto è stata supplementata mediante l'iniezione intramuscolare di Fentanyl (5µg/Kg) e Vecuronio (0,1 mg/Kg).

### 3.4 Protocollo chirurgico:

Tecnica chirurgica per la creazione della CDH:

Per la creazione dell'ernia diaframmatica posterolaterale (Bochdalek) sinistra l'addome della madre veniva preparato chirurgicamente. Prima di procedere all'intervento veniva eseguita un'ecografia per valutare il posizionamento del feto all'interno dell'utero e per stabilirne la frequenza cardiaca. L'intervento prevedeva una laparotomia mediana dall'ombelico alle mammelle. Una volta eseguito l'accesso alla cavità addominale si procedeva con l'identificazione e l'esteriorizzazione dell'utero gravido. Individuato il corno uterino gravidico e la posizione della testa del feto, si procedeva con una isterotomia trasversale all'asse maggiore del corno fino ad accedere alla regione toracica sinistra del feto. Il liquido amniotico veniva aspirato in un contenitore graduato in modo da poterlo misurare e conseguentemente sostituire alla fine delle manualità chirurgiche con un volume identico di soluzione fisiologica sterile a

38°C contenente 250 mg di Ampicillina sodica. Particolare attenzione veniva data all'emostasi uterina e al mantenimento in situ degli invogli fetali tramite l'ausilio di pinze di Duval.

Si procedeva quindi ad una toracotomia a livello del 10° spazio intercostale (Fig 3.3).

Dopo aver eseguito l'accesso alla cavità toracica il lobo principale di sinistra veniva lussato cranialmente mediante l'utilizzo di tamponi e si procedeva ad una frenectomia parziale sinistra, in posizione dorso-laterale, per permettere agli organi addominali di erniare in torace (Fig 3.4).

In alcuni casi è stato necessario procedere ad una compressione addominale esterna, al fine di indurre la fuoriuscita degli organi in torace.

La breccia toracotomica veniva ricostruita mediante sutura continua con un filo in polipropilene 5-0 USP passante l'arco costale. La parete dell'utero veniva infine ricostruita con una doppia sutura introflettente eseguita con un filo in poliglactina 910 2-0 USP. Al fine di evitarne il distacco, gli invogli fetali venivano compresi nel confezionamento della sutura uterina. La sintesi dei piani muscolari dell'addome materno avveniva in maniera tradizionale.

Tecniche chirurgiche per la legatura della trachea e per l'occlusione del bronco principale di sinistra:

Al centoventiseiesimo giorno di gestazione l'animale veniva nuovamente sottoposto ad intervento chirurgico per correggere l'ernia diaframmatica utilizzando una delle due tecniche stabilite a seconda del gruppo di appartenenza. In entrambi i casi l'accesso al feto veniva eseguito come precedentemente descritto e in prossimità dell'organo bersaglio. Nei soggetti del gruppo B (legatura della trachea) la testa ed il collo del feto venivano exteriorizzate dall'utero in maniera da evidenziare la regione cervicale ventrale. La testa dell'agnello era introdotta in un guanto chirurgico sterile contenente soluzione fisiologica a 38°, in modo da inibire la comparsa di atti respiratori spontanei. Si procedeva ad una cervicotomia mediana all'altezza del 5°-6° anello tracheale della lunghezza di 1cm circa per identificare la trachea del feto. Dopo il posizionamento di un divaricatore autostatico, si procedeva alla scontinuatione per via smussa

dei piani muscolari fino al raggiungimento dell' organo che veniva isolato e occluso un filo non riassorbibile delle dimensioni 2-0 USP (Fig 3.5).

I piani scontinuati venivano riapposti senza l'utilizzo di mezzi di sintesi. La breccia cutanea era ricostruita mediante sutura continua, mentre l'utero e la parete addominale della madre venivano ricostruite come precedentemente descritto.

Anche nei soggetti appartenenti al gruppo C (LMBO) la testa ed il collo del feto erano esteriorizzati per permettere l'esecuzione di una cervicotomia mediana. Veniva eseguita una tracheotomia temporanea a livello di 5°-6° anello tracheale per l'introduzione del solo occlusore bronchiale, quando la tecnica è stata eseguita "alla cieca" o sotto guida ecografica (con una sonda convex da 3,5 MHz, Hitachi), e anche di un broncoscopio quando il catetere è stato posizionato sotto visione (Figg 3.6 e 3.7). L'ottica utilizzata era di tipo rigido del diametro di 2,7 mm con grado di visione di 0° (Storz-Italia). Al fine di rendere più chiara la visione endoscopica, data la torbidità del liquido presente nelle vie aeree, sono stati eseguiti dei lavaggi all'interno della trachea con soluzione salina sterile a 38° utilizzando un catetere del diametro di 1mm. La ricostruzione dei piani scontinuati avveniva come descritto precedentemente.

Nell'immediato periodo post-operatorio tutti gli animali erano sottoposti ad una ecografia trans addominale per ri-valutare la frequenza cardiaca fetale. Nei 5 giorni successivi all'intervento veniva somministrata una terapia antibiotica con Ampicillina sodica alla dose di 20 mg/kg SC SID e venivano ripetute quotidianamente ecografie per stabilire la vitalità dei feti.

Al centoquarantesimo giorno si procedeva all'estrazione dei feti tramite parto cesareo in anestesia generale e alla loro eutanasia mediante un bolo endovenoso di 20 mEq di KCl .

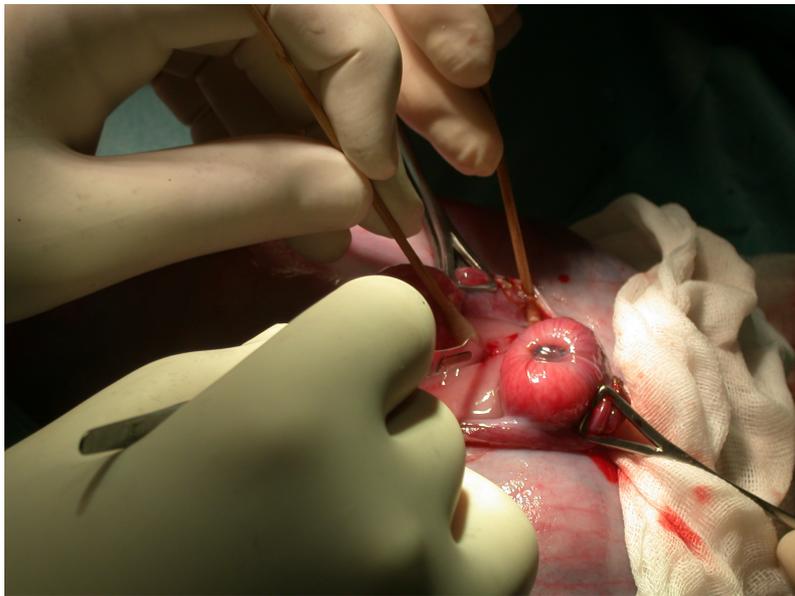


Fig 3.3 Creazione breccia toracotomica nel feto.

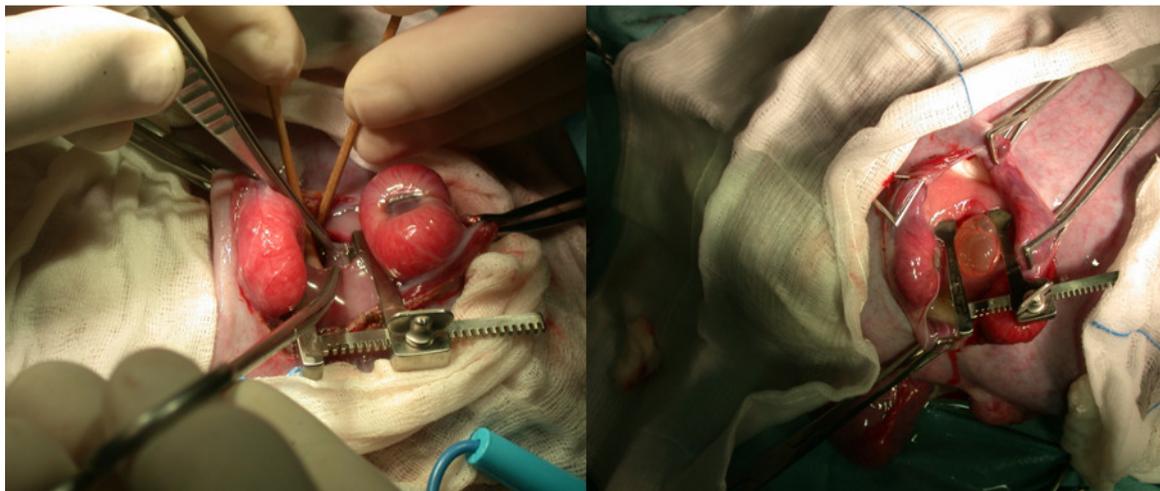


Fig 3.4 Creazione del difetto diaframmatico ed erniazione in torace dei visceri addominali.

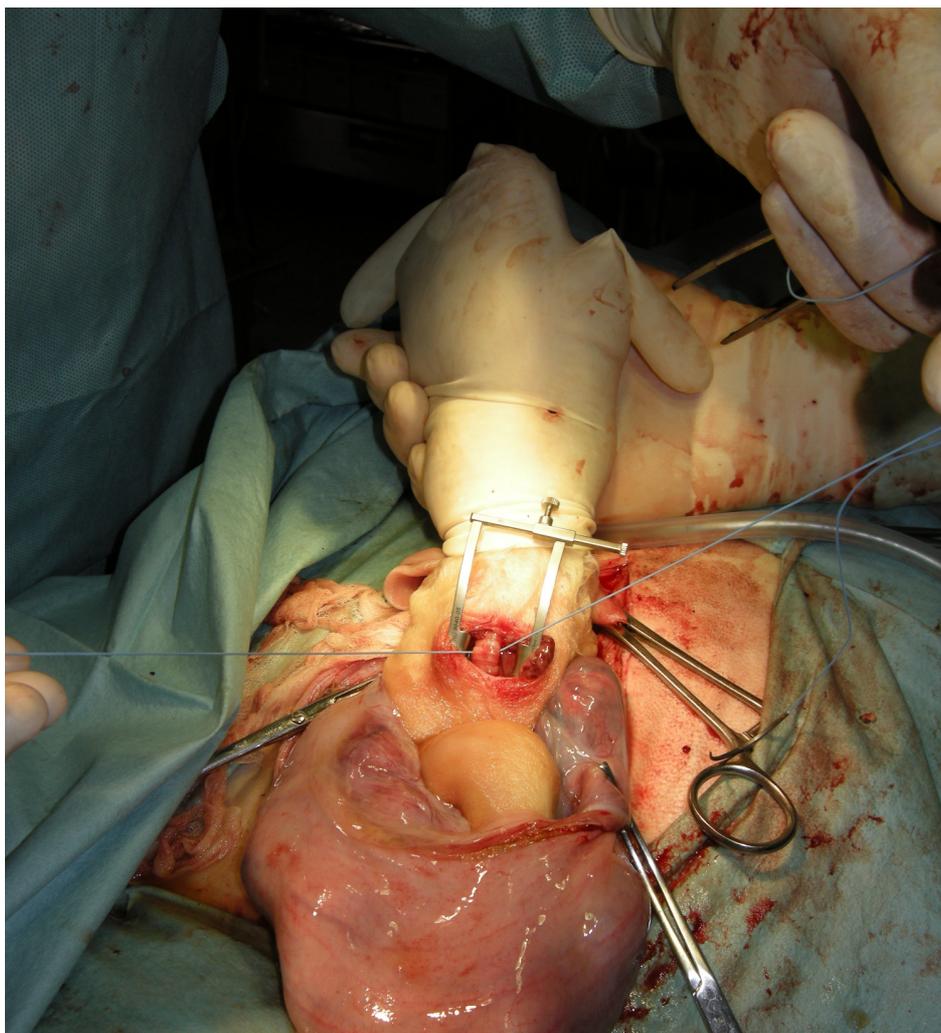


Fig 3.5 Legatura della trachea con filo non riassorbibile

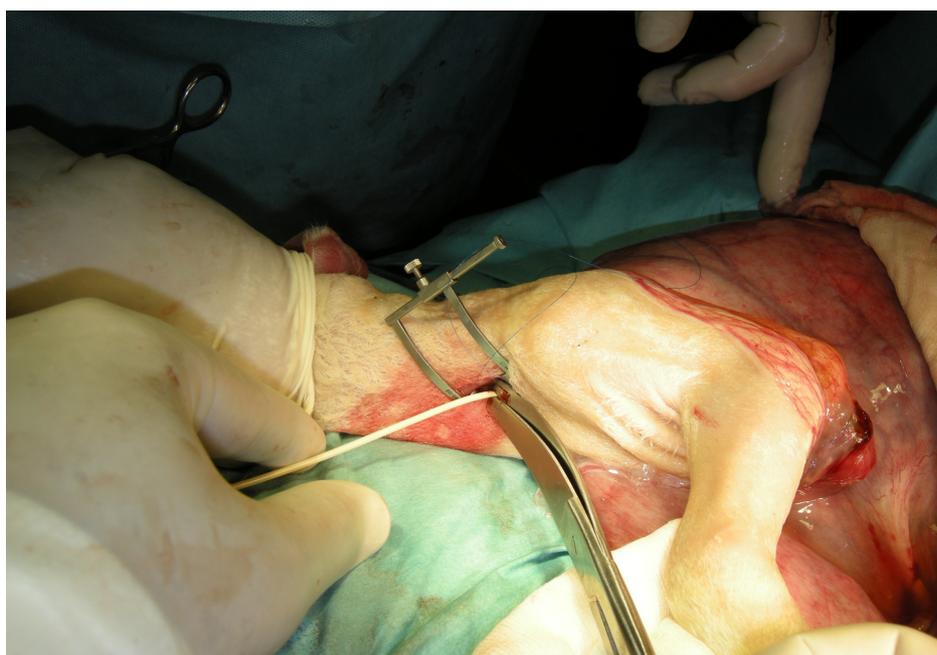


Fig 3.6 Introduzione del catetere per l'occlusione del bronco principale di sinistra e sua resezione.

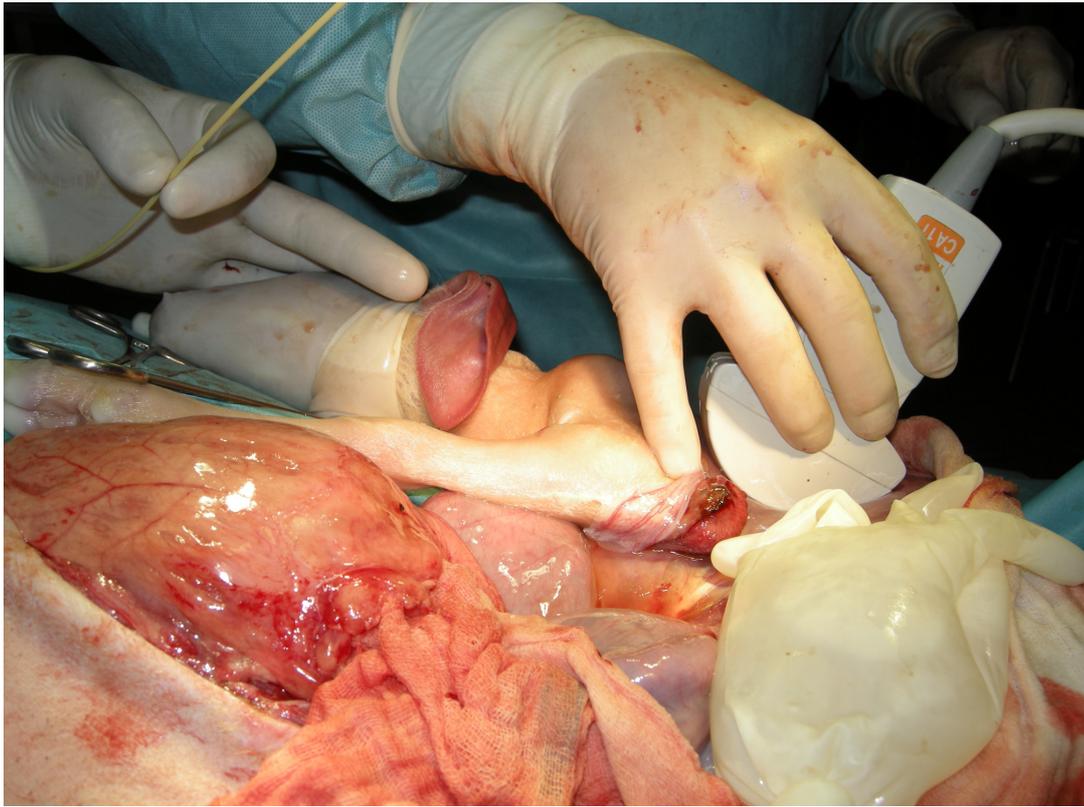


Fig 3.7 Tentativo di introduzione del catetere sotto guida ecografica

### 3.5 Analisi dei dati ottenuti

Di tutti i feti portati a termine gravidanza sono stati pesati i polmoni. Questo dato è stato rapportato al peso degli agnelli stessi in modo da ottenere un indice dello sviluppo polmonare (LW/BW). Successivamente gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ad una pressione di 20cm di H<sub>2</sub>O per 12 ore. Sono stati allestiti campioni per la valutazione del numero di pneumociti di II tipo mediante immunisto chimica, per poter contare il numero di cellule che reagivano con anticorpi anti SP-B. La conta è avvenuta manualmente andando ad individuare le cellule positive alla colorazione su 5 campi per ogni lobo polmonare basale di destra e di sinistra nei soggetti del gruppo C, e solo di sinistra nei soggetti degli altri gruppi. Gli anticorpi anti SP-B utilizzati per l'immunisto chimica sono stati prodotti dall'azienda Millipore (AB3780) e dall'azienda DBA (S8401). Entrambi i prodotti sono stati dichiarati dalle due aziende capaci di reagire con i pneumociti di II tipo della pecora. E' stato valutato istologicamente lo spessore

della tonaca muscolare, dell'avventizia e della parete di 5 arteriole polmonari per ogni animale su vetrini colorati con ematossilina-eosina. La metodica per la valutazione è stata mutuata dall'analisi della letteratura<sup>58</sup>. L'esecuzione delle varie misurazioni è stata svolta su microfotografie grazie all'utilizzo di un software gratuito sponsorizzato dal National Health Institute (NIH) in grado di funzionare su sistema operativo Macintosh (software ImageJ). Per poter eseguire le misurazioni è stato necessario inserire una misura di riferimento nota, dato che il programma è impostato per calcolare solo i pixel dell'immagine. Nel nostro caso è stato scelto il diametro di una emazia di pecora che, da letteratura, ha una misura media di 12  $\mu\text{m}$ <sup>60</sup>. Tutte le immagini sono state analizzate utilizzando una magnificazione di 20x.

### 3.6 Analisi statistica:

La statistica è stata eseguita con il software PASW18.0 prodotto dall'azienda SPSS. Tutti i valori sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Per comparare tra i vari gruppi i differenti valori di LW/BW e lo spessore delle pareti arteriolari, della tonaca muscolare e dell'avventizia è stata usata una analisi della varianza univariata GLM. La significatività statistica è stata assunta per  $P < 0,05$ . Per confrontare tra loro la numerosità dei pneumociti di II tipo presenti nei vari gruppi è stato utilizzato il T test per componenti indipendenti.

## 4. RISULTATI

4.1 Risultati dello studio dell'anatomia tracheale, sviluppo del catetere e anatomia endoscopica delle base vie aeree in feti di pecora

Le misure della lunghezza tracheale presa dalla glottide alla sua biforcazione, la lunghezza del bronco principale di sinistra, il diametro tracheale e del bronco di sinistra e l'angolo formato dal bronco con un piano perpendicolare all'asse maggiore della trachea, sono stati i parametri su cui ci siamo basati per progettare i diversi occlusori bronchiali (Tab 4.1).

Lunghezza trachea	Lunghezza bronco di sinistra	Diametro tracheale	Diametro bronco di sinistra	Angolo tra piano perpendicolare alla trachea e bronco di sinistra
16 cm	2,3 cm	1 cm	0,8 mm	40° circa

Tab 4.1 Misure dei principali parametri valutati per la progettazione degli occlusori bronchiali

I cateteri così sviluppati sono stati testati su trachea e polmoni posti in formalina, di agnelli di circa 126 giorni. Tutti i dispositivi hanno superato il test di tenuta della pressione a cui sono stati sottoposti. Hanno dimostrato di riuscire a mantenere occluso il bronco fino a una pressione di 300 mmHg. Questa pressione è sicuramente maggiore di quella prodotta dall'accumularsi del liquido polmonare, dato che il valore massimo registrato nel modello animale di occlusione tracheale è stato di  $23,7 \pm 4,6$  mmHg<sup>61</sup>.

Il primo dispositivo (catetere 1) è stato scartato dopo la prova su preparato anatomico per il rischio di ribaltamento della membrana presente nella parte terminale, durante la sua introduzione. Questo perché la coppa era costituita da uno sottile strato di silicone e pur dilatandosi al passaggio in un liquido, non si opponeva al suo ribaltamento durante la sua introduzione nel lume tracheale.

Il secondo dispositivo (catetere 2) è stato quello scelto per l'occlusione del bronco negli animali sperimentali, vista la capacità di inserirsi abbastanza facilmente al suo interno quando testato su

pezzo anatomico. Il catetere è stato però successivamente scartato per essersi rivelato difficilmente introducibile nel bronco di sinistra durante l'esecuzione dell'esperimento sul primo animale.

Il terzo dispositivo (catetere 3), è stato scartato per la maggiore rigidità della porzione terminale in silicone che rendeva difficoltosa l'introduzione nel bronco già durante le prove su preparato anatomico.

L'ultimo dispositivo (catetere 4) creato è stato quello utilizzato per tutti gli altri animali sperimentali. La scelta di utilizzare questo catetere è stata fatta perché, vista la sua particolare forma ad "albero di natale", ha permesso di occludere correttamente qualsiasi bronco fino a un diametro massimo di 8 mm.

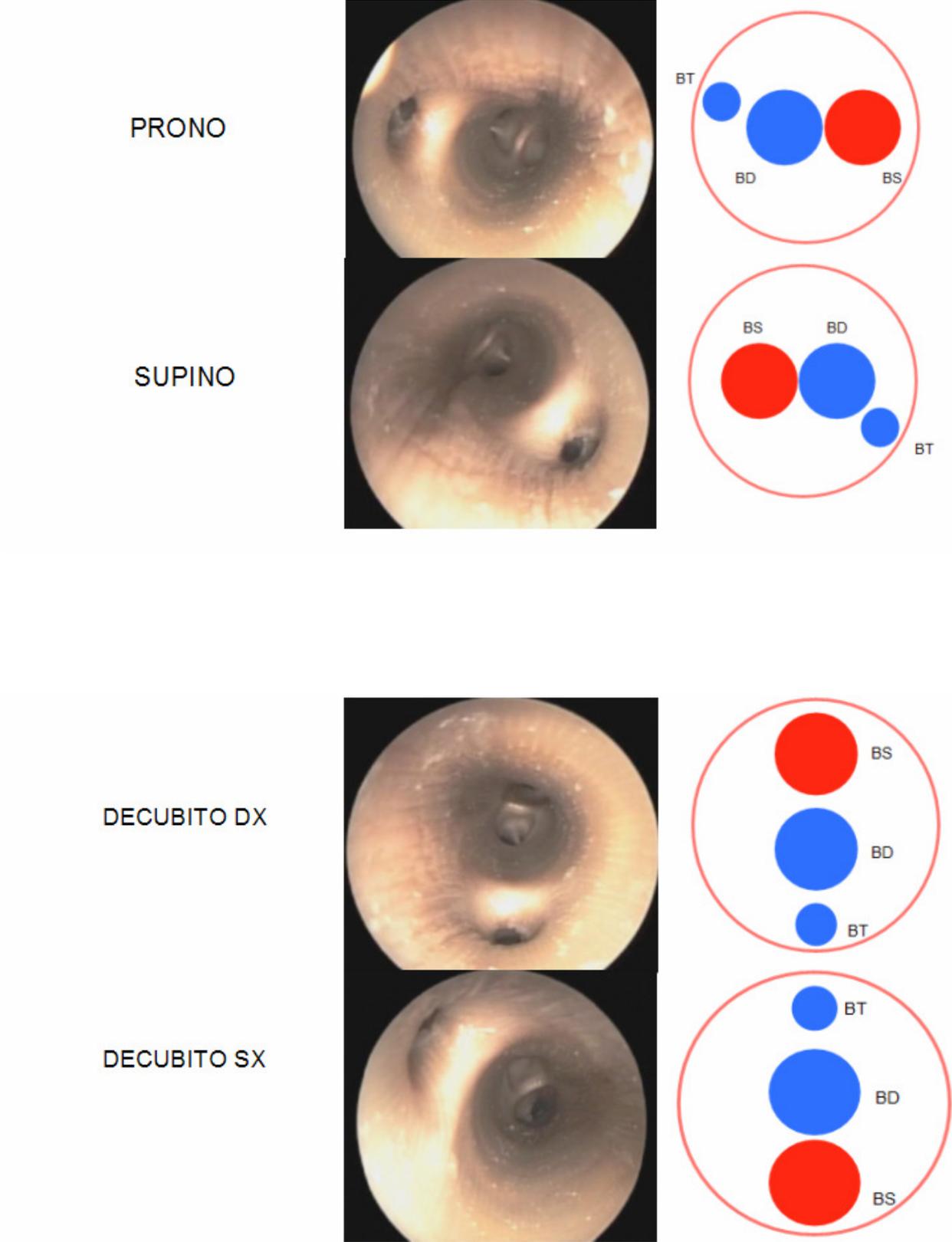
L'aver marcato la superficie del catetere ogni 10 cm, in maniera tale da riconoscere quando questo presentava la sua parte terminale angolata a sinistra, non è bastato a rendere efficace l'introduzione del dispositivo "alla cieca".

L'introduzione del catetere sotto visione ecografica non ha permesso di stabilire se questo fosse posizionato nel bronco sinistro per la mancata capacità di visualizzare correttamente la biforcazione della trachea e lo stesso catetere all'interno della trachea. Infatti dopo un primo tentativo fallito eseguito con questa metodica, si è optato per l'introduzione del dispositivo sotto guida endoscopica. Questa tecnica ha permesso di riconoscere il bronco principale di sinistra con relativa facilità.

L'idea di utilizzare un catetere cavo internamente per introdurre una guida metallica in modo da renderlo più rigido, facilitando la sua introduzione all'interno del lume tracheale, si è rivelata opportuna.

Nella fase di preparazione dei cateteri è stata studiata l'anatomia della trachea e dei bronchi del feto a seconda del variare del suo posizionamento all'interno dell'utero. Questo è stato fatto per poter fissare dei punti di repere che permettessero di inserire il catetere nel bronco principale di sinistra con una buona sicurezza durante la fase chirurgica. La possibilità di individuare durante

le endoscopie eseguite il bronco tracheale, caratteristica anatomica presente solo nei ruminanti, ha permesso di riconoscere con moderata facilità questa struttura. Le immagini ottenute durante le differenti endoscopie sono riportate in figura 4.1.



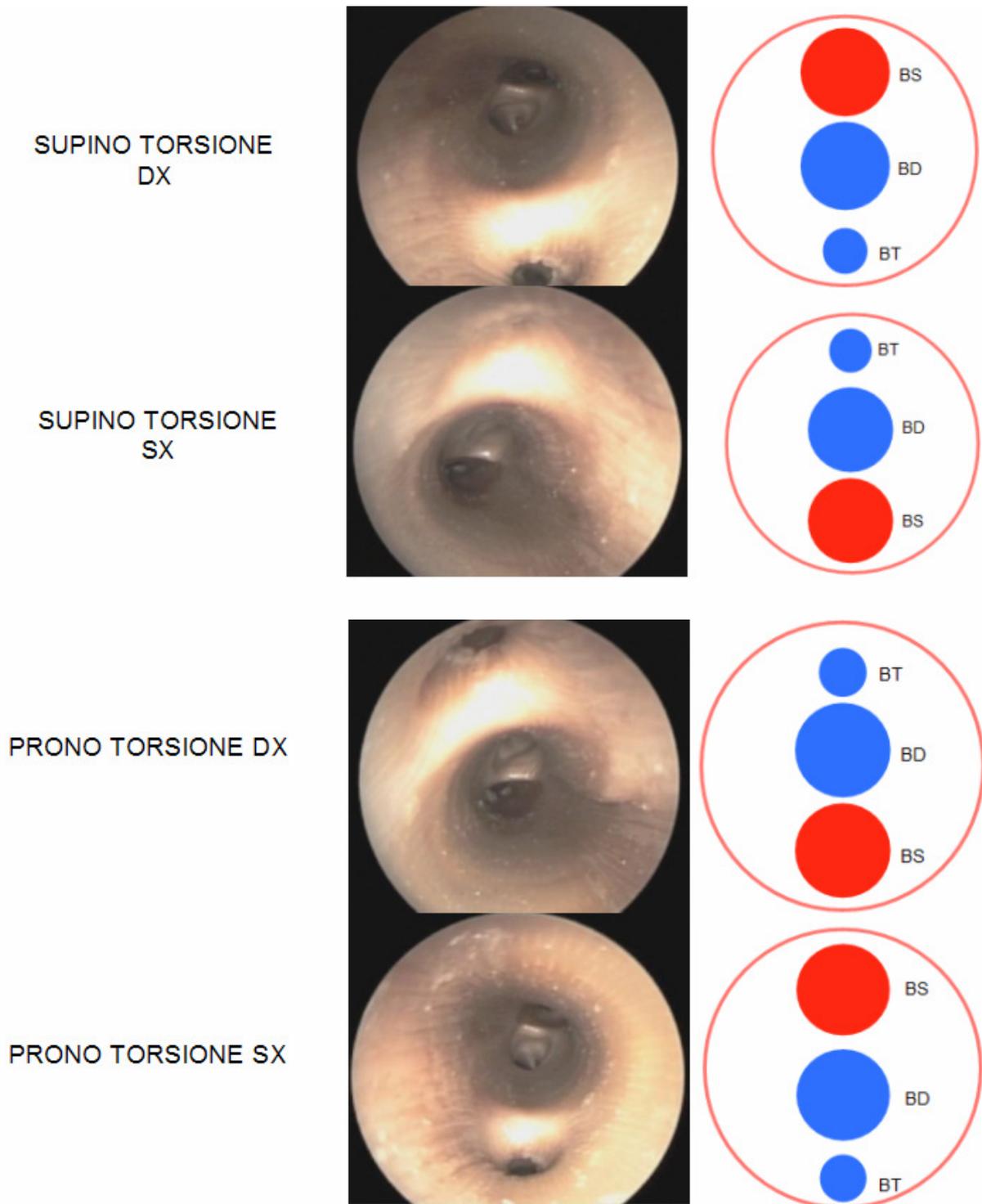


Fig 4.1 Immagini broncoscopiche e relativi schemi della variazione dell'anatomia delle vie aeree profonde a seconda del posizionamento del feto nell'utero (BS= bronco sinistro, BD= bronco destro; BT= bronco tracheale)

Grazie alla combinazione tra la tecnica di posizionamento del catetere sotto visione endoscopica e allo studio dell'anatomia endoscopica della regione, il dispositivo è stato posizionato correttamente in quattro casi su cinque.

L'unico caso in cui non è stato introdotto correttamente è stato attribuibile ad una sua rottura (distacco della parte in silicone dal catetere in PVC) durante l'introduzione accidentale di questo nel bronco destro. In questo caso, anche se avevamo notato di aver inserito il catetere nel bronco destro, non siamo riusciti a rimuovere la porzione distaccata per posizionare un nuovo catetere.

#### 4.2 Risultati degli interventi chirurgici e complicanze riscontrate:

Dalle 16 agnelle incluse nel nostro studio, abbiamo ottenuto: due animali con ernia diaframmatica (Fig 4.2), tre animali sottoposti a legatura della trachea, tre animali a cui è stato occluso un bronco principale e quattro animali controllo.

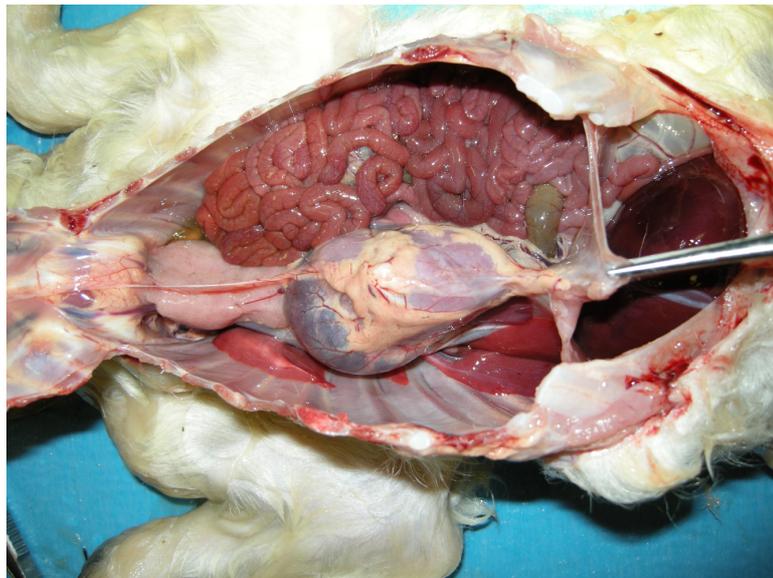


Fig 4.2 Aspetto autoptico di agnello con ernia diaframmatica di notevole entità.

Nei soggetti del gruppo occlusione del bronco in due casi è stato occluso quello di destra e in uno solo quello di sinistra. Inoltre due dei tre animali non sono arrivati a termine sperimentazione, ma sono stati inclusi lo stesso nello studio perché deceduti circa 72 ore post intervento. La scelta di includerli è stata fatta per valutare la tempistica con cui comparivano le modificazioni indotte da questa tecnica sul polmone. L'unico animale arrivato a fine sperimentazione di questo gruppo ha subito l'occlusione del bronco di destra (Fig 4.3).

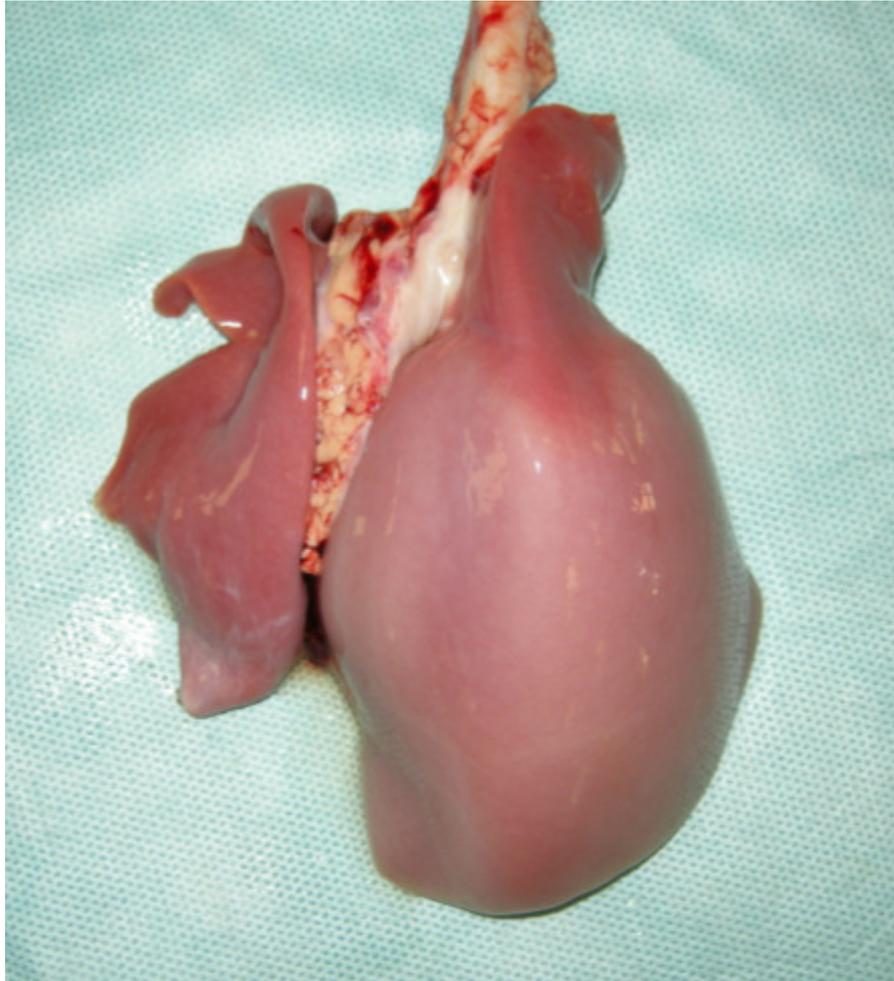


Fig 4.3 Aspetto macroscopico del polmone appartenente al soggetto del gruppo RMBO

I soggetti che hanno composto il gruppo controllo sono gli agnelli non operati appartenenti alle gravidanze gemellari degli altri gruppi. I due animali in cui è solo stata creata l'ernia sono gli unici provenienti da una gravidanza non gemellare.

I decessi degli altri feti operati sono avvenuti: in tre casi nei primi giorni dopo l'intervento di creazione dell'ernia diaframmatica e in altri tre casi entro le 24 ore dal posizionamento del catetere nel bronco sinistro. Un soggetto a cui era stata creata l'ernia è arrivato a fine esperimento, ma la porta erniaria era stata ostruita da una aderenza venutasi a formare tra la milza ed il diaframma (Fig 4.4). Un animale a cui è stata legata la trachea è deceduto per l'erniazione dei visceri addominali dalla breccia toracotomica.

In due casi in cui si è verificata la morte dei feti sono stati eseguiti dei tamponi microbiologici per valutare il possibile sviluppo di una infezione intra operatoria. Gli esiti dei tamponi hanno dato esito negativo.

Le principali complicanze chirurgiche riscontrate durante l'intervento di creazione dell'ernia diaframmatica sono state: la frattura di una costa in un caso e la rottura parziale della milza in altri due. Quella riscontrata durante gli interventi di correzione della patologia è stata la lacerazione dell'utero per la difficoltà di reintrodurre il feto al suo interno.

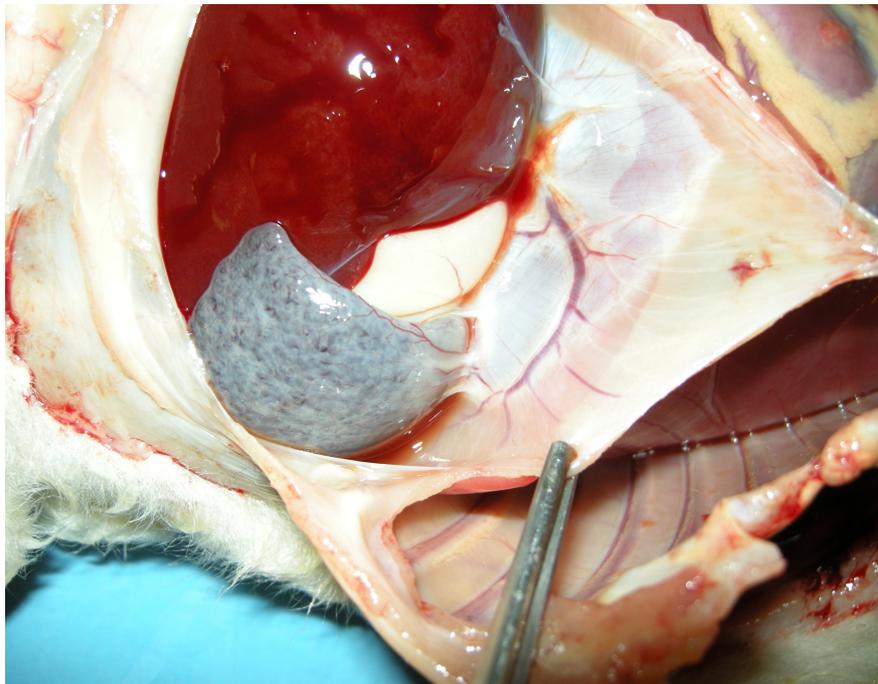


Fig 4.4 Aderenza tra milza e diaframma che occlude il difetto diaframmatico precedentemente creato.

Per confermare l'efficacia della creazione dell'ernia, su tutti i soggetti prematuramente deceduti, è stata eseguita un'autopsia. Dall'autopsia è stato possibile stabilire la corretta creazione dell'ernia diaframmatica in tutti i casi tranne uno in cui la milza, aveva occluso il difetto diaframmatico e creato un'aderenza con il polmone.

Due dei tre feti a cui erano stati somministrati prima dell'intervento di correzione dell'ernia Fentanyl e Vecuronio, per approfondire il piano anestesiológico, fornire analgesia e impedire la comparsa del respiro nel feto, sono deceduti.

L'analisi delle medie delle frequenze cardiache fetali, registrate immediatamente prima e dopo la fine della chirurgia, al fine di valutare la presenza di sofferenza fetale, è stata rispettivamente di 189 e di 179 battiti al minuto.

#### 4.3 Risultati comparazione Lung Weight/ Body Weighth:

La misurazione del LW/BW è stata eseguita per i soli animali arrivati a fine sperimentazione. I valori ottenuti sono riportati in tabella n 4.2

Gruppo feto	Peso feto	Peso polmoni	LW/BW
CDH	4,2 Kg	51,6 g	0.012
CTRL	3,9 Kg	87,6 g	0.022
CTRL	2,9 Kg	77,6 g	0.026
TL	2,7 Kg	99,4 g	0.036
RMBO	2,8 Kg	92,0 g	0.033
CDH	4,4 Kg	57,7 g	0.013
TL	1,8 Kg	94,5 g	0.052
CTRL	1,9 Kg	70,8 g	0.037
CTRL	1,9 Kg	86,6 g	0.045
TL	1,6 Kg	102,8 g	0.064

Tab 4.2 CDH= ernia diaframmatica congenita; CTRL= Controllo; TL= legatura trachea; RMBO= occlusione bronco destro; LW/BW= rapporto tra i pesi del polmoni e dell'animale.

Analizzando i dati si può vedere come i soggetti con ernia siano quelli che possiedono polmoni di dimensioni minore avendo una media di LW/BW=0,0125. La media dei valori di LW/BW nel gruppo con legatura tracheale risulta essere maggiore di tutti gli altri gruppi (LW/BW=0,05), ma con un valore statisticamente significativo solo rispetto agli animali con ernia. Tra i soggetti sani la media valori di LW/BW è risultata essere 0,032. Nell'unico caso dove si è giunti a termine dell'esperimento del gruppo dell'occlusione bronchiale, si è registrato un valore di LW/BW di

0,033. La differenza tra il LW/BW dei soggetti con ernia e quelli sani non è risultata, seppur di poco, statisticamente significativa.

#### 4.4 Risultati comparazione numero di pneumociti di II tipo:

Gli anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica forniti dalla ditta Millipore (AB3780) hanno reagito scarsamente con i pneumociti di II tipo di pecora. Dati i risultati di cattiva qualità ottenuti con questo prodotto le istologie sono state scartate e ripetute con nuovi anticorpi acquistati presso la ditta DBA (S8401).

I risultati ottenuti con questo nuovo prodotto sono stati giudicati soddisfacenti (Fig 4.5e 4.6).

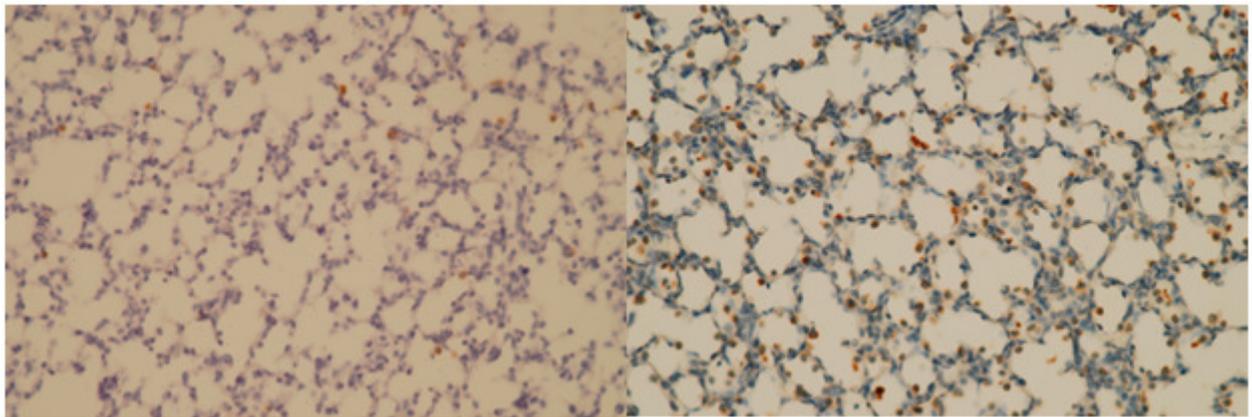


Fig 4.5 Confronto risultati immunoistochimica con anticorpi anti SP-B Millipore (sinistra) e DBA (destra) eseguiti su uno stesso soggetto.

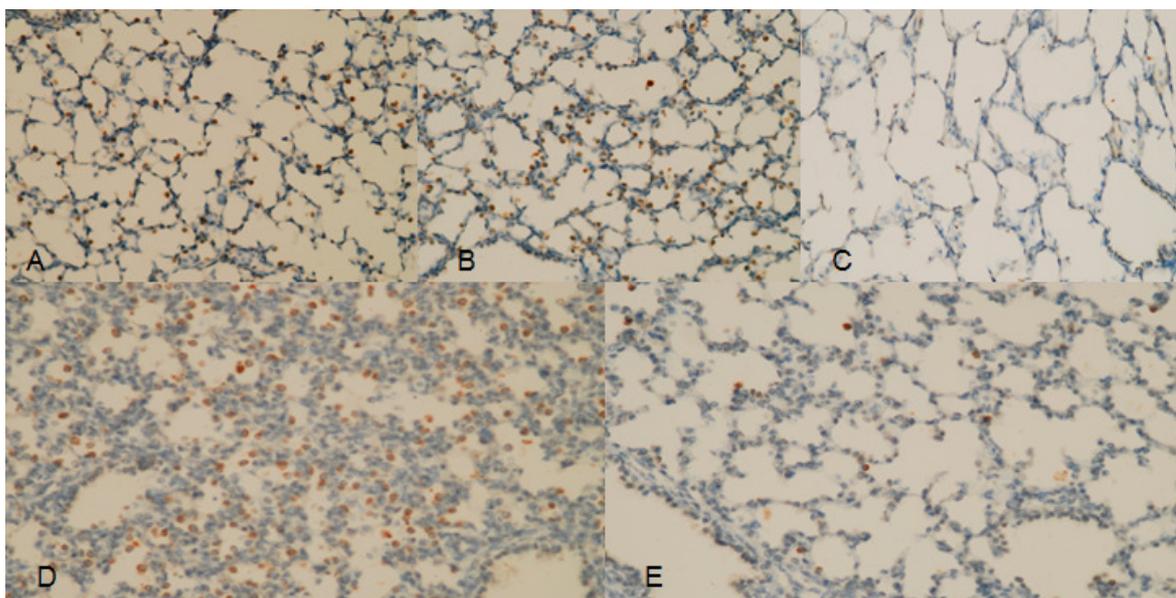


Fig 4.6 Microfotografie rappresentanti i pneumociti di II tipo presenti nei diversi gruppi (A=CTRL, B=CDH, C=TL, D=RMBOsx, E=RMBO dx)

La media e la deviazione standard del numero dei pneumociti di II tipo presenti tra i gruppi e nei singoli soggetti sono riportati in tabella 4.3 e 4.4.

TL	CTRL	RMBO DX e SX		CTRL	LMBO DX e SX		CDH	TL	CTRL	CTRL	CDH	TL	RMBO DX e SX	
24	59	41	131	58	120	39	107	18	72	70	105	20	170	11
16	52	48	143	68	156	46	102	17	65	63	101	5	190	39
18	40	57	120	68	102	41	130	14	81	66	120	11	183	21
10	59	60	117	70	149	46	147	13	83	59	143	6	180	28
20	42	45	153	78	161	43	100	8	87	68	113	11	166	20
17,8± 5,17	50,4± 9,07	50,± 8,04	132,8± 15,23	68,6± 6,76	137,6± 25,4	43± 3,08	117,2± 20,5	14± 3,93	77,6± 8,93	65,2± 4,32	116,4± 16,5	10,6± 5,94	177,8± 9,75	23,8± 10,4

Tabella 4.3 Media e deviazione standard del numero di pneumociti di II tipo riscontrati nei diversi soggetti. (TL= tracheal ligation; CTRL= controllo; CDH= ernia diaframmatica; RMBO= occlusione bronco principale di destra; LMBO= occlusione bronco principale di sinistra)

CTRL	CDH	TL	RMBO DX e SX	
65,4±11,3	116,8±0,56	14,5±3,6	23,8±10,4	177,8±9,75

Tab 4.4 Media e deviazione standard dei pneumociti di II tipo presenti tra i gruppi di animali arrivati a fine sperimentazione (TL= tracheal ligation; CTRL= controllo; CDH= ernia diaframmatica; RMBO= occlusione bronco principale di destra; LMBO= occlusione bronco principale di sinistra)

Le variazioni del numero di pneumociti di II tipo confrontati tra gli animali arrivati a fine sperimentazione è risultata, tra i gruppi, sempre statisticamente significativa (Tab 4.5).

Gruppo A (CDH)	Numero di pneumociti di tipo II ( $116,8 \pm 0,56$ ) significativamente maggiore di tutti i gruppi tranne che per gruppo C bronco sx
Gruppo B (TL)	Numero di pneumociti di tipo II ( $14,5 \pm 3,6$ ) significativamente minore di tutti i gruppi
Gruppo C bronco dx (RMBO)	Numero di pneumociti di tipo II significativamente minore ( $23,8 \pm 10,4$ ) dei gruppi A ( $116,8 \pm 0,56$ ), C bronco sx ( $177,8 \pm 9,75$ ) e D ( $65,4 \pm 11,3$ ); Numero di pneumociti di tipo II significativamente maggiore del gruppo B ( $14,5 \pm 3,6$ )
Gruppo C bronco sx (RMBO)	Numero di pneumociti di tipo II ( $177,8 \pm 9,75$ ) significativamente maggiore di tutti i gruppi
Gruppo D (CTRL)	Numero di pneumociti di tipo II significativamente minore ( $65,4 \pm 11,3$ ) dei gruppi A ( $116,8 \pm 0,56$ ) e C bronco sx ( $177,8 \pm 9,75$ ); Numero di pneumociti di tipo II significativamente maggiore dei gruppi B ( $14,5 \pm 3,6$ ) e C bronco dx ( $23,8 \pm 10,4$ ).

Tab 4.5 Riassunto della significatività del numero di pneumociti di II tipo tra i vari gruppi (TL= tracheal ligation; CTRL= controllo; CDH= ernia diaframmatica; RMBO= occlusione bronco principale di destra; LMBO= occlusione bronco principale di sinistra).

L'analisi del numero di pneumociti di II tipo negli animali con occlusione del bronco ma non arrivati a fine sperimentazione, ha evidenziato una riduzione del loro valore nel polmone occluso rispetto agli animali controllo già dopo pochi giorni del trattamento ( $46,6 \pm 6,88$ ). Il polmone controlaterale ha invece mostrato un numero di queste cellule maggiore rispetto agli animali con ernia diaframmatica ( $135,2 \pm 19,94$ ).

4.5 Risultati valori dello spessore della parete, della tonaca muscolare e dell'avventizia delle arteriole polmonari:

I diametri esterni dei vasi misurati nei differenti gruppi sono risultati essere omogenei tra loro.

La media dei valori dello spessore della parete, della tonaca muscolare (%), e dell'avventizia (%) delle arteriole polmonari è riportata per ogni gruppo di animale nelle tabelle 4.6, 4.7, 4.8, 4.9.

Un esempio delle immagini delle arteriole ottenute nei differenti gruppi è proposto in figura 4.7.

Tab 4.6 Dati analisi arteriole animali gruppo A (CDH)

Spessore parete ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca muscolare (%)	Spessore avventizia (%)	Diametro esterno arteria
140	120	160	50
160	85,7	175	70
200	75	142	80
180	100	160	80
120	57,1	125	70
120	80	160	50
200	75	142	70
140	57,1	175	80
120	80	125	50
180	100	114	80
MEDIA 156	MEDIA 82,99	MEDIA 147,8	MEDIA 68
DEVIAS STANDARD 32,38	DEVIAS STANDARD 19,55	DEVIAS STANDARD 21,53	DEVIAS STANDARD 13,16

Tab.4.7 Dati analisi arteriole animali gruppo B (TL)

Spessore parete ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca muscolare (%)	Spessore avventizia (%)	Diametro esterno arteria
70	80	60	60
100	44,4	66,6	60
120	44,4	88,8	60
120	66,6	133	70
120	50	100	70
100	66,6	100	50
80	80	80	90
80	33,3	100	90
100	50	75	60
120	50	100	80
100	66,6	100	60
60	66,6	33,3	50
100	66,6	100	60
80	57,1	57,1	80
120	85,7	85,7	80
MEDIA 98	MEDIA 60,52	MEDIA 85,3	MEDIA 68
DEV STANDARD 20,07	DEV STANDARD 15,07	DEV STANDARD 24,21	DEV STANDARD 13,20

Tab 4.8 Dati analisi arteriole animale Gruppo C (RMBO) sia per la porzione destra che per quella sinistra.

Spessore parete DX ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca DX muscolare (%)	Spessore avventizia DX (%)	Diametro esterno arteria DX
100	66,6	100	60
100	66,6	100	60
80	66,6	66,6	60
100	57,1	85,7	70
140	66,6	88,8	90
MEDIA 104	MEDIA 64,7	MEDIA 88,22	MEDIA 68
DEVIAZ STANDARD 21,9	DEVIAZ STANDARD 4,24	DEVIAZ STANDARD 13,70	DEVIAZ STANDARD 13,03
Spessore parete SX ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca muscolare SX (%)	Spessore avventizia SX (%)	Diametro esterno arteria SX
100	80	120	50
100	66,6	100	60
100	66,6	100	60
140	66,6	88,8	90
100	66,6	100	60
MEDIA 108	MEDIA 69,28	MEDIA 101,76	MEDIA 64
DEVIAZ STANDARD 17,88	DEVIAZ STANDARD 5,99	DEVIAZ STANDARD 11,29	DEVIAZ STANDARD 15,16

Tab 4.9 Dati analisi arteriole animali Gruppo D (CTRL)

Spessore parete ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca muscolare (%)	Spessore avventizia (%)	Diametro esterno arteria
80	80	80	50
80	80	80	50
140	66,6	88,8	90
140	75	100	80
100	80	120	50
120	60	60	100
200	90,9	90,9	110
120	85,7	85,7	70
120	85,7	85,7	70
160	66,6	111	90
80	57,1	57,1	70
100	66,6	100	60
100	66,6	100	60
100	57,1	85,7	70
100	57,1	85,7	70
80	57,1	57,1	70
100	80	120	50
120	85,7	85,7	70
100	66,6	100	60
120	85,7	85,7	70
MEDIA 113	MEDIA 72,505	MEDIA 88,955	MEDIA 70,5
DEVIAS STANDARD 29,92	DEVIAS STANDARD 11,57	DEVIAS STANDARD 17,76	DEVIAS STANDARD 16,69

Tutte le misure prese in considerazione sono risultate essere minori, in maniera statisticamente significativa, in tutti i gruppi rispetto ai soggetti con ernia. Le uniche eccezioni sono state lo spessore della tonaca muscolare del polmone non occluso del gruppo C (occlusione bronchiale) e degli animali controllo ( $p < .05$ ) (Tab 4.10).

	Spessore parete ( $\mu\text{m}$ )	Spessore tonaca muscolare (%)	Spessore avventizia (%)
Polmone legatura	Significativamente < al polmone CDH ( $98 \pm 20,07$ vs $156 \pm 32,38$ )	Significativamente < al polmone CDH ( $60,52 \pm 15,07$ vs $82,99 \pm 19,55$ ) e al polmone controllo ( $60,52 \pm 15,07$ vs $72,5 \pm 11,57$ )	Significativamente < al polmone CDH ( $85,3 \pm 24,21$ vs $147,8 \pm 21,53$ )
Polmone CDH	Significativamente > rispetto a polmone legatura ( $156 \pm 32,38$ vs $98 \pm 20,07$ ), al polmone dx occluso ( $156 \pm 32,38$ vs $104 \pm 21,9$ ) al polmone sx non occluso ( $156 \pm 32,38$ vs $108 \pm 17,88$ ) e al polmone controllo ( $156 \pm 32,38$ vs $113 \pm 29,92$ )	Significativamente > rispetto al polmone legatura ( $82,99 \pm 19,55$ vs $60,52 \pm 15,07$ ), al polmone dx occluso ( $82,99 \pm 19,55$ vs $64,7 \pm 4,24$ ), al polmone sx non occluso ( $82,99 \pm 19,55$ vs $69,28 \pm 5,99$ ) e al polmone controllo ( $82,99 \pm 19,55$ vs $72,5 \pm 11,57$ )	Significativamente > rispetto al polmone legatura ( $147,8 \pm 21,53$ vs $85,3 \pm 24,21$ ), al polmone dx occluso ( $147,8 \pm 21,53$ vs $88,22 \pm 13,7$ ), al polmone sx non occluso ( $147,8 \pm 21,53$ vs $101,76 \pm 11,29$ ) e al polmone controllo ( $147,8 \pm 21,53$ vs $70,5 \pm 16,69$ )
Polmone dx occluso	Significativamente < al polmone CDH ( $104 \pm 21,9$ vs $156 \pm 32,38$   $104 \pm 21,9$ )	Significativamente < al polmone CDH ( $64,7 \pm 4,24$ vs $82,99 \pm 19,55$ )	Significativamente < al polmone CDH ( $88,22 \pm 13,7$ vs $147,8 \pm 21,53$ )
Polmone sx non occluso	Significativamente < polmone al CDH ( $108 \pm 17,88$ vs $156 \pm 32,38$ )	No differenze	Significativamente < polmone CDH ( $101,76 \pm 11,29$ vs $147,8 \pm 21,53$ )
Polmone controllo	Significativamente < polmone al CDH ( $113 \pm 29,92$ vs $156 \pm 32,38$ )	Significativamente > rispetto al polmone legatura ( $72,5 \pm 11,57$ vs $60,52 \pm 15,07$ )	Significativamente < al polmone CDH ( $70,5 \pm 16,69$ vs $147,8 \pm 21,53$ )

Tab 4.10 Correlazioni di significatività statistica per i valori esaminati delle arteriole nei vari gruppi in riferimento a media e deviazione standard.

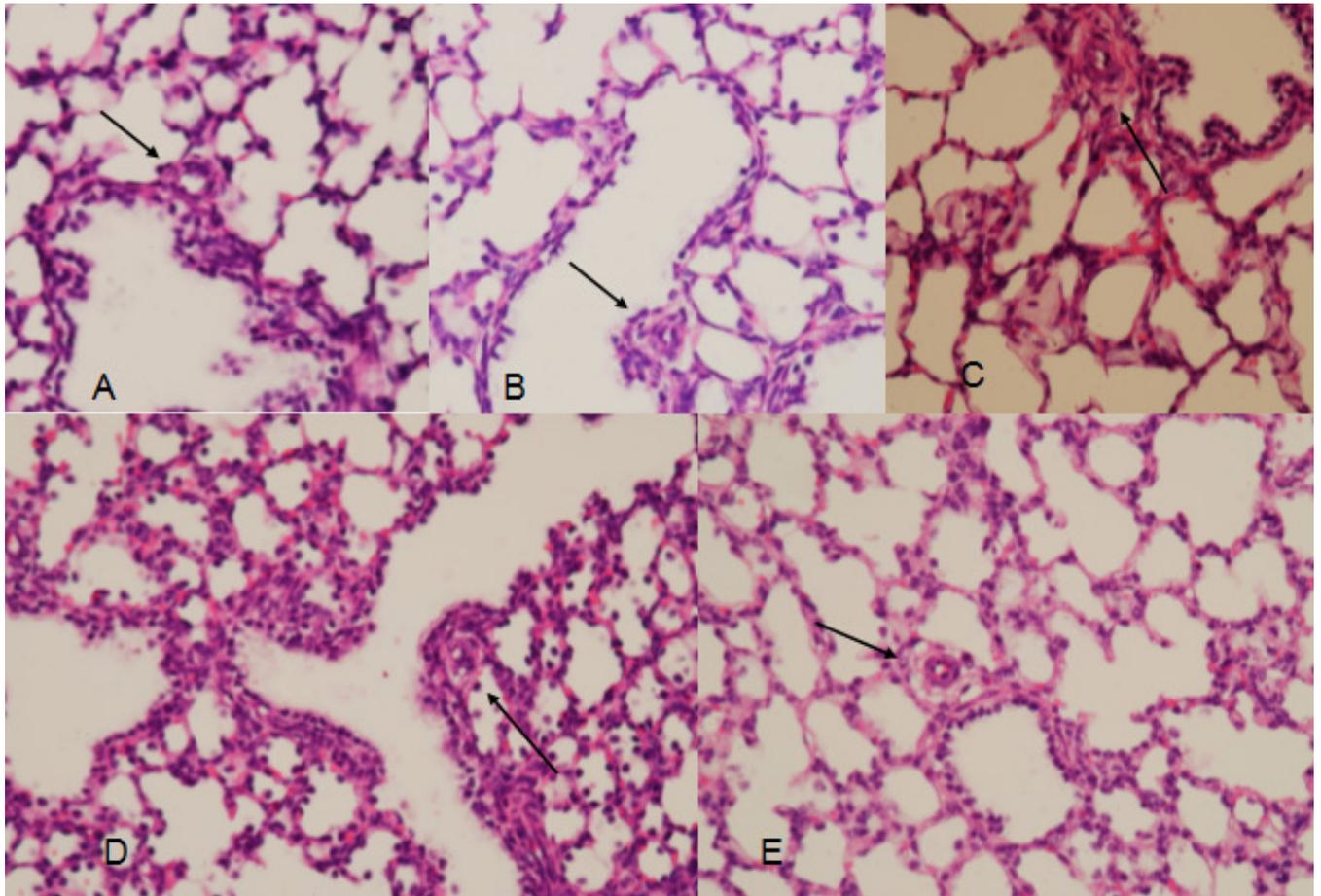


Fig 4.7 Differenze tra le pareti delle arteriole polmonari (freccie) analizzate nei diversi gruppi. (A= CTRL, B=CDH, C=TL, D=RMBO bronco dx, E=RMBO bronco sx)

L'analisi dello spessore della parete, della tonaca muscolare e dell'avventizia delle arteriole degli animali sottoposti ad occlusione bronchiale, ma non arrivati a fine sperimentazione, non è differita in entrambi i polmoni rispetto al gruppo con ernia diaframmatica.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I differenti cateteri progettati sono stati testati su trachea e polmoni di agnelli di circa 126 giorni, isolati e fissati in formalina. Il fatto che tutti abbiano superato il test di tenuta sotto pressione ci ha permesso di scegliere il dispositivo solo in base alla sua facilità di introduzione nel bronco.

Il primo catetere, che possedeva sulla porzione angolata una sottile membrana a forma di coppa in grado di dilatarsi per occludere il bronco, è stato scartato perché la membrana tendeva a ribaltarsi durante l'introduzione in trachea. Questo era dovuto sia alla resistenza incontrata contro le pareti tracheali sia per la presenza di liquido all'interno del lume dell'organo. Il catetere così ideato rendeva molto laboriosa la tecnica di occlusione del bronco.

Il secondo dispositivo, dotato di un'emisfera in silicone morbido di 7 mm di diametro nella porzione terminale, è stato inizialmente scelto per l'utilizzo negli animali sperimentali, vista la sua capacità di penetrare abbastanza facilmente all'interno del bronco.

E' stato invece successivamente scartato per la difficoltà riscontrata durante la sua introduzione nel primo animale. Il motivo della difficoltà è attribuibile ad una variabilità, maggiore di quanto avessimo previsto, delle dimensioni del bronco principale di sinistra. Una possibile causa di ciò può essere dovuta sia a una malnutrizione delle madri, che dal numero di feti presenti durante la gravidanza. Infatti uno stato di nutrizione migliore permette lo sviluppo di feti più grandi mentre al contrario una gravidanza gemellare fa sì che i feti risultino di dimensioni minori.

Anche il terzo dispositivo progettato, cioè quello con un cono in silicone la cui base veniva inserita nel lume del bronco di sinistra, è stato scartato. In questo caso la scelta di non utilizzarlo era dovuta alla maggiore rigidità della porzione terminale in silicone rispetto al prototipo precedente, che ne rendeva ancora più difficoltosa l'introduzione già durante le prove eseguite sui preparati anatomici.

L'ultimo dispositivo creato ricalcava il precedente tranne per il fatto che il cono terminale era applicato in maniera opposta ed era costituito in silicone più morbido. La scelta di questa forma

è stata fatta per ovviare alla variabilità di dimensioni del bronco principale di sinistra.

Utilizzando un catetere con questa forma ad “albero di natale”, è stato possibile, introducendo più o meno il catetere, occludere qualsiasi bronco fino a un diametro di 8 mm.

L’aver marcato la superficie del catetere ogni 10 cm, in maniera tale da riconoscere quando questo presentava la sua parte terminale angolata a sinistra, non ha comunque reso possibile l’introduzione del catetere con metodica “alla cieca”. Infatti dopo un primo tentativo fallito eseguito in questa maniera, si è optato per l’introduzione del dispositivo sotto visione ecografica. Il fallimento di questa metodica è attribuibile al fatto che, anche conoscendo l’orientamento del catetere, non è comunque possibile capire quale sia la parte destra o sinistra del feto all’interno dell’utero. Questo perché l’accesso da noi utilizzato consentiva di esteriorizzare il feto solo parzialmente.

Il tentativo di introdurre l’occlusore bronchiale sotto guida ecografica è fallito. Il poter utilizzare una sonda convex da 3,5 MHz, l’unica in nostro possesso, per andare a valutare strutture anatomiche superficiali non ci ha permesso di identificare in maniera chiara né la biforcazione tracheale né il catetere al suo interno, rendendo impraticabile questa tecnica. Una possibilità per risolvere questo problema sarebbe stato quello di acquistare una nuova sonda lineare in grado di permetterci la corretta visualizzazione di queste strutture.

Possedendo un broncoscopio rigido di piccolo diametro, siamo passati a valutare l’efficacia della tecnica endoscopica. Questa tecnica si è rivelata l’unica efficace nel permetterci di la topografia bronchiale in modo esaustivo. La scelta di introdurre il catetere in trachea tramite una tracheostomia temporanea e non attraverso il laringe, anche se tecnicamente possibile, è stata utilizzata perché il dispositivo da noi progettato non era in grado di rilasciare l’ultima porzione all’interno della trachea. Operando in questo modo abbiamo invece potuto accorciare il catetere, diminuendo il rischio di una sua dislocazione causata dai movimenti fetali.

L’aver reso cavo il catetere, in modo da inserire una guida metallica per renderlo più rigido durante la sua introduzione nel lume tracheale, ha facilitato notevolmente questa operazione. Ha

inoltre permesso di non danneggiare il dispositivo durante l'introduzione dell'ottica e ha indirettamente migliorato la visione del lume tracheale rendendo il catetere meno traumatico per la mucosa tracheale e maggiormente maneggiabile.

Lo studio dell'anatomia endoscopica sulle modificazioni delle vie aeree distali in tutti i potenziali decubiti, ci ha permesso di acquisire una ragionevole sicurezza nell'introdurre il catetere nel bronco corretto. La necessità di conoscere in maniera approfondita l'anatomia di questa regione è dovuta all'impossibilità di esteriorizzare tutto il corpo del feto durante l'intervento. Dai dati raccolti su feti di pecora, abbiamo individuato come unico punto di repere il bronco tracheale. Questa struttura, necessaria alla ventilazione del lobo apicale di destra, è posizionato circa 7 mm cranialmente al bronco principale omolaterale. La sua visualizzazione durante l'introduzione del catetere, ha permesso di differenziare un bronco dall'altro. Infatti, data la rigidità della trachea anche nel feto, e la conseguente impossibilità di compiere una torsione di 360° sul suo asse principale, il bronco tracheale si troverà sempre in posizione opposta al bronco principale di sinistra. L'efficacia di questa tecnica è confermata dai risultati ottenuti. Sui cinque casi eseguiti sotto visione endoscopica il catetere è stato posizionato correttamente in quattro. L'unico caso in cui non è stato introdotto correttamente è dovuto alla rottura del dispositivo (distacco della parte terminale in silicone dal catetere in PVC) durante l'introduzione accidentale di questo nel bronco destro.

Possiamo così affermare come lo sviluppo di diversi cateteri insieme allo studio dell'anatomia endoscopica della regione della biforcazione tracheale, abbia permesso di identificare una metodica affidabile per l'occlusione del bronco principale sinistro nel feto di pecora. A nostra conoscenza, è il primo caso in cui si è riusciti ad ottenere questo risultato mediante l'ausilio di un dispositivo endoluminale.

Per quello che riguarda la valutazione della parte chirurgica dello studio è possibile affermare che la tecnica di creazione dell'ernia diaframmatica sia ormai standardizzata e abbia alte percentuali di successo (87,5%). Anche le tecniche di legatura della trachea e di introduzione del

catetere nel bronco sinistro possono essere definite acquisite. Il principale problema, non ancora risolto, è l'elevata mortalità dei feti operati riscontrata durante lo studio. Delle 16 agnelle sottoposte ad intervento solo 7 hanno portato i feti a fine sperimentazione. Confrontando il tasso di mortalità riportato in letteratura <sup>53</sup> (35%) con quello nel nostro progetto ottenuto (56,25%) possiamo vedere come questo sia maggiore di circa un terzo. Il motivo che può spiegare in parte questi risultati è attribuibile alla nostra precedente scarsa esperienza posseduta su questa patologia, e quindi alla necessità di dover apprendere le diverse tecniche chirurgiche. Le principali complicanze intraoperatorie riscontrate durante la creazione dell'ernia diaframmatica sono state la frattura di una costa in un caso e il sanguinamento della milza in due. A seguito di queste complicanze l'animale con la costa fratturata e uno di quelli con la lacerazione della milza sono morti. Nell'altro caso l'animale è arrivato a fine sperimentazione, ma al momento dell'autopsia si è riscontrata l'assenza di ernia diaframmatica per la formazione di una aderenza presente tra milza e diaframma. La causa di questa aderenza potrebbe essere attribuibile all'esito del processo di organizzazione dell'ematoma venutosi a formare per l'emorragia provocata durante il primo intervento. La principale complicanza chirurgica riscontrata durante l'esecuzione degli interventi di correzione della patologia è stata la lacerazione dell'utero. Il motivo di ciò è dovuto alla difficoltà di reintrodurre il feto, che ha ormai acquisito dimensioni notevoli, all'interno dell'utero. L'animale in cui si è verificata in maniera più marcata questa complicanza è deceduto il giorno successivo alla chirurgia.

La somministrazione di Fentanyl e Vecuronio direttamente al feto, al fine di assicurare una copertura analgesica e inibire qualsiasi possibilità di movimenti respiratori fetali, non ha migliorato il tasso di sopravvivenza dei soggetti. Due dei tre animali sottoposti a questo trattamento sono comunque deceduti. Questo dato sembra poterci permettere di scartare quale causa di mortalità fetale sia attribuibile allo stress provocato dalla percezione del dolore durante le fasi di chirurgia; ciò è confortato dalla valutazione della frequenza cardiaca fetale nell'immediato post-operatorio che non ha evidenziato significatività statistica se confrontata

con quella preoperatoria. Valutando quali potessero essere le altre cause di mortalità nei nostri soggetti, sono state fatte varie ipotesi. La prima è stata quella di una contaminazione batterica durante il periodo intraoperatorio. Per confermare questa tesi sono stati svolti dei tamponi microbiologici su due dei feti abortiti che sono risultati sterili. Un'altra possibile causa di mortalità poteva essere una ipoperfusione uterina durante la fase di anestesia. Anche in questo caso possiamo affermare che questa eventualità non sia stata causa di morte fetale in quanto la pressione arteriosa media materna non è mai scesa sotto un valore di 80 mmHg, anche grazie all'ausilio di farmaci vasoattivi. Inoltre, come già evidenziato in precedenza, la valutazione della frequenza cardiaca fetale, misurata ecograficamente nel periodo pre e post operatorio, non ha mai mostrato variazioni importanti, facendo scartare l'ipotesi di una evidente sofferenza fetale per ipossia.

Il motivo che probabilmente ha influenzato maggiormente il tasso di mortalità è l'insulto chirurgico prodotto a livello di utero e di feto, dovuto alla notevole invasività delle procedure. Questa affermazione può essere giustificata dal riscontro, durante le ecografie eseguite nel periodo post operatorio di animali con gravidanza gemellare, della mantenuta vitalità del feto non operato anche quando l'altro soggetto risultava deceduto. Probabilmente l'uso di tecniche totalmente mini-invasive (FETENDO) potrebbero ridurre ulteriormente la morbilità e la mortalità fetale.

In alcuni studi pubblicati<sup>62</sup> per diminuire il rischio di aborto della pecora sono stati iniettati per via intramuscolare 250 mg di medrossiprogesterone al fine di ridurre la contrattilità uterina. Nessun altro metodo di tocolisi è stato riportato in questa specie per questa tipologia di interventi. Nella nostra esperienza possiamo dire che le contrazioni uterine sviluppate nelle pecore sono sempre di modesta entità. Questa nostra affermazione è confermata dal riscontro durante gli esperimenti della morte dei feti all'interno dell'utero e non alla loro espulsione prematura, perciò riteniamo di scarsa utilità l'impiego di mezzi di tocolisi in questa specie.

Per quello che riguarda l'analisi dei valori di LW/BW tra i vari soggetti dei differenti gruppi possiamo notare un basso valore di questo parametro nei soggetti con ernia. Questo risultato conferma, come ci sarebbe potuto aspettare dai dati presenti in letteratura, la presenza di una marcata ipoplasia polmonare. Il motivo per cui questi animali hanno riportato un peso corporeo maggiore è probabilmente attribuibile al fatto che provenissero da una gestazione singola e non gemellare. Anche nei soggetti sottoposti a legatura della trachea il valore riscontrato di LW/BW rispetto agli animali controllo e con ernia, è in linea con la letteratura<sup>37</sup>. Il confronto tra i risultati ottenuti negli animali sottoposti a legatura della trachea e quelli con ernia diaframmatica è stato l'unico che ha mostrato un aumento di dimensioni statisticamente significativo. I polmoni degli animali controllo sono risultati di dimensioni maggiori rispetto a quelli con ernia, anche se la differenza non è risultata significativa. Pur non potendo trarre conclusioni definitive, data la presenza di un solo soggetto in questo ultimo gruppo, paragonando il LW/BW tra gli animali controllo e quelli con occlusione del bronco è curioso notare una quasi totale sovrapponibilità dei due valori (0,033 bronco occluso vs 0,032 controllo). Questo potrebbe essere un indice di come questa tecnica possa riportare lo sviluppo polmonare a livelli normali. Sarebbe interessante valutare se questo risultato possa essere confermato analizzando un numero maggiore di soggetti. Non avendo pesato separatamente il polmone destro da quello sinistro non possiamo inoltre sapere se questa sovrapponibilità di risultati sia attribuibile ad una imponente iperplasia del solo polmone occluso o anche da un maggiore sviluppo del controlaterale.

I campioni ottenuti mediante l'impiego degli anticorpi anti SP-B forniti dalla ditta Millipore hanno fornito immagini di scarsa qualità. Anche se dichiarati dalla ditta produttrice in grado di reagire con i pneumociti di II tipo di pecora, la reazione dell'anticorpo è risultata molto labile. Possiamo affermare con certezza che il problema di reattività sia da attribuire alla qualità degli anticorpi e non ad una loro scorretta aliquotazione o conservazione per due motivi: il primo è che il prodotto non ha reagito con il tessuto di pecora, ma ha reagito correttamente con il tessuto

utilizzato come controllo (parenchima polmonare di uomo). Il secondo è che la stessa ditta produttrice non ha più in catalogo il prodotto.

Sono stati quindi acquistati dei nuovi anticorpi, anche questi dichiarati reagire con il tessuto di pecora, prodotti dalla ditta DBA. I risultati ottenuti con questo prodotto sono stati nettamente migliori paragonati sugli stessi preparati. Per questo motivo tutti i campioni sono stati processati con i nuovi anticorpi.

I soggetti sottoposti a legatura della trachea hanno fornito risultati in linea con quelli pubblicati in letteratura<sup>41,45</sup>. Si è cioè verificata una diminuzione marcata della presenza di pneumociti di II tipo. Il soggetto appartenente al gruppo occlusione del bronco di sinistra ha mostrato di possedere, nel polmone occluso, un numero di pneumociti di II tipo statisticamente maggiore rispetto agli animali sottoposti a legatura della trachea. Anche se questo dato è risultato significativamente minore rispetto al gruppo controllo, può far presupporre una maggiore capacità del polmone trattato con questa tecnica di produrre surfattante comparato al gruppo della legatura della trachea. Il polmone non occluso dello stesso soggetto ha invece presentato un numero di pneumociti di II tipo maggiore rispetto a tutti i gruppi, persino agli animali con ernia, facendo ipotizzare ad una sua immaturità ancora più marcata.

I risultati ottenuti in questo gruppo sono quindi contrastanti, se da un lato il polmone trattato sembra essere in grado di produrre una quantità maggiore di surfattante, il controlaterale sembra essere ancora più compromesso dei polmoni con ernia.

L'analisi dello spessore della parete, della tonaca muscolare e dell'avventizia delle arteriole polmonari ha fornito risultati interessanti. I soggetti del gruppo con legatura della trachea hanno mostrato, come ci si poteva attendere dai risultati riportati in letteratura<sup>40</sup>, valori di spessore della parete, della tonaca muscolare e dell'avventizia di statisticamente inferiori agli animali del gruppo ernia diaframmatica. Anche il polmone occluso dell'animale sottoposto alla nuova tecnica ha mostrato risultati statisticamente inferiori agli animali del gruppo con ernia. Il risultato da mettere in risalto è come anche il polmone non occluso di questo soggetto abbia mostrato

valori statisticamente minori per quanto riguarda lo spessore della parete arteriolare e della tonaca avventizia. L'unico parametro non è apparso significativamente differente è stato lo spessore della tonaca muscolare. Bisogna notare come questo valore non fosse statisticamente differente neanche tra i soggetti controllo e quelli con ernia. Un confronto tra i dati da noi ottenuti e lo studio di Biard<sup>53</sup>, che valutava una tecnica chirurgica sperimentale simile alla nostra non è possibile, dato che questi parametri non sono stati presi in considerazione.

Andando ad analizzare insieme i risultati ottenuti per il numero di pneumociti di II tipo e i valori delle arteriole del soggetto a cui è stato occluso il bronco, possiamo affermare di trovarci di fronte a risultati leggermente discordanti. Infatti se da un lato entrambi i polmoni presentano una diminuzione dei valori di spessore della parete e tonaca avventizia delle arteriole polmonari, facendoci presupporre di poter escludere la possibilità di trovarci alla nascita con un neonato affetto da ipertensione polmonare persistente, da un altro lato il polmone non trattato presenta un numero di pneumociti di II tipo ancora maggiore rispetto ai soggetti con ernia, dimostrando come questo polmone sia ancora più immaturo e non in grado di produrre surfattante. Una possibilità per aumentare la produzione di surfattante potrebbe essere la somministrazione, in aggiunta alla tecnica chirurgica, di glucocorticoidi pre natali alla madre o l'instillazione intratracheale di surfattante esogeno al momento della nascita, come già sperimentato in soggetti sottoposti a occlusione tracheale<sup>63,64</sup>.

La decisione di inserire nello studio l'analisi dei polmoni dei due animali con correzione della patologia mediante l'occlusione del bronco e deceduti a 72 ore circa dall'intervento è stata presa per cercare di valutare il trend della comparsa delle modificazioni indotte da questa tecnica sui polmoni. Il numero di pneumociti di II tipo, già dopo pochi giorni di correzione è diminuito rispetto al gruppo con ernia attestandosi su valori leggermente inferiori a quelli del gruppo controllo. Questo riscontro può suggerire che la rimozione del catetere prima del termine, come già avviene per la legatura della trachea, possa migliorare ulteriormente la numerosità dei pneumociti di II tipo rispetto a lasciare il catetere fino a termine gravidanza<sup>65</sup>. Per quanto

riguarda lo sviluppo delle arteriole polmonari l'analisi dei dati ha mostrato risultati simili al gruppo con ernia, dimostrando che il tempo intercorso tra l'occlusione del bronco e il decesso degli agnelli non ha portato a nessuna riduzione né dell'avventizia né della tonaca muscolare. In conclusione possiamo affermare che il fatto che un solo soggetto appartenente al gruppo di animali con il bronco occluso sia arrivato a fine sperimentazione non ci permette di avere dei risultati definitivi. Se i dati fino ad ora ottenuti saranno però confermati dai successivi esperimenti, questo lavoro potrebbe essere la base di partenza per ulteriori studi al fine di validare o meno questa nuova tecnica di correzione della patologia.

## 6.BIBLIOGRAFIA

1. Harrison M.R. Congenital diaphragmatic hernia Surg Clin North Am 1981 Oct;61(5):1023-35.
2. Beresford M.V. et al. Outcome of congenital diaphragmatic hernia Pediatr pulmonol 2000 Sep;30(3):249-56
3. Grisar Granowsky s. et al Congenital diaphragmatic hernia: review of the literature in reflection of unresolved dilemmas 2009 Acta Pediatr Dec;98(12):1874-81
4. Torfs CD, Curry CJ, Bateson TF, et al. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. Teratology 1992;46:555-65
5. Harrison M.D. The unborn patient The art and science of fetal therapy 3<sup>rd</sup> edition Saunders 2001
6. Sharland GK, Lockhart SM, Heward AJ, Allan LD. Prognosis in fetal diaphragmatic hernia. Am J Obstet Gynecol 1992;166(1 Pt 1):9– 13
7. Thebaud B, Azancot A, de Lagausie P, et al. Congenital diaphragmatic hernia: antenatal prognostic factors. Does cardiac ventricular disproportion in utero predict outcome and pulmonary hypoplasia? Intensive Care Med 1997;23:10062– 10069.
8. Metkus AP, Filly RA, Stringer MD, Harrison MR, Adzick NS. Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg 1996;31:148– 151.
9. Lipshutz GS, Albanese CT, Feldstein VA, et al. Prospective analysis of lung-to-head ratio predicts survival for patients with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg 1997; 32:1634– 1636.
10. Bahlmann F, Merz E, Hallermann C, Stopfkuchen H, Kramer W, Hofmann M. Congenital diaphragmatic hernia: ultrasonic measurement of fetal lungs to predict pulmonary hypoplasia. Ultrasound Obstet Gynecol 1999;14(3):162– 168

11. Bootstaylor BS, Filly RA, Harrison MR, Adzick NS. Prenatal sonographic predictors of liver herniation in congenital diaphragmatic hernia. *J Ultrasound Med* 1995;14(7):515–520;
12. Albanese CT, Lopoo J, Goldstein RB, et al. Fetal liver position and perinatal outcome for congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn* 1998;18(11):1138– 1142.;
13. Hatch EI, Kendall J, Blumhagen J. Stomach position as an in utero predictor of neonatal outcome in left-sided diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1992;27:778– 779
14. R. Zuanoa, A. Benachia, L. Joubinb, M. Aubrya, JC. Thalabardb, Y. Dumeza, M. Dommergues Three-dimensional ultrasonographic assessment of fetal lung volume as prognostic factor in isolated congenital diaphragmatic hernia; *BJOG* May 2004, Vol. 111, pp. 423–429
15. Worley KC, Dashe JS, Barber RG, et al. Fetal magnetic resonance imaging in isolated diaphragmatic hernia: volume of herniated liver and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:318.e1-318.e6
16. Harrison M.D. et al Correction of CDH in utero VII: a prospective trial. *J Pediatr Surg* 1997 Nov; 32(11):1637-42.
17. Azarow K. et al. Congenital diaphragmatic hernia-a tale of two cities: the Toronto experience. *J Pediatr Surg* 1997 Mar;32(3):395-400.
18. Wilson J.M. et al Congenital diaphragmatic hernia-a tale of two cities: the Boston experience. *J Pediatr Surg* 1997 Mar;32(3):401-5.
19. Donè et al Prenatal diagnosis, prediction of outcome and in utero therapy of isolated congenital diaphragmatic hernia *Prenat Diagn* 2008; 28: 581–591.
20. Khan PA, Cloutier M, Piedboeuf B. 2007. Tracheal occlusion:A review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:125–138.
21. Souba W.W., Wilmore D. W. *Surgery in research* Accademic Press 2001 1<sup>st</sup> edition

22. de Lorimeer A.A. et al Hypoplastic lungs in fetal lambs with surgically created congenital diaphragmatic hernia. *Surgery* 1967 62; 12-17.
23. Mukasa-Mugerwa E, Kasali OB, Said AN: Effect of nutrition and endoparasitic treatment on growth, onset of puberty and reproductive activity in Menz ewe lambs, *Therio* 36:319, 1991.
24. Forcada F, Abecia JA, Zarazaga L: A note on attainment of puberty of September-born early-maturing lambs in relation to level of nutrition, *Anim Prod* 53:407, 1991.
25. McCann MA et al: Effect of rapid weight gain to puberty on reproduction, mammary development and lactation in ewe lambs, *Therio* 32:55, 1989.
26. Kassem R, Owen JB, Fadel I: The effect of pre-mating nutrition and exposure to the presence of rams on the onset of puberty in Awassi ewe lambs under semi-arid condition, *Anim Prod* 48:393,1989
27. Sweeny T, O'Callaghan D: Physiology of seasonal reproductivetransitions in the ewe— regulation by photo period and other environmental cues, *Repro Domestic Anim* 30:178, 1995
28. Stellflug JN, Weems YS, Weems CW: Clinical reproductive physiology in ewes. In Youngquist RS, editor: *Current therapy in large animal theriogenology*, Philadelphia, 1997, WB Saunders
29. Jeffrey PK The development of large and small airways . *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:174-80
30. Hislop AA. Growth of the vascular tree. *Pediatr Respir Rev* 2000 Dec;1(4):321-7.
31. Kotecha S. Lung growth for beginners *Pediatr Respir Rev* 2000; 1 (4):308-13
32. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A et al. The number of alveoli in human lung. *Am J Resp Crit Care Med* 2004;169:120-4

33. Lipsett J.; Cool JC; Runciman SIC; et al Effect of antenatal tracheal occlusion on lung development in the sheep model of congenital diaphragmatic hernia: a morphometric analysis of pulmonary structure and maturity; *Pediatric Pulmonology* 1998 25:257-269
34. Keramidaris et al; Effect of gestational age on the increase in fetal lung growth following tracheal obstruction *Exp Lung Res* 1996 22: 283-98
35. Harrison M.R. et al Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. II. Simulated correction permits fetal lung growth with survival at birth. *Surgery* 1980 Aug;88(2):260-8.
36. Haller et al; pulmonary and ductal hemodynamics in studies of simulated diaphragmatic hernia of fetal and newborn lambs. *J Pediatr Surg* 11;675-80
37. Papadakis K. et al Fetal lung growth after tracheal ligation is not solely a pressure phenomenon *J pediatr surg* 1997 Feb;32(2):347-51
38. Bealer J.F. The PLUG odyssey: adventures in experimental fetal tracheal occlusion *J pediatr surg* 1995 Feb;30(2):361-4;
39. Chiba T. , Albanese C.T.: Balloon tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia: experimental studies *J Pediatr Surg* 2000 Nov;35(11):1566-70
40. Bratu I. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodelling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia *J. pediatr surg* 2001 2001 May;36(5):739-44
41. Bullard K.M.: Tracheal ligation increases cell proliferation but decreases surfactant protein in fetal murine lungs in vitro *J pediatr surg* 1997 Feb;32(2):207-11;
42. Kapour P, Tracheal ligation and mechanical ventilation do not improve the antioxidant enzyme status in the lamb model of CDH *J of pediatr surg* 1999 Feb;34(2):270-2
43. Keijzer R. et al Hormonal modulation of fetal pulmonary development: relevance for fetus with CDH, *Eur j obstet gynecol reprod biol* 2000 Sep;92(1):127-33

44. O'toole S.J. Tracheal ligation: the dark side of in utero congenital diaphragmatic hernia treatment J pediatr surg 1997 Mar;32(3):407-10
45. Bratu I. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and pre natal steroids in experimental diaphragmatic hernia J pediatr surg 2001 Jan;36(1):122-7
46. Schnitzer J.J. et al., Pre-natal glucocorticoid therapy reverses pulmonary immaturity in congenital diaphragmatic hernia in fetal sheep, Ann surg 1996 Oct;224(4):430-7
47. Boucherat O. et al. Surfactant maturation is not delayed in human fetuses with diaphragmatic hernia PLoS Med. 2007 Jul 31;4(7):e237
48. Muratore C.S. Stretch induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development J pediatr surg 2000 Jun;35(6):906-12
49. Nobuhara K.K. et al Insuline like growth factor one: gene expression in three models of accelerated lung growth J pediatr surg 1998 Jul;33(7):1057-60
50. Li. J et al. Effect of epidermal growth factor on pulmonary Hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia J pediatr surg 2004 Jan;39(1):37-42
51. McCabe A.J. et al. Upregulation of keratocyte growth factor in the tracheal ligation lamb model of CDH J pediatr surg 2001 Jan;36(1):128-32.
52. Larson J.E. et al. 2006 Improvement of pulmonary hypoplasia associated with congenital diaphragmatic hernia by in utero CFTR gene therapy Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006 Jul;291(1):L4-10.
53. Biard M.J. et al. Main bronchus occlusion for treatment of congenital diaphragmatic hernia in fetal lambs J pediatr surg 2008 Apr;43(4):620-6.
54. Jani et al. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion; 2009 Ultrasound Obstet Gynecol, 34: 304-10

55. Deprest J. et al Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. 2004 *Ultrasound Obstet Gynecol*; 24: 121-6
56. Peetsold MG, et al The long term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity 2009. *Pediatr Surg Int*; 25:1-17.
57. Enrico Danzer et al. Fetal tracheal occlusion for severe congenital diaphragmatic hernia in humans: a morphometric study of lung parenchyma and muscularization of pulmonary arterioles 2008 *Journal of Pediatric Surgery* 43, 1767–1775
58. Van den Hout L. et al Can we improve outcome of congenital diaphragmatic hernia? 2009 *Pediatr Surg Int* 25:733–743
59. Soper R., Pringle K., Scofield J. Creation and repair of diaphragmatic hernia in the fetal lamb: techniques and survival. 1984 *Journal of Pediatric Surgery* 33-40
60. Aggugini G, Beghelli V, Giulio L, et al. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. 2002 Seconda edizione UTET Torino.
61. Hellmery L. Et al. Telemetric monitoring of tracheal pressure after tracheal occlusion for treatment of severe congenital diaphragmatic hernia *Arch Gynecol Obstet* (2007) 275:245–248
62. Bratu I. Et al. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. 2001 *Journal of Pediatric Surgery* 5-739-44
63. O’Tool s. Et al. Surfactant rescue in the fetal lamb model of congenital diaphragmatic hernia 1996 *Journal of Pediatric Surgery* 31, 1105-09
64. Suen HC, BlochKD, Donahoe PK (1994) Antenatal glucocorticoid corrects pulmonary immaturity in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Res* 35: 523–529

65. Bin Sadding W. Et al The effects of tracheal occlusion and release on type II pneumocytes in fetal lambs. 1997 J Pediatr Surg 32:834- 8