

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E1

Settore Scientifico disciplinare: MED/21

**METODICHE DI PRESERVAZIONE DEL POLMONE ISOLATO
PER LO STUDIO ECOGRAFICO: STUDIO SPERIMENTALE**

Presentata da: Dr. Ottorino Perrone

Coordinatore Dottorato

Relatore

Ch. mo Prof. Roberto Di Bartolomeo

Ch. mo Prof. Sandro Mattioli

Esame finale anno 2015

Indice

1. Introduzione.....	4
2. Principi fisici e determinanti biologiche.....	8
3. Metodiche di preservazione del polmone isolato.....	13
4. Lo studio ecografico del polmone.....	15
5. Il modello sperimentale.....	19
6. Conclusioni.....	27
Bibliografia.....	29

1. Introduzione

In natura la dinamica dei sistemi biologici è governata dal principio di conservazione. Il segno tangibile della veridicità di questo principio è la lunga serie di trasformazioni, cui quasi invariabilmente si assiste all'interno dei sistemi cellulari, nel corso del campionamento anatomico, una volta privato l'organo da sottoporre all'indagine scientifica del supporto organico nativo. Queste modificazioni devono essere considerate come il segno di una profonda adattabilità dei sistemi stessi all'ambiente, e più in generale, alla variabilità dell'insulto cui possono essere esposti. I cambiamenti che ogni sistema cellulare è in grado di compiere si risolvono nei complessi rapporti che sottendono la fine regolazione dell'omeostasi. La frequenza con la quale è dato di documentare al ricercatore alcuni di questi passaggi e la capacità di dedurre le possibili correlazioni con il quadro osservato, costituiscono il fondamento di una ricerca empirica rigorosa e di una rigorosa interpretazione del dato statistico. In quest'ottica i fattori di confondimento e le determinanti di ogni eventuale bias nel modello animale rappresentano un ostacolo non facile da superare per la relativa frequenza di fenomeni non sempre di facile inquadramento. Ciò è tanto più vero nel modello macroscopicamente sezionato e nelle linee filogenetiche più prossime all'uomo. Accanto alle considerazioni di carattere generale, attinenti le specie animali e le peculiari forme di costituzione anatomica andrebbero analizzate nel complesso le tecniche che dei tessuti, da queste prelevate, andrebbero messe in opera per una corretta valutazione scientifica dei tessuti. Le metodiche di

preservazione tissutale, adattate allo scopo clinico o sperimentale, debbono riconoscere come ultimo traguardo il mantenimento dell'integrità funzionale a livello morfologico tanto macroscopico quanto molecolare¹. Il ricercatore, dovrebbe inoltre poter garantire che il modello sperimentale, ideato come tale per lo studio fisico o strumentale, possa essere tanto riproducibile nel metodo quanto trasferibile al contesto clinico nei risultati ottenuti. La realizzazione di questi obiettivi, nel modello di polmone isolato da animale, fa capo all'inibizione metabolica, alla prevenzione del danno ischemico secondario, ed in definitiva si pone come traguardo la riduzione, nella portata, di tutti quei fenomeni autocatalitici che si verificano nel dopo l'isolamento autoptico (e, nella fattispecie nel tessuto polmonare). La perdita dell'integrità di questi sistemi corrisponde al danno cellulare, al rigonfiamento idropico ed in ultima analisi, alla morte cellulare. I metodi attraverso cui poter evidenziare l'evoluzione dei meccanismi molecolari implicati sono essenzialmente, almeno in una fase precoce, quelli del saggio enzimatico e della determinazione, per concentrazione, dei prodotti di degradamento cellulare prodotti dalla citolisi, dalla lipolisi e dalla perossidazione lipidica. A questi momenti fisiopatologici è stata rivolta, con enorme interesse scientifico, una considerevole parte della ricerca sperimentale degli ultimi decenni. Un capitolo di grande interesse nella comunità scientifica riguarda la comprensione dei meccanismi che vengono generalmente designati come ischemico-riperfusivi². Nonostante la mole di lavori scientifici sviluppata negli anni e la lunga osservazione prodotta al riguardo, un'esatta determinazione dei fenomeni coinvolti nel danno da ischemia-riperfusion è ancora

lontana dall'essere realizzata³. Il deterioramento del campione anatomico prelevato è dovuto per molta parte alla ridondanza di effetti altrove categorizzabili come negati per i sistemi biologici. La tolleranza del sistema polmonare all'insulto ischemico è definita dal tempo trascorso dal suo allontanamento dal supporto vascolare. L'evoluzione degli eventi che seguono questo particolare attimo della vita cellulare va considerata nel dettaglio. Per comprendere l'imprescindibilità di queste conoscenze basterà qui ricordare che le metodiche di preservazione del polmone isolato nel modello animale comportano, nella realizzazione, una serie di accorgimenti operativi che sotto intendono una particolareggiata analisi dei meccanismi cellulari. Esse, pur essendo relativamente poche nel numero, devono essere condotte attraverso l'utilizzo di soluzioni di condizionamento che evitino il burst metabolico, prevenendo proprio la serie di eventi dannosi cui si è fatto cenno. Nel modello sperimentale respiratorio convivono poi più problematiche legate a questo genere di condizionamento dal momento che non soltanto il supporto vascolare ma anche quello ventilatorio risultano necessari per una corretta preservazione del blocco anatomico. L'integrità del sistema alveolo-capillare si esaurisce con il trascorrere del tempo dando vita a fenomeni di edema e disfunzione endoteliale. Difficile sarà immaginare come lo studio ecografico, in un modello così costituito e tanto fragile dal punto di vista strutturale, possa essere realizzato con un metodo scientifico che sottovaluti questi aspetti peculiari e le necessarie implicazioni scientifiche. Il modello sperimentale che in ultima analisi qui si vuole proporre corrisponde idealmente al sistema costruito tenendo nel dovuto conto tutti questi

fattori. Gli studi di Carrel⁴, primo ad esplorare con tecniche di preservazione i tessuti e gli organi sottoponendoli a perfusione controllata in normotermia, e le conclusioni cui giunse nei primi anni del 900, sono ancora oggi pertinenti. Da allora le tecniche di preservazione sono tecnologicamente migliorate e gli effetti protettivi non soltanto dell'ipotermia ma di numerosi altri parametri (pressione osmotica, pH, ossigenazione, composizione ionica) sono stati definitivamente chiariti⁵⁻⁶. La ricerca scientifica, ideata su modello animale ed esposta di seguito, intende proporre un contributo originale nella individuazione di un sistema ideale di indagine che consenta l'analisi strumentale (ecografica) e raccolga con severo spirito empirico le prove di una sua reale applicabilità nel contesto clinico.

2. Principi fisici e determinanti biologiche

Ogni organo, esposto ad un insulto ischemico protratto nel tempo, rimane vitale per un periodo relativamente breve determinato dall'intervallo trascorso dall'interruzione dal proprio supporto vascolare. Questo intervallo viene generalmente ridotto dalla comparsa di fenomeni autolitici, invariabilmente legati alla separazione dal proprio contesto fisiologico che garantisce, con fine equilibrio, funzionalità ed omeostasi⁷. In modo non dissimile è possibile osservare questa cascata di eventi tanto a distanza dal campionamento nel modello sperimentale tanto negli organi espuntati nella pratica trapiantologica. Nel complesso questi fenomeni sono riconducibili ad un rapido declino delle riserve di ATP all'interno della cellula ed alla ridotta disponibilità di fonti energetiche. Ciò inevitabilmente comporta la redistribuzione all'interno dei sistemi cellulari dei substrati metabolici, una imponente variazione nella composizione elettrolitica, una massiva riduzione del pH e la messa in moto, più in generale, di alcuni processi cellulari come la proteolisi, la lipolisi e la perossidazione lipidica. L'eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), in questa fase, va dunque considerato come la conseguenza naturale di questa cascata di eventi⁸. Alcune osservazioni empiriche, condotte da equipe di ricercatori diverse intorno alla fine del secolo scorso, suggeriscono l'utilità di determinare un limite temporale entro il quale poter ragionevolmente considerare avvenuto il danno ischemico. L'attivazione dei sistemi metabolici e catalitici cui pocanzi si è fatto cenno, considerata per singolo sistema o apparato, azionerebbe in questo particolare

intervallo, quella serie di eventi che pressoché invariabilmente conduce alla morte cellulare. La natura di questi processi è finemente regolata a livello molecolare, attraverso la messa in moto di pathways ben definite sulle quali i sistemi cellulari fanno leva per garantirsi la sopravvivenza in condizioni ambientali non favorevoli. Questo limite, secondo la stima scientifica, sarebbe identificativo del sistema stesso poiché funzione della caratteristica portata vascolare e metabolica⁹. Costituirebbe, in altri termini, l'intervallo massimo di sicurezza entro il quale considerare non ancora avvenuti i processi autolitici propri dell'organo ischemico. La corretta identificazione di questo range temporale consente di verificare la veridicità di alcuni presupposti biologici, secondo i quali il ricondizionamento di un organo, una volta prelevato, non sarebbe ulteriormente realizzabile dopo tale intervallo¹⁰. In virtù di alcune sue caratteristiche peculiari (rete vascolare e capacità venosa tra tutte) e della precipua funzione cui assolve (ematosi) questo limite è, per l'apparato polmonare, ancora oggi, poco definibile. Bando ed i suoi Collaboratori¹¹, analizzando l'outcome di pazienti sottoposti a trapianto polmonare, ha identificato questo intervallo in sei ore. Intorno a questo intervallo temporale cioè, andrebbero collocati tutta quella serie di eventi come la perdita di stabilità dei sistemi di membrana, l'alterazione nella composizione ionica ed il mancato approvvigionamento di fonti energetiche per sistemi mitocondriali nel sistema polmonare¹². Il gruppo di Blades¹³ ha stabilito che la funzione polmonare subisce un rapido decremento dopo trenta minuti dall'induzione ischemica. Borrie¹⁴ considera che il sistema polmonare possa tollerare anche due ore di ischemia. Gli esperimenti di Veith¹⁵ a tale riguardo hanno chiarito come

l'intervallo di tolleranza possa essere convenientemente prolungato attraverso una precoce ventilazione del blocco polmonare. Grazie a questo artificio i danni da ischemia non sono evidenti prima delle 3 ore nella serie di Veith. Il complesso di eventi cui generalmente si fa riferimento con il termine di danno da ischemia è stato oggetto di numerosi studi scientifici e costituisce il presupposto biologico della preservazione nel modello sperimentale¹⁶, tanto respiratorio quanto generale. Risultato, finemente regolato, dell'artificio sperimentale dovrà essere il maggiore grado di garanzia nella prevenzione dal deterioramento biologico prima che l'intervallo temporale di salvaguardia (e peculiare del sistema stesso) si concluda. Garantire di poter ricondizionare l'organo sino allo stadio funzionale nativo. E' questo il traguardo di ogni modello di preservazione clinica o sperimentale. Allo stato attuale esistono sostanzialmente due metodiche di preservazione nel polmone isolato: una prima tecnica prevede l'interruzione del danno ischemico attraverso l'ipotermia controllata (static cold storage), una seconda viene realizzata attraverso la perfusione pulsatile in ipotermia per mezzo di una strumentazione dedicata (hypothermic machine perfusion)¹⁷. Entrambe queste metodiche prevedono l'utilizzo di soluzioni di condizionamento d'organo e la replezione di un adeguato volume cellulare. La strategia di preservazione del polmone isolato in sostanza prevede la somministrazione sul campo di composti farmacologicamente attivi portati in soluzione e come tali somministrati in modo pulsatile o meno all'organo per favorirne l'approvvigionamento in nutrienti¹⁸. Composti chimici pur diversi per composizione e parametri di utilizzo, sono infatti comunemente impiegati nello

studio nel modello animale e su questo vengono preliminarmente testati per essere poi impiegati nella pratica trapiantologica¹⁹⁻²⁰. Accanto alle prime soluzioni di supplementazione elettrolitica, ad elevato tenore potassico, sviluppate grazie al lavoro pionieristico di Collins²¹ (e pertanto definite soluzioni Euro Collins), tutta una serie di altre sostanze chimiche dalle proprietà spiccatamente protettive sono state sviluppate ed impiegate in setting specifici, tanto di analisi su campionamento anatomico quanto nella pratica clinica corrente (è il caso delle soluzioni Ross-Marshall, Bretschneider, Winsconsin, Kyoto). Gli studi di applicabilità di queste soluzioni di perfusione alla pratica trapiantologica sono fiorenti²²⁻²⁶. Il condizionamento sperimentalmente ottenuto nel polmone isolato è caratteristico e peculiare. Esso viene realizzato sfruttando tutte le proprietà fisico-chimiche di restoring della matrice cellulare, salvaguardando le funzioni biologiche della cellula attraverso il mantenimento dell'integrità del bilayer fosfolipidico di membrana, salvaguardando il *milieu* intracellulare²⁷. La prima e più logica considerazione che è opportuno avanzare è quanto il regime ipotermico associato, dimostratosi valido nella preservazione di altri organi, possa essere applicabile all'apparato respiratorio e quanto possa sinergicamente ridurre il danno da ischemia-riperfusion nel sistema polmonare, oggetto di questa trattazione²⁸. Il condizionamento ottenuto attraverso l'induzione di una relativa ipotermia consente di rallentare e talvolta arrestare le reazioni che inevitabilmente conducono all'apoptosi ed alla necrosi²⁹. È questo il motivo per cui a lungo si è inteso considerare come protettivo nella preservazione dal danno d'organo un regime ipotermico moderato^{30,31}. Kayano ha dimostrato nel ratto che la

temperatura ideale per un a corretta preservazione del polmone è intorno ai 10 gradi Celsius³². Nel modello sperimentale animale, in ogni caso questa temperatura viene approssimata al valore di 4°C (temperatura del ghiaccio) per semplificazione del metodo evitando accuratamente di protrarre il tempo di ischemia fredda oltre le otto ore³³. L'analisi stereochimica dei composti biologici dimostra la sottrazione dei costituenti naturalmente presenti nel polmone isolato di maiale al disequilibrio indotto dal danno ischemico-riperfusivo ove si introduca l'applicazione di temperatura controllata.

3. Metodiche di preservazione del polmone isolato

Unico e primo obiettivo di una metodica di preservazione del polmone isolato dovrebbe essere l'adeguata salvaguardia dell'integrità dei sistemi cellulari deputati alla fine regolazione dell'omeostasi nell'organismo³⁴. L'integrità della membrana cellulare, delle complesse funzioni recettoriali, della fine regolazione ionica e dei numerosi sistemi enzimatici gioca un ruolo cruciale nel determinismo del danno d'organo³⁵. A questo proposito è intuitiva la necessità di garantire un certo grado di pervietà al sistema alveolare all'interno del modello animale proposto. La ventilazione protettiva raggiunge questo scopo. Le strategie di ventilazione nel polmone isolato sono paragonabili a quelle messe in moto nel contesto del quadro clinico conosciuto come ARDS e comprendono la stretta osservanza di alcuni parametri ventilatori (TV, Tidal volume = 6-8mL/kg, PEEP, positive end-expiratory pressure=5 cm H₂O, FiO₂, fractional inspired oxygen <0.5)³⁶. Nel contesto delle tecniche di preservazione, attuate per mezzo dell'ipotermia controllata e delle soluzioni di condizionamento cui si è fatto cenno una metodica senza dubbio di grande interesse è costituita dall'EVLP (Ex Vivo Lung Perfusion). La realizzazione di questa metodica nel modello animale (porcino, in particolare) si è dimostrata efficace nell'interruzione del danno ischemico precoce e tardivo. Essa prevede il ricondizionamento normotermico del blocco anatomico, successivamente al prelievo, e la perfusione al banco ex vivo. Del tutto recentemente Noda e suoi Coll³⁷ hanno ottenuto con successo la preservazione del graft nel ratto dimostrando come il tessuto

sottoposto a condizionamento in un modello sperimentale animale (rat EVLP model) mostrasse valori stabili di ossigenazione, di compliance e resistenza vascolare. Questo modello ricalca quello proposto dal gruppo trapiantologico di Toronto e mostra il vantaggio di estendere la quantità di organi (e di tessuto vitale nel modello sperimentale animale) disponibile per il ricondizionamento biologico. Questo modello, cioè, consente di raggiungere con un discreto margine di successo il campionamento da esaminare per l'indagine sperimentale ovvero allargare la quantità di soggetti donatori al trapianto. I ricercatori canadesi e quelli appartenenti al gruppo di Hannover in realtà si sono da sempre dedicati alla ricerca di soluzioni in questo campo³⁸. Il gruppo di Cypel³⁹, in particolare, ha suggerito che attraverso questa metodica di preservazione si possano ottenere il graduale rewarming sino alla normotermia, re-incrementare in flusso vascolare sino ad una portata adeguata al supporto sanguigno (predittivamente calcolata sul parametro di output cardiaco), attuare una ventilazione protettiva e per fondere con soluzione colloidale in modo sicuro. I benefici ottenuti attraverso il ricondizionamento dall'ipotermico sono ascrivibili al rallentamento dei processi cellulari nella cascata apoptotica. Vengono in tal modo scavalcati i passaggi di attivazione delle proteine dello shock termico e l'accensione dei meccanismi che ad esse fanno capo⁴⁰⁻⁴². Queste innovative metodiche possono essere utilizzate nel modello animale. Il gruppo dell'Università di Bologna, nell'ambito di un progetto di ricerca mirato alla definizione di un protocollo "ideale" di trasporto e condizionamento di tessuto animale prelevato da maiale ha messo in opera più volte, nel corso di questi anni, le tecniche pocanzi descritte.

4. Lo studio ecografico del polmone

L'interpretazione del dato strumentale, in particolare di quello ecografico, presuppone l'approfondita conoscenza e la particolareggiata comprensione dei meccanismi fisici che sottendono la trasmissione del fascio ultrasonico all'interno dei tessuti. Le modificazioni della corrente ultrasonica all'interfaccia aria/liquido, che costituisce la barriera naturale del sistema polmonare, rappresentano la sorgente di alcuni artefatti tecnici, i quali, se non adeguatamente riconosciuti, possono essere fonte di errore per l'esaminatore. Il parenchima polmonare, in virtù della propria consistenza e della peculiare struttura esibisce elevati valori di impedenza acustica per cui l'esame ecografico, nel polmone isolato, deve essere inequivocabilmente condotto con attenzione e minuziosità d'esecuzione. L'indagine ecografica è rivolta al precoce riconoscimento di quei fenomeni disatelettasici o talvolta obliterativi dell'immagine stessa che caratterizzano l'alterazione proprio del sistema aria/liquido. Le implicazioni diagnostiche, deducibili dall'analisi seriata del dato strumentale, devono essere correttamente correlate con il substrato patologico (esplorazione per immagini di riferimento) e consentono di ottenere un quadro completo e dettagliato della situazione anatomica in essere. L'ecografia polmonare può essere virtualmente realizzata con ogni apparecchio bidimensionale, con sonde universali (da 3.5 MHz a 5.0 MHz) o dedicate, consente di distinguere aree di consolidazione alveolare sino ad un limite di risoluzione sufficientemente ridotto (comparabilità della metodica ecografica) ed è facilmente implementabile nel setting di ricerca clinica. La

trasferibilità delle evidenze scientifiche al contesto clinico esula dagli scopi di questa trattazione ma sempre più numerose sono le evidenze, nella Letteratura scientifica degli ultimi anni, riguardo all'utilità del supporto ecografico nella pratica chirurgica in particolare nel campo della chirurgia toracica^{43,44}. In questo contesto, una metodica strumentale che consenta con buon margine di affidabilità la localizzazione di un target specifico, risulta indispensabile ai fini della diagnosi e della cura di numerose patologie polmonari. E' qui solo il caso di ricordare come il nodulo polmonare solitario rappresenti ancora oggi una sfida nel trattamento della patologia toracica e che le metodiche di localizzazione con traccianti sensibili non mostrano un margine di sicurezza clinica sufficientemente elevato⁴⁵⁻⁴⁷. Il razionale dello studio condotto dal nostro gruppo, si fonda sull'indicazione all'exeresi chirurgica di noduli polmonari di diametro inferiore al centimetro, ovvero di diametro superiore ma localizzati in aree centrali del polmone. Queste lesioni sono sempre più frequentemente diagnosticate per mezzo di avanzate tecniche di imaging. L'atto chirurgico ha scopo terapeutico quando sia stata posta la diagnosi di neoplasia maligna, diagnostico-terapeutico quando non sia ancora ottenuta la tipizzazione istologica della lesione. La tecnica toracoscopia e quelle minimamente invasive offrono numerosi vantaggi rispetto alle tecniche chirurgiche tradizionali sul piano clinico (migliore outcome) ma presentano il grave limite di non permettere la palpazione diretta del tessuto polmonare e la localizzazione della formazione tumorale quando essa non sia visibile macroscopicamente. Gli ultrasuoni sono stati utilizzati con successo per indirizzare la localizzazione del nodulo polmonare già alla fine degli anni '80. Anche nel modello

animale sono stati sperimentalmente saggiati metodiche di localizzazione del bersaglio patologico⁴⁸. In una recente revisione dei dati presenti nel panorama scientifico riguardo alle metodiche di localizzazione di noduli polmonari subcentimetrici Zaman e Coll.⁴⁹ hanno osservato come la tecnica ultrasonografica, pur essendo strettamente operatore-dipendente, mostri percentuali di sensibilità che si attestano nel range tra il 92.6% ed il 100%. Come in cenno gli studi condotti dal gruppo di Bologna alla fine degli anni '90 hanno messo in evidenza la reale utilità dell'implementazione ecografica al tavolo operatorio. Queste ricerche hanno condotto all'evidenza che lo strumento ecografico e le procedure endosonografiche possono essere di ausilio nel guidare la resezione in VATS⁵⁰. Questo dato è stato successivamente accolto da altri Autori⁵¹. Nel nostro modello animale abbiamo voluto saggiare la reale attendibilità del dato ecografico nel riconoscimento di alcuni bersagli appositamente diversificati per morfologia e contesto spaziale. Abbiamo proceduto ad una diversificazione di massima (in ogni caso sferoidale) del bersaglio per una maggiore comodità all'operatore. E' necessario arguire, come presupposto scientifico, che la diagnostica ecografica, attraverso la precisa localizzazione delle forme primitivamente maligne consente una diagnosi precoce, consenta una corretta stadiazione delle forme tumorali e la cura di molte di queste. Poco opinabile è che la radicalità oncologica delle primitive forme tumorali costituisca in tempi moderni il fattore prognosticamente più importante nella cura del cancro polmonare. Il metodo che segue vuole dimostrare più oltre quanto, una volta raggiunti i limiti di riproducibilità clinica (preservazione tissutale per lo studio strumentale), i mezzi

diagnostici di cui disponiamo siano coerenti con il progetto terapeutico (resezione della forma tumorale). La tecnica clinica applicata allo studio del particolare ecografico nel modello animale, ha reso comprensibile e meglio definito il ruolo delle sonde ecografiche nell'individuazione di forme tumorali suscettibili di exeresi definitiva. Ancora oltre si potrebbe argomentare l'utilizzo di sonde ultrasonografiche ideate per altro scopo (EBUS nella stadiazione del NSCLC) ma perfettamente fruibili in ambito diagnostico "on table demand" per realizzare terapie individualizzate (riconoscimento di pattern istologici specifici, resezioni limitate..).

5. Il modello sperimentale

Grande attenzione è stata profusa da parte del nostro gruppo nella ricerca di una piattaforma ideale di studio che consentisse l'ottimizzazione del supporto ecografico e l'implementazione di questa metodica alle stringenti necessità di analisi nel modello animale. La capillarità con cui l'intervento di prelievo multi organo si è diffusa ha permesso di attingere ad una risorsa scientifica preziosa rappresentata dai numerosi studi sulle metodiche di preservazione clinica nel campo dei trapianti. Cooper ha evidenziato, nei suoi studi proprio sulla biologia del trapianto, come il tipo di animale e lo stesso tipo di intervento che si voglia validare sul blocco debbano essere oggetto di accurata selezione⁵². Al di là della particolare appropriatezza nella scelta della specie animale da sottoporre ad indagine risulta intuitivo il vantaggio ottenuto nella messa in opera di metodiche di preservazione realizzate tempestivamente. L'induzione di una relativa ipotermia ha un fondamento solido nella Letteratura che riguarda l'argomento^{53,54}. I vantaggi di una corretta preservazione del campionamento anatomico sono cruciali ai fini dell'interpretazione del dato ultrasonografico e le modificazioni che intervengono, anche a breve distanza dalla fine dissezione, costituiscono fonte di mal interpretazione del dato patologico e statistico⁵⁵⁻⁵⁶. Esse rappresentano, al contempo, uno degli ostacoli nella corretta individuazione dei meccanismi molecolari intervenuti nel campione ed esse stesse nel complesso il pattern da indagare per meglio comprendere l'evoluzione naturale di questi eventi⁵⁷. La deprivazione dalla maternità vascolare induce all'interno dell'organo e dei tessuti

ad esso afferenti delle modifiche sostanziali⁵⁸. Questa cascata di processi può essere convenientemente arrestata attraverso la messa in atto di alcuni procedimenti dedicati, superselettivi e specifici dell'organo oggetto di studio. Scopo di questa dissertazione è la precisa individuazione di questi atti e la valutazione della loro applicabilità nel modello sperimentale animale. Con queste ragioni si è inteso sviluppare, all'interno del DIMEC, facente capo all'Università di Bologna, un modello di preservazione dell'organo polmonare che fosse estremamente riproducibile, dal costo contenuto e chiaramente applicabile al contesto clinico. La necessità di ottenere un campionamento anatomico idealmente simile al setting intraoperatorio ha condotto alla realizzazione di un metodo originale di preservazione del polmone isolato tale da rendere agevole la ricerca dei noduli, per come avviene nella pratica clinica. Questa ricerca è stata realizzata con il supporto ecografico a distanza dal ricondizionamento dell'organo animale. In modo simile a come è stato possibile documentare nel cane con la tomografia a distanza⁵⁹ l'ecografia ha ottenuto di visualizzare la mappa di perfusione nel nostro modello porcino. Gli esemplari di maiale, uccisi in struttura certificata (UNI-En ISO 9001) e dedicata alla macellazione sono stati inizialmente sottoposti ad un regime ipotermico controllato (4°C). Successivamente a questa fase, una volta raggiunta la preservazione in ghiaccio dei blocchi anatomici costituiti da cuore trachea e sistema polmonare in toto, alcuni tessuti sono stati de raffreddati ed osservati dall'operatore ecografista. L'invio di sezioni ultrasottili di tessuto ha consentito di riconoscerne in atto il rimaneggiamento strutturale dovuto ai fenomeni dell'infiammazione (danno dell'ischemia-

riperfusion). Questo primo blocco è stato denominato (A) e tenuto preso a riferimento per controllo (evoluzione essudatizia, morte cellulare). In altra banca organica denominata diversamente (B) tessuti sono stati ricondizionati tessuti in blocco anatomico uguale con soluzione di perfusione a distanza di 24 ore (PERFADEX). Questo ricondizionamento è stato realizzato seguendo il modello dell'EVLP⁶⁰, a banco ed in temperatura controllata. Questo blocco anatomico è stato ulteriormente preservato a 4 C° per essere riperfuso con soluzione *ad hoc* (Steen solution). A questi campionamenti sono stati applicati dei bersagli meccanici, quanto più simili a quelli clinicamente evidenti durante le manovre chirurgiche di riconoscimento (forma, elasticità). Sono stati dunque identificati dei bersagli appositamente costituiti, diversi per natura e forma, introdotti nel contesto del parenchima polmonare ventilato. Questi bersagli fungevano, nell'esperimento, da target per l'indagine ultrasonografica e la valutazione della performance di quattro diverse sonde ecografiche, saggiata attraverso il potere di localizzazione dei bersagli stessi. Il modello animale, preservato per lo scopo scientifico, veniva offerto all'indagine ultrasonografica completa. L'analisi seriata ed degli esemplari prelevati veniva eseguita con l'ausilio di un medico ecografista, unico operatore, per ridurre le fonti di bias. I dati sono stati dunque categorizzati e sistematizzati ai fini di una analisi scientifica dettagliata dei risultati ottenuti. Sviluppata sul modello EVLP, questa metodica, recentemente adottata dal gruppo scientifico dell'Università di Bologna guidato dal Prof. Mattioli, costituisce il presupposto empirico dell'utilità del supporto ecografico nella localizzazione di noduli subcentimetrici nel modello

animale. Il modello EVLP è stato ampiamente utilizzato nella specie porcina e ritenuto affidabile come metodica di preservazione polmonare post-cadaverica⁶⁰⁻⁶¹. In questi esemplari si è proceduto altresì all'eparinizzazione del messo solvente. Su questo passaggio alcuni Autori mostrano alcune riserve⁶². A distanza il polmone isolato è stato ripperfuso a freddo. Questo trattamento sembra mettere ulteriormente in salvaguardia il campione come ha dimostrato recentemente il gruppo belga⁶². Artificialmente sono stati poi introdotti nei tessuti dell'animale i bersaglio morfologici che sono stati coerentemente identificati all'indagine ecografica nella quasi totalità dei casi. Questo dato ricalca la sensibilità dell'indagine ecografica sottolineata da Zaman⁴⁹. Il sampling anatomico, ottenuto all'interno di una struttura certificata dedita al macello, veniva immediatamente processato al banco, sottoposto ad un regime di condizionamento ipotermico e dunque ripperfuso in temperatura controllata secondo i dettami tecnici delle più innovative tecniche di preservazione trapiantologica. Per lo scopo scientifico sono state dunque considerate tutte le metodiche di preservazione polmonare nel tempo proposte nella Letteratura scientifica. La storia della preservazione organica nel modello animale muove dai primi infruttuosi tentativi di procedere al reimpianto chirurgico polmonare intorno agli anni '50, verificatisi per deiscenza dell'anastomosi tracheo-bronchiale, nel tentativo di individuare una metodica di salvataggio sufficientemente trasferibile al contesto clinico. Si debbono ad Haglin⁶³ ed ai suoi studi pionieristici sui primati le prime evidenze scientifiche ottenute nel modello polmonare animale. Haglin ed i suoi Collaboratori hanno il merito di aver originalmente dimostrato come le funzioni

vitali, nel polmone isolato da cane, possano essere adeguatamente mantenute nel tempo nonostante la denervazione e la deprivazione dal supporto vascolare. Questi principi, dimostrati sul modello dei primati, hanno consentito di realizzare agli Autori anglosassoni con insperato successo per l'epoca, il primo trapianto polmonare nel modello animale. L'avvento degli immunosoppressori, a distanza di qualche decade, ed il primo storico successo chirurgico nel campo della trapiantologia polmonare da parte del gruppo di Toronto⁵¹ ha dato nuovo impulso alla ricerca sperimentale e prodotto una numerosa Letteratura scientifica sull'argomento oggetto di questa trattazione. I traguardi raggiunti nel campo della preservazione dell'organo isolato hanno rappresentato in concreto lo sforzo scientifico sviluppato intorno alla fine del secolo scorso, attraverso al quale sono stati svelati alcuni dei meccanismi più remoti del danno ischemico. Grazie a questi contributi il trapianto polmonare costituisce oggi una procedura relativamente sicura in centri specializzati ed il numero di interventi eseguiti è in costante aumento⁶⁴. La ricerca farmacologica dei primi anni, nel XXI secolo ha portato allo sviluppo di nuovi e diversi principi, attivi nella preservazione dal danno d'organo. Sono oggi disponibili numerose soluzioni tecnologicamente avanzate che consentono di evitare le profonde alterazioni che quasi invariabilmente si accompagnano al danno ischemico. Queste soluzioni possono essere convenientemente utilizzate nel modello sperimentale ed anzi costituiscono il fondamento di una corretta tecnica di preservazione. In questo contesto risulta evidente che una soluzione di condizionamento ideale debba garantire la preservazione della barriera endoteliale e proteggere i sistemi cellulari dal danno

alveolare⁵³. La maggiore parte degli studi scientifici diretti ad indagare la reale efficacia di questi composti nel modello di polmone isolato riguarda sostanzialmente due miscele ideate ad hoc nel sistema di preservazione d'organo: Celsior e Perfadex®⁶⁵. Queste soluzioni sono state distintamente ideate nel supporto al condizionamento del sistema cuore polmoni da circa dieci anni. La maggiore parte delle metodiche di preservazione utilizzate nel modello animale prevede oggi il condizionamento elettrolitico in ipotermia (4°C), la riperfusione con soluzioni dedicate e il trapianto del campione anatomico en bloc^{66,67}. Nonostante questo modello abbia ampiamente trovato la sua naturale applicazione clinica, e consentito di guardare alla frontiera del trapianto polmonare con un discreto margine di sicurezza, ancora molti sono i meccanismi chimici e biomolecolari sconosciuti ed ancora elevati i tassi di mortalità osservati dopo trapianto⁶⁸. Questo modello sperimentale di ricondizionamento al banco prevede, un protocollo di ventilazione/perfusione polmonare sul modello EVLP (Ex Vivo Lung Perfusion) ideato *ad hoc* nel campo del trapianto polmonare. Questo protocollo viene ad oggi utilizzato nelle procedure di espanto da donatore a cuore non battente allo scopo di adeguare il numero di organi necessari alla crescente richiesta di soggetti riceventi. Come fatto cenno l'analisi statistica prevedeva la separazione dei campioni in gruppi omogenei di tessuto. Un primo blocco veniva appositamente conservato a 4° Celsius per sei ore (gruppo A, controllo). Un secondo blocco (gruppo B, studio), perfuso a banco con soluzione Perfadex® a temperatura controllata (4° C), veniva preservato dal deterioramento al medesimo regime termico ma successivamente riperfuso con

soluzione di Steen e sottoposto a ventilazione secondo il protocollo adottato dagli Autori canadesi. La tecnica di preservazione del campione anatomico secondo il modello EVLP, nello studio proposto dal gruppo, consentiva guardare agli obiettivi ecografici in modo ideale. Una biglia di gel (WB, water ball), il gel stesso (GL), tessuto muscolare (MS, muscolo) ed adipe (FT) sono stati dunque introdotti all'interno della campionatura animale. Sono state testate una sonda radiale (UM-BS20R-3 da 20 MHz, una seconda sonda Olympus radiale da 12 MHz (UM-2R), una sonda EBUS (EB1970UK2.0, 5-10 MHz) ed un'ultima sonda convex Hitachi (EUP-OL531, 5-10 MHz). Il metodo di preservazione adottato ha consentito di ottimizzare la performance dello strumento ultrasonografico, riducendo il margine di errore inevitabilmente correlato con l'interpretazione del dato strumentale da parte dell'operatore. Le sonde ultrasonografiche sono state confrontate tra loro per: a) numero di noduli localizzati/non localizzati; b) qualità dell'immagine US fondata sul profilo del nodulo e la sua particolare ecogenicità. E' stato ideato un grading di colore (scala dei grigi), paragonabile a quello utilizzato nell'indagine ecografica tutta, che prevedeva una scala semi-quantitativa. L'analisi ecografica ha consentito di distinguere immagini relativamente povere in dettaglio anatomico (poor) da immagini molto meglio definibili (excellent). Lo spettro di questa variabilità è stato identificato in un punteggio (da 0 a 4). I dati sono stati analizzati utilizzando il t-test di Student e l'analisi della varianza con confronto post hoc multiplo (parametro di significatività di $p < 0.05$). Analizzando il dato complessivo, la sonda lineare endobronchiale ad ultrasuoni (EBUS, sonda 3) ha ottenuto una performance significativamente superiore

nel riconoscimento delle strutture bersaglio. Va sottolineato come la sonda eco-broncoscopica EBUS, oltre a garantire un margine di manovrabilità ottimale, consenta un prelievo real-time di tessuto, campionabile per esame citologico. Attraverso questo modello di preservazione di polmone isolato il nostro gruppo scientifico ha dimostrato un'eventuale applicabilità dello strumento eco-endoscopico nel contesto clinico. I particolari operativi di questo sistema di preservazione sono originali e personale è la serie di metodiche messe in atto per ovviare al deterioramento del campionamento anatomico.

6. Conclusioni

Alla luce dell'esperimento condotto è possibile dedurre alcune considerazioni di carattere generale. L'intervallo temporale che intercorre tra l'arresto di circolo e l'analisi strumentale risulta critico ai fini della validazione del dato statistico. Tale range deve essere standardizzato in funzione della mira clinica (corretta identificazione dei dettagli e delle alterazioni morfo-strutturali) e coerentemente rapportato all'esame tecnico. La metodica ecografica, applicata alla ricerca delle modificazioni nel campionamento anatomico, mostra il vantaggio di essere facilmente riproducibile, a basso costo, comunemente implementabile nello scenario clinico ma consente un'esplorazione sufficientemente corretta esclusivamente a personale qualificato. La mancata esecuzione del protocollo di preservazione conduce in quasi tutti i casi al fallimento della ricerca scientifica per mancata visualizzazione dei dettagli anatomici e per la comparsa dei fenomeni di edema all'interno del parenchima polmonare animale. Questo fallimento, corrisponderebbe in qualche misura al verificarsi di condizioni sfavorevoli sul piano clinico nel corso del processo trapianto logico (PGD). La relazione tra i fenomeni autolitici osservative nel modello animale ed, in altri termini, potrebbe rappresentare il corrispettivo patologico di alcune sindromi cliniche che riducono enormemente le possibilità di successo dell'atto chirurgico. Il gruppo di ricercatori dell'Università di Bologna ha sviluppato molto recentemente una metodica di preservazione del tessuto polmonare sul maiale. Questa ricerca è originale quanto agli obiettivi che intendeva raggiungere

(applicabilità clinica) e va compresa nel più ampio raggio degli studi condotti sperimentalmente su tessuto cadavere di recente acquisizione. E' stato statisticamente dimostrato che lo strumento ecografico consente di riconoscere al banco di ricondizionamento la quasi totalità dei bersagli artificialmente introdotti. Quale tra le varie opzioni sonografiche vada prediletta nello studio su questo modello è oggetto di riflessione e discussione critica. Si può preliminarmente arguire che le sonde EBUS e le metodiche di ultima generazione mostrino un vantaggio in termini di risoluzione ed applicabilità. Il modello di preservazione animale costituisce in ogni caso un riferimento per future indagini poiché affidabile nella ricerca empirica.

Bibliografia

1. Toledo-Pereyra LH, Hau T, Simmons R, Najarian J. Lung preservation techniques. *Ann Thorac Surg*. 1977 May; 23 (5): 487-94.
2. Esme, H., Fidan, H., Koken, T., Solak, O., 2006. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg* 29, 294-298.
3. O'Donnell, C.J., Nabel, E.G., 2011. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 365, 2098-2109.
4. Carrel, A., On the permanent life of tissues outside of the organism, *J Exp Med*, 15, 516-528, 1912.
5. Humphries, A.L. and Dennis, A.J., Historical developments in preservation, in *Basic Concepts of Organ Procurement, Perfusion, and Preservation for Transplantation*, Toledo-Pereyra, L.H., Ed., Academic Press, Inc. 1-30, 1982.
6. Carrel, A., Perfusing media, in *The Culture of Organs*, Carrel, A. and Lindbergh, C.A., Eds., Paul B. Hoeber, Inc., New York, 1938, pp. 55-74.
7. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. *Transfus Med Hemother*. 2011; 38 (2): 125-142. Epub 2011 Mar 21.
8. Parks DA, Bulkley GB, Grange DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery*. 1983 Sep; 94 (3): 415-22.
9. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 2004; 52: 299-309.

10. Hochachka, P.W., Defense strategies against hypoxia and hypothermia, *Science*. 231, 234-241, 1986.
11. Bando T, Kosaka S, Liu C, Hirai T, Hirata T, Yokomise H. Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jul 1994; 108 (1): 92-8.
12. Pegg, D.E., The future of organ preservation, *Transpl Proc*, 16(1), 147-152, 1984.
13. Blades B, Pierpont HC, Samadi A, et Al. The effect of experimental lung ischemia on pulmonary function. *Surg Forum* 4: 255, 1953
14. Borrie J, Lichter I. Lung transplantation, tecnica problems. *Thorax* 19: 383, 1964.
15. Veith FJ, Dougherty JC, Attai L, et Al. Lung, liver and kidney preservation in transplantation. *Transplant Proc* 1: 808, 1969.
16. Brownlee RT, Couves CM. Factors concerned in the maintenance of viability in pulmonary transplants. *Ann Thorac Surg* 5: 112, 1968.
17. Fuller, B.J., Gower, J.D., and Green, C.J., Free radical damage and organ preservation: Fact or fiction? *Cryobiology*, 25, 377-393, 1988.
18. Potera, C., Biolife solutions offers preservation platforms: A molecular approach to cell preservation. *Genet Eng News*, 22 (5), 2002.
19. Kirk AJ, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg* 1993 Oct; 56 (4): 99D-100.
20. Baretta R, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F, Matheis G, Francischetti I, Kreitmayer B. Distribution of lung preservation solutions in parenchyma and airways: influence of

atelectasis and route of delivery. *J Heart Lung Transplant* 1995 Jan-Feb; 14 (1 Pt 1): 80-91.

21. Collins GM, Hartley LC, Clunie GJ. Kidney preservation for transportation. Experimental analysis of optimal perfusate composition. *Br J Surg* 1972; 59: 187-189.

22. Muller C, Furst H, Reichenspurner H, et Al. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Transplantation* 1999; 68: 1139-43.

23. Fischer S, Matte-Martyn A, De Perrot M, et Al. low potassium dextran preservation solutions improves lung function after human transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 594-6.

24. Struber M, Wilhelmi M, Harringer W. Et Al. Flush perfusion with low potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19: 190-4.

25. Aziz TM, Pillay TM, Corris PA, et Al. Perfadex for clinical lung procurement: is it an advance? *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 900-5.

26. Rabanal JM, Ibanez AM, Mons R, et Al. Influence of preservation solution on early lung function (Euro Collins vs Perfadex). *Transplant Proc* 2003; 35: 1938-9.

27. Binns, O. A., N. F. DeLima, S. A. Buchanan, J. T. Cope, R. C. King, C. A. Marek, K. S. Shockey, C. G. Tribble, and I. L. Kron. 1996. Both blood and crystalloid-based extracellular solutions are superior to intracellular solutions for lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 112:1515–1521.

28. Fuller B, Grout BWW. *Clinical applications of cryobiology*. Taylor & Francis Inc. 08/1991; pp.19-21.

29. Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS. Organ preservation. *Methods Mol Biol.* 2006; 333: 331-74.
30. Mora BN, Patterson GA. *Lung preservation in Heart and Lung transplantation.* Baumgartner WA Eds. W. B. Saunders, Philadelphia, 2002, pp 140-143.
31. Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C* 2002; 133: 537-56.
32. Kayano K, Toda K, Naka Y, Pinsky DJ. Identification of optimal conditions for lung graft storage with Euro-Collins solution by use of a rat orthotopic lung transplant model. *Circulation.* 1999; 100(19 Suppl): II 257-61.
33. Jirsch DW, Fisk RL, Couves CM. Ex vivo evaluation of stored lungs. *Ann Thorac Surg.* 1970; 10(2): 163-8.
34. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 427-40.
35. De Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Curr Opin Organ Transplant* 2001; 6: 233-30.
36. Gillette MA, Hess DR. Ventilator-induced lung injury and the evolution of lung-protective strategies in acute respiratory distress syndrome. *Respir Care* 2001; 46: 130-48.
37. Noda K, Shigemura N, Tanaka Y, Bhama JK, D'Cunha J, Luketich JD, Bermudez CA. Successful prolonged ex vivo lung perfusion for graft preservation in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Mar; 45 (3): e 54.

38. Legal YM, Barthelemy R, Puel P. Heart-lung preservation: historical evolution and current research data. *Ann Chir* 1991; 45 (2): 141-5.
39. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, Sato M, Harwood S, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27(12): 1319-25.
40. dos Santos PR, Iskender I, Machuca T, Hwang D, de Perrot M, Liu m, Keshavjee S, Waddell Tk, Cypel M. Modified in vivo lung perfusion allows for prolonged perfusion without acute lung injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014. Feb; 147 (2): 774-81: discussion 781-2.
41. Cypel M, Keshavjee S. The clinical potential of ex vivo lung perfusion. *Expert Rev Respir Med* 2012 Feb; 6 (1): 27-35
42. Machuca TN, Cypel M. Ex vivo lung perfusion. *J Thorac Dis*. 2014 Aug 6 (8): 1054-62.
43. Gruppioni F, Piolanti M, Coppola F, Papa S, Di Simone M, Albin L, Mattioli S, Gavelli G. Intraoperative echography in the localization of pulmonary nodules during video-assisted thoracic surgery. *Radiol Med*. 2000 Oct; 100 (4): 223-8.
44. Piolanti M, Coppola F, Papa S, Pilotti V, Mattioli S, Gavelli G. Ultrasonographic localization of occult pulmonary nodules during video-assisted thoracic surgery. *Eur Radiol*. 2003 Oct; 13 (10): 2358-64.

45. Ellis MC, Hessman Cj, Weerasinghe R, Schipper PH, Vetto JT. Comparison of pulmonary nodule detection rates between preoperative CT imaging and intraoperative palpation . *Am J Surg*. 2011 May; 201 (5): 619-22.
46. Schramm A, Wormanns D, Leschber G, Merk J. Reliability of a computer-aided detection system in detecting lung metastases compared to manual palpation during surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011 Jan; 12 (1): 20-3.
47. Bettio D, Venci A, Cariboni U, Di Rocco M, Infante M. Fluorescent in situ hybridization (FISH) in the differential diagnosis of ground-glass opacities in the lung. *Lung Cancer*. 2011 Mar; 71 (3): 319-22.
48. Biederer J,Schoene A, Freitag S, Reuter M, Heller M. Simulated pulmonary nodules implanted in a dedicated porcine chest phantom: sensitivity of MR imaging for detection. *Radiology*. 2003 May; 227 (2): 475-83.
49. Zaman M, Bilal H, Woo CY, Tang A. In patients undergoing video-assisted thoracoscopic surgery excision, what is the best way to locate a subcentimetre solitary pulmonary nodule in order to achieve successful excision?. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 Aug; 15(2): 266-72.
50. Mattioli S, D'Ovidio F, Daddi N, Ferruzzi L, Pilotti V, Ruffato A, Bolzani R, Gavelli G. Transthoracic endosonography for the intraoperative localization of lung nodules. *Ann Thorac Surg*. 2005 Feb; 79 (2):443-9; discussion 443-9.
51. Khereba M, Ferraro P, Duranceau A, Martin J, Goudie E, Thiffault V, Liberman M. Thoracoscopic localization of intraparenchymal pulmonary nodules using direct intracavitary thoracoscopic ultrasonography prevents conversion of VATS

- procedures to thoracotomy in selected patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Nov; 144 (5): 1160-5.
52. Cooper JD, Vreim CE. NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Sep; 146 (3): 803-7.
53. Belzer FO, Southard JH: principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* . Apr 1988; 45 (4): 673-6.
54. Karlsson JO. Cryopreservation: freezing and vitrification. *Science*. Apr 26 2002; 296 (5568): 655-6.
55. Baust. *Advances in biopreservation*. CRC press. Aug 15, 2006.
56. de Souza LL, Ford E, Gilbert C, Yarmus L, Meneshian A, Feller-Kopman D, Hales R. Novel application of an injectable radiopaque hydrogel tissue marker for management of thoracic malignancies. *Chest*. 2013 Jun; 143 (6): 1635-41.
57. Steinbrook R. Organ donation after cardiac death. *N Engl J Med*. 2007; 357(3): 209-13.
58. Fard N, Saffari A, Emami G, Hofer S, Kauczor HU, Mehrabi A. Acute respiratory distress syndrome induction by pulmonary ischemia-reperfusion injury in large animal models. *J Surg Res*. 2014 Jun 15; 189 (2): 274-84.
59. Lu L, Zhang LJ, Morelli J, Krazinski AW, Silverman JR, Schoepf UJ, Lu GM. Lung ischaemia-reperfusion injury in a canine model: dual energy CT findings with pathophysiological correlation. *Br J Radiol*. 2014 Apr; 87 (1036): 20130716.

60. Nelson K, Bobba C, Ghadiali S, Hayes D Jr, Black SM, Whitson BA. Anima models of ex vivo lung perfusion as a platform for transplantation research. *World J Exp Med.* May 20; 4 (2): 7-15.
61. Wallinder A, Hansson C, Steen S, Hussein AA, Sjoberg T, dellgren G. A simplified preservation method for lungs donated after cardiac death. *J Heart Lung Transplant.* 2014 May; 33 (5) 528-35.
62. Stanzi A, Neyrinck A, Somers J, Cauwenberghs H, Verbeken E, Santambrogio L, Van Raemdonck D. Do we need to cool the lung graft after ex vivo lung perfusion? A preliminary study. *J Surg Res.* 2014 Dec; 192 (2):647-55.
63. Haglin J, Telander RL, Muzzall RE, Kiser JC, Strobel CJ. Comparison of lung autotransplantation in the primate and dog. *Surg Forum.* 1963; 14: 196-8.
64. Warnecke G, Moradiellos J, Tudorache I, Kuhn C, Avsar M, Wiegmann B, et Al. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. *Lancet.* Nov 24 2012; 380 (9856): 1851-8.
65. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, DeMajo WA. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987; 93(2): 173-81.
66. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2011. *J Heart Lung Transplant.* 2011; 30(10): 1104-22, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.healun.2011.08.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2011.08.004).

67. Novick, R. J., K. E. Gehman, I. S. Ali, and J. Lee. 1996. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann. Thorac. Surg.* 62: 302-314.

68. Binns, O. A., N. F. DeLima, S. A. Buchanan, J. T. Cope, R. C. King, C. A. Marek, K. S. Shockey, C. G. Tribble, and I. L. Kron. 1996. Both blood and crystalloid-based extracellular solutions are superior to intracellular solutions for lung preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 112: 1515-1521.