

PROTOCOLLO IN ESTESO

MiFrAADiF Trial

TRATTAMENTO DELLE AMPUTAZIONI MINORI NEL PIEDE DIABETICO MEDIANTE INOCULAZIONE LOCALE DI TESSUTO ADIPOSO AUTOLOGO MICROFRATTURATO: UNO STUDIO RANDOMIZZATO CONTROLLATO.

INTRODUZIONE

Il diabete è una patologia cronica con un trend di incidenza in continua crescita e un significativo impatto sociosanitario. L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che ne siano affetti circa 350 milioni di persone nel mondo (6,5% della popolazione mondiale) e che entro il 2030 questo dato aumenti sino ad arrivare ad interessare il 7,8% della popolazione adulta¹.

In Italia, secondo i dati ISTAT (Istituto Nazionale Italiano di Statistica) del 2012, si contano più di tre milioni di persone affette da diabete (5.5% della popolazione)².

Tra le complicanze del diabete un ruolo sempre più rilevante è assunto dal "piede diabetico" che comporta il maggior numero di ricoveri ospedalieri con conseguenti ingenti costi sanitari. Il problema maggiore correlato ad una lesione del piede nei diabetici è il rischio di una amputazione maggiore (sopra la caviglia) con gravi ricadute sulla vita di relazione. Ogni anno più di 1 milione di persone sono soggette ad un'amputazione dell'arto inferiore come conseguenza del diabete, tenendo comunque conto che nella maggior parte dei paesi non esiste un sistema di registrazione delle amputazioni; queste pertanto risultano probabilmente sottostimate.

La prevalenza delle amputazioni di una estremità inferiore varia da 0,2-4,8%, l'incidenza annuale varia da 46,1-936 per 100.000 persone con diabete³.

Nei diabetici inoltre, l'amputazione maggiore è legata ad un aumento significativo del tasso di mortalità che si stima essere intorno al 30% ad 1 anno, del 50% a 3 anni e del 70% a 5 anni dall'intervento demolitivo².

Queste complicazioni non solo hanno un significativo impatto psicologico e relazionale sulla vita del paziente, ma anche un notevole onere finanziario per la Sanità e per la società in generale.

Negli ultimi anni diversi studi hanno valutato la qualità della vita nelle persone con problemi di piede diabetico, evidenziando un impatto devastante della malattia sulla vita dei pazienti.

In molti casi l'ulcera è un evento centrale che porta ad una progressione e all'amputazione. Si stima infatti che l'amputazione sia preceduta nell'85% dei casi da una lesione al piede e che ogni anno circa 4 milioni di persone sviluppino ulcere del piede diabetico⁴. Una amputazione minore non guarita (digitale o di avampiede) precede molto spesso una amputazione maggiore con conseguente impatto negativo sulla funzione e sulla qualità di vita dei pazienti. La guarigione di una lesione al piede può richiedere diversi mesi di trattamento e riabilitazione; lo sviluppo di sindromi depressive è estremamente frequente. Molti pazienti infatti vivono con la paura di ulcere ricorrenti, ripetuti attacchi di infezione e il potenziale di una lunga vita di disabilità^{5,6}.

Oltre alle conseguenze sulla qualità della vita di pazienti sottoposti ad amputazioni maggiori, va considerato l'impatto economico che questo problema riveste per i pazienti, per la società e per il Sistema Sanitario Nazionale. I problemi di lesioni nel piede diabetico assorbono il 12-15% delle risorse sanitarie per la gestione e la cura della patologia diabetica in senso globale. Il costo di un'ulcera al piede che non richiede l'amputazione varia da \$.1.150 a \$.35.758 dollari USD. Il costo dell'amputazione varia da \$.19.052 (amputazione minore) a \$.66.176 dollari USD (amputazione maggiore)(dati del 2005)².

Un recente studio condotto in Cina sulle amputazioni minori nei pazienti diabetici ha evidenziato che, nonostante il tasso di guarigione sia elevato (82,4%), i risultati a lungo termine non sono incoraggianti con una percentuale di recidive del 27,3% a un anno (76,4% a 5 anni) e una percentuale di re-interventi del 12,5% (47,1% a 5 anni), con una mortalità complessiva del 5,8%⁷. Diventa quindi un imperativo terapeutico la prevenzione delle recidive di lesioni e dei re-interventi al fine di migliorare l'outcomes a lungo termine degli interventi demolitivi minori.

Nella provincia di Modena si contano circa 50 mila diabetici e si stima che il 15% andrà incontro nella vita a una lesione del piede. Presso l'U.O. di Chirurgia Vascolare del Nuovo Ospedale Civile Sant'Agostino Estense (NOCSAE) di Baggiovara, vengono sottoposti a intervento di amputazione minore in media 90 pazienti all'anno, che rappresentano circa l'80-85% dei pazienti diabetici con lesioni localizzate al piede. Si tratta di pazienti diabetici di entrambi i sessi, di età compresa tra i 40 e i 95 anni, con problematiche vascolari risolte, con presenza di una gangrena irreversibile localizzata alla dita o all'avampiede. Di questi pazienti circa l'80% guarisce in un tempo medio di 4 mesi, il restante 15-20% non guarisce e va incontro ad un intervento di amputazione maggiore.

E' evidente quindi che se si vuole ridurre il numero delle amputazioni maggiori è necessario migliorare la capacità di curare efficacemente e precocemente l'ulcera ma anche le lesioni da amputazioni minori. Una possibile strategia per migliorare il processo di guarigione delle lesioni da piccole amputazioni potrebbe essere il lipofilling, cioè l'autotrapianto di tessuto adiposo, contenente fra i tanti componenti anche le cellule staminali mesenchimali adulte.

Le cellule staminali mesenchimali adulte (ASCs) e in particolare quelle derivate dal tessuto adiposo sono considerate una possibilità terapeutica promettente in medicina rigenerativa e nelle patologie autoimmuni, per la loro capacità immunomodulatoria, i loro effetti paracrini attraverso fattori trofici che presentano attività antifibrotica, antiapoptotica e pro-angiogenica^{8,9}. Queste cellule staminali mesenchimali presentano proprietà immunomodulanti e modulano una vasta gamma di cellule del sistema immunitario compresi i linfociti B e T, le cellule "natural killer" e i neutrofili¹⁰⁻¹³. E' stato recentemente dimostrato che le ASCs derivate dal tessuto adiposo contengono cellule progenitrici in grado di differenziarsi in cellule endoteliali adulte e di partecipare attivamente alla formazione dei vasi sanguigni¹⁴⁻¹⁶. L'effetto terapeutico delle ASCs nell'uomo è supportato da diversi modelli sperimentali di malattie infiammatorie¹⁷ e da studi sull'uomo in particolare in ambito di chirurgia ricostruttiva ed estetica^{18,19} ma anche proctologica, intestinale, cardiaca, vascolare ed endocrinologica^{16,20-25}. Lo sviluppo di tecnologie in grado di separare le ASCs dal tessuto adiposo con minime manipolazioni è auspicabile per la successiva applicazione clinica delle stesse. In questo ambito si inserisce il sistema Lipogems.

Il sistema Lipogems® nasce dal perfezionamento della classica metodica di lipofilling secondo Coleman²⁶ fornendo cluster di lipoaspirati trapiantabili con dimensioni ridotte per migliorare l'attecchimento post-trapianto. La riduzione delle dimensioni dei cluster del tessuto adiposo ottenuta con altri mezzi meccanici, quali lame rotanti è molto traumatico per le cellule, e produce grandi quantità di residui di olio e detriti cellulari²⁷. Il sistema Lipogems è una tecnologia innovativa,

senza l'utilizzo di sistemi enzimatici, in grado di aspirare, processare e reiniettare lipoaspirati umani. L'intera procedura avviene in un sistema chiuso completamente ad immersione in soluzione fisiologica al fine di rendere possibile la riduzione del volume medio dei cluster e minimizzare qualsiasi azione traumatica sui prodotti cellulari e rischio di contaminazione. Viene utilizzata una minima azione meccanica sul tessuto adiposo, ottenendo un tessuto adiposo micronizzato, non-espanso, con una frazione vascolostromale contenente ASCs^{28,29}.

Lo scopo dello studio è di valutare l'efficacia del lipofilling con metodica Lipogems in pazienti diabetici candidati ad un intervento di piccola amputazione a livello del piede. In particolare si valuterà se il lipofilling sarà in grado di accorciare i tempi di guarigione delle amputazioni minori e di ridurre il numero di amputazioni maggiori, con conseguente impatto positivo sulla qualità della vita di questi pazienti.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario dello studio è di valutare in pazienti diabetici i tempi di guarigione delle lesioni derivanti da interventi di amputazione minore (digitali o avampiede) trattate con lipofilling con metodica Lipogems.

Gli obiettivi secondari sono: valutazione della sicurezza del lipofilling; stima dell'intensità del dolore (scala VAS); valutazione clinica del trofismo cutaneo; calcolo del tasso di recidive (inteso come comparsa di infezioni locali, di deiscenze e sofferenza dei lembi cutanei da cui la necessità di ricorrere a revisioni del moncone di amputazione o amputare a un livello più alto), valutazione del tempo di ospedalizzazione e della qualità di vita (QoL).

DISEGNO DELLO STUDIO

Si propone uno studio randomizzato controllato monocentrico che si svolgerà presso l'Unità Operativa di Chirurgia Vascolare del Nuovo Ospedale Civile Sant'Agostino Estense di Baggiovara. I pazienti verranno selezionati presso l'Ambulatorio della Chirurgia Vascolare del NOCSAE di Baggiovara, durante le visite effettuate come da normale pratica clinica.

Il campione sarà di 114 pazienti diabetici, che soddisfino tutti i criteri di seguito riportati.

Criteri di inclusione

- a) Pazienti diabetici (Diabete Mellito di tipo 1 e di tipo 2) di ambo i sessi e di età superiore ai 18 anni.
- b) Presenza di gangrena irreversibile digitale o localizzata all'avampiede (con RX piede negativo o positivo per lesioni osteolitiche a carico delle falangi e/o del metatarso).
- c) Pazienti con problematiche vascolari assenti o risolte (valutazione Eco Color Doppler e mediante indice ABI (Ankle/Brachial Index, calcola il rapporto tra la pressione sistolica rilevata alla caviglia e la pressione sistolica al braccio, entrambe misurate in posizione supina mediante Doppler ad onda continua. Laddove è valutabile dovrà essere maggiore/uguale a 0,7) ed indice pressorio dito/braccio TBI (Toe/Brachial Index, laddove è valutabile dovrà essere maggiore/uguale a 0,6) e/o mediante determinazione della pressione di ossigeno transcutanea (TcPO₂ che dovrà avere valore pari o superiore a 30mmHg).

Criteri di esclusione

- a) Terapie oncologiche in corso o pregresse (negli ultimi 5 anni) e/o lesioni neoplastiche

- b) Paziente in terapia steroidea
- c) Problematiche vascolari attive

Ai pazienti ritenuti idonei secondo i criteri stabiliti, verranno fornite tutte le informazioni relative allo studio durante una visita programmata secondo la normale pratica clinica presso l'Ambulatorio della Chirurgia Vascolare; verrà rilasciato il modulo informativo e in caso di accettazione dello studio verrà fatto firmare il consenso informato al momento del ricovero presso la U.O. di Chirurgia Vascolare.

I pazienti verranno ricoverati prima 24 ore prima dell'intervento presso la U.O di Chirurgia Vascolare, come da normale pratica clinica. Dopo la firma del consenso informato il paziente verrà randomizzato in modo centralizzato al gruppo di trattamento con lipofilling secondo metodica Lipogems (inoculazione locale di tessuto adiposo autologo micro fratturato) o al gruppo di controllo, cioè al trattamento secondo la normale pratica clinica.

Per ogni gruppo di pazienti verrà seguita la medesima procedura che consta delle le seguenti fasi:

- Esecuzione di esami ematici preoperatori di routine, ECG e visita anestesiologicala per confermare l'idoneità al trattamento in anestesia locale.
- Durante il trattamento, eseguito in sala operatoria, con assistenza anestesiologicala, verranno monitorati ECG, PA e saturimetria del paziente.
- Verrà eseguita antibiotico terapia perioperatoria
- La prima fase dell'intervento consisterà nella procedura di amputazione al livello prestabilito e sarà comune ad entrambi i gruppi di pazienti, secondo la normale pratica clinica e in anestesia loco-regionale.
- Il gruppo di intervento verrà sottoposto poi, nell'ambito della stessa seduta operatoria, a iniezione locale di tessuto adiposo autologo mediante tecnica Lipogems. Il grasso verrà prelevato dal sito donatore (coscia o addome del paziente) per infiltrazione sottocutanea, con utilizzo delle cannule fornite dal sistema Lipogems, studiate per rendere più rapido il prelievo e minimizzare il traumatismo. Il preparato per l'inoculazione è ottenuto tramite una minima manipolazione meccanica del tessuto adiposo senza l'utilizzo di processi enzimatici. Il rationale prevede la processazione del tessuto in un cilindro contenente soluzione fisiologica a flusso continuo che svolge la duplice funzione di ridurre i cluster del lipoaspirato e di lavare il tessuto da olio e emocomponenti. Il lipoaspirato viene infuso all'interno del cilindro di processazione. Grazie al filtro a setaccio in ingresso vi è una prima riduzione grossolana dei cluster. Una volta terminata l'infusione del lipoaspirato (quantità minima 60 cc, massima 250 cc), tramite azione meccanica di "shakeraggio" le sfere metalliche agiscono emulsionando il lipoaspirato, mentre l'azione del flusso di fisiologica riduce i cluster del tessuto. I prodotti di scarto (olio ed emocomponenti) vengono raccolti nell'apposita sacca di scarto. Ultimata la processazione meccanica (il tessuto appare privo di elementi di scarto e la soluzione fisiologica limpida) si può procedere al prelievo del tessuto. Il cilindro viene capovolto rispetto alla posizione di processazione. Il grasso così prelevato e preparato verrà iniettato nel letto dell'amputazione.
- Il gruppo di controllo: i pazienti verranno sottoposti ad amputazione digitale o di avampiede secondo normale pratica clinica. E' prevista una anestesia locale o loco regionale a livello del piede, accompagnata se necessario da una sedazione superficiale con assistenza anestesiologicala. L'amputazione, a seconda dell'indicazione, può essere trans-falangica o trans-metatarsale delle dita o del piede. L'incisione è nella maggior parte dei casi a due

lombi. La tecnica chirurgica deve essere il più atraumatico possibile e deve implicare la minore quantità possibile di scollamento cutaneo e muscolare con maggior conservazione dei tessuti molli plantari. A seconda del livello dell'amputazione, l'osteotomia si esegue con tronchesi (transfalangica) o con sega oscillante (trans metatarsale). I tendini vengono sezionati e lasciati retrarre. Segue un'accurata emostasi. E' possibile avvicinare i tessuti sottocutanei e suturare il moncone mediante punti di avvicinamento in seta o mantenere i lembi liberi in modo che il moncone guarisca per seconda intenzione. La medicazione in genere si effettua previa detersione con acqua ossigenata e lavaggio con soluzione fisiologica, con garze paraffinate e soluzione di iodopovidone al 10% di iodio. Il paziente, nei primi giorni del post operatorio dovrà osservare riposo assoluto e mantenere l'arto in lieve scarico.

Dopo l'intervento il paziente verrà tenuto in osservazione e dimesso con il consiglio di mantenere il riposo assoluto sino al controllo successivo (entrambi i gruppi) e la medicazione compressiva a livello del sito di prelievo per le successive 48 ore (gruppo di intervento).

Il follow up prevede controlli ambulatoriali a 20 giorni e quindi a cadenza mensile per un periodo di 6 mesi dalla data dell'intervento.

I risultati ottenuti verranno inseriti in un database, su appositi moduli di registrazione (CRF). Nelle CRF verranno anche raccolti i seguenti dati anamnestici: età, sesso, durata della malattia diabetica, altre copatologie (ipertensione, cardiopatia, iperlipidemia, arteriopatie), terapia in atto. Ognuno di questi moduli verrà compilato al termine di ogni procedura e al termine di ogni visita di follow up. Verranno inoltre raccolti i seguenti indicatori:

1. tempo di guarigione, dal termine dell'intervento delle amputazioni minori in soggetti diabetici, intendendo per guarigione la completa cicatrizzazione del moncone di amputazione, in assenza di segni di sofferenza cutanea, di infiammazione, di infezione, di tumefazione locale.
2. tollerabilità della procedura: si valuterà la sicurezza per il paziente in particolare verranno raccolte tutte le tipologie di eventi avversi.
3. tasso e tempo di insorgenza di recidive, che possono essere rappresentate da comparsa di infezioni locali, di deiscenze e sofferenza dei lembi cutanei da cui la necessità di ricorrere a revisioni del moncone di amputazione o amputare a un livello più alto;
4. valutazione del dolore con scala VAS. La scala VAS verrà valutata prima dell'intervento chirurgico e durante tutti i successivi follow-up;
5. tempo di ospedalizzazione totale
6. tempo di immobilità del paziente: dipende dal tempo di guarigione in quanto fino al momento della completa cicatrizzazione del moncone di amputazione e il paziente deve da normale pratica clinica rimanere fermo a letto. Si valuterà l'immobilità del paziente mediante il numero dei giorni di allettamento
7. della qualità di vita mediante scala (QoL) verrà valutata prima dell'intervento e a tutti i successivi controlli.

DESCRIZIONE DEL TRATTAMENTO DI LIPOFILLING.

Il sistema Lipogems® è un dispositivo per raccogliere, processare e reiniettare lipoaspirati umani. Si tratta di un device monouso che riduce progressivamente le dimensioni dei cluster di tessuto adiposo (da cluster sferoidali con diametro da 1 a 3,5 mm ad un micro-cluster da 0,2 a 0,6 mm) mentre elimina sostanza oleosa e residui di sangue a contenuto pro-infiammatorio. L'intera procedura avviene in un sistema chiuso completamente ad immersione in soluzione fisiologica al fine di rendere possibile la riduzione del volume medio dei cluster e minimizzare qualsiasi azione traumatica sui prodotti cellulari e rischio di contaminazione.

Il sistema Lipogems® nasce dal perfezionamento della classica metodica di lipofilling secondo Coleman²⁶ fornendo cluster di lipoaspirati trapiantabili con dimensioni ridotte per migliorare l'attecchimento post-trapianto. La riduzione delle dimensioni dei cluster del tessuto adiposo ottenuta con altri mezzi meccanici, quali lame rotanti è molto traumatico per le cellule, e produce grandi quantità di residui di olio e detriti cellulari²⁷.

Si è scelto questo dispositivo medico perché permette di ottenere un prodotto cellulare micronizzato derivato dal tessuto adiposo totalmente privo di residui oleosi e di derivazione ematica, con una procedura standardizzabile e particolarmente veloce (circa 12-15 minuti).

Il lipoaspirato oltre a contenere sostanze pro-infiammatorie (olio), è in genere costituito da cluster cellulari di 1,5-3mm che danno una consistenza poco fluida, globosa ed è sempre di difficile inserimento in tessuti duri o poco elastici se non con l'uso di aghi di dimensioni relativamente grandi (18G). Il sistema PureGraft®, un sistema commerciale alternativo per lipofilling, sebbene riesca ad eliminare con quasi altrettanta efficienza le componenti oleose ed ematiche di scarto, non provvede alla micronizzazione del tessuto adiposo. Il sistema commerciale Celution® invece utilizza un lipoaspirato arricchito di cellule staminali estratte enzimaticamente da un secondo lipoaspirato del medesimo paziente e prevede una lunga metodica di processazione e diversi problemi autorizzativi.

Il sistema Lipogems® permette di ottenere intraoperatoriamente in tempi brevi del tessuto adiposo micronizzato, non-espanso, che agisce da deposito altamente disponibile di hMSCs presenti nella frazione vascolostromale^{28,29}.

PROCEDURA E MATERIALI

Anestesia e infiltrazione del tessuto sottocutaneo per il prelievo di tessuto adiposo

Per la fase d'infiltrazione del tessuto adiposo nel sottocutaneo si utilizza una cannula smussata monouso appositamente progettata di 18,5 cm inserita dopo una puntura cutanea con un ago da 18 Gauge e collegata ad una siringa per essere direttamente collegata alla sacca di infusione, fornendo un sistema ideale per la procedura ambulatoriale. La sacca d'infusione prevede soluzione salina con adrenalina (con concentrazione finale di 2 µg/ml (1:500.000) con aggiunta di lidocaina sino alla diluizione di circa 0,02%. In questo modo si ottiene, aspettando almeno 15 minuti dopo un abbondante infiltrazione, un'ottima anestesia locale a livello del sito donatore.

Aspirazione del tessuto adiposo sottocutaneo

La procedura di aspirazione (lipoaspirazione) viene eseguita da siringhe luer lock da 10 cc o da 60cc a stop progressivi collegati a una cannula dedicata smussa di 185 mm (3 mm di diametro) con 6 fori ovali (1 x 2 mm) all'estremità della cannula. L'apice della cannula è completamente smussato per evitare penetrazioni accidentali della parete addominale o dei vasi.

Tenendo presente la lunghezza da 185 mm e i 6 fori all'estremità della cannula che cominciano a 4 mm circa dall'estremità, si esegue una piccola incisione da un minimo di 5 mm a un massimo di 19 mm dalla sede donatrice in cui si vuole agire; l'incisione viene effettuata con lama da bisturi 11 (e' sufficiente introdurre nella sede di accesso metà della lunghezza della lama); il vuoto durante l'aspirazione può essere ottenuto manualmente o bloccando lo stantuffo della siringa con uno strumento a morsetto (es. pinza Backhaus). E' consigliato impugnare la cannula del sullo speciale raccordo in plastica, dotato di impugnatura ergonomica, evitando di impugnare e guidare la cannula agendo sulla siringa (l'eventuale forza esercitata su quest'ultima potrebbe infatti favorire una rottura del raccordo). Fino a 1000 ml possono essere raccolti in meno di 15' minuti e 1'- 2' sono sufficienti per raccogliere i 100 - 150 ml di solito necessari. Il lipoaspirato raccolto può essere progressivamente inserito nel dispositivo Lipogems® utilizzando più siringhe da 10 cc o la siringa da 60cc a più stop se si è utilizzata questa per il prelievo.

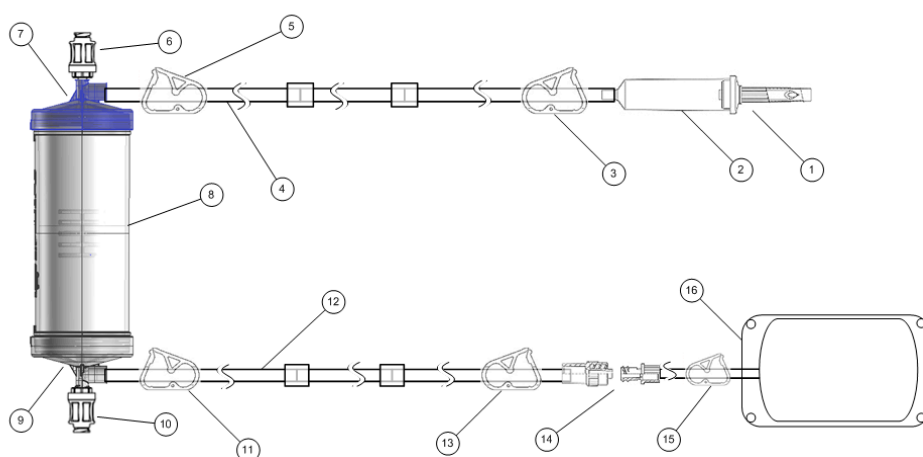
Il sistema Lipogems® è un sistema chiuso ad immersione (figura 1). Dopo aver effettuato un riempimento completo con soluzione fisiologica eliminando le tracce di aria, il lipoaspirato prelevato dal paziente viene inserito attraverso il primo filtro nel device. Il passaggio attraverso il primo filtro determina la prima riduzione della dimensione dei cluster e l'eliminazione dei frustoli fibrosi eventualmente presenti. In una fase successiva il chirurgo agita il sistema provvisto all'interno di cinque sfere in acciaio inossidabile che permettono l'emulsione della componente oleosa. Il flusso continuo di soluzione salina che attraversa, continuamente il dispositivo, provvede ad allontanare efficacemente i prodotti di scarto in una sacca di raccolta, mentre i due filtri trattengono i cluster all'interno del device. Non appena il tessuto adiposo appare totalmente giallo e la soluzione salina trasparente, il chirurgo può effettuare la seconda riduzione del volume medio dei cluster adipocitari attraverso il secondo filtro. Il prodotto finale Lipogems® è quindi pronto per l'applicazione desiderata, sia clinica che tramite bancaggio.

Attualmente sono a disposizione due grandezze differenti di device Lipogems®, uno da 240 cc (LGD 240) e uno da 60 cc (LGD 60) di capacità totale nominale (volume interno netto rispettivamente 216 e 54 cc) che permettono di ottenere lo stesso prodotto tessutale a seconda della quantità di tessuto adiposo che il paziente presenta o meglio della quantità di tessuto Lipogems® necessaria alla procedura.

Utilizzando il device Lipogems® LGD 240 la procedura manuale richiede meno di 15 minuti, consentendo di lavorare in una volta da 50 a 120cc ml di lipoaspirato (la quantità ideale è di 100cc) ed ottenere circa 5 - 80cc di prodotto cellulare finale Lipogems® (utilizzando lo standard di 100cc di lipoaspirato si ottengono di norma da 50 a 60cc). Il device Lipogems® può essere caricato due volte nella stessa seduta sino a un massimo di 240 ml di lipoaspirato complessivamente trattato.

L'utilizzo del device Lipogems® LGD 60 permette una processazione più rapida in meno di 5 minuti ed è in grado di processare, con minimo spreco di tessuto, e massima resa, da 7 a 30cc di lipoaspirato (la quantità ideale è 25cc) ottenendo da 1,5 a 23cc di Lipogems® (utilizzando lo standard di 25cc di lipoaspirato si ottengono di norma da 13 a 17cc). Anche il device Lipogems® da 60cc può essere caricato due volte nella stessa seduta sino a un massimo di 60cc di lipoaspirato complessivo trattato.

Figura 1: descrizione del device.



1	Spike per sacca di fisiologica con cappuccio di protezione
2	Camera di gocciolamento morbida
3	Clamp di ingresso linea di lavaggio
4	Linea di lavaggio
5	Clamp di ingresso
6	Valvola di carico materiale lipoaspirato
7	Testata blu (filtro di ingresso)
8	Unità di processazione
9	Testata grigia (filtro di uscita)
10	Valvola di estrazione Lipogems
11	Clamp linea di scarico
12	Linea di scarico
13	Clamp connessione sacca di scarico
14	Connessione sacca di scarico
15	Clamp sacca di scarico
16	Sacca di scarico

ANALISI STATISTICA.

Per il calcolo delle dimensioni del campione è stato considerato come end-point primario un beneficio del trattamento in termini di riduzione del 50% del tempo di guarigione della lesione. Il tempo medio di guarigione della lesione è di 4 mesi, per cui una riduzione di 2 mesi può essere considerata un beneficio clinicamente rilevante. Considerando un drop-outs del 10% fissando un livello di significatività $\alpha=0.05$ e una potenza di $1-\beta=0.80$, saranno richiesti 57 pazienti per ciascuno dei due bracci di sperimentazione.

Verrà effettuata una randomizzazione a blocchi, centralizzata presso la Direzione Aziendale USL. La lista di randomizzazione sarà depositata presso la Direzione stessa.

L'end-point primario, la differenza nel tempo di guarigione della lesione fra i due gruppi verrà calcolata applicando il log rank test e le curve di Kaplan-Meier.

Verrà inoltre effettuata un'analisi descrittiva mediante SPSS software per l'analisi statistica; verrà valutato il ruolo delle variabili continue utilizzando il t-test di Student o ANOVA test. Per le variabili categoriche verrà utilizzato il test chi-quadro. Sarà effettuata una regressione logistica multivariata per identificare i fattori eventualmente coinvolti nella diversa risposta al trattamento di lipofilling. I risultati dei test statistici saranno considerati significativi per un valore di $p<0.05$.

EVENTI AVVERSI.

I dati ricavati dalla documentazione pubblicata dimostrano che la metodica Lipogems è sicura. Il principale potenziale rischio connesso alla procedura è quello infettivo durante il trapianto autologo che è sostanzialmente mitigato dalla struttura completamente chiusa del dispositivo sterile, diversamente da quanto avviene nella tecnica dei Coleman, che prevede la processazione in campo aperto. Gli effetti collaterali a breve termine e a lungo termine del trattamento sono legati alla tecnica di lipoaspirazione e/o re inoculazione e sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati per la usuale tecnica di lipofilling con incidenza del 5-15%. Sono rappresentati da sanguinamento, ematomi, ecchimosi, aderenze sottocutanee e cicatrici delle zone cruentate; infezioni, ascessi, disturbi nevralgici, inefficacia del trattamento. Al momento non vi sono segnalazioni di tali eventi avversi legati alla tecnica Lipogems.

Durante lo studio verranno raccolte tutte le tipologie di eventi avversi compresi quelli attesi dalla normale pratica clinica in questi pazienti fra cui: infezioni locali, deiscenza e sofferenza dei lembi cutanei, emorragie in sede di amputazione, necessità di intervento di amputazione maggiore. L'intervento di amputazione maggiore è contemplato come complicanza in questa tipologia di pazienti, poiché può esservi la possibilità di fallimento della procedura di amputazione minore correlata a peggioramento del quadro perfusionale vascolare.

MONITORAGGIO DELLO STUDIO DELLA SICUREZZA

Lo Sperimentatore dovrà segnalare tempestivamente, entro 24 ore, ogni evento avverso che si verifichi ai pazienti durante allo studio al Comitato Etico, al Promotore, secondo quanto previsto dalla normativa.

In caso di incidenti (definiti dall'art.9, comma 1 del D.Lgs 46/97 e dell'art. 11, comma 1 del D.Lgs 507/92) eventualmente occorsi durante il progetto le segnalazioni verranno inviate all'Ufficio V (Vigilanza dispositivi medici) della DGDFSC del Ministero della Salute, secondo le modalità previste dalla Meddev 2.12-1 rev 6 anno 2009, da parte del Promotore. Le informazioni relative agli incidenti verranno inoltre inviate al Fabbriante.

L'Ingegneria Clinica dell'AUSL effettuerà il collaudo e il controllo dell'attrezzatura in comodato d'uso.

CONSIDERAZIONI ETICHE

Questo protocollo sperimentale è stato redatto in conformità con le norme di buona pratica clinica, di cui al DM del 15/07/97 ed a quanto è stato stabilito nella Dichiarazione di Helsinki (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013). E' previsto un consenso informato scritto da parte del del paziente alla partecipazione al progetto e al trattamento dei dati nel rispetto della Legge sulla Privacy (Dlgs n. 196/2003). Il modulo di consenso informato esplicita il carattere sperimentale della procedura e il diritto del paziente ad interrompere in qualsiasi momento la partecipazione allo studio. Sono inoltre esplicitati i nomi dei medici cui rivolgersi in caso di dubbi.

PUBBLICAZIONE DEI DATI

Lo Sperimentatore si impegna alla pubblicazione dei dati risultanti dallo studio anche qualora risultassero negativi.

Bibliografia

1. World Health Org. Fact sheet N.312 August 2011 (Internet) Available at www.who.int/mediacentre/factsheets/fs/312/en (Cited 2013, Sep 18)
2. “International Consensus on the Diabetic Foot & Practical Guidelines on the management and prevention of the diabetic foot” (2007) by the International Working Group on the Diabetic Foot“
3. Boulton AJI, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease *Lancet*. 2005 Nov 12;366(9498):1719-24.
4. Caravaggi C, Ferraresi R, Bassetti M, Sganzeroli AB, Galenda P, Fattori S, De Prisco R, Simonetti D, Bona F. Management of ischemic diabetic foot. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2013 Dec;54(6):737-54. Review.
5. Snyder RJ, Hanft JR Diabetic foot ulcers--effects on QOL, costs, and mortality and the role of standard wound care and advanced-care therapies. *Ostomy Wound Manage*. 2009 Nov 1;55(11):28-38.
6. Cox PS, Williams SK, Weaver SR. Life after lower extremity amputation in diabetics. *West Indian Med J*. 2011 Oct;60(5):536-40.
7. Chu Y-J, Li X-W, Wang P-H, Xu J, Sun H-J, Ding M, Jiao J, Ji X-Y, Feng S-H. Clinical outcomes of toe amputation in patients with type 2 diabetes in Tianjin, China. *Int Wound J* 2014; doi: 10.1111/iwj.12249
8. Singer NG, Caplan AI Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:457-478
9. Delarosa O, Dalemans W, Lombardo E Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol* 2012 ; 23:1-5.
10. Krampera M, Glennie S, Dyson J et al Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigenspecific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101:3722-3729
11. Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G et al Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010; 185:302-312
12. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P et al. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 2009; 27:693-702
13. Delarosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S et al . Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev* 2012; 21:1333-1343.
14. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656 - 663.
15. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349 -355.
16. Madonna R, Geng Y.J. and De Caterina R. Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Characterization and Potential for Cardiovascular Repair; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; -1728
17. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L et al .Adipose derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009; 136:978-989.
18. Coleman S.R., Saboeiro A. Fat Grafting to the Breast Revisited: Safety and Efficacy *Plastic and Reconstructive Surgery* • March 2007.
19. Coleman S.R. . Hand Rejuvenation with Structural Fat Grafting. *Plastic And Reconstructive Surgery*, 2002: 1731-44.
20. Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol*. 2007; 213(2):341-347.
21. Satija, N. K.; Singh, V. K.; Verma, Y. K.; Gupta, P., et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: A new paradigm in regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med*. 2009; 13(11-12):4385-402.
22. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Garcia LG et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:451-454.
23. F. de la Portilla et al. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial *Int J Colorectal Dis* 2013; 28:313-323.

24. Salemi S, Rinaldi C, Manna F, Guarneri GF, Parodi PC. Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Dec;61(12):1565-7.
25. Cervelli V, Gentile P, De Angelis B et al. Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers. *Stem Cell Res.* 2011 Mar;6(2):103-11
26. Coleman S.R. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plastic Surgery* 1995, 19: 421-425.
27. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T et al. Influences of Centrifugation on Cells and Tissues in Liposuction Aspirates: Optimized Centrifugation for Lipotransfer and Cell Isolation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, March 2008: 1033-1041.
28. Tremolada C., Ventura C., Raffaini M. et al. A new non- enzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Celi Trasplant* 2012: 8.
29. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E et al. A New Nonenzymatic Method and Device to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Pericyte-Like Elements by Mild Mechanical Forces From Human Lipoaspirates. *Cell Transplantatio*; 2013; Vol. 22, pp. 2063–2077.