

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA
IN FISIOPATOLOGIA PRE E POST-OPERATORIA
IN CHIRURGIA DI ELEZIONE E D'URGENZA
XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO

L'IMPIEGO DI *PATCH* DI PERICARDIO BOVINO
NELLE ANASTOMOSI INTESTINALI.
STUDIO SPERIMENTALE SUL MAIALE.

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Basile

Tutor:

Chiar.mo Prof. Mario Testini

Dottoranda:

Dott.ssa Angela Gurrado

INDICE

Introduzione	pag. 3
1. La storia delle anastomosi gastro-intestinali	4
2. Le anastomosi intestinali	8
- <i>I meccanismi di guarigione delle anastomosi</i>	<i>8</i>
- <i>Anastomosi di ileo e colon: differenze biomolecolari e fisiopatologiche</i>	<i>11</i>
- <i>Fattori di rischio di deiscenza</i>	<i>15</i>
3. Le protesi biologiche	19
- <i>Classificazione</i>	<i>19</i>
- <i>Indicazioni</i>	<i>23</i>
4. Studio sperimentale	27
- <i>Introduzione</i>	<i>27</i>
- <i>Scopo dello studio</i>	<i>28</i>
- <i>Materiale e metodo</i>	<i>29</i>
- <i>Risultati</i>	<i>38</i>
- <i>Discussione</i>	<i>56</i>
Conclusioni	62
Bibliografia	63

INTRODUZIONE

La deiscenza anastomotica è una complicazione severa dopo chirurgia gastrointestinale. Nonostante i risultati eccellenti ottenuti con l'utilizzo delle suturatrici meccaniche, anche tali suture non sono scevre da rischi di fallimento.

Scopo di questo studio sperimentale è quello di verificare se le proprietà che hanno fatto delle protesi biologiche, i *devices* più indicati nella chirurgia dei difetti parete nelle condizioni di contaminazione o infezione, possano essere utilizzate nel rinforzo delle anastomosi ileali e coliche, verificando se la capacità intrinseca della *mesh* di pericardio bovino di fungere da "*scaffold*" nella riparazione tissutale durante la guarigione della parete addominale, sia utile anche nella guarigione delle anastomosi intestinali.

1. La storia delle anastomosi gastro-intestinali

Le regole per un corretto confezionamento delle anastomosi intestinali sono state ben lungi dall'essere standardizzate per molti anni e le nozioni proposte hanno subito numerose rivalutazioni.

La storia delle anastomosi è relativamente antica, risalendo agli inizi del 1800, quando *Benjamin Travers* (1783-1858), scrivendo sulle lesioni intestinali (*An Inquiry into the Process of Nature in Repairing Injuries of the Intestine*, 8vo, London, 1812), sottolineava la necessità di garantire il contatto uniforme tra i monconi intestinali, utilizzando punti di sutura estroflettenti.

Ma il problema della guarigione delle lesioni gastroenteriche poté essere risolto solo dopo una lunga serie di osservazioni cliniche e sperimentali compiute da vari anatomisti e chirurghi.

L'idea di *Travers* venne successivamente sconfessata dopo i risultati ottenuti da *Alfred Velpeau* (1795-1867) e poi da *A. Lembert* (*Mémoire sur l'entéroraphie avec la description d'un procédé nouveau pour pratiquer cette opération chirurgicale, in Répertoire gén. d'anat. et de physiol. pathologiques...,II* -1826) che affermavano la necessità di giustapporre gli strati sierosi dei monconi intestinali per ottenere la migliore guarigione dell'anastomosi. Venne così introdotta la "sutura di Lembert", a punti introflettenti; questa tecnica rappresentò la base della moderna chirurgia gastrointestinale.

Negli stessi anni, in Italia, *Nicola D'Apolito* (1815-1862) ideava un nuovo metodo di sutura intestinale (*Nuovo metodo di entero-rafia*, in *Osservatore medico*, XIX-1841; *Memoria sopra un nuovo metodo di enterorafia*, in *Comptes-rendus hebdom. des séances de L'Inst. de France, Acad. royale des sciences*, XIII-1841; *Rischiaramento sul nuovo metodo di sutura*, in *Osservatore medico*, XX-1842), che consisteva in una sutura continua operata con un solo ago e un solo filo a punti paralleli all'asse della ferita. Sempre in Italia, comunque, già nel secolo precedente, *Giovanni Ambrogio Bertrandi* (1723-1765) aveva introdotto un metodo di sutura intestinale cosiddetto a filzetta, con affondamento dei monconi.

Un'ulteriore acquisizione fu quella di *Halsted* (1852-1922), che aveva riconosciuto, nello strato sottomucoso della parete intestinale, lo *strength-bearing layer* dell'anastomosi.

Nel 1892, venne acclamata l'invenzione del primo dispositivo meccanico per il confezionamento delle anastomosi: il *bottone di Murphy*, ideato da *John Benjamin Murphy* (1857-1916). Questo strumento era composto da due pezzi a forma di fungo che erano introdotti nei monconi intestinali e bloccati da una borsa di tabacco; la sutura conseguente era a punti introflettenti e, una volta guarita, si otteneva l'espulsione per via rettale dello strumento (*Murphy JB. Cholecysto-intestinal, gastro-intestinal, entero-intestinal, anastomosis, and approximation without sutures: original research. Med Rec 1892*). Anche *Jabulay* (1860-1913) introdusse in quegli anni un sistema simile, identificato con il nome di *bottone di Jabulay*.

Questi metodi trovarono applicazione per molti anni e i loro presupposti saranno ripresi quasi un secolo dopo nella concezione del *Valtrac*, un anello biodegradabile utilizzato a questo scopo.

Lo scenario restò per lo più immutato fino alla metà del 1900, quando si individua il momento di svolta nel confezionamento delle anastomosi gastro-intestinali.

E' opportuno fare delle considerazioni per spiegare quale necessità sia stata alla base delle successive innovazioni. E' indubbio che la riuscita di un intervento chirurgico dipenda in buona parte dell'abilità e dall'esperienza del chirurgo; è proprio la volontà "politica" di ridurre l'impatto del fattore umano sull'esito di un atto chirurgico che è stata alla base della nascita nella Mosca sovietica degli anni '50 di uno *Scientific Research Institute of Experimental Surgical Apparatus and Instruments*, nel quale si cominciarono a studiare e fabbricare strumenti per sutura automatica che potessero essere impiegati da ogni chirurgo, anche del più lontano ospedale di quello sterminato territorio così da garantire a tutti un analogo adeguato livello di assistenza.

In realtà i primi congegni per apporre punti di sutura in maniera automatica risalgono agli inizi del XX secolo. *Humer Hulti*, nel 1908, durante il II congresso della Società Ungherese di Chirurgia presentò, infatti, un apparecchio in grado di apporre quattro file di punti metallici che, fissando ermeticamente la parete anteriore a quella posteriore dello stomaco durante le resezioni gastriche, permetteva di asportarne una porzione senza sanguinamento né contaminazione del campo. I non trascurabili svantaggi erano rappresentati dal peso di oltre i 3500 grammi e dal fatto che, solo per assemblarlo, occorrevano alcune ore.

Qualche anno dopo, nel 1921, *Aladar von Petz* presentò all'VIII Congresso della Società Ungherese di Chirurgia, uno strumento più leggero e facile da assemblare, che dopo 2 anni, si diffuse su larga scala nel mondo. Nel 1934, *H. Friedrick* introdurrà le cartucce intercambiabili che agevoleranno la ricarica dei punti metallici.

I primi apparecchi in grado di suturare con *clip* metalliche ma anche di tagliare contemporaneamente, introdotti dai Russi negli anni '50 (*P.I. Androsov*, e quindi *Belkin* e *Kalinina*) venivano, però, accolti tiepidamente e con scetticismo, probabilmente perché era in corso la Guerra Fredda e l'osmosi delle informazioni era limitata.

Risale, poi, al 1960 l'invenzione di *T.V. Kalinina* della suturatrice circolare capace di realizzare una anastomosi termino-terminale. Tale suturatrice, per quanto innovativa ed efficientissima, era ancora troppo ingombrante e pesante, rettilinea e quindi mal posizionabile in alcune distretti addominali, e confezionava solo uno strato di sutura, per cui era ancora necessario effettuare il secondo strato sieroso-sieroso a mano.

Solo dagli anni '70 si assiste alla diffusione su scala mondiale delle suturatrici meccaniche lineari e circolari; esse andranno ben oltre le loro progenitrici, con cui hanno in comune soltanto il principio. Molto leggere per le particolari leghe impiegate, sono soprattutto più sicure e semplici da usare. Nascono le nuove sigle con le quali diventeranno sempre più note: EEA, GIA, TA equivalenti delle PKS, delle NGKA, delle YTL sovietiche. Sono apparecchi adatti a tutte le chirurgie, facilmente sterilizzabili e quindi riutilizzabili infinite volte anche perché sfruttano set intercambiabili di cartucce con *agrafes* già montate.

Nonostante la diffusione delle suturatrici meccaniche, le anastomosi confezionate a mano secondo le varie tecniche esistenti non sono state completamente soppiantate e le metanalisi redatte in letteratura non hanno finora messo in evidenza la superiorità delle prime sulle seconde.¹⁻⁷

2. Le anastomosi intestinali

Il fallimento dei meccanismi di guarigione delle anastomosi è responsabile della deiscenza e/o delle fistole intestinali, con incremento significativo di morbilità e mortalità post-operatoria.

I MECCANISMI DI GUARIGIONE DELLE ANASTOMOSI

Al momento della resezione intestinale e del confezionamento dell'anastomosi, quella che si verifica, a carico del tratto di parete intestinale coinvolto, è una reazione flogistica che si snoderà attraverso varie fasi che condurranno alla guarigione dell'anastomosi.

Anche se la guarigione è un processo dinamico, si possono accademicamente riconoscere 3 fasi, che si susseguono, accavallandosi: 1) *la fase dell'emostasi e della flogosi propriamente detta*; 2) *la fase della proliferazione*; 3) *la fase della maturazione e del rimodellamento*. Tutto ciò che disturba lo svolgimento di queste fasi, potrebbe risultare in complicazioni a carico dell'anastomosi gastrointestinale.⁸⁻²⁶

Durante il 1° giorno post-operatorio, la flogosi è determinata dalla presenza di un infiltrato di polimorfonucleati, specie sulla rima di sutura.⁸⁻²⁶ Questi sono rappresentati da neutrofili, eosinofili e istiociti che infiltrano la lamina propria, la sottomucosa e il materiale di sutura. La mucosa e la sottomucosa appaiono edematose e congeste. L'azione dei polimorfonucleati si esplica nel controllo immunitario contro l'estesa invasione batterica, tipica del sito di anastomosi e nella produzione di collagenasi.

Il 3° giorno post-operatorio, permane ancora l'edema e si annovera l'incremento dei linfociti. Al progressivo incremento del tessuto di granulazione, si affianca la degradazione del materiale di sutura.⁸⁻²⁶ A partire poi dal 3° giorno circa dal confezionamento dell'anastomosi, poi, si assiste al progressivo incremento del numero dei fibroblasti e miofibroblasti a livello degli strati della sutura.⁸⁻²⁶

I dati scientifici più attuali^{14-17,26} permettono di affermare che l'iniziale integrità delle anastomosi è dipendente dalla formazione di fibrina sulla sierosa perianastomotica, che garantisce l'impermeabilità dell'anastomosi, e dalla sutura stessa, particolarmente per quanto concerne la tenuta dello strato effettuato sulla sottomucosa. A questi due elementi si associa anche la contrazione della lamina propria della parete gastrointestinale.

L'integrità finale dell'anastomosi non risulta, invece, essere correlata alla quantità assoluta di collagene, ma specialmente alla struttura e all'arrangiamento dello stesso, nel contesto degli strati di sutura.^{14-17,26}

I fibroblasti e i miofibroblasti sono considerate le cellule fondamentali nel processo di guarigione, in quanto sono ritenute i maggiori responsabili della contrazione della muscolatura liscia, della formazione e riparazione della matrice extracellulare e della proliferazione e differenziazione degli elementi epiteliali, vascolari e nervosi.^{8-12,16,18-20,22-25}

La guarigione completa dell'anastomosi è, quindi, il risultato dell'equilibrio tra la lisi del collagene, che interviene nelle fasi iniziali del processo (primi 3-5 giorni post-operatori), e la sintesi dello stesso ad opera dei fibroblasti, che inizia invece alcuni giorni dopo (fase di proliferazione).

Nella fase della proliferazione rientra anche la neoangiogenesi. Il numero dei capillari va progressivamente aumentando; è acclarato, infatti, che l'ipossia stimoli la neoangiogenesi, ma il suo vero ruolo nel sostentamento di tutto il processo angiogenetico non è chiaro.²⁴

Al 7° giorno post-operatorio, infatti, l'edema del tessuto contenente la sutura è quasi completamente scomparso; il tessuto di granulazione è consistente e avvolge il materiale di sutura.⁸⁻²⁶ La deposizione di collagene con aumento dell'attività fibroblastica è presente, ma irregolare. La quota dei macrofagi è notevole, perché importante è l'attività richiesta di asportazione dei detriti accumulati nel sito.⁸⁻²⁶

La fase di maturazione e rimodellamento segue e si interdigita con la fase di proliferazione.⁸⁻²⁶ Essendo il rimodellamento tissutale dipendente dalla deposizione dei componenti della matrice extracellulare, specie le fibre collagene, si intuisce come i fibroblasti e i miofibroblasti abbiano un ruolo chiave in tale fase.

Al 14° giorno post-operatorio, si può rilevare la quasi completa rigenerazione dell'epitelio mucosale che riveste la rima di sutura, mentre la massiva e organizzata deposizione di collagene si rileva a livello dello strato sottomucoso della sutura. La fase finale del processo di guarigione riguarda anche la maturazione del neocollagene in fasci e unità contrattili.⁸⁻²⁶

Le infezioni locali, che spesso si verificano nel sito perianastomotico, sono per questo responsabili dell'aumento del fenomeno della lisi del collagene e del ritardo della

sua sintesi, aumentando così il rischio di deiscenza. Diversi studi hanno dimostrato che il pericolo di deiscenza è maggiore tra il 4° e il 7° giorno, qualora al fenomeno della lisi del collagene non subentri correttamente e prontamente la sua stessa neodeposizione.⁸⁻²⁶

Un dato interessante è che dopo una settimana dal confezionamento dell'anastomosi, se la guarigione si sta verificando correttamente, la resistenza agli aumenti di pressione endoluminale del tratto intestinale che contiene l'anastomosi è maggiore di quella dei tratti intestinali a monte e a valle.^{9,12,14-16,18-23,25} Questo potrebbe essere attribuito al fatto che i tratti vicini all'anastomosi sono stati comunque coinvolti nella reazione flogistica perioperatoria, così da vedere attivata anche al loro livello la lisi del collagene.

ANASTOMOSI DI ILEO E COLON: DIFFERENZE BIOMOLECOLARI E FISIOPATOLOGICHE

I processi biomolecolari che contribuiscono alla guarigione delle anastomosi sono ancora lungi dall'essere tutti conosciuti. Come precedentemente rilevato, mentre la precoce resistenza dell'anastomosi è garantita dalla integrità della sutura, la sintesi finale del collagene è necessaria per cancellare la soluzione di continuo presente nella parete intestinale. Perciò, la corretta deposizione del collagene gioca un ruolo fondamentale nelle sequenze di guarigione dell'anastomosi.

Molti studi sperimentali hanno messo in evidenza che l'ileo e il colon presentano caratteristiche diverse per quanto riguarda i processi di produzione di energia e di sintesi

del collagene.²⁷⁻³¹ La conoscenza della peculiare fisiologia di ognuno di questi segmenti permette di capire alcune delle problematiche alla base della diversa incidenza di deiscenza anastomotica di ileo e colon.

E' accertato che fisiologicamente, in assenza quindi di anastomosi, i livelli di sintesi di collagene sono maggiori nel colon rispetto all'ileo; la spiegazione dovrebbe essere che le cellule proposte a tale sintesi (fibroblasti e miofibroblasti) a livello del colon siano caratterizzate per un livello di attività più alto rispetto alle stesse cellule presenti nell'ileo.^{27,28}

Un dato interessante che emerge dall'analisi della letteratura scientifica è che la sintesi del collagene nel sito anastomotico inizia, invece, più precocemente e più intensamente nell'ileo rispetto a quanto non avvenga nel colon.^{27,28,32-37}

Studi condotti *in vitro*³² e *in vivo*^{27,28,33} hanno rilevato che l'entità della sintesi di collagene osservata in 2 tratti, ileale e colico rispettivamente, contenente un'anastomosi, è stata maggiore di circa 9 volte nell'ileo e di circa 6 volte nel colon, rispetto al controllo (tratti ileali e colici non contenenti anastomosi).

Studi biomolecolari hanno poi permesso di riconoscere l'inizio della sintesi di collagene, 3 ore dopo il confezionamento dell'anastomosi nell'ileo e 48 ore dopo nel colon.^{35,36} Tenendo conto però che l'attivazione dei fibroblasti si rileva a partire dal 2° giorno post-operatorio e che tali cellule sono considerate la maggiori responsabili della sintesi di collagene, questo significherebbe che cellule già presenti nel sito anastomotico, e più peculiarmente nell'ileo, sanno rispondere al danno con l'incremento della loro capacità di sintesi del collagene. Alcuni studi^{35,36} hanno infatti dimostrato che le cellule della muscolatura liscia isolate dal digiuno sono in grado di sintetizzare collagene di tipo I, III e V.

Probabilmente ciò che stimola le cellule muscolari lisce e poi i fibroblasti migrati nel sito di anastomosi alla produzione di collagene, è rappresentato dai mediatori della flogosi, tra cui spiccherebbero i fattori rilasciati dalle piastrine.³⁷

Il perché del fatto che il medesimo tipo di cellule nell'ileo reagisca al medesimo stimolo diversamente da quanto non avvenga nel colon, forse si spiega con il fatto che nel colon quelle cellule necessitano di stimoli ancora maggiori, essendo già a un più alto livello di attività di sintesi.

L'importanza del metabolismo energetico nei processi di riparazione tissutale è intuitiva, quali che essi siano. Studi sperimentali sui conigli,³¹ condotti dal nostro gruppo di lavoro hanno, infatti, indagato le differenze nel metabolismo energetico tra ileo e colon, partendo dalla considerazione che, per esempio, alla base del megacolon delle pseudo-occlusioni intestinali croniche fosse stata individuata una mutazione genetica del tRNA^{Gly} mitocondriale.³⁸

I risultati hanno permesso di concludere che a livello dei mitocondri delle cellule del colon si rilevava un maggior consumo di ossigeno rispetto a quanto non avvenisse nell'ileo.³¹ E questo aveva una sua corrispondenza nella prevalenza del metabolismo ossidativo a livello colico rispetto all'ileo, in cui la tendenza era quella di un maggior metabolismo glicolitico.³¹ I nostri esperimenti hanno, inoltre, dimostrato, durante il processo di guarigione dell'anastomosi colica, la crisi di tutti i parametri biochimici misurati: un crollo significativo dell'attività enzimatica e respiratoria mitocondriale, la dissociazione mitocondriale e la riduzione dell'espressione dei complessi mitocondriali all'analisi gel-elettroforetica. Gli stessi parametri, invece, risultavano inalterati quando misurati nelle cellule delle anastomosi ileali. A 21 giorni dal confezionamento delle

anastomosi, infatti, si osservava un recupero di tali attività a livello colico ancora non superiore al 30%.³¹

Partendo da questi dati, abbiamo potuto osservare che, in presenza di uno stress chirurgico (quale è il confezionamento di un'anastomosi) che si caratterizza anche per un ipossia transitoria nella sede della sutura, essendo il colon così dipendente dalla fosforilazione ossidativa per produrre l'energia necessaria ai processi di guarigione della sutura stessa, le cellule dell'anastomosi colica sono sede di difficoltosa produzione di ATP.³¹ Nelle stesse condizioni di stress, invece, le cellule dell'anastomosi ileale potranno avvalersi efficacemente della glicolisi anaerobia per la produzione di ATP.³¹ Si può quindi facilmente desumere come questa differenza biochimica nella produzione dell'energia necessaria ai fini della guarigione dell'anastomosi sia alla base della maggiore incidenza di deiscenza a carico delle anastomosi del colon, piuttosto che dell'ileo.

La rilevanza fisiopatologica di questi risultati è stata successivamente verificata indagando se il danno mitocondriale riscontrato a livello colico avesse poi delle ripercussioni su altri processi biochimici, per esempio sulla regolazione intracellulare del Ca^{2+} e quindi sulla contrazione della muscolatura liscia intestinale.^{39,40}

Un altro nostro studio sperimentale sul coniglio ha evidenziato come il deficit energetico a livello del colon, infatti, oltre ad essere responsabile dell'alterata deposizione e maturazione del collagene in sede di anastomosi, pone le basi anche per l'alterazione della contrattilità della muscolatura liscia intestinale riscontrata.^{39,40} I risultati tensiometrici ottenuti, infatti, sono la conseguenza delle alterazioni biochimiche registrate, in quanto l'ATP è fisiologicamente richiesto per il mantenimento del potenziale di membrana, per l'omeostasi del calcio e per le interazioni actina-miosina.^{39,40}

FATTORI DI DEISCENZA

L'incidenza della deiscenza anastomotica in letteratura è compresa tra il 2% e il 10%,⁴¹⁻⁴⁸ tale complicazione è ritenuta determinare l'impatto maggiore sulla morbilità e mortalità dei pazienti sottoposti a chirurgia resettiva gastrointestinale, con incidenze comprese tra il 20-30% e il 7-12%, rispettivamente.⁴⁷

Per tale motivo, l'identificazione dei pazienti a più alto rischio di deiscenza anastomotica è mandatoria durante la valutazione pre-operatoria.

Dalla revisione della letteratura si evince che i fattori di rischio di deiscenza possono essere divisi in 3 gruppi:⁴⁹⁻⁶³

2. *fattori sistemici*: età >65 aa, sesso maschile, obesità, abuso di alcool, fumo, perdita di peso, ASA score, caratteristiche demografiche dei pazienti, stato nutrizionale, anemia (Hb<11 g/dl), ipoproteinemia (proteine sieriche <6 g/dl), terapia immunosoppressiva preoperatoria/corticosteroidi, ipovolemia, tensione di ossigeno, leucocitosi, leucopenia, ipovitaminosi, ittero, uremia, aterosclerosi diffusa;
3. *fattori correlati all'intervento chirurgico*: durata dell'intervento chirurgico, perdite ematiche, politrasfusioni, difficoltà delle procedure chirurgiche, labilità intraoperatoria del mantenimento della pressione arteriosa, anastomosi meccanica vs manuale, laparoscopia vs laparotomia, prova idro-pneumatica, intervento chirurgico eseguito in urgenza o d'elezione, preparazione intestinale, esperienza del chirurgo;
4. *fattori specifici di malattia*: patologia neoplastica, malattie infiammatorie croniche dell'intestino, patologia cardiovascolare, malattia diverticolare,

comorbilità, broncopatia cronica ostruttiva (BCO), diabete, indicazioni alla resezione.

Nell'ambito dei fattori sistemici, l'albuminemia pre-operatoria <3.5 mg/dL, l'ipoproteinemi e la perdita di peso, che indicano lo stato nutrizionale scadente del paziente, è stata correlata al rischio di deiscenza.^{64,65} Alcuni studi hanno infatti rilevato che, garantendo un adeguato introito di tutti gli elementi nutrizionali necessari per 7-10 giorni nel pre-operatorio, si registrava un significativo miglioramento dell'*outcome* globale di pazienti sottoposti a chirurgia addominale.⁶⁶⁻⁶⁸ Per tale motivo, si raccomanda l'ottimizzazione della nutrizione enterale nell'ambito della chirurgia addominale di elezione.

Pareri discordanti si annoverano, invece, per quanto riguarda il rischio aumentato di deiscenza in correlazione all'età avanzata, al sesso maschile, all'ASA score, all'anamnesi personale di patologia cardiovascolare e di malattia diverticolare, l'obesità, l'abuso di alcool, ipovitaminosi, ittero e uremia.^{41,56,69,70}

La stessa discordanza di opinioni emerge dall'analisi della letteratura, per quel che concerne le caratteristiche demografiche dei pazienti, le comorbilità, le indicazioni alla resezione, le eventuali terapie immunosoppressive preoperatorie, la concomitanza di diabete o leucocitosi/leucopenia, l'ipovitaminosi e l'aterosclerosi.⁴¹

Gli studi condotti nel nostro gruppo di lavoro, comunque, hanno dimostrato una correlazione tra la presenza di BCO e il più alto tasso di incidenza di deiscenza anastomotica colica, e quindi un aumento del rischio di insuccesso nel paziente in età geriatrica, più frequentemente affetto da BCO⁷¹ e conseguentemente affetto da minore *oxygen delivery* periferica.

La BCO è una patologia caratterizzata da una condizione di ipossia cronica⁷² che determina una ridotta ossigenazione tissutale (ridotta disponibilità di ossigeno: DaO₂).

Tuttavia, il meccanismo di controllo del flusso sanguigno e la modulazione dell'estrazione di ossigeno- a livello intestinale- rendono il consumo di ossigeno (VO₂) indipendente dalla DaO₂;⁷³ di conseguenza, nei pazienti con BCO la ridotta DaO₂ non influenza la VO₂. Durante il processo di guarigione dell'anastomosi colica, al contrario, la richiesta di ossigeno aumenta, sia per la più alta richiesta metabolica legata all'attuarsi della fosforilazione ossidativa, sia per la sintesi del collagene.⁷⁴ Nei pazienti con BCO che sono sottoposti al confezionamento di un'anastomosi colica, queste modificazioni fisiopatologiche inevitabilmente mettono in relazione la VO₂ alla insufficiente DaO₂. La correzione della compromissione della tensione di ossigeno potrebbe, quindi, ridurre l'incidenza di deiscenza anastomotica nei pazienti affetti da BCO.

Come conseguenza, una completa valutazione preoperatoria della funzionalità respiratoria è, quindi, indispensabile prima di ogni intervento di chirurgia colica resettiva. L'ossigeno-terapia perioperatoria, inoltre, potrebbe – *per quanto detto* - agevolare il processo di guarigione anastomotica.

Precedenti studi sperimentali⁷⁵⁻⁸⁰ hanno enfatizzato il ruolo della ipovolemia, dell'anemia e della tensione di ossigeno come fattori predittivi per la guarigione dell'anastomosi. L'ipovolemia determina l'ipossia tissutale, compromettendo la guarigione anastomotica. L'ossigeno, inoltre, è essenziale per l'idrossilazione della lisina e della prolina durante la sintesi del collagene nell'area di sutura; di conseguenza, la bassa tensione di ossigeno influenza in maniera negativa la guarigione della parete intestinale, incrementando il rischio di fallimento.

Per quanto riguarda i fattori specifici di malattia, è stata identificata l'associazione tra la comparsa della deiscenza anastomotica e le resezioni per patologia neoplastica e in corso di IBD.^{41,45-47,49,50,53-55,57-59,65,81-85} Si ritiene, comunque, che l'ottenimento di margini

di resezione liberi da malattia e l'esecuzione di una resezione che rispetti la vascolarizzazione dei monconi intestinali, con una corretta assenza di tensione sui monconi e quindi sulla rima anastomotica, siano prerogative necessarie alla riduzione dell'incidenza di deiscenza.

I fattori correlati all'intervento chirurgico sono stati oggetto di ampie valutazioni in letteratura. Tra questi, la durata dell'intervento chirurgico, le perdite ematiche, le politrasfusioni, le difficoltà delle procedure chirurgiche, l'esperienza del chirurgo, sono stati quelli per cui si è evidenziata la più forte associazione con lo sviluppo di deiscenza anastomotica.^{41,54,86-92}

Al contrario, la labilità intraoperatoria del mantenimento della pressione arteriosa, l'esecuzione dell'anastomosi secondo tecnica meccanica *vs* manuale, l'intervento condotto per via laparoscopica *vs* laparotomia, la verifica intraoperatoria dell'integrità dell'anastomosi con le prove idro-pneumatiche, l'esecuzione dell'intervento chirurgico in regime di urgenza o di elezione, con o meno preparazione intestinale, non hanno messo in evidenza in maniera univoca l'associazione con l'aumentato rischio di deiscenza.^{41,54,86-92}

4. Le protesi biologiche

I materiali protesici in chirurgia generale sono stati introdotti a partire dagli anni 60' per la riparazione delle ernie e dei laparoceli,^{93,94} con il fine di ridurre l'incidenza delle recidive e del dolore post-operatorio.⁹³⁻⁹⁶ Da allora, diversi *trial* clinici hanno dimostrato la superiorità delle tecniche di riparazione *tension-free* con l'utilizzo di protesi sintetiche come sostituti fasciali o come rinforzo di parete.⁹⁵⁻¹⁰⁰

Il diffondersi dell'uso di protesi sintetiche ha permesso di mettere in evidenza, però, che il materiale sintetico è esposto al rischio di infezione nel 5-18%,¹⁰¹ oltre che a una certa percentuale di formazione di sieromi, aderenze con le anse intestinali e fistole enterocutanee.

Stante la necessità di ridurre la frequenza di tali complicazioni, che possono incidere sugli *outcome* a lungo termine dei pazienti trattati, perciò, sono state ideate e diffuse le protesi biologiche.

CLASSIFICAZIONE

Le protesi biologiche sono costituite da una matrice extracellulare privata della sua componente cellulare; sebbene siano tutte caratterizzate da questo elemento, esse

differiscono tra loro sostanzialmente in relazione alla risorsa biologica da cui quella matrice extracellulare è ottenuta.¹⁰²

Dal punto di vista del rimodellamento nell'ospite, i materiali biologici si suddividono in (Tab.1):¹⁰³⁻¹¹⁰

- *cross-linked*: parzialmente rimodellati e integrati del tessuto dell'ospite;
- *non cross-linked*: totalmente rimodellati e sostituiti dal tessuto di nuova formazione.

Tabella 1: Classificazione delle protesi biologiche

Nome	Tessuto	Origine	Crosslinked?	Sterile?
Alloderm®	Derma	umana	No	No
Allomax™	Derma	umana	No	Sì
Collamend™	Derma	porcina	Sì	Sì
FlexHD™	Derma	umana	No	No
Periguard®	Pericardio	bovina	Sì	Sì
Permacol™	Derma	porcina	Sì	Sì
Strattice®	Derma	porcina	No	Sì
Surgimend®	Derma	bovina fetale	No	Sì
Surgisis®	Sottomucosa intestinale	porcina	No	Sì
Tutopatch®	Pericardio	bovina	No	Sì
Veritas®	Pericardio	bovina	No	Sì
XenMatrix®	Derma	porcina	No	Sì

Le protesi biologiche attualmente a disposizione sono ottenute da tessuti animali o umani: sottomucosa del piccolo intestino porcino, pericardio bovino, matrice di derma umano acellulare, collagene del derma porcino, fascia lata.

La mesh biologica ottenuta dalla **sottomucosa del piccolo intestino del maiale**¹¹¹⁻¹¹⁴ (Surgisis®) è costituita da un materiale acellulare sterile, composto da lamina propria, *muscularis mucosae* e sottomucosa. La matrice extracellulare ha conservato la propria composizione a base di collagene naturale (tipo I, III e IV), glicosaminoglicani (acido ialuronico, condroitinsolfato A e B, dermatansolfato e eparansolfato), proteoglicani e glicoproteine, responsabili del rimodellamento e della riparazione tissutale. Essa contiene anche fattori utili alla crescita, quali il TGF- β e VEGF, quest'ultimo fondamentale nel processo di neovascolarizzazione.

La protesi così fatta, usufruendo della naturale struttura tridimensionale, funge comodamente da scheletro per la progressiva crescita tissutale da parte delle cellule dell'ospite. Si assiste, infatti, dopo l'impianto, all'invasione e proliferazione da parte delle cellule dell'ospite e alla crescita dei vasi neoformati, fino alla completa sostituzione della protesi da tessuto neoformato e maturo, identico sia per morfologia che per fisiologia a quello dell'ospite, nell'arco di 6-12 mesi.

Le protesi biologiche ottenute dal **collagene del derma porcino**¹¹⁶⁻¹²⁰ (Permacol™, Pelvicol®, Collamend Implant®, Strattice®, Xen Matrix®) sono costituite da fibre acellulari di collagene e elastina, resistenti, ma flessibili. Il collagene è stabilizzato da un processo di *cross-linking*, che rende la struttura della *mesh* resistente alla degradazione e al riassorbimento da parte delle collagenasi.

La protesi, pertanto, resta permanentemente incorporata nel tessuto di crescita, attraverso un meccanismo di incapsulamento, piuttosto che invasa dalle cellule dell'ospite e dai neovasi. Lo spazio morto potenziale tra la *mesh* e la neocapsula potrebbe, comunque, predisporre alla formazione di sieromi, nonché infezioni in sede di impianto. Per migliorare l'integrazione della protesi, si è per questo pensato che riducendo la

quantità del disaccaride terminale (alpha-Gal), si potesse ridurre la potenziale risposta antigenica da parte dell'ospite, aumentando l'entità del rimodellamento della *mesh*.

La protesi biologica prodotta a partire dalla **matrice acellulare del derma umano**¹²¹⁻¹²⁵ (Alloderm, Allomax, FlexHD), ricavato da donatori cadaveri, è resistente al rigetto grazie alla separazione effettuata tra il derma, l'epidermide e tutti gli elementi cellulari ivi presenti. Anche questa matrice acellulare funge da scheletro per la rigenerazione tissutale attraverso la rivascolarizzazione e l'invasione e ripopolazione cellulare (fibroblasti) da parte dell'ospite.

Tra il 1° e il 4° mese dopo l'impianto si assiste al consolidamento tra la *mesh* e il tessuto ospite. Il materiale biologico va incontro a completa degradazione e sostituzione da parte di neocollagene, deposto i fibre parallele, interdigitato ai neovasi.

La **mesh di pericardio bovino**¹²⁶⁻¹³¹ (Tutopatch[®], Veritas[®], PeriGuard[®]) è costituita a partire da una membrana acellulare di puro collagene che mantiene la sua struttura nativa. Anche le sue proprietà biochimiche sono altresì conservate, così da garantire resistenza e al contempo flessibilità e morbidezza e facilità nella manipolazione.

Il processo di produzione prevede che le proprietà antigeniche del materiale siano annullate, che la struttura sia preservata e che i patogeni presenti siano inattivati in maniera definitiva.

La protesi funge da guida per la deposizione di neocollagene, grazie anche alla sue fibre connettivali multidirezionali; tale multispazialità permette che la forza tensile si sviluppi in ogni direzione. La formazione del neotessuto avviene in tempi brevi dopo l'impianto e contestualmente alla digestione del collagene nativo della *mesh*. Non si rileva alcun incapsulamento fibroso, così che le infezioni o i sieromi non si verificano; ciò è favorito anche dalla presenza di fori utili al drenaggio del siero.

Una caratteristica non trascurabile è poi la tendenza alla rapida proliferazione mesoteliale se a contatto con il peritoneo.

INDICAZIONI

L'**infezione della protesi** costituisce una delle complicazioni più temibili della chirurgia erniaria, la cui incidenza, tuttavia, dipende strettamente dal tipo di materiale e dalla tecnica di riparazione usati.¹³¹

I batteri aderiscono avidamente ai polimeri e producono un biofilm che li protegge dalle difese immunitarie dell'ospite e dagli antibiotici, contribuendo alla sopravvivenza batterica e all'infezione cronica.¹⁰¹

Nel tentativo di ridurre l'incidenza delle infezioni, si sono sviluppate le *protesi sintetiche riassorbibili* (in *polyglactin* e *acido poliglicolico*) che si sono configurate come buona alternativa alle *mesh sintetiche non riassorbibili*. Queste ultime, infatti, presentano in letteratura tassi di infezioni variabili: le protesi in *polipropilene* (PP) hanno un tasso di infezione compreso tra il 2 e il 4,2%; le protesi in *poli-tetra-fluoro-etilene espanso* mostrano un più ampio *range* di incidenza tra lo 0 e il 9,2%; le protesi in *poliestere* (POL) multifilamento mostrano il più alto tasso di infezione (7-16%), mentre quelle in monofilamento hanno un tasso di infezione paragonabile alle reti in PP.¹³³

I materiali riassorbibili consentono la rapida formazione di un solido tessuto fibroconnettivale che determina la riparazione del difetto di parete prima che la protesi venga riassorbita completamente.¹³³ La massiva reazione tissutale causata dalle protesi riassorbibili è frequentemente responsabile di *discomfort* nel paziente ed è stata anche correlata a una

maggior incidenza di recidive in uno studio sperimentale;¹³⁴ pertanto, è stata ideata una combinazione di materiali assorbibili e non assorbibili per garantire la formazione di tessuto solido nelle prime settimane dal posizionamento della protesi, mentre successivamente la componente non assorbibile *low-weight* assicura una tenuta permanente e maggior flessibilità al nuovo tessuto, con relativa minore incidenza di complicazioni a lungo termine, comprese le recidive.¹³⁵

Il tasso di recidiva erniaria con l'uso di protesi si è significativamente ridotto nel tempo, aumentando però in modo significativo in presenza di infezione; in questi casi la rimozione della protesi è, spesso, mandatoria.

Il rischio di infezione limita, inoltre, notevolmente l'uso di una protesi in presenza di un campo operatorio contaminato, potenzialmente contaminato o infetto.¹³³

Questo scenario è cambiato radicalmente dall'avvento delle protesi biologiche, costituite da matrice di collagene acellulare, proveniente da animali (xeno-impianto) o da tessuto umano (allo-impianto).

Esse sono ottenute tramite liofilizzazione, che distrugge il contingente cellulare eliminando l'antigenicità del prodotto e che risparmia la componente connettivale rappresentata prevalentemente da collagene di tipo I, III, IV ed elastina. Il processo di purificazione è necessario affinché la risposta del ricevente all'impianto sia minima.¹⁰²

Le bioprotesi più diffuse e studiate attualmente in commercio sono costituite dalla sottomucosa di intestino porcino, dal derma porcino, dal pericardio bovino, e dal derma umano acellulare. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo di questi materiali nella **riparazione dei laparoceli in condizioni di contaminazione**.^{132,136}

Una volta impiantate, le protesi biologiche costituiscono un microambiente naturale che stimola la migrazione delle cellule del ricevente e favorisce la angiogenesi

comportandosi da "impalcatura" (*scaffold*) con il risultato di ottenere un nuovo tessuto in cui la deposizione di collagene avviene per strati paralleli, diversamente dalle protesi sintetiche in cui essa avviene in maniera casuale e disordinata.

Le bioprotesi conservano una buona resistenza meccanica qualora i legami tra le eliche di collagene siano stabili. Al contrario, queste vengono rapidamente riassorbite dalle collagenasi e metallo-proteinasi prodotte dalle cellule del sistema immunitario dell'ospite, richiamate dalla - seppur minima - reazione infiammatoria locale. Tale flogosi, a sua volta può essere amplificata da un'eventuale sovrainfezione batterica, con produzione di enzimi litici di origine batterica, compromettendo la solidità meccanica del tessuto neoformato.

Il tasso di riassorbimento della protesi e il suo pattern rigenerativo dipendono sostanzialmente dal grado di *cross-linking* tra le fibre collagene della matrice acellulare.

Maggiore è il *cross-linking*, maggiore sarà la resistenza alla degradazione che rende sicure queste protesi anche in presenza di enzimi litici di origine batterica; la dimostrazione di questo fenomeno è presente in alcuni studi che hanno valutato una bioprotesi non *cross-linked* costituita di sottomucosa intestinale bovina, la quale subiva una accelerata degradazione quando utilizzata in campi contaminati; in uno studio in vivo questo biomateriale non era più rintracciabile nella sede dell'impianto dopo 17 giorni.^{102,137}

In un modello animale è stato dimostrato che un elevato grado di *cross-linking* (*i.e.* nel derma suino) costituisce un ostacolo alla deposizione del collagene nel contesto della protesi (*ingrowth*). Si determina, quindi, una deposizione di fibre collagene parallele all'impianto, con formazione di una capsula "*a sandwich*" scarsamente vascolarizzata sui due versanti della protesi. Tale capsula, se da una parte induce un'aumentata resistenza del tessuto neoformato, dall'altra favorisce la potenziale formazione di uno spazio morto

tra l'impianto e la capsula fibrosa, con risultati non ottimali per la scarsa integrazione della protesi.¹³⁶

Una riduzione del grado di *cross-linking* si associa ad una maggiore rigenerazione tissutale, ma a una più rapida degradazione del biomateriale.^{138,139} Recentissimi studi sperimentale^{140,141} hanno, infatti, dimostrato che è possibile conservare l'integrità strutturale della matrice extracellulare delle protesi in derma porcino, minimizzando la risposta antigenica che provoca l'incapsulamento e impedisce *l'ingrowth*, attraverso l'eliminazione di un disaccaride terminale con specifici enzimi di clivaggio. Questo trattamento consente una efficace ripopolazione del materiale protesico da parte dei fibroblasti e neoangiogenesi con integrazione tra la protesi e il tessuto neoformato a due settimane dall'impianto, migliorando la biocompatibilità di questa tipologia di protesi e mantenendo la sua resistenza al riassorbimento grazie alla conservazione del *cross-linking*.^{140,141}

Un ulteriore vantaggio delle protesi biologiche è la **mancata formazione di aderenze** con le anse intestinali qualora vengono posizionate in sede intraperitoneale, fenomeno che potrebbe essere legato alla formazione di un neostrato mesoteliale sul versante peritoneale della protesi che possiede proprietà fibrinolitiche dovute alla secrezione di plasminogeno.¹⁴² Inoltre, non sono stati riportati casi di fistolizzazione intestinale associati con l'uso di impianti di collagene.¹⁰¹

Queste caratteristiche permettono l'uso delle bioprotesi anche nel trattamento definitivo dell'*open abdomen* nei traumi e nei grossi difetti di parete con perdita di sostanza, che spesso richiedono multiple procedure.¹⁴³

3.STUDIO SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Il fallimento dell'anastomosi intestinale rappresenta a tutt'oggi uno dei maggiori problemi in chirurgia resettiva addominale.^{1-7,41-44,47-71,79,81-92} L'evidenza clinica di tale evento può essere rappresentata dalla filtrazione o dalla completa deiscenza anastomotica.^{1-7,41-44,47-71,79,81-92}

Mentre la completa deiscenza è responsabile di un quadro di peritonite acuta con rischio di sepsi per il paziente e richiede, quindi, il re-intervento in regime di urgenza, la filtrazione dell'anastomosi può determinare quadri subdoli che vanno dalla comparsa di una fistola entero-cutanea alla formazione di ascessi endoaddominali, che in talune circostanze possono portare il paziente verso uno stato settico generalizzato. Nel caso della comparsa della fistola enterica, l'approccio terapeutico può essere di tipo conservativo, in relazione alla portata e all'andamento della stessa verso la risoluzione, ma deve anche contemplare l'opzione della revisione chirurgica nei casi ad alta portata, come anche nei casi degli ascessi endoaddominali che stanno evolvendo verso la sepsi.

L'impatto del fallimento dell'anastomosi, nelle sue varie forme (incidenza tra il 2% e il 10%), sull'*outcome* del paziente è decisamente cattivo, in relazione all'aumento della morbilità (20-30%) e della mortalità (7-12%), rispetto ai casi *uneventfully* dopo chirurgia resettiva addominale, con sensibile aumento della degenza ospedaliera e dei costi.^{1-7,41-44,47-71,79,81-92}

SCOPO DELLO STUDIO

Come già ampiamente illustrato in precedenza, le protesi biologiche sono costituite da una matrice proteica extracellulare che funge da impalcatura per la crescita del tessuto connettivo dell'ospite e per la migrazione, adesione e proliferazione cellulare.

Scopo dello studio è verificare se di una benderella di materiale protesico biologico di pericardio bovino, apposta *in vivo* sulla rima di sutura (a punti staccati di PDS 3/0 in monostrato secondo *Gambie*) di anastomosi intestinali di maiale:

- eserciti la stessa funzione di guida ("*scaffold*") per la crescita di tessuto dell'ospite fino alla guarigione dell'anastomosi;
- eviti la comparsa di filtrazione anastomotica nei casi - *confezionati ad arte* - di suture intestinali incomplete in un punto di sutura.

A tal fine, sono stati condotti valutazioni intraoperatorie, analisi istopatologiche, biochimiche, di tensiometria e di elettrofisiologia sui segmenti intestinali prelevati.

MATERIALE E METODO

Lo studio sperimentale è stato sottoposto all'approvazione del *National Animal Care and Use Committee*.

Animali

Sono stati adoperati nello studio 95 maiali domestici (Landrace); la parte sperimentale dello studio ha avuto inizio nel Settembre 2009 ed è terminata ad Aprile 2010.

Tutti gli animali nelle 24h precedenti gli interventi chirurgici sono stati sottoposti a digiuno. Dopo gli interventi chirurgici, tutti gli animali sono stati sottoposti a terapia antibiotica con Ampicillina (25 mg/kg ogni 12 h) e tramadolo (5 mg/kg al giorno).

Essi sono stati quotidianamente monitorati durante il periodo sperimentale al fine di individuare ogni tipo di alterazione delle loro condizioni cliniche (controllo della diuresi e della canalizzazione intestinale, alimentazione e perdita di peso, temperatura corporea e mutazioni comportamentali).

Anestesia

Gli animali sono stati sedati con Telazol[®] (Tiletamina-Zolazepam; 4 mg/kg) e morfina (0.4 mg/kg) per via intramuscolare. Appena era ottenuto un adeguato livello di sedazione, si posizionava un accesso venoso nella vena periferica auricolare. L'anestesia generale veniva indotta con un'infusione endovenosa di tiopentale (3-4 mg kg⁻¹) e, dopo

intubazione orotracheale, veniva mantenuta con una miscela di isoflurano e ossigeno (Fig.1).

Tutti gli animali durante gli interventi chirurgici sono stati collegati al ventilatore e ventilati meccanicamente, così da garantire la normocapnia (PETCO₂ 35-45 mmHg). Durante le procedure, si monitoravano in continuo: frequenza cardiaca (FC), pressione arteriosa sistolica (SAP), diastolica (DAP), differenziale (MAP), frequenza respiratoria (FR), saturazione dell'ossigeno nell'emoglobina (SpO₂), End-Tidal CO₂ (EtCO₂) e la concentrazione di isoflurano.

Alla fine degli interventi chirurgici, gli animali, a seconda dei casi, sono stati risvegliati dalla anestesia generale, con l'assistenza necessaria ad ognuno o sottoposti a eutanasia con un bolo di tiopentale seguito da un bolo di KCl.



Figura 1: un esemplare di maiale Landrace durante l'esperimento.

Tecnica chirurgica

Tutti gli animali sono stati sottoposti a 2 laparotomie con una propria tempistica. I 95 maiali sono stati divisi in 4 gruppi e durante la prima laparotomia, ogni animale è stato

sottoposto a una resezione ileale e una resezione colica a cui seguiva l'anastomosi ileo-ileale e colo-colica con la tecnica del gruppo di appartenenza:

- **gruppo 1 (30 animali)**: in cui l'anastomosi ileo-ileale e colo-colica veniva eseguita in singolo strato con punti staccati di PDS 3/0 secondo *Gambee*;
- **gruppo 2 (30 animali)**: in cui sulle anastomosi così confezionate si è apposta una benderella biologica di pericardio bovino (Fig.2);
- **gruppo 3 (5)**: in cui uno dei punti di PDS 3/0 secondo *Gambee* del singolo strato delle anastomosi veniva deliberatamente saltato;
- **gruppo 4 (30 animali)**: in cui uno dei punti di PDS 3/0 secondo *Gambee* del singolo strato delle anastomosi veniva deliberatamente saltato, e sulla rima delle 2 anastomosi veniva apposta la benderella biologica di pericardio bovino.

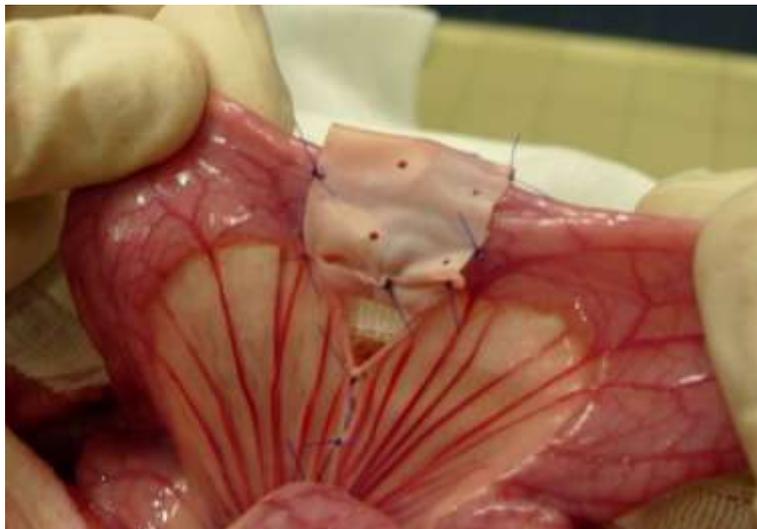


Figura 2: apposizione di una benderella biologica di pericardio bovino sull'anastomosi ileo-ileale (Gruppo 2).

In base al protocollo, tutti gli animali sono stati sottoposti alla seconda laparotomia, durante la quale si effettuava l'ispezione della cavità peritoneale e di tutti i visceri, al fine di verificare la presenza di versamento libero, ascessi o reazione peritoneale. Dopo l'ispezione, si individuavano i segmenti intestinali sottoposti ad anastomosi e si effettuava

la resezione intestinale con margine a 4 cm a monte e a valle dalla sutura, così da poter eseguire le analisi programmate. Al termine della seconda laparotomia gli animali venivano sacrificati. La seconda laparotomia è stata eseguita nei tempi illustrati in Tabella 2.

Tabella 2: Protocollo riguardante la II laparotomia.

	Gruppo 1 (n)	Gruppo 2 (n)	Gruppo 3 (n)	Gruppo 4 (n)
48 h	5	5	5	5
96 h	5	5	-	5
7 gg	5	5	-	5
14 gg	5	5	-	5
30 gg	5	5	-	5
90 gg	5	5	-	5

Valutazioni istopatologiche

Per ogni sezione sono stati valutati i seguenti parametri istologici: grado di infiammazione, fibrosi parietale, integrità dello strato della mucosa, lo stato della sierosa. Nei casi in cui era stata apposta la protesi biologica, si è rilevato anche il grado di infiltrazione granulocitaria della membrana basale.

Preparazione del pezzo

Tutti i campioni sono stati fissati in una soluzione neutra tamponata di formalina per 24-48h, sezionate longitudinalmente per includere l'anastomosi e i tratti intestinali adiacenti; sono state poi incluse in paraffina così da poter osservare l'intera sezione in tutto il suo spessore, dalla superficie mucosa allo strato sieroso. Sono poi state preparate

sezioni consecutive di 3µm ciascuna, che sono state colorate con ematossilina-eosina e PAS e osservate al microscopio.

Valutazioni biochimiche

Si è effettuata l'analisi dell'attività respiratoria mitocondriale, dell'NADH-UQ ossidoreduktasi, della Citocromo C ossidasi, della Citrato sintasi, delle ROS nei segmenti intestinali contenenti le anastomosi con e senza apposizione della benderella di pericardio bovino.

Preparazione dei mitocondri delle cellule del muscolo liscio

I segmenti rappresentativi di colon e ileo sono stati utilizzati per gli esperimenti biochimici subito dopo la resezione chirurgica. Dopo la dissezione della mucosa e della sierosa, il tessuto è stato sottoposto a microframmentazione mediante l'omogeneizzatore Teflon-glass, contenente mediamente: 100 mg di tessuto a fresco/ml, 250 mM di saccarosio, 2 mM EDTA, tris-HCl 10 mM e eparina 50 U/ml; pH 7.4.

I mitocondri sono stati isolati secondo *Bookelman et al.*¹⁴⁴ Le proteine mitocondriali sono state determinate secondo il metodo di *Lowry et al.*¹⁴⁵

Attività respiratoria mitocondriale

L'attività respiratoria mitocondriale è stata misurata con metodo polarografico¹⁴⁶ tramite un elettrodo per l'ossigeno di *Clark* in una celletta termostata ad acqua a 37°C, sotto agitazione magnetica, contenente una soluzione tampone, miscelata magneticamente a 37°C: saccarosio 75mM, Tris-HCl 30mM, KCl 50mM, EDTA 0,5mM, MgCl₂ 0,5mM, KH₂PO₄ 2mM.

I mitocondri sono stati trasferiti nella camera polarografia e un'aliquota è stata utilizzata per la determinazione mediante il metodo *Bradford*. I substrati e gli inibitori dell'OXPHOS mitocondriale sono stati aggiunti alle seguenti concentrazioni: oligomicina

(1µg/µl), CCCP (0,25mM), Rot (1µg/µl), succinato (1M), antimicina A (1µg/µl), ascorbato (1M)+TMPD (0.1M) e KCN (0,1M).

Abbiamo misurato l'indice RCR (indice di controllo respiratorio) dal rapporto tra stato III disaccoppiato/ stato IV. I tassi della respirazione sono stati espressi in nanomoli di ossigeno molecolare per milligrammi di proteine mitocondriali.¹⁴⁶

Attività della NADH-UQ ossido-reduttasi (Complesso I)

I mitocondri sono stati esposti all'energia ultrasonica per 15 s a 0°C, la Vmax e Km (costanti cinetiche dell' enzima) sono state determinate utilizzando il coenzima NAD ridotto come donatore di elettroni e seguendo la reazione allo spettrofotometro alla coppia di lunghezze d'onda di 360 nanometri per il raggio di misura e 374 nanometri per il raggio di riferimento e un coefficiente differenziale di estinzione, $\Delta\epsilon$, di 2,01 mM⁻¹). In 800 µl di Mix (Kpi 50mM ph 7.4, MgCl₂ 2 mM, K-EDTA 2 mM, KCN 3 mM, antimicina A 1µg/ml) sono state aggiunte 30 µg di proteine in presenza di decylubiquinone 0,2mM. La reazione è stata iniziata con concentrazioni diverse di NADH (13-2,8 µM). Le misurazioni sono state determinate con e senza rotenone 1µg/ml per discriminare l'attività del complesso I. La Vmax e Km del complesso I sono state determinate utilizzando il grafico dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk seguendo la reazione di ossidazione del NADH.

Attività della Citocromo C ossidasi (complesso IV)

E' stata determinata sui mitocondri in 700 µl di tampone (10 mM tampone fosfato, KPi, MgCl₂ 2mM, pH 7.4) seguendo la reazione di ossidazione di 10 micromolare di ferrocitocromo c 10 µM.

Attività della Citrato sintasi (Ciclo di Krebs)

E' stata utilizzata come marker per la matrice enzimatica mitocondriale. Le proteine mitocondriali (30 µg/ml), 0.5 mM acetil-coenzima A, e 0.5 mM DTNB sono state aggiunte

al tampone di Tris-HCl (100 mM), pH 8. La reazione veniva iniziata dalla aggiunta di 0.5 mM di ossalacetato e la pendenza iniziale della curva veniva misurata seguendo la riduzione del di-tio-nitro-benzoato alla lunghezza d'onda di 419 nanometri ($\Delta\epsilon=163 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Misurazioni delle ROS (specie reattive dell'ossigeno)

L'intero omogenato di tessuto è stato trattato con 10 μ M di diclorofluoresceina-diacetato DCF-DA (503-570 λ) per l'individuazione di H₂O₂ con l'analisi fluorimetrica.¹⁴⁷ L'omogenato è stato risospeso in un piccolo volume di PBS e incubato in 800 μ l di PBS con 10 micromolare di dicloro-fluoresceina-di-acetato per 20 minuti al buio a 37 °C. L'aumento lineare della fluorescenza (eccitazione 507 nm e 530 nm di lunghezza d'onda di emissione), prodotta dall'ossidazione ROS-dipendente della DCFH₂ che porta alla formazione della di-cloro-fluorescina ossidata (DCF), è stata misurata con lo spettrofluorimetro Jasco FP6200.

Studi di tensiometria

La tensione isometrica del tessuto ileale e colico è stata misurata sui pezzi anatomici asportati a 48 ore, 7,14,30 e 90 giorni dopo il confezionamento delle anastomosi rispettive.

Preparazione del tessuto intestinale

Subito dopo l'eutanasia indotta nei maiali, sezioni di circa 1 cm di lunghezza di ileo e colon sono stati immersi in una soluzione di Krebs modificata fredda (pH= 7.4), così costituita (mM): NaCl 113, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ (H₂O) 2.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucosio 5.5, e acido ascorbico 5.5. Le sezioni sono state poi lavate e immerse (20 ml)

nella soluzione di *Krebs* modificata, conservata a 37°C e sottoposta a una miscela di gas (95% O₂ e 5% CO₂).

Una'estremità del pezzo è stata connessa ad un tubo di metallo, mentre l'altra estremità è stata collegata ad un estensimetro (cat. 7003 Basile, Milan, Italy). La tensione isometrica è stata misurata mediante il sistema di acquisizione dei dati PowerLab e registrata utilizzando il Chart 4.1.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Il tessuto è stato lasciato per almeno 45 minuti prima dell'inizio dell'esperimento così che si potesse equilibrare.

Un carico iniziale di 1,0 g di tensione è stata applicata alla preparazione. Sono state così rilevate le curve di risposta all'acetilcolina (ACh, 10⁻⁷ – 10⁻⁴ M). E' stata registrata, inoltre, la risposta contrattile al KCL (80 mM). I dati sono stati espressi in percentuale del valore tensiometrici ottenuti prima del trattamento farmacologico.

Analisi statistica

E' stata eseguita l'analisi unidirezionale o bidirezionale della varianza, come appropriato, seguita dal t-test appaiato o di comparazione multipla di *Newman-Keuls*. I valori di p<0.05 sono stati considerati significativi. I risultati sono stati espressi come media ± S.E.M.

Misurazioni elettrofisiologiche

I parametri elettrofisiologici funzionali misurati sono stati: potenziali transepiteliali (V_t), resistenza transepeliale (R_t) e corrente di corto circuito (I_{sc}), quali indicatori dell'efficacia nel trasporto attraverso la mucosa intestinale nei tratti di colon e ileo asportati. Tali parametri sono stati misurati nella fase precoce dopo il confezionamento dell'anastomosi (dopo 48 ore, 7, 14 giorni) e nella fase tardiva (dopo 30 e 90 giorni).

Preparazione del tessuto intestinale

Il tessuto di ileo e colon appena asportato è stato immerso in una soluzione di Krebs, fredda modificata e tamponata, contenente (in mM): NaCl 107.00, KCl 4.50, NaHCO₃ 25.00, Na₂HPO₄ 1.80, NaH₂PO₄ 0.20, CaCl₂ (2H₂O) 1.25, MgCl₂ 1.00, glucosio 12.00. Durante la dissezione e gli esperimenti, i tessuti sono stati in continuo bagnati nella soluzione di Krebs e sottoposti alla miscela gassosa con O₂/CO₂ (95% / 5%), a pH 7.4 e a 37°C.

Dopo l'asportazione della sierosa e della muscolatura circolare, la mucosa così ottenuta è stata montata verticalmente come foglio piatto a metà delle camere *Ussing* (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany), con un'area esposta di 1 cm². Ciascuna mezza camera di Perspex aveva un canale circolare fluido di 3,0 ml di volume totale riempito con soluzione *Krebs* costantemente in circolazione mediante una bolla di gas. Due paia di elettrodi di Ag/AgCl erano stati usati per monitorare qualsiasi differenza di potenziale trans epiteliale (VT, mV) e la resistenza tissutale (RT, Ω.cm²). La corrente di corto circuito (ISC, μA/cm²) è stata misurata con il potenziale transepiteliale bloccato a zero a intervalli regolari di 5 minuti.

Il voltaggio delle coppie di elettrodi e la resistenza del liquido sono stati valutati prima dell'inizio di ogni esperimento e sistematicamente sottratti. A intervalli fissi di 1 min, un impulso di corrente transepiteliale bipolare (I) di ampiezza 1μA e di durata di 200 msec è stato applicato al tessuto e la R_T è stato calcolata automaticamente in base al cambiamento di tensione nel circuito aperto (ΔVT) secondo la legge di *Ohm* ($RT = \Delta VT / I$) (*Debellis et al.* 2009 PLOS).

Gli esperimenti sono stati condotti simultaneamente su multipli frammenti, ciascuno proveniente da un singolo maiale. I parametri elettrici sono stati misurati in camere

controllate-computerizzate (software Clamp v. 2.14, Aachen, Germany) e registrati per 60 min dopo l'iniziale equilibrio ottenuto in 30 min dopo la preparazione dei pezzi.

Analisi statistica

I dati delle misurazioni effettuate in 60 min sono state espresse come media \pm S.E.M. La comparazione tra il tessuto controllo e il tessuto trattato è stata effettuata con il t-Student test per dati non-appaiati tra la media dei dati della fase precoce e tardiva *vs* giorno 0 e per anastomosi con patch *vs* anastomosi senza patch. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI

Valutazioni intraoperatoria alla II laparotomia

Controllo (Gruppo 1)

La cavità addominale a tutte le esplorazioni in ogni t è apparsa priva di versamento libero, ascessi o reazione peritoneale. Non si sono rilevati, altresì, aderenze tra le anse e il reperimento delle anastomosi confezionate in precedenza è stato agevole (Fig. 3 A-C).



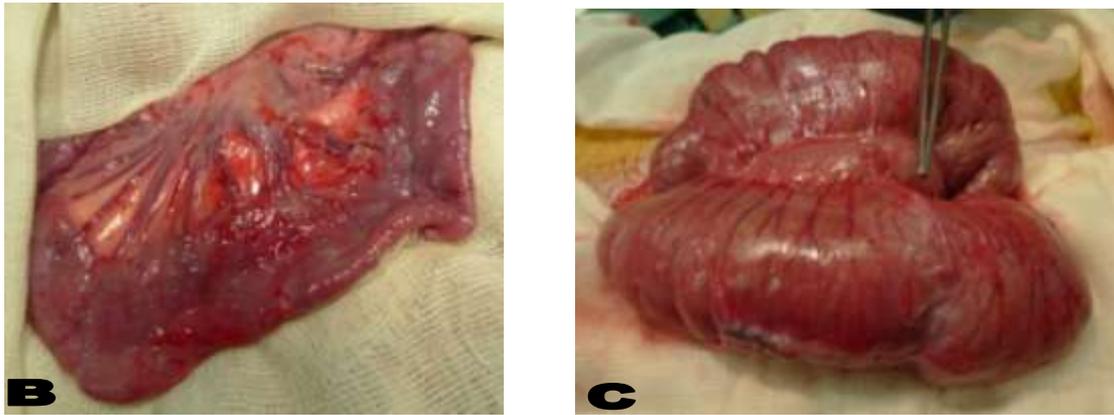


Figura 3: quadro intraoperatorio: A) di anastomosi ileale a 7 gg;
B) di anastomosi ileale a 30 gg; C) di anastomosi colica a 30 gg (Gruppo 1).

Gruppo 2

Anche nei casi di anastomosi protette dalla protesi biologica, non si sono mai rilevate alterazioni degne di note all'esplorazione delle cavità addominali durante le due laparotomie (Fig. 4 A,B). Inoltre, il reperimento dei tratti intestinali, sede di anastomosi, è stato ovviamente più semplice.

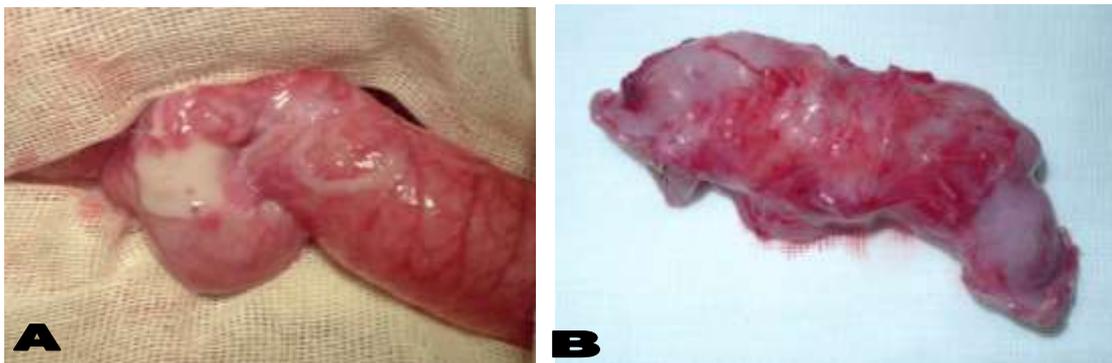


Figura 4: quadro intraoperatorio: A) di anastomosi ileale a 7 gg;
B) di anastomosi colica a 14 gg (Gruppo 2).

Gruppo 3

Si trattava di animali operati alle 48h per la comparsa di diffusa peritonite da perforazione intestinale (Fig.5); la cavità addominale presentava versamento libero e

estesa flogosi peritoneale. Diffusa era la deposizione di fibrina sulla sierosa delle anse, che tendevano alla confluenza in conglomerati facilmente dissociabili.



Figura 5: quadro intraoperatorio di peritonite acuta.

Gruppo 4

La situazione intra-addominale nei maiali sottoposti ad anastomosi deliberatamente confezionate in modo incompleto e simulando una deiscenza, protetta dalla benderella di pericardio bovino, appariva inaspettatamente sovrapponibile ai casi del gruppo 2 (Fig. 6 A-D). Si trattava, tra l'altro, di animali che clinicamente non presentavano nessun segno di peritonite acuta, né alterazione dell'alvo o febbre. Macroscopicamente si rilevava solo la maggiore tendenza della protesi venuta a contatto con il materiale enterico attraverso la perforazione ad una maggiore degradazione/assottigliamento a parità di tempo intercorso dal confezionamento dell'anastomosi, rispetto al gruppo 2.



Figura 6: quadro intraoperatorio: A) di anastomosi ileale a 96 h; B)) di anastomosi colica a 96 h; C) di anastomosi ileale a 30 gg; D) di anastomosi colica a 30 gg (Gruppo 4).

Valutazioni istopatologiche

Controllo (Gruppo 1)

Come prevedibile, nei casi di controllo si è rilevata un'importante infiltrato infiammatorio che è andato riducendosi dal 14° al 30° post-confezionamento dell'anastomosi, e che al 90° giorno era pressoché assente. D'altro canto, si è rilevato un processo fibrogenico che è iniziato intorno al 7° giorno, è stato evidente al 14° e si è completato al 90°.

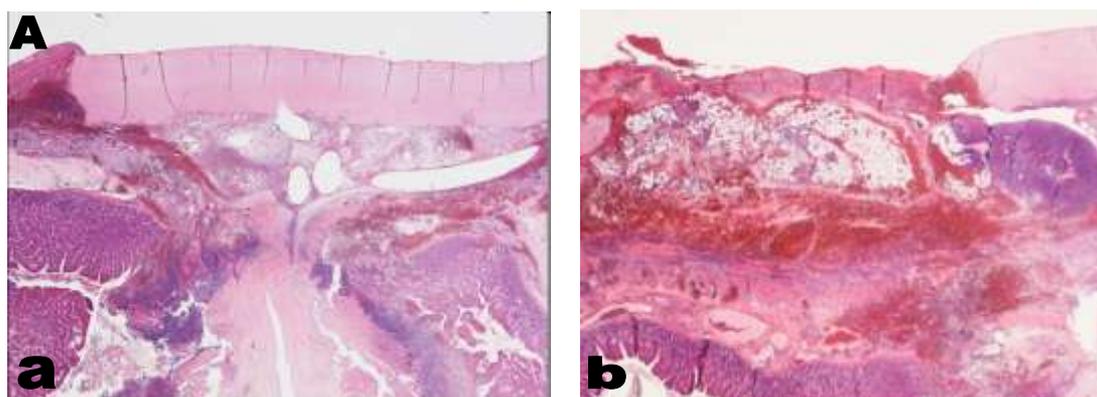
La superficie della mucosa e della sierosa è andata incontro a rapida guarigione; la sierosa in modo particolare appariva liscia con pochissime cellule infiammatorie sin dal 14° giorno post-anastomosi. La Tabella 3 riassume i dati emersi nei casi controllo.

Tabella 3: Caratteristiche istologiche nel Gruppo 1

	48h	7 gg	14 gg	30gg	90 gg
Flogosi	+++	++	++	+	-
Fibrosi	-	+	+	++	++
Mucosa	ulcera	erosa	erosa	erosa	integra
Sierosa	induito	liscia	liscia	liscia	liscia

Gruppo 2 e 4

Nei casi di apposizione della benderella di pericardio bovino, i quadri istopatologici sono sovrapponibili sia che si trattasse di anastomosi ben confezionate (Gruppo 2), sia che si trattasse di anastomosi mal confezionate (Gruppo 4) (Fig. 7 A-C e 8 A e B, rispettivamente). L'infiammazione è rimasta di grado severo-moderata per un intervallo di tempo più prolungato e dopo il 30° giorno è stata ancora rilevabile, mentre al 90° era scarsa (Tab. 4). La reazione fibrotica è, invece, risultata meno evidente rispetto al gruppo controllo, in quanto il tessuto di granulazione era evidente inizialmente solo al bordo della *mesh* e successivamente nelle aree più centrali (Tab. 4). Le figure 7 e 8 illustrano i progressivi cambiamenti istologici rilevati.



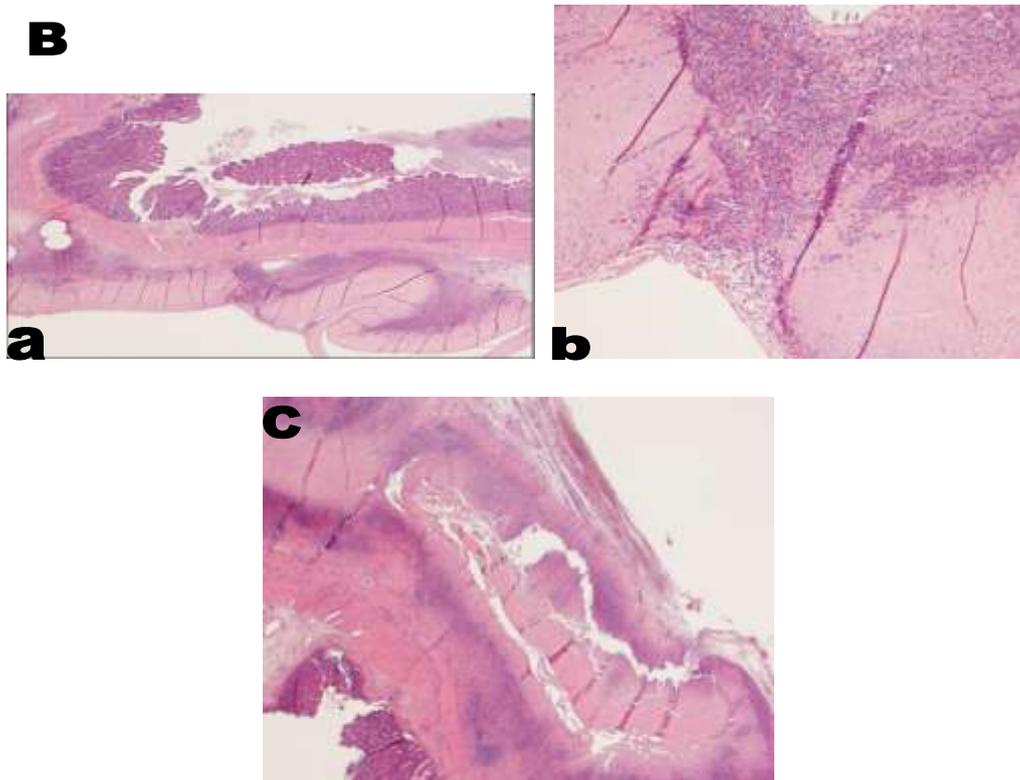


Figura 7: Sezione a tutto spessore della parete intestinale in corrispondenza dell'anastomosi rivestita dalla protesi (Gruppo 2). A) a 48h, si rileva la protesi integra (a: parte centrale; b: margini), inizialmente infiltrata ai bordi; B) a 7 gg, in corrispondenza del versante sieroso è visibile la membrana protesica integra (a), localmente infiltrata da elementi infiammatori, che appaiono tuttavia contenuti nel suo spessore (b); C) in 14° giornata la membrana protesica è inglobata in un tessuto di granulazione infiammatorio ed è parzialmente riassorbita. Si noti la continuità del versante sieroso che appare liscio e privo di essudato. In nessuna sezione, si rilevano alterazioni a carico della sierosa.

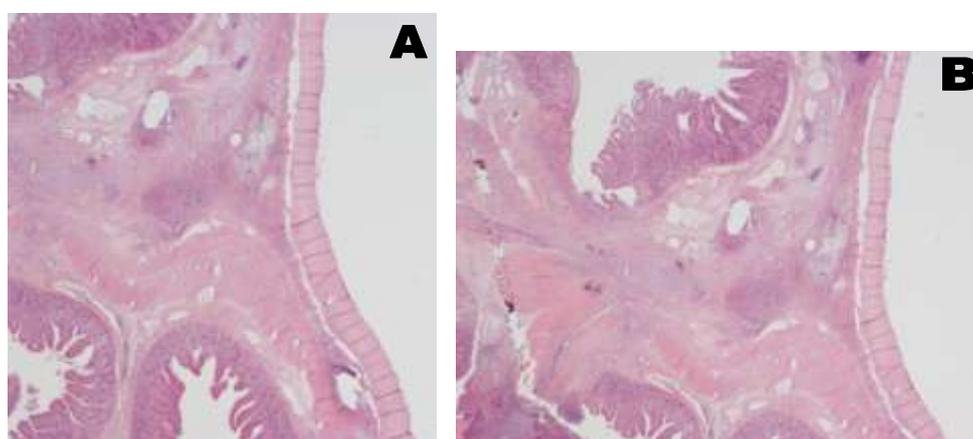


Figura 8: Sezione a tutto spessore della parete intestinale in corrispondenza dell'anastomosi rivestita dalla protesi nel gruppo con perforazione (Gruppo 4). A 96h, si rileva la protesi integra (A, B), inizialmente infiltrata ai bordi. Non si rilevano alterazioni a carico della sierosa.

La protesi è stata rapidamente infiltrata dalle cellule infiammatorie, specie granulociti, che sono stati rilevabili fino al 30° giorno post-anastomosi. Al 90°, erano rilevabili a stento solo piccoli frammenti di protesi, circondati da macrofagi e linfociti (Tab. 4). Mentre la superficie della mucosa è andata incontro a una rapida guarigione, la sierosa è divenuta liscia solo dopo il 30° dall'apposizione della protesi (Tab. 4).

Tabella 4: Caratteristiche istologiche nei gruppi 2 e 4.

	48h	7 gg	14 gg	30gg	90 gg
Flogosi	++	+++	+++	++	-
Fibrosi	-	-	-	+	+
Infiltrazione protesi	-	+	++	+	-
Mucosa	ulcera	erosa	integra	integra	integra
Sierosa	integra	infiltrata	infiltrata	liscia	liscia

Gruppo 3

Nei casi di mal confezionamento dell'anastomosi (senza apposizione di patch), gli animali sono stati sacrificati a 48h dall'intervento chirurgico. Il quadro istologico era rappresentato da flogosi spiccata con estesa infiltrazione di polimorfonucleati, non solo nelle sezioni contenenti la perforazione, ma anche nei segmenti a monte e a valle. Si rilevava un'imponente deposizione di fibrina, con rilievo di sierosa opaca e infiltrata ed edema della parete a tutto spessore.

Valutazioni biochimiche

Attività respiratoria mitocondriale, della NADH-UQ ossido-reduttasi, della Citocromo C ossidasi, della Citrato sintetasi

La respirazione mitocondriale e le attività enzimatiche misurate hanno mostrato un declino una settimana dopo il confezionamento delle anastomosi sia nel colon che nel tenue. Il recupero è stato completo per quanto riguarda la funzione mitocondriale nel colon dopo 4 settimane a non si sono rilevate differenze tra il Gruppo 1 e il Gruppo 2.

Il consumo di ossigeno durante la fosforilazione ossidativa (espresso come "respirazione endogena", Fig. 9 A,B) è minore nelle anastomosi ileali, rispetto a quelle coliche, indicando che il metabolismo energetico a livello del colon è maggiormente di tipo aerobio.

Rispetto al controllo (tessuto integro) si rileva una riduzione del consumo di ossigeno nel tenue con o senza apposizione di protesi che, nei diversi tempi dal confezionamento dell'anastomosi, non si riduce mai più del 50%; ai 90 giorni, inoltre, il valore è simile a quello del controllo (Fig. 9 A,B).

Nel colon, invece, solo i casi con apposizione della protesi, ai 90 giorni presentano valori quasi uguali al controllo, mentre nei casi senza pericardio bovino, si rileva una riduzione critica del consumo di ossigeno (20-30%)(Fig. 9 A,B).

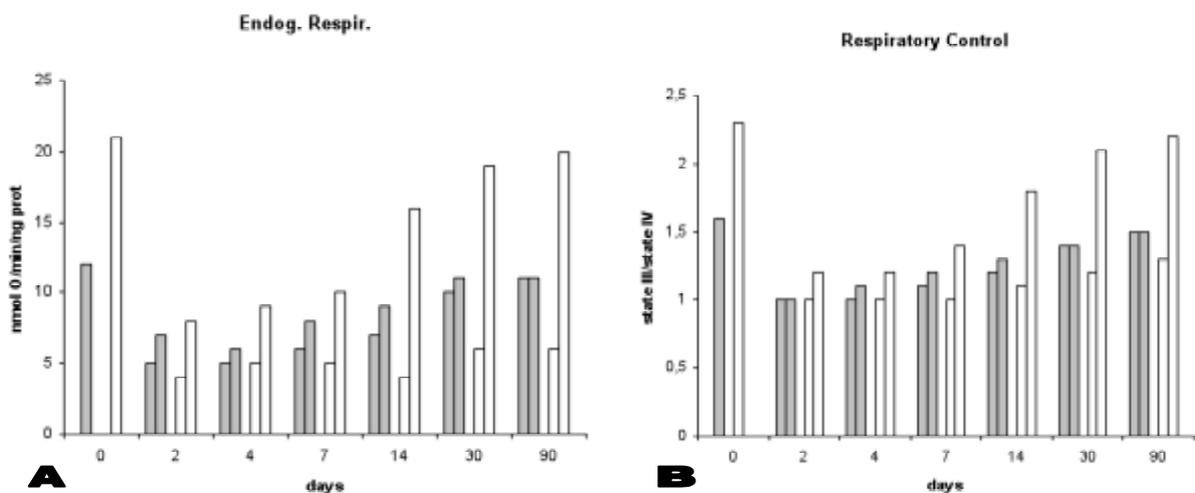


Figura 9: Consumo di ossigeno durante la fosforilazione ossidativa (A) e indice di RCR (B). I colonna grigia: anastomosi ileale senza protesi; II colonna grigia: anastomosi ileale con

protesi; I colonna bianca: anastomosi colica senza protesi; II colonna bianca: anastomosi colica con protesi.

Lo stesso andamento è stato registrato con le misurazioni dell'attività del complesso mitocondriale I, IV e della citrato sintasi del ciclo di Krebs (Fig. 10 A-E).

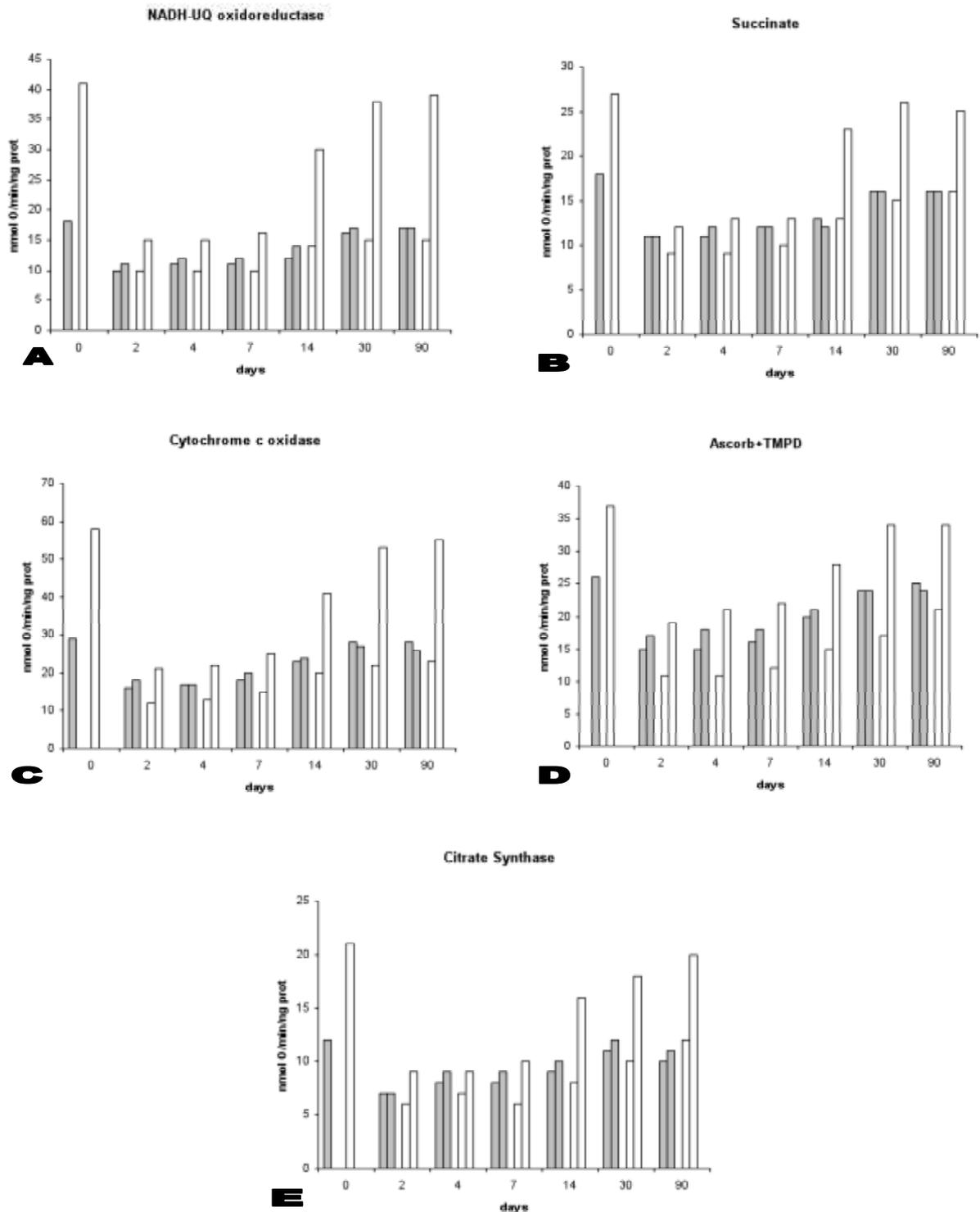


Figura 10: Attività del complesso I (A,B),IV (C,D) e della Citrato sintasi (E): I colonna grigia: anastomosi ileale senza protesi; II colonna grigia: anastomosi ileale con protesi; I colonna bianca: anastomosi colica senza protesi; II colonna bianca: anastomosi colica con protesi.

Misurazioni delle ROS

Lo stress ossidativo è stato misurato attraverso la produzione di perossido di idrogeno (Fig. 11). La produzione dei ROS è stata indotta dalle 72h ad 1 settimana dopo il confezionamento delle anastomosi sia nel colon che nel tenue. I ROS sono aumentati marcatamente specialmente nei casi di anastomosi coliche rivestite di pericardio bovino.

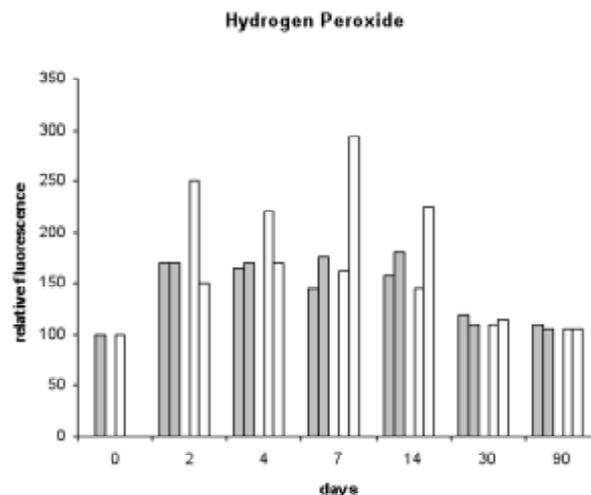


Figura 11: Produzione di H₂O₂: I colonna grigia: anastomosi ileale senza protesi; II colonna grigia: anastomosi ileale con protesi; I colonna bianca: anastomosi colica senza protesi; II colonna bianca: anastomosi colica con protesi.

Studi di tensiometria

Valori basali di contrazione indotti dall'acetilcolina nell'ileo e colon del maiale

La somministrazione *in vitro* di acetilcolina (ACh, 10^{-7} – 10^{-4} M) nei pezzi di ileo e colon di controllo (tessuto sano) ha indotto contrazioni che presentavano una relazione dose-risposta. Le risposte all'acetilcolina sono state leggermente più pronunciate nelle

preparazioni ileali (Fig. 12). Non sono state rilevate, inoltre, differenze nella risposta contrattile al KCl, nè nei preparati ileali, nè colici (Fig. 12).

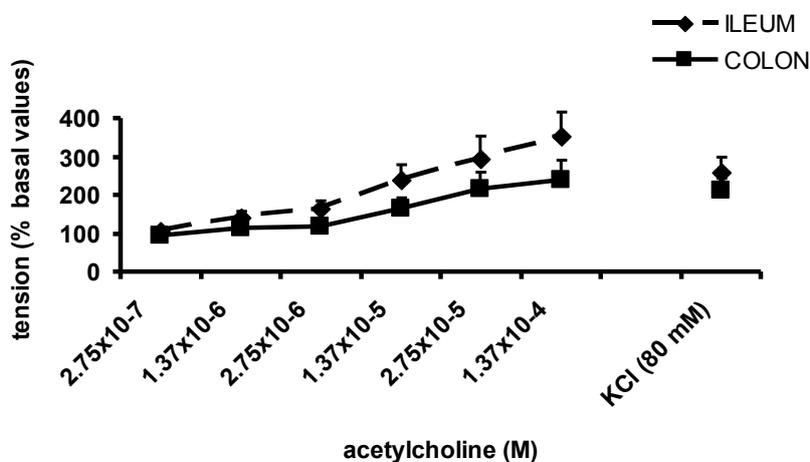


Figura 12: Tono basale dopo somministrazione di acetilcolina e KCl nell'ileo e colon.

Risposta all'acetilcolina nei frammenti di ileo e colon a 48h dal confezionamento dell'anastomosi nel Gruppo 1 (solo anastomosi) e 2 (anastomosi + benderella di pericardio bovino)

A 48h dal confezionamento dell'anastomosi, i risultati sono stati diversi a secondo che si trattasse di ileo o di colon.

Nel colon, i dati mostrano che la risposta contrattile all'aumentare della dose di acetilcolina è significativamente ridotta ($p < 0.05$) nei segmenti sottoposti ad anastomosi senza apposizione della benderella di pericardio bovino (Gruppo 1), mentre, nel gruppo 2 si rilevava una risposta simile a quella del gruppo controllo (Fig. 13 A). La figura 13 B mostra, invece, nell'ileo una contrattilità sovrapponibile a quella controllo. Non si rilevano differenze di contrattilità dopo esposizione al KCl nei 2 tipi di segmento (Fig. 13 A,B).

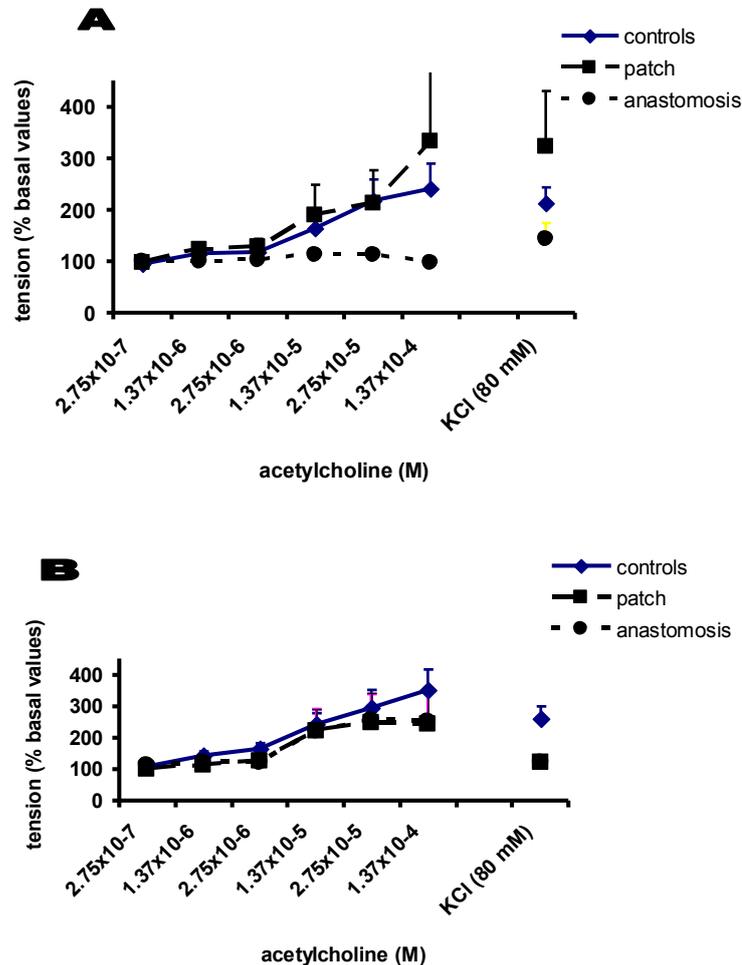


Figura 13: Risposta all'acetilcolina e KCl a 48h nel colon (A) e ileo (B).

Risposta all'acetilcolina nei frammenti di ileo e colon a 7 giorni dal confezionamento dell'anastomosi nel Gruppo 1 e 2

L'apposizione della benderella di pericardio bovino sull'anastomosi colica impedisce l'aumento della contrattilità in risposta all'aumento di acetilcolina a 7 giorni dal confezionamento dell'anastomosi. La curva dose-risposta all'acetilcolina (10^{-7} – 10^{-4} M è significativamente più alta ($p < 0.05$) rispetto al controllo nei segmenti del gruppo 1, mentre il gruppo 2 non mostra differenze rispetto al controllo (Fig. 14 A).

Nell'ileo, poi, alla somministrazione di tale agente, la contrattilità risulta ridotta ($p < 0.05$) nel gruppo 2, mentre i segmenti del gruppo 1 reagiscono in maniera simile al

controllo (Fig. 14 B). Nessuna variazione di risposta si aggiunge alla somministrazione di KCl (Fig. 14 A,B).

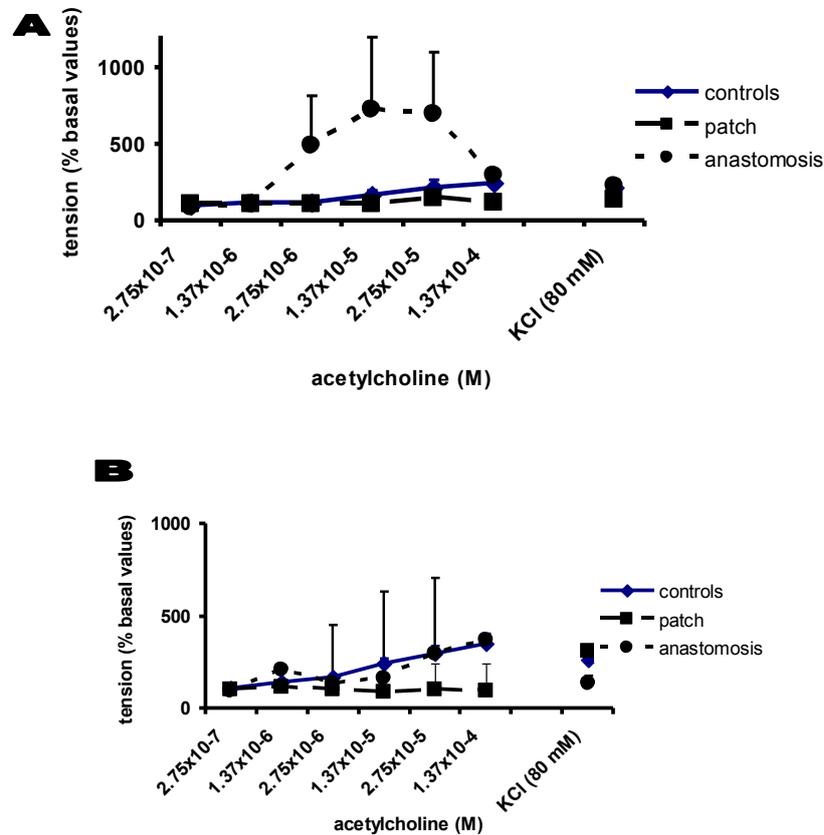


Figura 14: Risposta all'acetilcolina e KCl a 7 gg nel colon (A) e ileo (B).

Risposta all'acetilcolina nei frammenti di ileo e colon a 14 giorni dal confezionamento dell'anastomosi nel Gruppo 1 e 2

I segmenti di colon del gruppo 1 e 2 non mostrano significative differenze rispetto al controllo nella risposta all'acetilcolina e al KCl (Fig. 15 A). I segmenti ileali hanno reagito in modo simile a quelli testati 7 giorni dopo l'intervento chirurgico con una ridotta risposta alla ACh ($p < 0,05$) nei casi di apposizione della benderella di pericardio bovino (Fig. 15 B).

La somministrazione di KCl non ha indotto nessuna modificazione nella contrattilità (Fig. 15 A,B).

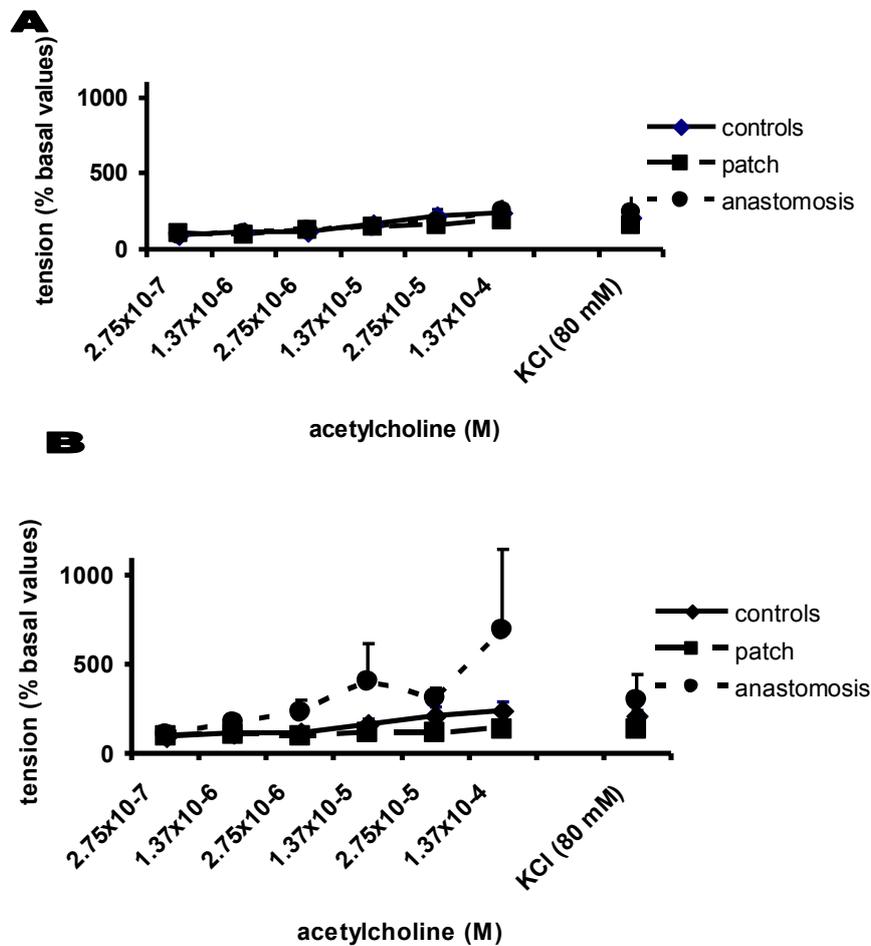


Figura 15: Risposta all'acetilcolina e KCl a 14 gg nel colon (A) e ileo (B).

Risposta all'acetilcolina nei frammenti di ileo e colon a 30 giorni dal confezionamento dell'anastomosi nel Gruppo 1 e 2

I segmenti colici del gruppo 2 hanno mostrato una ridotta risposta all'acetilcolina rispetto al gruppo 1 ($p < 0.05$); questo effetto, comunque, non è stato significativamente differente rispetto al controllo (Fig. 16 A). Nessuna differenza nella risposta rispetto al

controllo si è rilevata nelle preparazioni ileali (Fig. 16 B); come pure, nessuna ulteriore differenza si è riscontrata in risposta al KCl (Fig. 16 A,B).

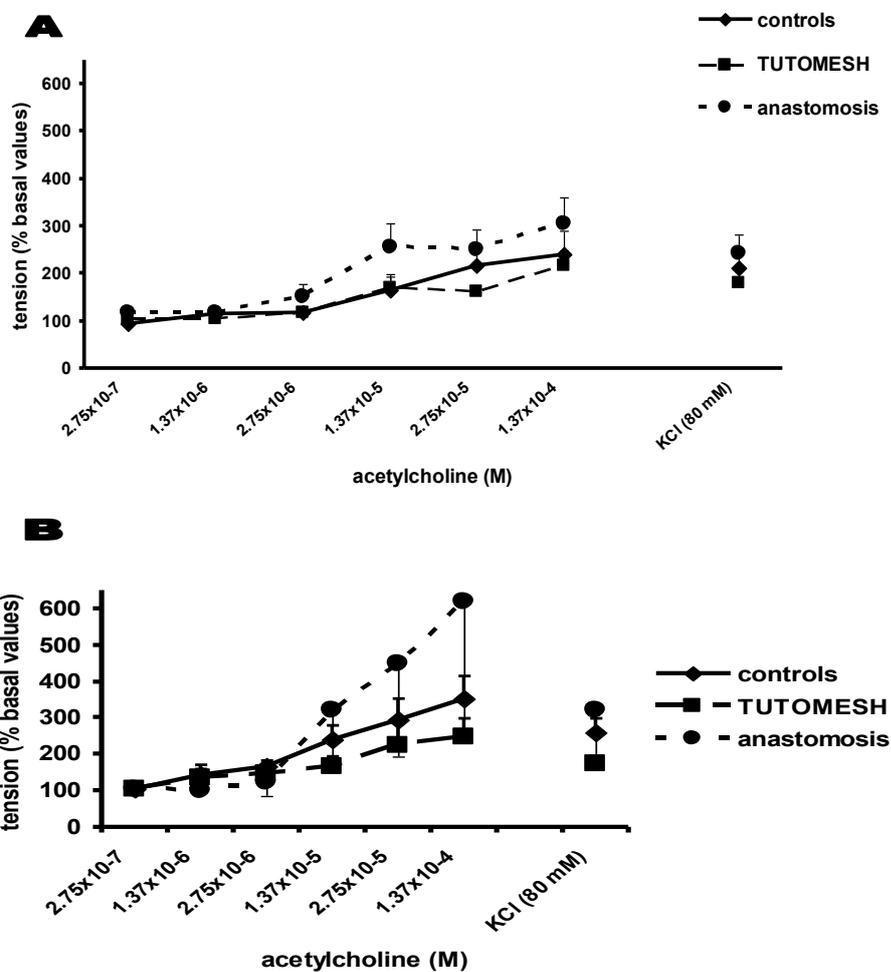


Figura 16: Risposta all'acetilcolina e KCl a 30 gg nel colon (A) e ileo (B).

Risposta all'acetilcolina nei frammenti di ileo e colon a 90 giorni dal confezionamento dell'anastomosi nel Gruppo 1 e 2

La risposta all'acetilcolina o al KCl è stata simile tra i gruppi 1 e 2 nelle preparazioni ileali e coliche, rispettivamente (Fig. 17 A,B).

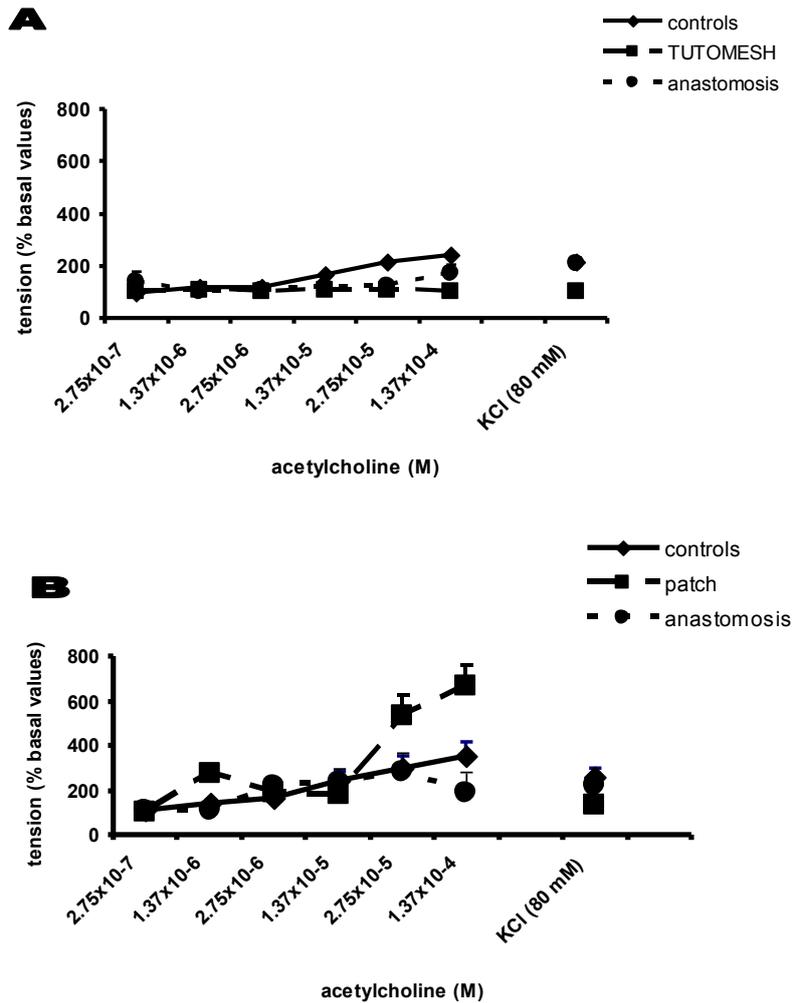


Figura 17: Risposta all'acetilcolina e KCl a 90 gg nel colon (A) e ileo (B).

Misurazioni elettrofisiologiche

Valori basali dei parametri elettrofisiologici nell'ileo e colon del maiale

Nel gruppo controllo (segmenti intestinali integri), i parametri elettrofisiologici rilevati nei segmenti dell'ileo sono stati: $I_{SC} -12.07 \pm 1.34 \mu A/cm^2$, $R_T 131.16 \pm 8.14 \Omega \cdot cm^2$, $V_T 1.06 \pm 0.15 mV$, lume negativo (N= 13). Nel colon, gli stessi parametri sono stati: $I_{SC} -14.67 \pm 1.22 \mu A/cm^2$, $R_T 126.60 \pm 6.92 \Omega \cdot cm^2$, e $V_T 0.59 \pm 0.14 mV$, lume negativo (N= 14).

Effetto dell'anastomosi

Nell'ileo, la presenza di anastomosi nella fase di studio precoce (a 48h, 7 e 14 giorni) è stata associata alla diminuzione dell' I_{SC} (-74.1%, $p < 0.0001$ vs controllo) e all'aumento della R_T (+25.7%, $p < 0.05$ vs controllo) (fig. 18 A-B). Un trend simile (i.e. riduzione del 35%) è stato osservato per V_T .

Nella fase tardiva dello studio (a 30 e 90 giorni), l' I_{SC} è rimasta al di sotto del valore di controllo (-40.9%, $p < 0.05$ vs controllo; fig. 18 A), la R_T è aumentata significativamente a più del 53% ($p < 0.02$ vs controllo; fig. 18 B), e V_T è diminuita al 57.5% ($p < 0.02$ vs controllo).

Nel colon, la presenza dell'anastomosi nella fase precoce è stata associata con una riduzione significativa dell' I_{SC} (-36,4%, $p < 0.05$ vs controllo; fig. 18 C) e una tendenza all'aumento della R_T (fig. 18 D) e alla riduzione della V_T . Nella fase tardiva, I_{SC} è rimasta stabile, mentre R_T e V_T tendevano all'aumento, sebbene le differenze rispetto al controllo non sono state significative.

Effetto dell'apposizione della benderella di pericardio bovino sull'anastomosi

Nelle valutazioni effettuate sui segmenti ileali del gruppo 2, è emersa una riduzione delle variazioni elettrofisiologiche rispetto al gruppo 1 e rispetto ai segmenti integri di controllo: per esempio, l' I_{SC} è rimasto pressoché invariato sia nella fase precoce che tardiva dello studio ($p = NS$ vs controllo; fig. 18 A), mentre R_T (fig. 18 B) e V_T hanno mostrato un minor aumento, comunque non significativo.

Nei segmenti del colon del gruppo 2, allo stesso modo, è stato evidenziato che l'applicazione della benderella di pericardio bovino ha prevenuto la variazioni di I_{SC} , R_T e V_T (fig. 18 C-D).

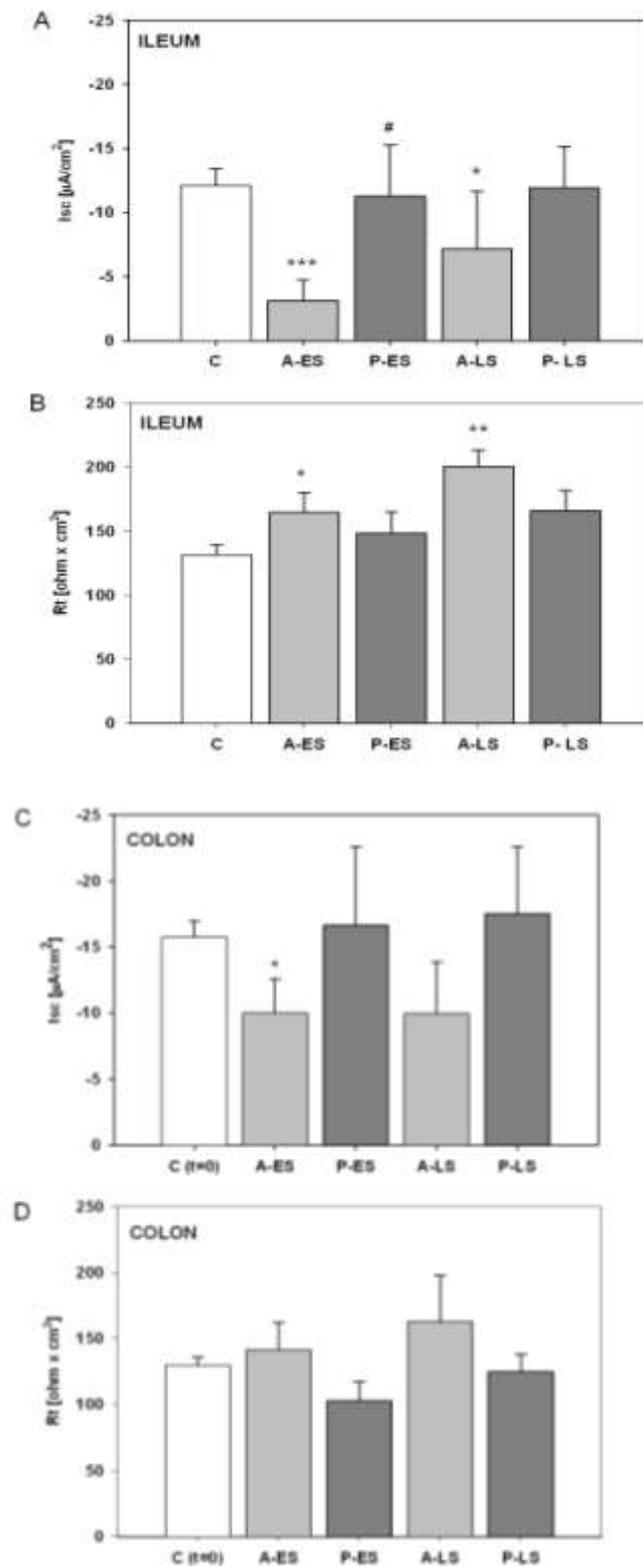


Figura 18: Corrente di corto circuito (I_{sc} , mA/cm^2) e resistenza transepiteliale (R_t , $\text{ohm} \times \text{cm}^2$) nei tratti di colon e ileo asportati.

Abbreviazioni: C, preoperatori; A-ES, postoperatori senza patch e in fase precoce; P-ES, postop. con patch e in fase precoce; A-LS, postop. senza patch e in fase tardiva; P-LS, postop. con patch e in fase tardiva.

Le barre rappresentano la media + S.E.M. delle misurazioni in n=13 (C); 4 (A-ES); 4 (P-ES); 6 (A-LS); 5 (P-LS) di segmenti di ileo e n=14 (C); 4 (A-ES); 4 (P-ES); 6 (A-LS) e 5 (P-LS) di segmenti di colon. La significatività è stata determinata con il Student's t test per dati non-appaiati tra la media dei dati della fase precoce e tardiva vs. control (*p≤0.05; **p≤ 0.002; ***p≤ 0.0001) e per anastomosi con patch vs anastomosi senza patch (#: p≤0.05).

DISCUSSIONE

L'insuccesso di un'anastomosi gastrointestinale si manifesta con la completa deiscenza o con la fistola. Queste complicazioni rappresentano ancor oggi i fattori maggiori di morbilità nella chirurgia addominale.

In passato sono stati condotti molti studi, sia sperimentali che clinici, sulla prevenzione della deiscenza anastomotica. Sono state così investigate numerose tipologie di interventi che miravano a garantire l'adeguata ossigenazione e perfusione della regione peri-anastomotica, a stimolare l'angiogenesi, che contemplavano la somministrazione di fattori di crescita o miravano all'inibizione delle metallo proteinasi.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

Altri modi ideati per prevenire tale complicazione hanno incluso approcci meccanici al problema, con l'utilizzo di colle topiche (di origine umana o animale) e membrane di collagene (principalmente di origine animale), ma che hanno riportato un limitato o nessun miglioramento significativo della guarigione anastomotica.¹⁵²⁻¹⁶²

Talune esperienze hanno contemplato l'utilizzo dell'apposizione della membrana amniotica sulle anastomosi nei ratti e hanno riportato conclusioni positive in relazione alla guarigione della sutura e alla prevenzione della sepsi intraperitoneale,¹⁶³⁻¹⁶⁶ mentre altre

che hanno utilizzato *graft* di dura madre umana e peritoneo libero non hanno sortito sempre gli effetti desiderati.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

In letteratura sono riportati alcuni studi che hanno sperimentato se il rinforzo della sutura con materiali biologici o sintetici prevenga la comparsa del *leakage*. Mentre i reports sull'utilizzo dei materiali sintetici sono sporadici e hanno avuto risultati contrastanti,¹⁷⁰⁻¹⁷³ di pari passo all'introduzione dei materiali biologici nella chirurgia di parete, si sono diffusi gli studi sperimentali che utilizzano tali materiali come protezione delle anastomosi gastrointestinali.

Dalla revisione della letteratura, si evince che dei 4 tipi di protesi biologica al momento in uso, sono presenti studi solo che riguardano l'utilizzo di pericardio bovino,¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ sottomucosa dell'intestino tenue porcino,¹⁷⁸⁻¹⁸¹ derma porcino,^{182,183} mentre non è presente nessun report sull'utilizzo del derma umano di cadavere.

Al di là dei diversi materiali biologici utilizzati come rinforzo delle anastomosi, ad oggi sono riportate in letteratura 2 metodiche di applicazione a seconda che l'anastomosi sia manuale^{178,182} o mediante suturatrice meccanica.^{174,175-177,180,184} Incentrando l'attenzione sugli studi che hanno riguardato l'utilizzo del pericardio bovino a rinforzo delle anastomosi intestinali, in letteratura se ne annoverano solo 4. Si tratta di 3 studi sperimentali (condotti su cani o conigli)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ e di 1 clinico,¹⁷⁷ in cui si sono effettuate anastomosi meccaniche con *stapler* circolari. Gli *strip* di pericardio bovino venivano inseriti negli tra il caricatore e la testina e si otteneva l'interposizione del pericardio bovino tra i 2 strati sieromuscolari giustapposti nella sutura introflettente.

Il nostro studio rientra nel gruppo degli studi in cui l'anastomosi è confezionata *a mano* in monostrato con punti di PDS secondo *Gambiee* ed è, ad oggi, il primo in cui il

rinforzo dell'anastomosi è stato effettuato mediante apposizione di una benderella di pericardio bovino intorno alla sutura.

Tenendo in considerazione le fasi di guarigione delle anastomosi, il nostro protocollo ha contemplato l'esecuzione delle seconde laparotomie per ogni animale dei gruppi nella fase precoce (tra le 48 h e i 14 giorni) e nella fase tardiva (dopo 30 e 90 giorni) dopo il confezionamento delle anastomosi.

Gli studi presenti in letteratura, invece, hanno analizzato la risposta precoce dell'anastomosi alla interposizione di pericardio bovino nella sutura, conducendo gli esperimenti sugli animali a poche ore dopo il confezionamento dell'anastomosi,^{174,176} mentre solo *Hagerman et al.*¹⁷⁵ ha effettuato i controlli anche nella fase tardiva della guarigione della sutura. Lo studio clinico, invece, ha elaborato i dati sull'*outcome* finale dei pazienti.¹⁷⁷

La nostra evidenza intraoperatoria durante la seconda laparotomia, a conferma dei quadri clinici degli animali, è stata quella di assenza di alterazioni macroscopiche viscerali e peritoneali di tipo patologico (ascessi, stenosi, aderenze, occlusione, perforazione) sia nel gruppo controllo (anastomosi tradizionale), sia nel gruppo in cui si era apposta la benderella di pericardio bovino a rinforzo dell'anastomosi.

Il dato più importante è che il quadro di assenza di alterazioni macroscopiche, né tantomeno di peritonite, si rilevava anche nel gruppo 4 (anastomosi con rinforzo e con perforazione iatrogena).

Macroscopicamente, l'entità della guarigione delle suddette anastomosi rispecchiava quelle delle fasi precoce e tardiva di appartenenza; come anche il quadro di peritonite che si rilevava negli animali con perforazione iatrogena e senza rinforzo dell'anastomosi (gruppo 3).

Istologicamente, queste evidenze corrispondevano ai quadri peculiari per ogni fase della guarigione dell'anastomosi. Degno di nota è il rilievo che anche nei casi perforazione iatrogena delle anastomosi rivestite dalla protesi, non vi erano microscopicamente segni di peritonite o perforazione, ma solo un prolungamento della fase infiammatoria; la fibrosi successiva è risultata di minore entità rispetto ai casi controllo.

Ai 90 giorni, le protesi apposte erano pressoché completamente degradate, a fronte della completa guarigione della sutura, in ogni gruppo.

Per quanto meno dettagliatamente condotta, negli studi presenti in letteratura, anche in questi si descrive un impatto positivo del pericardio bovino sulla guarigione dell'anastomosi; si tratta comunque di studi che non hanno simulato la condizione della perforazione intestinale e valutato la capacità della protesi a bloccare la peritonite. Tali studi, infatti, hanno tutti mirato a valutare di quanto le anastomosi con interposizione del pericardio bovino miglioravano la loro capacità di resistere agli aumenti delle pressioni endoluminali, e andavano quindi a misurare la "*burst pressure*" rispetto alle anastomosi tradizionali.

Al momento nessuno degli studi presenti in letteratura ha condotto valutazioni biochimiche, tensiometriche ed elettrofisiologiche sulle anastomosi protette dal pericardio bovino. I nostri risultati hanno indicato un miglioramento a tutti i livelli della funzionalità mitocondriale e di ripresa della motilità intestinale nei casi di apposizione della benderella di pericardio bovino.

Nel dettaglio, da un punti di vista biochimico, i risultati indicano che il colon, nella produzione di ATP, usufruisce della respirazione aerobica mitocondriale a differenza del tenue. Questa differenza nel metabolismo aerobico può portare il tenue a una migliore tolleranza allo stress cellulare dopo confezionamento dell'anastomosi; tale maggiore

resistenza probabilmente si manifesta durante tutte le fasi dell'infiammazione, in cui si verifica il rilascio delle citochine e dei fattori della crescita cellulare. Il metabolismo anaerobico di cui è capace, permette all'intestino tenue di sopportare meglio le procedure chirurgiche, mentre il metabolismo prettamente aerobico del colon può condurlo alla sofferenza cellulare, nei casi di ridotta disponibilità di ossigeno. Queste differenze possono spiegare il pieno recupero biochimico dell'intestino tenue rispetto al colon, e che quindi lo stress chirurgico appaia essere meglio tollerato dal tenue, con o senza protesi biologica sulla rima anastomotica.

Nello studio, abbiamo misurato lo stress ossidativo attraverso la misurazione della produzione di perossido di idrogeno. Lo stress chirurgico è associato a un incremento della produzione delle ROS (specie reattive dell'ossigeno), che può essere indotta dai mediatori dell'infiammazione (citochine, prostaglandine, ecc...). La produzione delle ROS, nei nostri risultati, appare essere bifasica nel colon in cui non si è apposta la benderella di pericardio bovino, essendo aumentata nelle fasi precoci e ridotta nelle fasi tardive della guarigione. E' risaputo che quando precoce, la generazione delle ROS è da ritenersi deleteria per il processo rigenerativo.

L'andamento della produzione delle ROS nel colon con anastomosi rivestite di pericardio bovino, invece, è inverso, con alti livelli di produzione tardivi. In questo caso, la produzione delle ROS potrebbe indurre la risposta cellulare con il risultato di una migliore guarigione del colon in cui le anastomosi sono rivestite di pericardio bovino.

E' comunque possibile che, senza l'induzione delle ROS, si verifichi solo la reazione di riparazione fibrotica, mentre, quando le ROS sono prodotte in notevole quantità, può essere stimolata la crescita delle cellule muscolari lisce, piuttosto che quella dei fibroblasti, similmente a quanto accade nelle placche aterosclerotiche.¹⁴⁴

Per quanto riguarda le valutazioni tensiometriche, i nostri risultati ci permettono di concludere che l'apposizione del *patch* di pericardio bovino induce una risposta all'acetilcolina simile ai controlli nei segmenti di colon nella fase precoce post-confezionamento di anastomosi (48h, 7,14 gg). L'utilizzo del pericardio bovino, comunque, nella stessa fase precoce (7, 14 gg), sembra ridurre la risposta contrattile dell'ileo. Nelle fasi tardive, le risposte all'acetilcolina sono state sovrapponibili al controllo sia per il colon che per l'ileo in cui si è apposta la benderella.

L'ultima valutazione ha riguardato l'elettrofisiologia dell'ileo e colon. I valori riportati dei parametri elettrofisiologici sono in accordo con quelli riportati sui maiali da altri Autori,^{185,186} anche quando si tengono in considerazione le differenze tessuto-specifiche tra ileo e colon.¹⁸⁶

I nostri risultati suggeriscono che dopo l'atto chirurgico e nei casi di anastomosi non protette, sottili ma importanti variazioni siano osservate sia nel colon che nell'ileo. Un numero di fattori, che includono i cambiamenti indotti dall'infiammazione, dallo stress ossidativo e dalla formazione di tessuto cicatriziale intorno all'anastomosi, possono alterare sia la permeabilità, sia le capacità di trasporto della mucosa.

Dai nostri dati si evince che nell'ileo la presenza del pericardio bovino previene chiaramente le alterazioni conseguenti all'effetto traumatico della chirurgia.

Il colon, invece, sembra comportarsi in maniera leggermente diversa, in quanto le capacità di trasporto sono significativamente ridotte solo durante la fase precoce post-anastomotica, mentre la permeabilità è meno colpita.

Il pericardio bovino, ad ogni buon conto, sembra modulare e contrastare l'effetto traumatico della chirurgia e i nostri risultati suggeriscono che l'applicazione del *patch*

migliori anche la funzionalità della mucosa, ripristinando quasi completamente le proprietà di trasporto.

CONCLUSIONE

Dal nostro studio, si evince che l'utilizzo della benderella di pericardio bovino a rivestimento delle anastomosi intestinali rappresenta una metodica sicura; a tutti i livelli di analisi effettuate è, inoltre, evidenziabile un miglioramento del processo di guarigione delle stesse. Inedito e inaspettato è anche il rilievo istopatologico dell'arresto dello spandimento del contenuto intestinale in cavità addominale nei casi di perforazione iatrogena ileale e colica a carico delle anastomosi rivestite da pericardio bovino, con conseguente prevenzione della peritonite acuta.

I risultati di questo studio sperimentale potrebbero rappresentare la base per l'organizzazione di *trials* clinici controllati multicentrici sull'uomo, confrontando l'*outcome* in pazienti con anastomosi intestinali confezionate con e senza apposizione di *patch* di pericardio bovino. Questi studi potrebbero, inoltre, mirare ad analizzare la ricaduta in termini di costo-beneficio sanitario, verificabile mediante una eventuale diminuzione della morbilità e della mortalità legate alla guarigione dell'anastomosi.

Bibliografia

1. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA. Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery: a systematic review of randomized controlled trials. Sao Paulo Med J. 2002 Sep 2;120(5):132-6.
2. Thiede A, Schubert G, Poser HL, Jostardt L. Technique of rectum anastomoses in rectum resection, a controlled study: instrumental suture versus han suture. Chirurg 1984;55:326-35.
3. McGinn FP, Gartell PC, Clifford PC, Brunton FJ. Staples or suture for colorectal anastomoses: prospective randomized trial. Br J Surg 1985; 72:603-5.
4. Elhaddad A. Anastomoses colorectales: à la main ou à la machine. Chirurg 1990; 78:337-41.
5. West of Scotland and Highland anastomosis study group. Suturing or stapling in gastrointestinal surgery:a prospective randomized study. Br J Surg 1991;78:337-41.
6. Cajozzo M, Compagno G, DiTora P, Spallita SI, Bazan P. Advantages and disadvantages of mechanical vs manual anastomoses in colorectal surgery. Acta Chir Scand 1990;156:167-9.
7. MacRae HM, McLeod RS. Handsewn vs stapled anastomoses in colon and rectal surgery: a meta-analysis. Dis Colon Rectum 1998; 41:180-9.
8. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Clin North Am 1997; 77:549-73.
9. Kuzu MA, Kuzu I, Koksoy C, Alyol FH, Uzal D, Kale IT, Orhan D, Terzi C. Histological evaluation of colonic anastomotic healing in the rat following preoperative 5-fluorouracil, fractionated irradiation, and combined treatment. Int J Colerctal Dis 1998;13:235-240.

10. Portera CA, Love EJ, Memore L, Zhang L, Muller A, Browder W, Williams DL. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg* 1997;63:125-131.
11. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77:575-586.
12. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology* 1987;92:400-405.
13. Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972;51:2009-2023.
14. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery* 2006;26:131-136.
15. Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Erdemli E. Ultrastructural view of colon anastomosis under propolis effect by transmission electron microscopy. *World J Gastroenterol* 2008; 14:4763-4770.
16. Kosmidis C, Efthimiadis C, Anthinidis G, Basdanis G, Apostolidis S, Hytioglou P, Vasiliadou K, Prousalidis J, Fahantidis E. Myofibroblasts and colonic anastomosis healing in Wistar rats. *BMC Surgery* 2011, 11:6.
17. Barbul A: Wound Healing. In *Schwartz's Principles of Surgery*. 8 edition. Edited by: Brunickardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. New York: McGraw-Hill; 2005:223-248.
18. Joyce NC, Haire MF, Palade GE. Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1987; 92:68-81.
19. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-29.

20. Moore R, Carlson S, Madara JL. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol* 1989; 257 (Gastrointest Liver Physiol 20): G274-G283.
21. Racine-Samson L, Rockey DC, Bissel DM. The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J Biol Chem* 1997;272:30911-30917.
22. Rugger-Brandle E, Gabbiani G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic processes. *Top Clin Nurs* 1986;8:361-392.
23. Tomasek JJ, Haaksma CJ, Eddy RJ, Vaughan MB. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *Anat Rec* 1992;32:359-368.
24. D'Amore PA. Capillary growth: a two-cell system. *Semin Cancer Biol* 1992; 3:49-56.
25. Saunders KB, D'Amore PA. An in vitro model for cell-cell interactions. *Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28:521-528.
26. Hunt TK. Wound Healing. In *current Surgical Diagnosis & Treatment*. 12 edition. Edited by: Doherty GM. New York; McGraw-Hill; 2006:75-88.
27. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Collagen metabolism in small intestinal anastomoses. *Am J Surg* 1987;154:288-291.
28. Jönsson K, Jiborn H, Zederfeldt B; Comparison of healing in the left colon and ileum. *Acta Chir Scand* 1985;151:537-541.
29. Müller-Höcker J: Cytochrome e oxidase deficient cardiomyocytes in human heart: an age related phenomenon. *Am J Pathol* 1989;134:1167-1173.
30. Boffoli D, Scacco S, Veragari R, Santacroce G, Solarino G, Papa S: Decline with age of respiratory chain activities in human skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226:73-82.

31. Testini M, Scacco S, Loiotila L, Papa F, Vergari R, Regina G, Nicolardi V, Paccione F. Comparison of oxidative phosphorylation in the anastomosis of the small and large bowel. An experimental study in the rabbit. *Eur Surg Res* 1998;30:1-7.
32. Martens MFWC, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: difference between small and large bowel. *Gut* 1991;32:1482-1487.
33. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *Am J Surg* 1980;139:398-405.
34. Hesp WLEM, Hendriks Th, Schillings PHM, Lubbers EJC, de Boer HHM. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Br J Exp Pathol* 1985;66:511-8.
35. Graham MF, Drucker D, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology* 1987;92:400-405
36. Perr HH, Graham MF, Diegelmann RF, Downs PN. Cyclic nucleotides regulate collagen production by human intestinal smooth muscle cell. *Gastroenterology* 1989;96:1521-8.
37. Ross R, Browen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]* 1990;327:155-69.
38. Munscher C, Muller-Hocker J, Kadenback B. Human aging is associated with various point mutations in tRNA genes of mitochondrial DNA. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993;374:1099-1104.
39. Testini M, Portincasa P, Scacco S, Piccinni G, Minerva F, Lissidini G, Papa F, Loiotila L, Bonomo GM, Palasciano G. Contractility in vitro and mitochondrial response in small and large rabbit bowel after anastomosis. *World J Surg* 2002; 26:493-498.

40. Testini M, Piccinni G. The role of interleukin-6 in healing of intestinale anastomoses. (Letter) *World J Surg* 1999; 23:1315-1316.
41. Telem D, Chin E, Nguyen S, Divino CM. Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery. A case-control study. *Arch Surg* 2010;145:371-375.
42. Hyman N, Manchester T, Osler T, Burns B, Cataldo P. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg* 2007;245:254-258.
43. Byrn JC, Schlager A, Divino CM, Weber KJ, Baril D, Aufses AH Jr. The management of 38 anastomotic leaks after 1,684 intestinal resections. *Dis Colon Rectum* 2006; 49:1346-1353.
44. Jex RK, van Heerden JA, Wolff BG, Ready RL, Ilstrup DM. Gastrointestinal anastomosis: factors affecting early complication. *Ann Surg* 1987;206:138-141.
45. Varma JS, Chan AC, Li MK, Li AK. Low anterior resection of the rectum using double stapling technique. *Br J Surg* 1990;77:888-890.
46. Zaheer S, Pemberton JH, Farouk R, Dozois RR, Wolff BG, Ilstrup D. Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1998;227:800-811.
47. Branagan G, Finnis D; Wessex Colorectal Cancer Audit Working Group. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1021-1026.
48. Arenal JJ, Benito C, Concejo MP, Ortega E. Colorectal resection and primary anastomosis in patients aged 70 and older: a prospective study. *Eur J Surg* 1999;165:593-597.
49. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg* 1973;177:513-518.

50. Pickleman J, Watson W, Cunningham J, Fisher SG, Gamelli R. The failed gastrointestinal anastomosis: an inevitable catastrophe? *J Am Coll Surg* 1999; 188:473-482.
51. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005;92:1150-1154.
52. Hermanek P, Hermanek PJ. Role of surgeon as a variable in treatment of rectal cancer. *Semin Surg Oncol* 2000;19:329-335.
53. Bell SW, Walker KG, Rickard MJ, et al. Anastomotic leakage after curative anterior resection results in a higher prevalence of local recurrence. *Br J Surg* 2003; 90:1261-1266.
54. Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. *J Am Coll Surg* 2006;202:439-444.
55. Matthiessen P, Hallböök O, Rutegaard J, Simert G, Sjødahl R. Defunctioning stoma reduces symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection of the rectum for cancer: a randomized multicenter trial. *Ann Surg* 2007;246: 207-214.
56. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic risk factors, diagnosis and treatment *J Am Coll Surg* 2009;208:269-278.
57. Millan M, Garcia-Granero E, Flor B, García-Botello S, Lledo S. Early prediction of anastomotic leak in colorectal cancer surgery by intramucosal pH. *Dis Colon Rectum* 2006;49:595–601.
58. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998;85:355–358.

59. Law WL, Chu KW, Ho JW, Chan CW. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg* 2000;179:92–96.
60. Sorensen LT, Jorgensen T, Kirkeby LT, Skovdal J, Vennits B, Wille-Jørgensen P. Smoking and alcohol abuse are major risk factors for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Br J Surg* 1999;86:927–931.
61. Morgenstern L, Yamakawa T, Ben-Shoshan M, Lippman H. Anastomotic leakage after low colonic anastomosis. Clinical and experimental aspects. *Am J Surg* 1972;123:104-109.
62. Irvin TT, Hunt TK. Effect of malnutrition on colonic healing. *Ann Surg* 1974;180:765-772.
63. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985; 72:606-609.
64. Golub R, Golub RW, Cantu R Jr, Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg* 1997;184:364-372.
65. Mäkelä JT, Kiviniemi H, Laitinen S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:653-660.
66. The Veterans Affairs Total Parenteral Nutrition Cooperative Study Group. Perioperative total parenteral nutrition in surgical patients. *N Engl J Med* 1991; 325:525-532.
67. Akbarshahi H, Andersson B, Norde'n M, Andersson R. Perioperative nutrition in elective gastrointestinal surgery—potential for improvement? *Dig Surg* 2008; 25:165-174.
68. Heyland DK, Montalvo M, MacDonald S, Keefe L, Su XY, Drover JW. Total parenteral nutrition in the surgical patient: a meta-analysis. *Can J Surg* 2001; 44:102-111.

69. Williams LA, Sagar PM, Finan PJ, Burke D. The outcome of loop ileostomy closure: a prospective study. *Colorectal Dis* 2008;10:460-464.
70. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg* 2006;76:579-585.
71. Testini M, Miniello S, Piccinni G, Di Venere B, Lissidini G, Esposito E, Bonomo GM. Correlation between chronic obstructive bronchial disease and colonic anastomosis dehiscence in the elderly. *Ann Ital Chir* 2003;74:247-50.
72. Kawasaki Y, Khishi F, Yamamoto H, Miyamoto K: Relation of oxygen delivery, mixed venous oxygenation and pulmonary hemodynamics to prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1983;308:1045-49.
73. Dantzker DR. Adequacy of tissue oxygenation. *Crit Care Med* 1993; 21: S40-S43.
74. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Intraoperative tissue oximetry in the human gastrointestinal tract. *Am J Surg* 1990; 159:314-9.
75. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985;72:606-9.
76. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1987;30:867-71.
77. Kirk D, Irvin TT. The role of oxygen therapy in the healing of experimental skin wounds and colonic anastomosis. *Br J Surg* 1977; 64:100-3.
78. Kimberger O, Fleischmann E, Brandt S, Kugener A, Kabon B, Hildebrand L, Krejci V, Kurz A. Supplemental oxygen, but not supplemental crystalloid fluid increases tissue oxygen tension in healthy and anastomotic colon in pigs. *Anesthetic Analg* 2007;105:773-9.

79. Foster ME, Laycock JR, Silver IA, Leaper DJ. Hypovolaemia and healing in colonic anastomoses. *Br J Surg* 1985;72:831-4.
80. Stephen FO, Hunt TK. Effect of changes in inspired oxygen and carbon dioxide tensions on wound tensile strength: an experimental study. *Ann.Surg* 1971;173: 515-9.
81. Heuman R, Boeryd B, Bolin T, Sjö Dahl R. The influence of disease at the margin of resection on the outcome of Crohn's disease. *Br J Surg.* 1983; 70(9): 519-521.
82. McLeod RS. Resection margins and recurrent Crohn's disease. *Hepatogastroenterology* 1990;37:63-66.
83. Iancu C, Mocan LC, Todea-Iancu D, Mocan T, Acalovschi I, Ionescu D, Zaharie FV, Osian G, Puia CI, Muntean V. Host-related predictive factors for anastomotic leakage following large bowel resections for colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis* 2008;17:299-303.
84. Foster RS Jr, Costanza C, Foster J, et al. Adverse relationship between blood transfusions and survival after colectomy for colon cancer. *Cancer* 1985; 55:1195-1201.
85. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. 1. The healing process and sutured anastomoses - a review. *BrJ Surg* 1983;70:61-3.
86. Biondo S, Pare's D, Kreisler E, et al. Anastomotic dehiscence after resection and primary anastomosis in left-sided colonic emergencies. *Dis Colon Rectum.* 2005; 48:2272-2280.
87. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC, et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1,014 patients. *J Am Coll Surg.* 1997;185:105-113.

88. Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2050-2059.
89. Docherty JG, McGregor JR, Akyol AM, Murray GD, Galloway DJ; West of Scotland and Highland Anastomosis Study Group. Comparison of manually constructed and stapled anastomoses in colorectal surgery. *Ann Surg.* 1995;221:176-184.
90. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA. Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; (3):CD003144.
91. Patankar SK, Larach SW, Ferrara A, et al. Prospective comparison of laparoscopic vs. open resections for colorectal adenocarcinoma over a ten-year period. *Dis Colon Rectum.* 2003;46:601-611.
92. Beard JD, Nicholson ML, Sayers RD, Lloyd D, Everson NW. Intraoperative air testing of colorectal anastomoses: a prospective, randomized trial. *Br J Surg.* 1990;77:1095-1097.
93. Mudge M, Hughes LE. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. *Br J Surg* 1985;72:70-1.
94. Lewis RT, Wiegand FM. Natural history of vertical abdominal parietal closure: Prolene versus Dexon. *Can J Surg* 1989;32:196-200.
95. Sugerman HJ, Kellum JM JR, Reines HD, Demaria EJ, Newsome HH, Lowry JW. Greater risk of incisional hernia with morbidly obese than steroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh. *Am J Surg* 1996;171:80-4.
96. Read RC, Yoder G. Recent trends in the management of incisional herniation. *Arch Surg* 1989;124:485-8.
97. Manninen MJ, Lavonius M, Perhoniemi VJ. Results of incisional hernia repair: a retrospective study of 172 unselected hernioplasties. *Eur J Surg* 1991;157:29-31.

98. Uscher FC. Hernia repair with marlex mesh. *Arch Surg* 1962; 84:325–8.
99. Paul A, Korenkov M, Peters S, Kohler L, Fischer S, Troidl H. Unacceptable results of the Mayo procedure for repair of abdominal incisional hernias. *Eur J Surg* 1998;164:361-7.
100. Anthony T, Bergen PC, Kim LT, et al. Factors affecting recurrence following incisional herniorrhaphy. *World J Surg* 2000;24:95-101.
101. Van Der Linden FTPM, Van Vroonhoven TJMV. Long-term results after surgical correction of incisional hernia. *Neth J Surg* 1988;40:127-9.
102. Gaertner W, Bonsack ME, Delaney JP. Experimental evaluation of four biologic Prostheses for ventral hernia repair. *J Gastrointest Surg* 2007;12:75-85.
103. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993, 260:920-6.
104. Hiles M, Hodde J. Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial. *Int Urogynecol J* 2006;17:S39-S43.
105. Hodde J. Extracellular matrix as a bioactive material for soft tissue reconstruction. *ANZ J Surg* 2006;76:1096-100.
106. Parker DM, Armstrong PJ, Frizzi JD, North JH. Porcine dermal collagen [Permacol] for abdominal wall reconstruction. *Curr Surg* 63:255-258.
107. Ma SZ, Li XH, Hu J. Acellular extracellular matrix for inguinal hernia repair. *Hernia* 2006; 10:229-231.
108. Buinewicz B, Rosen B. Acellular cadaveric dermis [AlloDerm]: a new alternative for abdominal hernia repair. *Ann Plast Surg* 2004;52:188-194.
109. Espinosa-de-los-Monteros A, de la Torre JI, Marrero I, Andrades P, Davis MR, Vásconez LO. Utilization of human cadaveric acellular dermis for abdominal hernia reconstruction. *Ann Plast Surg* 2007;58(3):264-7.

110. Lipman J, Medalie D, Rosen MJ. Staged repair of massive incisional hernias with loss of abdominal domain: a novel approach. *Am J Surg* 2008;195(1):84-8.
111. Zhang J, Wang GY, Xiao YP, Fan LY, Wang Q. The biomechanical behavior and host matrix acellular grafts in a rat abdominal defect model. *Biomaterials*. 2011;32:7086-95.
112. Zhou HY, Zhang J, Yan RL, Wang Q, Fan LY, Zhang Q, Wang WJ, Hu ZQ. Improving the antibacterial property of porcine small intestinal submucosa by nano-silver supplementation: a promising biological material to address the need for contaminated defect repair. *Ann Surg*. 2011;253:1033-41.
113. Luo JC, Chen W, Chen XH, Qin TW, Huang YC, Xie HQ, Li XQ, Qian ZY, Yang ZM. A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS). *Biomaterials*. 2011 Jan;32(3):706-13. Epub 2010 Oct 8.
114. Helton WS, Fisichella PM, Berger R, Horgan S, Espat NJ, Abcarian H. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia. *Arch Surg*. 2005 Jun;140(6):549-60.
115. Shaikh FM, Kennedy TE, Kavanagh EG, Grace PA. Initial experience of double-layer tension free reconstruction of abdominal wall defects with porcine acellular dermal collagen implant and polypropylene mesh. *Ir J Med Sci*. 2011 Oct 27.
116. Gentile P, Colicchia GM, Nicoli F, Cervelli G, Curcio CB, Brinci L, Cervelli V. Complex Abdominal Wall Repair Using a Porcine Dermal Matrix. *Surg Innov* 2011 Oct 16.
117. Ma S, Wang X, Dong L, Li Y, Zhou M, Zhao Y, Li B. Porcine acellular dermal matrix for repair of abdominal wall defects in rabbit model. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011;25:884-8.
118. Liu Z, Tang R, Zhou Z, Song Z, Wang H, Gu Y. Comparison of two porcine-derived materials for repairing abdominal wall defects in rats. *PLoS One* 2011;6:e20520.

119. Campbell KT, Burns NK, Rios CN, Mathur AB, Butler CE. Human versus non-cross-linked porcine acellular dermal matrix used for ventral hernia repair: comparison of in vivo fibrovascular remodeling and mechanical repair strength. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:2321-32.
120. Ngo MD, Aberman HM, Hawes ML, Choi B, Gertzman AA. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in an in vivo model for incisional hernia repair. *Cell Tissue Bank* 2011;12:135-45.
121. Zhong T, Janis JE, Ahmad J, Hofer SO. Outcomes after abdominal wall reconstruction using acellular dermal matrix: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011 May 28.
122. Brewer MB, Rada EM, Milburn ML, Goldberg NH, Singh DP, Cooper M, Silverman RP. Human acellular dermal matrix for ventral hernia repair reduces morbidity in transplant patients. *Hernia* 2011 Apr;15:141-5.
123. Momoh AO, Kamat AM, Butler CE. Reconstruction of the pelvic floor with human acellular dermal matrix and omental flap following anterior pelvic exenteration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:2185-7.
124. Eberli D, Rodriguez S, Atala A, Yoo JJ. In vivo evaluation of acellular human dermis for abdominal wall repair. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1527-38.
125. Lee EI, Chike-Obi CJ, Gonzalez P, Garza R, Leong M, Subramanian A, Bullocks J, Awad SS. Abdominal wall repair using human acellular dermal matrix: a follow-up study. *Am J Surg* 2009;198:650-7.
126. Zardo P, Zhang R, Wiegmann B, Haverich A, Fischer S. Biological materials for diaphragmatic repair: initial experiences with the PeriGuard Repair Patch®. *Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59:40-4.

127. Limpert JN, Desai AR, Kumpf AL, Fallucco MA, Aridge DL. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium. *Am J Surg* 2009;198:e60-5.
128. Szerafin T, Leny A, Palotás L, Veres L, Homolay A, Papp C. Abdominal hernia repair with No-React treated bovine pericardial patch. *Magy Seb* 2008;61 Suppl:61-5.
129. Kapan S, Kapan M, Goksoy E, Karabicak I, Oktar H. Comparison of PTFE, pericardium bovine and fascia lata for repair of incisional hernia in rat model, experimental study. *Hernia* 2003;7:39-43.
130. James NL, Poole-Warren LA, Schindhelm K, Milthorpe BK, Mitchell RM, Mitchell RE, Howlett CR. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. *Biomaterials* 1991;12:801-9.
131. Decurtins M, Buchmann P. Bovine pericardium - a new graft material for hernial repair (author's transl). *Res Exp Med (Berl)* 1982;180:11-4.
132. Engelsman AF, Van Der Mei HC, Ploegb RJ, Busscher HJ. The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction. *Biomaterials* 2007;28:2314–2327.
133. Luijendijk RW, Hop WCJ, Van Den Tol MP, De Lange DCD, Braaksma MMJ, Ijzermans JNM, et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 2000;343:392–8.
134. Collaboration EH. Mesh compared with non-mesh methods of open groin hernia repair: systematic review of randomized controlled trials. *Br J Surg* 2000;87:854–9.
135. Hesselink VJ, Luijendijk RW, De Wilt JH, Heide R, Jeekel J. An evaluation of risk factors in incisional hernia recurrence. *Surg Gynec Obstet* 1993;176:228–34.
136. Tyrell J, Silberman H, Chandrasoma P, Niland J, Shull J. Absorbable versus permanent mesh in abdominal operations. *Surg Gynec Obstet* 1989;168:227–32.

137. Klinge U, Klosterhalfen B, Muller M, Anurov M, Ottinger AP, Schumpelick V. Influence of polyglactin-coating on functional and morphological parameters of polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1999;20:613–23.
138. Helton WS, Fisichella PM, Berger R, Horgan S, Espot NJ, Abcarian H. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia. *Arch Surg* 2005;140:549–560.
139. Catena F, Ansaloni L, Gazzotti F, Gagliardi S, Di Saverio S, D'alessandro L, Pinna AD. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. *Hernia* 2007;11:57-60.
140. Ansaloni L, Catena F, Gagliardi S, Gazzotti F, D'alessandro L, Pinna AD. Hernia repair with porcine small-intestinal submucosa. *Hernia* 2007; 11:321-6.
141. Ueno T, Pickett LC, De La Fuente SG, Lawson DC, Pappas TN. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects. *J Gastrointest Surg* 2004;8:109–112.
142. Zheng F, Lin Y, Verbeken E, Claerhout F, Fastrez M, De Ridder D, Deprest J. Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1961–1970.
143. Bellón JM. Bioprótesis: indicaciones y utilidad en la reparación de defectos herniarios de la pared abdominal. *Cir Esp* 2008;83:283-9.
144. Bookelman H, Trijbels JM, Sengers RC, et al. Pyruvate oxidation in rat and human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med* 1978;20:395–403.
145. Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 1951;193:265–271.

146. Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, et al. Ageing is associated in females with a decline in the content and activity on the b-c1 complex in skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1996;1315: 66–72.
147. Iuso A, Scacco S, Piccoli C, Bellomo F, Petruzzella V, Trentadue R, Minuto M, Ripoli M, Capitanio N, Zeviani M, Papa S. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):10374-80. Epub 2006 Feb 13.
148. Enestvedt CK, Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: healing in gastrointestinal anastomoses, part II. *Microsurgery* 2006; 26: 137-143.
149. Zacharakis E, Demetriades H, Kanellos D, Sapidis N, Mantzoros I, Kannellos I, Koliakos G, Zaraboukas T, Topouridou K, Betsis D. Contribution of insuline-like growth factor I to the healing of colonic anastomoses in rats. *J Invest Surg* 2007; 20: 76-82.
150. Kiyama T, Onda M, Takunaga A, Efron DT, Barbul A. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on colonic anastomotic healing in rats. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 303-311.
151. Vignali A, Gianotti L, Braga M, radaelli G, Malvezzi L, Di Carlo V. Altered microperfusion at the rectal stump is predictive for rectal anastomotic leak. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 76-82.
152. Pantelis D, Beissel A, Kahl P, Wehner S, Vilz TO, Kalff JC. The effect of sealing with a fixed combination of collagen matrix-bound coagulation factors on the healing of colonic anastomoses in experimental high-risk mice models. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 1039-48.
153. Ozel SK, Kazez A, Akpolat N. Does a fibrin-collagen patch support early anastomotic healing in the colon? An experimental study. *Tech Coloproctol* 2006; 10: 233-6.

154. Kannellos I, Mantzoros I, Goulimaris I, Zacharakis E, Zavitsanakis A, Betsis D. Effects of the use of fibrin glue around the colonic anastomosis of the rat. *Tech Coloproctol* 2003; 7: 82-4.
155. Mutter D, Aprahamian M, Tiollier J, Sonzini P, Marescaux J. Evaluation of human collagen biomaterials on the healing of colonic anastomoses in dogs. *Eur J Surg* 1997; 163: 287-95.
156. van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, Jeekel H. Transient protection of incomplete colonic anastomoses with fibrin sealant: an experimental study in the rat. *J Surg Res* 1993; 55: 256-60.
157. van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, van der Ingh HF, Jeekel H. Healing of ischemic colonic anastomosis: fibrin sealant does not improve wound healing. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 884-91.
158. Havlicek K, Vlcek B. Reinforcement anastomoses in the small intestine with fibrin glue (experimental study). *Rozhl Chir* 1992; 71: 314-9.
159. Rendano F, Coco G, Quarto G, Rinaldo M, Castellitto D, Sarno A. Experimental evaluation of the reinforcement effect of fibrin glue on intestinal anastomosis with an original in vivo method. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1985; 61: 1335-42.
160. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: an overview. *Am J Surg* 2001; 182: 1s-7s.
161. Mutter D, Aprahamian M, Damge C, Sonzini P, Marescaux J. Biomaterial supports for colonic wall defect healing. An experimental study in the rat. *Biomaterials* 1996; 17: 1411-1415.

162. Schreinemacher MH, Bloeman JG, van der Heijden SJ, Gijbels MJ, Dejong CH, Bouvy ND. Collagen fleeces do not improve colonic anastomotic strength but increase bowel obstructions in an experimental rat model. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 729-35.
163. Uludag M, Citgez B, Ozkaya O, Yectin G, Ozcan O, Polat N, Isgor A. Effects of the amniotic membrane on healing of colonic anastomoses in experimental left-sided colonic obstruction. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395:535-43.
164. Uludag M, Citgez B, Ozkaya O, Yectin G, Ozcan O, Polat N, Isgor A. Effects of the amniotic membrane on the healing of primary colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of secondary peritonitis in rats. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 559-67.
165. Uludag M, Citgez B, Ozkaya O, Yectin G, Ozcan O, Polat N, Isgor A. Effects of the amniotic membrane on the healing of normal and high-risk colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:809-17.
166. Uludag M, Ozdili K, Citgez B, Yectin G, Ipcioglu OM, Ozcan O, Polat N, Kartal A, Torun P, Isgor A. Covering the colon anastomoses with amniotic membrane prevents the negative effects of early intraperitoneal 5-FU administration on anastomotic healing. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 223-32.
167. Perju D, tarcoveanu E, Lupascu C. Comparative experimental study of left colonic anastomoses in intestinal obstruction; the value of anastomoses protection with free peritoneal graft. *Rev Med Chir Soc med nat Iasi* 2005; 109:781-6. ù
168. Erylmaz R, Samuk M, Tortum OB, Akcakaya A, Sahim M, Goksel S. The role of dura madre and free peritoneal graft in the reinforcement of colon anastomosis. *J Invest Surg* 2007; 20: 15-21.

169. Dilek ON, Bakir B, Dilek FH, Demirel H, Yigit MF. Protection of intestinal anastomoses in septic environment with peritoneal graft and polyglycolic acid mesh: an experimental study. *Acta Chir Belg* 1996; 96: 261-5.
170. Portillo G, Franklin Me Jr. Clinical results using bioadsorbable staple-line reinforcement for circular stapler in colorectal surgery: a multicenter study. *J Laparoendosc Adv Tech A* 2010; 20:323-7.
171. Gulati SM, Thusoo TK, Kakar A, Ivenger B, Oandey KK. Comparative study of free omental, peritoneal, Dacron velour and Marlex mesh reinforcement of large-bowel anastomosis: and experimental study. *Dis Colon Rectum* 1982; 25:517-21.
172. Henne Bruns D, Kreischer HP, Schmiegelow P, Kremer B. Reinforcement of colon anastomoses with polyglycolic acid mesh: an experimental study. *Eur Surg Res* 1990; 22: 224-30.
173. Dilek ON, Bakir B, Dilek FH, DDemirel H, Yigit MF. Protection of intestinal anastomoses in septic environment with peritoneal graft and polyglycolic acid mesh: an experimental study. *Acta Chir Belg* 1996; 96: 261-5.
174. Gaertner WB, Hagerman GF, Potter MJ, Karulf RE. Experimental evaluation of a bovine pericardium-derived collagen matrix buttress in ileocolic and colon anastomoses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92: 48-54.
175. Hagerman GF, Gaertner WB, Ruth GR, Potter ML, Karulf RE. Bovine pericardium buttress reinforces colorectal anastomoses in a canine model. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1053-60.
176. Arnold W, Shikora SA. A comparison of burst pressure between buttressed versus non-buttressed staple-lines in an animal model. *Obes Surg* 2005; 15: 164-71.

177. Shijora Sa, Kim JJ, Tarnoff ME. Reinforcing gastric staple-lines with bovine pericardial strips may decrease the likelihood of gastric leak after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2003; 13:37-44.
178. Hoepfner J, Crnogorac V, Marjanovic G, Juttner E, Keck T, Weiser HF, Hopt UT. Small intestinal submucosa for reinforcement of colonic anastomosis. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24: 543-50.
179. Hoepfner J, Wassmuth B, Marjanovic G, Timme S, Hopt UT, Keck T. Anastomotic sealing by extracellular matrices (ECM) improve healing of colonic anastomoses in critical early phase. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 977-86.
180. Downey DM, Harre JG, Dolan JP. Increased burst pressure in gastrointestinal staple-lines using reinforcement with a bioprosthetic material. *Obes Surg* 2005; 15: 1379-83.
181. Kini S, Gagner M, de Csepel J, Gentileschi P, Dakin G. A biodegradable membrane from porcine intestinal sub mucosa to reinforce the gastrojejunostomy in laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg* 2001; 11: 469-73.
182. Hoepfner J, Willa K, Timme S, Tittelbach-Helmrich D, Hopt UT, Keck T, Marjanovic G. Reinforcement of colonic anastomoses with a collagenous double-layer matrix extracted from porcine dermis. *Eur Surg Res* 2010; 45:68-76.
183. Eckert MJ, Perry JT, Sohn VY, Keylock JB, Munaretto JA, Beekley AC, Martin MJ. Bioprosthetic repair of complex duodenal injury in a porcine model. *J Trauma* 2009; 66: 103-9.
184. Burugapalli K, Chan JC, Kelly JL, Pandit a. Butressing staple with cholecyst-derived extracellular matrix (CEM) reinforces staple lines in an ex vivo peristaltic inflation model. *Obes Surg* 2008; 18: 1418-23.

185. Moeser AJ, Nighot PK, Engelke KJ, Ueno R, Blikslager AT. Recovery of mucosal barrier function in ischemic porcine ileum and colon is stimulated by a novel agonist of the ClC-2 chloride channel, lubiprostone. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G647-56.
186. Nejdors P, Ekelund M, Jeppsson B, Weström BR. Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:501-7.