

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Nuova applicazione clinica del verde indocianina
nella biopsia linfonodale laparoscopica guidata
dalla fluorescenza in caso di linfoma. Valutazione
dell'efficacia su casistica preliminare.**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Marco Casaccia

Candidato:

Federico Ugo

Anno accademico 2022/2023

Vorrei dedicare questa tesi ai miei genitori, per il loro costante sostegno, i loro sacrifici e l'incrollabile fede in me.

Desidero ringraziare il Professor Marco Casaccia per la sua
disponibilità, professionalità e cortesia; la sua passione
dimostrata verso questo lavoro è per me di grande ispirazione.

Un ringraziamento al Dottor Nicolò Maria Barabino per il
prezioso aiuto durante la stesura di questo elaborato.

Sommario

Introduzione	1
1. Il verde Indocianina	2
1.1 Caratteristiche del colorante	2
2. Utilizzo del verde indocianina.....	3
2.1 Utilizzo in campo medico.....	4
2.2 Utilizzo in campo chirurgico	6
3. La biopsia linfonodale laparoscopica nella diagnostica delle malattie linfoproliferative	13
3.1 Linee guida e stato dell'arte	13
3.2 Casistica di reparto	16
4. Studio clinico.....	18
4.1 Razionale e obiettivi	18
4.2 Disegno dello studio	19
4.2.1 Piano di studio.....	19
4.2.2 Durata dello studio e fine della sperimentazione	19
4.2.3 Endpoint primario	19
4.2.4 Endpoint secondari	20
4.2.5 Criteri di inclusione ed esclusione.....	20
4.2.6 Visite ed esami di controllo	21
4.3 Strumentazione	23
4.4 Tecnica chirurgica	26
4.5 Analisi statistica	30
5. Casistica di reparto	33
5.1 Materiali e metodi	33
5.2. Risultati e analisi statistica.....	34

6. Discussione	37
7. Conclusioni.....	40
8. Bibliografia	42

Introduzione

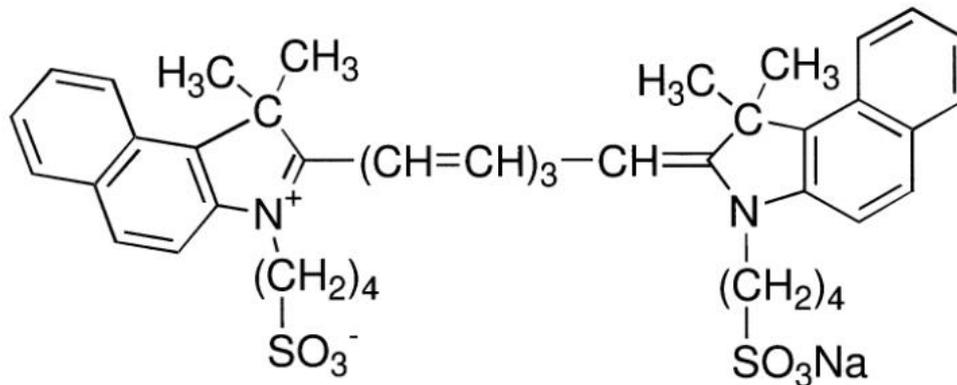
La biopsia del linfonodo sentinella è stata convalidata come standard di cura nel carcinoma mammario, nel melanoma e nelle neoplasie ginecologiche. Per quanto riguarda il cancro dell'endometrio e della cervice uterina, l'uso della fluorescenza con verde Indocianina (ICG) è stato ampiamente studiato e si è dimostrato un metodo sicuro, efficiente in termini di tempo e affidabile rispetto ai traccianti standard come il patent blue e il tecnezio 99m.

In campo ginecologico, le revisioni sistematiche pubblicate di recente raccomandano l'uso dell'ICG come tracciante di scelta per la maggior parte dei tumori ginecologici.

Tuttavia, l'uso di questo colorante nelle malattie linfonodali primarie non è stato ancora sufficientemente studiato. Ad oggi, esistono solo alcuni rapporti aneddotici che ne indicano l'uso per rilevare il tessuto linfatico patologico quando viene eseguita una biopsia linfonodale per una sospetta malattia linfoproliferativa.

Sfruttando le note proprietà di tropismo elettivo per il tessuto linfonodale dell'ICG, si è deciso di studiare l'uso di questo fluoroforo per l'identificazione intraoperatoria del tessuto linfatico patologico. Nel caso di linfonodi addominali affetti da malattie linfoproliferative primarie, l'ipotetico vantaggio, non ancora completamente studiato, sarebbe quello di semplificare la ricerca dei linfonodi stessi e di poter scegliere il sito biotico con maggiore precisione, mirando al tessuto vitale necessario per ottenere un esame patologico contributivo. È stata quindi studiata una serie prospettica di pazienti sottoposti a biopsia linfonodale laparoscopica guidata dalla fluorescenza per escludere o seguire la progressione di un linfoma.

1. Il verde Indocianina



Indocyanine Green

Figura 1.1 Struttura chimica del verde indocianina

1.1 Caratteristiche del colorante

Il verde indocianina (ICG) è un colorante tricarbocianina carico negativamente, con peso molecolare di 751,4 Dalton utilizzato principalmente per l'imaging in campo medico (1). L'ICG secco è stabile a temperatura ambiente. Date le sue caratteristiche anfipatiche è solubile in acqua ma presenta anche caratteristiche idrofobiche per cui quando viene somministrata endovena si lega ad albumina (2), alfa-lipoproteine (3), e beta-lipoproteine (4), confinando il suo volume di distribuzione allo spazio extracellulare e rendendolo particolarmente adatto per applicazioni angiografiche (5); l'aggregazione influenza anche le sue proprietà ottiche. La stabilizzazione spettrale è più veloce quando l'ICG viene disciolto in acqua distillata, per cui alcuni autori sconsigliano l'aggiunta di soluzione salina e/o albumina all'iniettato, quando è essenziale una rapida stabilità spettrale, quando per esempio si usa l'ICG per scopi quantitativi.

Si distribuisce uniformemente nel sangue in 2-3 minuti dalla somministrazione (6). La sua clearance è totalmente a carico degli epatociti tramite il trasportatore OATP13B e il sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) (7). Ha un tasso di eliminazione rapido dal 18% al 24% al minuto da parte del fegato; viene escreto nella

bile senza subire biotrasformazioni (non sono noti metaboliti) dalla multidrug-resistance-associated protein 2 (MRP 2) (8). I livelli di ICG calano esponenzialmente nei primi 20 minuti dalla somministrazione, in questo tempo circa il 97% del colorante è già stato eliminato nella bile. La sua emivita è di circa 3-4 minuti a seconda della vascolarizzazione dell'organo d'interesse (9). Quando iniettato al di fuori dei vasi sanguigni, l'ICG viene raccolto dalla linfa, raggiungendo il più vicino linfonodo solitamente in 15 minuti. Dopo 1-2 ore si lega ai linfonodi regionali, depositandosi nei macrofagi (10). Dalla sua scoperta ad oggi il verde indocianina ha trovato impiego nel campo medico in numerose applicazioni.



Figura 1.1.1 Fiala di polvere di verde indocianina

2. Utilizzo del verde indocianina

2.1 Utilizzo in campo medico

Il verde indocianina è stato sviluppato dalla Kodak nel 1955 come colorante per le fotografie. Le sue applicazioni in campo medico sono state approvate dalla statunitense Food and Drug Administration nel 1959. Nel 1960, vengono riportate le sue caratteristiche e i risultati del suo uso nelle Mayo Clinics; da allora l'ICG è stato, ed è tutt'ora utilizzato per determinare la funzionalità epatica. Dal 1963 viene applicata per determinare il flusso di sangue renale. Dal 1965 viene impiegata per valutare la perfusione cerebrale e dal 1975 per l'angiografia oculare. Numerose applicazioni per studi angiografici e di perfusione sono poi state implementate in seguito all'avanzamento delle tecnologie sull'imaging basato sulla fluorescenza (11).

Il verde indocianina viene impiegato in campo medico sfruttando le sue peculiarità quali la capacità di agire come colorante per evidenziare strutture vascolari e il suo metabolismo epatico. Una delle applicazioni è la valutazione della funzionalità epatica. La clearance dell'ICG dal sangue ad opera del fegato dipende dal flusso sanguigno, dall'uptake cellulare e dalla escrezione biliare; è simile a quella di numerose sostanze endogene ed esogene come per esempio bilirubina, ormoni, farmaci e tossine (2); per questo motivo testare la clearance epatica del verde indocianina riflette molti importanti parametri funzionali del fegato, tra cui la capacità dei trasportatori e il flusso di sangue che attraversa l'organo (7). È stato riportato che il valore ICG-R15 è un indicatore di funzione epatica più affidabile del Child-Pugh score nei pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca. In questi pazienti un alto valore di ICG-R15 correla con un alto tasso di mortalità (12). Inoltre, il test di clearance del verde indocianina è stato scoperto essere il miglior test preoperatorio per valutare la riserva di funzione epatica in pazienti con epatocarcinoma rispetto all'aminopirina breath test e al test di clearance degli aminoacidi (13). Il monitoraggio dell'eliminazione del verde indocianina è anche indicato nella valutazione della funzione epatica nei donatori di organi e riceventi nel contesto del trapianto di fegato (6).

l'ICG trova applicazione anche in oftalmologia, più precisamente nell'angiografia oculare. Permette di studiare anatomia e fisiologia nonché di mettere in evidenza condizioni patologiche di retina e coroide, tra cui neo-vascularizzazioni coroidali, vasculopatia polipoidale coroidale, corioretinopatia sierosa centrale, proliferazione angiomatosa retinica e condizioni infiammatorie. Queste condizioni si giovano della maggiore lunghezza d'onda del verde indocianina rispetto alla fluoresceina (14). Il verde indocianina si localizza nei vasi retinici e coroidali nella fase precoce dopo l'iniezione. Successivamente strava in nello stroma corioideale e si accumula nell'epitelio pigmentato retinico nel tempo permettendo di visualizzare un'omogenea fluorescenza di fondo in fase tardiva, in condizioni fisiologiche (15).

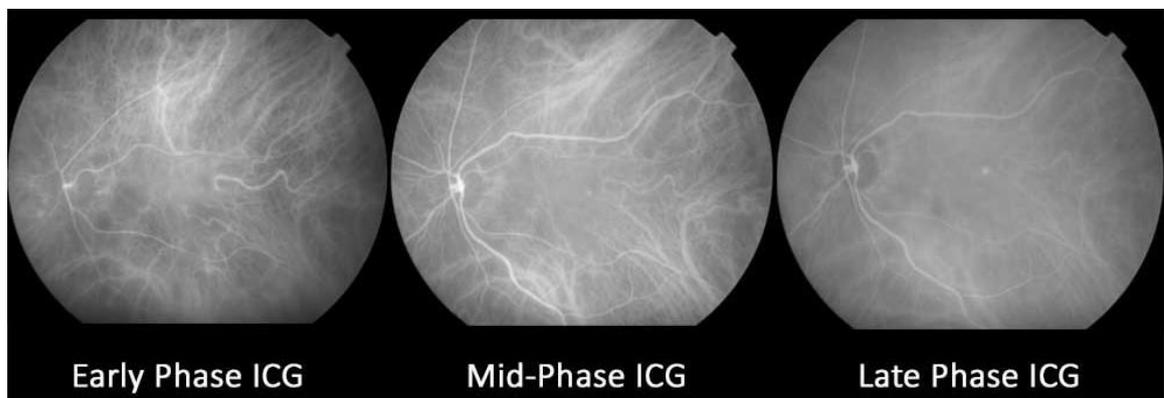


Figura 2.1.1 Fasi dell'angiografia oculare con verde indocianina

2.2 Utilizzo in campo chirurgico

In origine il processo diagnostico e terapeutico in campo chirurgico si basava sugli occhi e sulle mani del medico. Nel 1895 il fisico Wilhelm Röntgen mentre svolgeva esperimenti ottenne accidentalmente la prima immagine radiografica della storia, raffigurante la mano di sua moglie, scoprendo la radiografia (16)

Da allora dopo molti anni di miglioramenti in medicina le tecniche di imaging attualmente impiegate nella routine clinica possono essere suddivise in due segmenti principali, imaging radiologico e imaging ottico. L'imaging radiologico comprende raggi X, tomografia computerizzata (TC), ultrasuoni, risonanza magnetica (MRI) e tomografia a emissione di positroni (PET). Queste tecniche solo occasionalmente vengono impiegate per la chirurgia guidata dalle immagini. Vengono utilizzate principalmente per l'imaging preoperatorio, fondamentale per la pianificazione dell'intervento chirurgico ma possono portare a interpretazioni errate a causa dell'intervallo di tempo tra l'esecuzione dell'imaging e l'intervento chirurgico. L'imaging ottico invece include endoscopia, microscopia, laser e chirurgia basata sulla robotica. Nell'imaging ottico è fondamentale l'uso della luce nelle regioni dell'ultravioletto, luce visibile e vicino

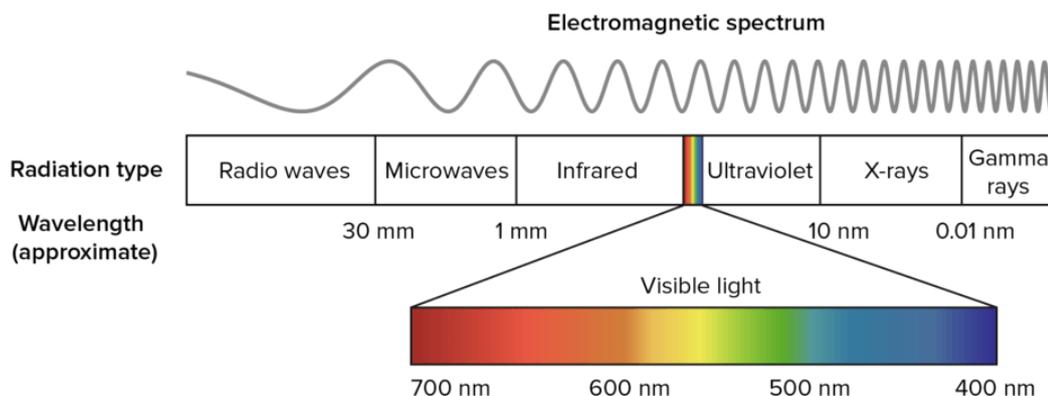


Figura 2.2.1 Spettro elettromagnetico

infrarosso dello spettro elettromagnetico. Questo permette diagnosi e rivalutazioni più frequenti dato che i pazienti non sono esposti a radiazioni ionizzanti. Grazie anche alla variabilità di assorbimento dei fotoni e diffusione della luce nei diversi tipi di tessuto, l'imaging ottico può differenziare tessuti sani da tessuti patologici sfruttando le proprietà dei tessuti molli (17). Una delle branche dell'imaging ottico è la chirurgia

guidata dalla fluorescenza (FGS) come tecnica di imaging intraoperatorio. Il termine chirurgia guidata dalla fluorescenza fa riferimento ad una tecnologia medica basata sull'imaging in tempo reale mirata ad aiutare e guidare il chirurgo. La pratica chirurgica è ancora basata sull'anatomia vista dal chirurgo con il supporto di luce bianca. Questo approccio non consente un'accurata differenziazione dei diversi tessuti; questi si presentano con varie tonalità dal bianco al rosa (ossa, nervi, cartilagini, grasso, tessuto connettivo) o dal rosso al rosso intenso (vasi sanguigni e organi come fegato milza e reni). Inoltre, lavorare attraverso un'interfaccia con telecamere e strumenti inseriti all'interno del corpo attraverso stretti condotti di ingresso (come per la chirurgia microinvasiva laparoscopica e robotica) ha sacrificato il feedback tattile che si aveva con il lavoro diretto sui tessuti, rendendo la chirurgia, prima basata anche sul tatto, ancora più dipendente dalla vista (18). Ciò porta a potenziali ambiguità durante la dissezione chirurgica. L'imaging chirurgico a fluorescenza promette di essere un potente miglioramento della tradizionale visualizzazione a luce bianca a basso contrasto, offrendo un'evidenziazione delineata in tempo reale di strutture anatomiche complesse. Una migliore visualizzazione dei tessuti porterà a una rimozione più completa della malattia, a una diminuzione delle lesioni involontarie alle strutture vitali e a una migliore identificazione dei tessuti danneggiati (19). Per questo motivo la chirurgia guidata dalla fluorescenza potrebbe rappresentare un importante contributo durante le procedure chirurgiche.

Al giorno d'oggi il verde indocianina è uno dei fluorofori (molecole in grado di emettere fluorescenza) più impiegati per riprodurre la fluorescenza near-infrared (NIR), ovvero in grado di emettere una radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda nello spettro della luce visibile quando stimolata tramite un'onda incidente nella gamma del vicino infrarosso (lunghezza d'onda tra i 600 e i 1000 nm). Le proprietà che la rendono un eccellente fluoroforo sono: breve emivita che consente applicazioni ripetute; sicurezza per il paziente vista la sua bassa tossicità; buon rapporto segnale/sfondo; permette di vedere sotto la superficie a una profondità di diversi millimetri; i dispositivi di imaging sono semplici da utilizzare e relativamente economici (20). Il verde indocianina ha molti impieghi in campo chirurgico; uno di questi è il poter permettere

l'esecuzione di una angiografia operatoria. A confronto con altre tecniche angiografiche (Raggi X, TC, MRI e PET) permette di ottenere informazioni in modo facile ed economico quando i vasi sanguigni sono esposti permettendo un'osservazione diretta. Dopo pochi minuti dalla somministrazione endovena del bolo di ICG si può effettuare l'imaging e dopo 15 minuti è già possibile svolgere nuovamente la procedura.

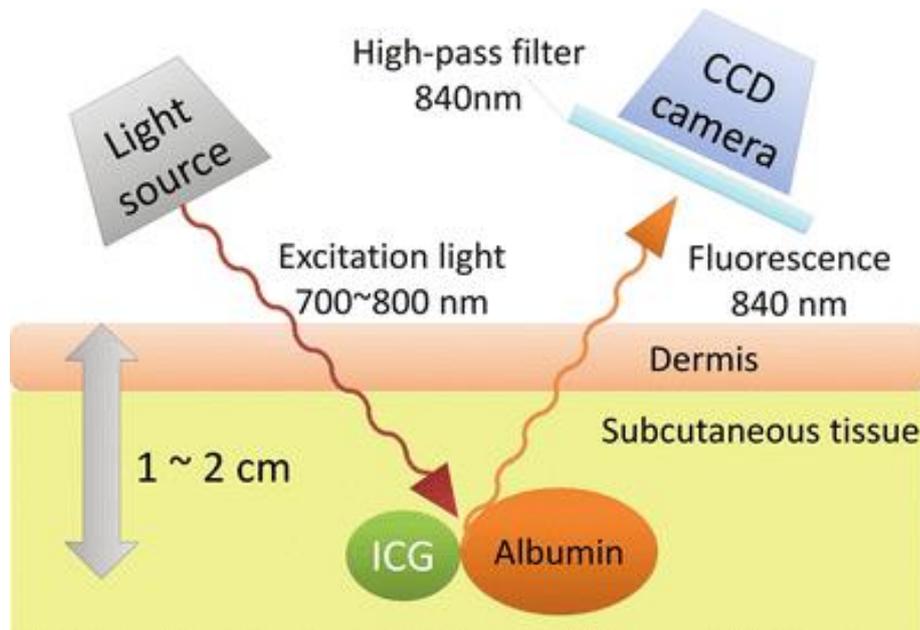


Figura 2.2.2 Schema della fluorescenza del verde indocianina nei tessuti

La neurochirurgia è uno dei campi in cui il verde indocianina ha trovato impiego, questo perché gli interventi sono già svolti tramite un microscopio e uno strumento di cattura delle immagini e perché i vasi sanguigni presenti sulla superficie del cervello sono molto esposti. In neurochirurgia serve principalmente ad escludere anomalie vascolari (principalmente aneurismi o malformazioni arterovenose) dalla circolazione o per valutare la rivascolarizzazione in caso di compromessa perfusione cerebrale (21). Anche la chirurgia coronarica è ideale per l'impiego dell'ICG per via della superficialità delle coronarie stesse. Durante questo tipo di chirurgia un aspetto chiave è ottenere la pervietà del vaso sanguigno per cui una verifica di ciò tramite angiografia coronarica intraoperatoria permette di osservare in tempo reale l'andamento dell'intervento.

Negli ultimi anni, l'uso della chirurgia guidata dalla fluorescenza ICG durante la colecistectomia laparoscopica è emerso come una nuova tecnologia che consente una migliore visualizzazione e identificazione in tempo reale delle strutture biliari

extraepatiche senza l'uso di radiazioni. Di conseguenza, è facilitata la corretta identificazione delle strutture vitali e delle aree ad alto rischio che dovrebbero essere osservate fino a quando la dissezione non consente di localizzare i punti di riferimento chiave. Un vantaggio dell'esecuzione routinaria della colangiografia fluorescente (FC) è la capacità di riconoscere il dotto biliare comune prima della dissezione; ciò si è rivelato utile non solo nel normale corso della procedura ma serve anche come misura precauzionale in presenza di variazioni anatomiche o in determinate condizioni (per esempio la presenza di tessuto infiammato o la presenza di una colecistite acuta) che aumenterebbero il rischio di danno iatrogeno (22).

La deiscenza anastomotica è una delle complicanze più importanti dopo la chirurgia coloretale. È ben noto che uno dei motivi principali di una perdita anastomotica è l'insufficiente perfusione tissutale che fa sì che l'anastomosi non guarisca correttamente. Per questo motivo, negli ultimi anni, abbiamo osservato un aumento del numero di centri che utilizzano l'ICG per valutare la perfusione durante l'anastomosi coloretale (23,24). Sulla base della ricerca in letteratura e dei risultati meta-analitici possiamo affermare che l'uso della fluorescenza ICG per valutare la perfusione durante la chirurgia coloretale riduce significativamente il rischio di perdite anastomotiche (25).

Tra le possibili applicazioni cliniche della chirurgia guidata dalla fluorescenza ICG, vi è la navigazione linfonodale e la linfografia in tempo reale per i tumori (26). Dopo l'iniezione sottomucosa, sottosierosa o intradermica, l'ICG si disperde nella linfa, si lega alle lipoproteine e viene drenato attraverso le vie linfatiche e i linfonodi. La linfografia fluorescente ICG risultante è uno strumento che potrebbe essere utilizzato per guidare il chirurgo nell'esecuzione di una linfadenectomia e resezione più precise e potrebbe essere un'opzione migliore per i risultati complessivi del paziente. Nella chirurgia coloretale, la linfografia fluorescente ICG è stata segnalata per valutare le vie linfatiche sia per valutare la presenza e il valore dei linfonodi sentinella sia, specialmente nella colectomia destra laparoscopica e nei tumori della flessura, per evidenziare un'area spartiacque attorno ai principali rami vascolari e facilitare una dissezione mesenterica più precisa (27).

L'obiettivo primario è la possibilità di eseguire una linfangiografia fluorescente ICG per la mappatura linfatica nel cancro del colon. In tutti i casi, la linfografia ICG è sicura e fattibile ed ha portato a un maggior numero di linfonodi recuperati (25).

La chirurgia guidata dalla fluorescenza ICG ha guadagnato popolarità anche come modalità di imaging intraoperatorio nella chirurgia epatobiliare negli ultimi dieci anni, con un gran numero di studi condotti nei paesi orientali, creando nuove interessanti prospettive. Tra le molteplici potenziali applicazioni in questo campo, l'imaging a fluorescenza si è dimostrato utile nell'identificazione di piccoli tumori sottocapsulari e superficiali, ma anche per migliorare l'identificazione di lesioni più profonde e per ottenere chiari margini di resezione; può anche essere utilizzato per visualizzare l'anatomia del dotto biliare extraepatico e i bordi segmentali epatici, aumentando l'accuratezza e la facilità dell'epatectomia a cielo aperto e minimamente invasiva soprattutto per la prevenzione delle perdite biliari post-operatorie (28).

Oltre che per la chirurgia del colon-retto, garantire una buona perfusione viscerale è probabilmente il fattore controllabile più importante per prevenire le deiscenze anastomotiche. L'angiografia fluorescente ICG è stata studiata anche per l'esofagectomia e la gastrectomia, in particolare per la valutazione della perfusione del condotto gastrico durante l'esofagectomia, poiché la perfusione del tubulo, specialmente nella parte prossimale, si basa esclusivamente sull'arteria gastroepiploica destra. La fluorescenza ICG potrebbe guidare i chirurghi nella stima dell'afflusso di sangue del segmento gastrico e nell'identificare il sito anastomotico ottimale (29).

La maggior parte degli studi ha riportato un cambio di strategia sul sito anastomotico pianificato, fino al 25% dei casi, quando la fluorescenza dell'ICG era considerata insoddisfacente; per quanto riguarda la valutazione della perfusione, studi più recenti hanno anche riportato, come esiti secondari, dati sulla valutazione quantitativa della perfusione grazie alla valutazione dell'intensità della fluorescenza o del tempo necessario per documentare una fluorescenza soggettiva accettabile sul condotto. Nel corso degli anni, il concetto di bacino linfatico è stato studiato, in particolare in relazione al carcinoma gastrico precoce, concentrandosi sulla mappatura linfatica della fluorescenza ICG con l'obiettivo di personalizzare la linfadenectomia chirurgica in base

allo stadio T del tumore, alle condizioni del paziente e al profilo di rischio (30). Alla luce di ciò che emerge dall'analisi degli studi a riguardo si può affermare che: durante la chirurgia del cancro gastrico, la mappatura linfatica fluorescente ICG mediante iniezione endoscopica prima dell'intervento chirurgico è sicura e fattibile e può portare all'identificazione e alla rimozione di un numero maggiore di linfonodi (Livello di evidenza: moderato). L'uso della mappatura linfatica fluorescente ICG durante la chirurgia del cancro gastrico può essere raccomandato per migliorare la linfadenectomia (Grado di raccomandazione: forte) (25).

L'imaging guidato dalla fluorescenza ICG nella chirurgia ginecologica è utilizzato principalmente per la dissezione del linfonodo sentinella nel cancro dell'endometrio e del collo dell'utero: infatti, l'identificazione accurata dei linfonodi sentinella nei pazienti con cancro migliora l'individuazione della malattia metastatica e potrebbe diminuire la morbilità chirurgica. In questo campo, la linfografia ICG ha già dimostrato di essere un metodo fattibile, sicuro, efficiente in termini di tempo e affidabile per la mappatura linfatica, con migliori tassi di rilevamento bilaterale; eviterebbe anche l'esposizione dei pazienti a traccianti radioattivi, e per questo motivo, in alcuni paesi, la mappatura del nodo sentinella dell'ICG è già diventata il gold standard. L'esperienza nel carcinoma vulvare è più limitata, con l'ICG utilizzato insieme al Tecnezio-99m come doppio tracciante e da solo nella linfadenectomia inguinale laparoscopica, mentre nel carcinoma ovarico in fase iniziale i risultati sono ancora preliminari ma promettenti (31).

Per quanto riguarda la chirurgia urologica, l'imaging in fluorescenza ICG è stato ampiamente esplorato da quando questa tecnologia è diventata disponibile nei sistemi robotici, ampiamente utilizzati in questa specialità chirurgica. La fluorescenza ICG si è rivelata utile durante la nefrectomia parziale robotica nel guidare il clampaggio selettivo/superselettivo delle arterie, mentre l'intensità di fluorescenza differenziale può svolgere un ruolo nel discernere tra tessuto renale patologico e normale con conseguente perdita minima del parenchima renale (solo fattibilità e studi preliminari disponibili su quest'ultima applicazione). La guida dell'ICG durante la prostatectomia radicale robotica e la cistectomia è stato scoperto assistere meglio i chirurghi nell'identificazione del drenaggio linfatico sia per la biopsia del linfonodo sentinella che

per la dissezione linfonodale estesa, dove diversi studi hanno dimostrato, come per i tumori gastrointestinali e ginecologici, un maggior numero di linfonodi rimossi rispetto all'imaging a luce bianca standard (32).

3. La biopsia linfonodale laparoscopica nella diagnostica delle malattie linfoproliferative

3.1 Linee guida e stato dell'arte

La presenza di una linfadenopatia addominale è un comune scenario clinico che i medici si trovano a dover affrontare. La sua presenza può rappresentare uno spettro di patologie che spaziano da una linfadenopatia reattiva benigna a patologie maligne come linfomi, sarcomi e diffusionsi metastatiche.

Quando la partenza della malattia è dai linfonodi addominali profondi abbiamo due opzioni: una radiologica ed una chirurgica. La prima si avvale della guida ecografica o TAC per prelevare tramite ago un frustolo di campione di tessuto patologico mentre la metodica chirurgica prevede un intervento normalmente con accesso laparoscopico. Quest'ultimo mira ad ottenere un prelievo di tessuto patologico tramite una biopsia che può essere incisione o escissionale garantendo una maggior quantità di tessuto per gli studi istopatologici necessari. La biopsia linfonodale percutanea guidata da ecografia o tomografia computerizzata spesso non fornisce tessuto sufficiente per la diagnosi istopatologica di un linfoma. La biopsia linfonodale laparoscopica (BLL) ha il vantaggio di ottenere l'intero linfonodo evitando l'invasività e tutte le possibili complicazioni di una laparotomia.

Ed è per questi motivi che secondo le attuali linee guida ESMO (European Society for Medical Oncology) e AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica) per effettuare diagnosi di malattia linfoproliferativa il "gold standard" consiste nell'effettuare una biopsia linfonodale escissionale. In casi particolari come assenza di linfonodi periferici palpabili, soggetti particolarmente anziani e/o con rilevanti comorbidità il tessuto su cui effettuare la biopsia deve essere ottenuto dai linfonodi addominali tramite un'ago-biopsia eco/TC guidata. Salvo casi particolari, quando le condizioni cliniche del paziente lo consentono, è utile effettuare un'ulteriore verifica biptica in caso di recidiva di malattia anche per accertarne un'eventuale progressione spesso associata a modificazioni delle caratteristiche bio-molecolari lesionali.

Per molti anni la chirurgia ha rappresentato l'unico approccio ad una corretta diagnosi e stadiazione in ogni caso di linfoma sospetto o precedentemente diagnosticato. All'inizio degli anni '80, tuttavia, tecniche più sofisticate come l'ago-biopsia eco/TC guidata e le biopsie percutanee sono state spesso impiegate per via della loro bassa morbilità e resa diagnostica accettabile.

Queste tecniche, tuttavia, possono talvolta essere rischiose a causa della vicinanza dei linfonodi a strutture vitali, ed il campione ottenuto è spesso piccolo e inadeguato per eseguire l'esame istopatologico ed i test immunohistochimici necessari. La resa diagnostica è del 64% per l'agoaspirato e dall'83% all'86% per l'ago biopsia.

Negli anni '90, tuttavia, le tecniche minimamente invasive sono state utilizzate per eseguire le stesse procedure chirurgiche una volta eseguite con chirurgia "a cielo aperto", con lo stesso, o ancora maggiore, visualizzazione del campo operatorio, e con l'ulteriore vantaggio di un minimo trauma chirurgico.

Ci sono pochi dati in letteratura che analizzino il valore clinico e diagnostico della BLL. Nel 1988, Salky descrisse la prima esperienza laparoscopica di biopsia retroperitoneale, ma è stato solo alla fine degli anni '90 che sono stati riportati buoni risultati. Oggi, prendendo in considerazione una esperienza cumulativa di 8 diversi centri, possiamo vedere che la resa diagnostica mediana della procedura è del 95% (range: 60% -100%; media 90%).

Con le moderne indagini di laboratorio, una percentuale di falsi negativi esiste ancora, senza tenere conto della tecnica di campionamento utilizzata. Questo perché nelle fasi iniziali della malattia, il campione di linfonodi può avere le caratteristiche di un fenomeno reattivo non neoplastico e potrà essere riconoscibile solo successivamente.

Negli anni '90, le tecniche minimamente invasive hanno iniziato ad essere utilizzate per eseguire le stesse procedure chirurgiche con visualizzazione simile o addirittura migliore del campo operatorio. Pertanto, l'eccellente accuratezza diagnostica è stata mantenuta, con il vantaggio aggiunto di minimo trauma chirurgico.

Questo approccio fornisce in modo sicuro tessuto adeguato a una valutazione istologica completa, superiore all'agobiopsia. La biopsia linfonodale è infatti

fondamentale per la diagnosi e un'adeguata classificazione del linfoma può essere effettuata solo sul tessuto linfonodale. Pertanto, è importante ottenere un intero linfonodo con conservazione della capsula.

Poiché il sottotipo istologico di linfoma porta con sé importanti informazioni su aspetti prognostici e terapeutici, una diagnosi specifica e la classificazione del linfoma richiede uno studio dell'architettura dei linfonodi, una valutazione immunofenotipica ed una valutazione del riarrangiamento genico. Inoltre, la biopsia consente di seguire la progressione della malattia, in particolare il verificarsi di potenziali ricadute o cambiamenti nella linea cellulare, consentendo così modifiche o conferme della terapia in corso.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno analizzato gli outcome della biopsia linfonodale laparoscopica (LLB) rispetto all'ago-biopsia percutanea imaging guidata (PB); ne emerge nel tempo una superiorità della LLB. Quando si sospetta una malattia linfoproliferativa e la linfadenopatia isolata localizzata all'addome è scarsamente accessibile alla biopsia percutanea, la laparoscopia è il mezzo chiave con cui effettuare diagnosi (33,34). A fronte di una maggiore invasività, la LLB rende possibile fare diagnosi in casi in cui la PB non sia realizzabile per via della vicinanza con parenchimi, grossi vasi o visceri cavi. Di recente ha fatto la sua comparsa la laparoscopia in single port. Questa rappresenta un'ulteriore evoluzione della chirurgia laparoscopica, nata con l'obiettivo di ridurre ulteriormente il trauma chirurgico riducendo il numero delle incisioni addominali (35).

3.2 Casistica di reparto

La biopsia linfonodale laparoscopica (BLL) è stata introdotta nel nostro reparto nell'aprile 1999. Da allora sono stati eseguiti 55 interventi (35 uomini e 20 donne, età media: 52 anni) di BLL per escludere o per seguire la progressione di un linfoma. Tutti i pazienti presentavano anomalie radiologiche alla TAC in forma di linfadenopatia intra-addominale (cioè, retroperitoneale e/o mesenterica) in assenza di linfadenopatie periferiche.

La tecnica utilizzata è stata per i primi 35 pazienti quella laparoscopica multi-port con l'impiego in media di 3 trocar. Dall'Ottobre del 2016 i successivi 20 pazienti sono stati operati tramite una tecnica laparoscopica single-port, ossia utilizzando un trocar unico. La BLL è stata eseguita con l'obiettivo di stabilire una diagnosi in 39 pazienti e per motivi di ristadiatione in 16 pazienti con una precedente diagnosi di linfoma. La procedura è stata completata in laparoscopia in 53 casi. Una conversione alla laparotomia è stata necessaria in 2 pazienti. In un caso, per difficoltà dovuta a una peritonite incapsulante che impediva la mobilizzazione dell'intestino e in un altro caso è stato dovuto alla dissezione emorragica di una linfadenopatia gigante alla biforcazione aortica. I dettagli delle procedure sono elencati nella Tabella 1.

Non si sono verificate complicanze postoperatorie maggiori e la mortalità è stata nulla. La degenza media in ospedale è stata di 2 giorni (da 1 a 6 giorni) e nella maggior parte dei casi con ricovero di una singola notte (one-day surgery). Venticinque pazienti erano affetti da linfoma non Hodgkin, 12 da linfoma di Hodgkin, 1 sarcoidosi, 8 pazienti avevano un'infiltrazione metastatica da tumori solidi e 9 pazienti avevano una linfadenopatia benigna. Nel 97% dei casi, la BLL ha fornito le informazioni necessarie per una corretta diagnosi, classificazione e per le decisioni terapeutiche successive.

Tabella 1	SPLB	MPLB	P-Value
Sesso F/M	8/12	12/23	0.678
Età, anni	53.7 (13)	51.5 (17)	0.299
Durata della chirurgia, min.	84 (31.7)	81.1 (22.2)	0.455
Trocar aggiunti, n (%)	1 (5)	0	0.188
Conversioni chirurgiche, n (%)	0	2 (5.7)	0.284
Drenaggi addominali posizionati, n (%)	0	1 (2.8)	0.454
Degenza in ospedale, giorni	1.7 (0.9)	2.1 (1.2)	0.455
Morbidity, pazienti (%)	1 (5)	0 0	0.188
Localizzazione della malattia (1/2/3/4) *	8/3/7/5	12/8/11/10	/
Rendimento diagnostico ottenuto, pazienti (%)	19 (95)	34 (97.1)	0.689

I valori indicati rappresentano la mediana, a meno che non indicato diversamente. SPLB: biopsia linfonodale laparoscopica single-port; MPLB: biopsia linfonodale laparoscopica multi-port.

*Localizzazione della malattia: 1 periaortica, 2 periliaca, 3 mesenterica, 4 legamento gastroepatico.

P-Value: livello di significatività osservato.

4. Studio clinico

4.1 Razionale e obiettivi

Le possibili difficoltà nell'effettuazione di una biopsia linfonodale laparoscopica, come sappiamo, sono spesso dovute alle piccole dimensioni del linfonodo, alla sua scarsa accessibilità a causa della sua posizione profonda ed infine alla colorazione dei suoi tessuti che spesso lo rendono difficile da distinguere dai tessuti circostanti.

Per questo motivo, la possibilità di facilitare il compito del chirurgo nella ricerca del tessuto patologico da biopsiare grazie alla colorazione di queste strutture con la fluorescenza potrebbe avere enormi vantaggi, non solo per la loro individuazione ma anche per la possibilità di effettuare il prelievo chirurgico su di un'area sicuramente vitale. Infatti, la fluorescenza manifestata dal tessuto patologico, indicando che il tessuto è vascolarizzato, eviterebbe falsi negativi dovuti al prelievo di aree tumorali necrotiche o di aree fibrose acellulari.

L'obiettivo primario dello studio è di valutare se l'uso della fluorescenza con verde indocianina per l'identificazione dei linfonodi durante la chirurgia addominale per la diagnosi/ristadiazione delle malattie linfoproliferative sia utile nel semplificare la ricerca dei linfonodi stessi, oltre a permettere di identificare con maggiore precisione la sede della biopsia. Gli obiettivi secondari mirano a valutare se l'impiego di tale colorante renda la tecnica della biopsia chirurgica laparoscopica più efficace rispetto alla metodica tradizionale. In particolare, si valuterà se la tecnica risulterà semplificata e se questo abbia un impatto sulla durata dell'intervento e sugli altri parametri di "outcome". Inoltre, verrà valutata l'accuratezza diagnostica del campione prelevato.

4.2 Disegno dello studio

Studio monocentrico, a braccio singolo, sull'uso del colorante verde Indocianina (ICG) nella chirurgia guidata dalla fluorescenza nella prima diagnosi/ristadiatione dei linfomi di origine addominale.

4.2.1 Piano di studio

I pazienti, di età superiore ai 18 anni, candidati alla dissezione linfonodale addominale per stabilire o confermare la diagnosi di malattia linfoproliferativa saranno sottoposti a screening con l'intento di arruolare pazienti da sottoporre a procedura di biopsia linfonodale laparoscopica guidata dal verde di indocianina. Dopo aver firmato il consenso informato e confermato la conformità ai criteri di inclusione ed esclusione, i pazienti saranno sottoposti a intervento chirurgico. Ogni paziente sarà seguito fino a 30 giorni dopo l'intervento per monitorare l'insorgenza di eventi avversi e/o complicanze post-operatorie.

4.2.2 Durata dello studio e fine della sperimentazione

Il periodo di arruolamento è di 24 mesi; la durata del follow-up è di 30 giorni. La durata massima dello studio sarà di 25 mesi. L'ultima valutazione dell'ultimo paziente sarà considerata la fine dello studio.

4.2.3 Endpoint primario

Verificare in quanti casi si ottiene la fluorescenza e quindi l'identificazione di almeno 2 linfonodi addominali dopo la somministrazione sottocutanea o perilesionale di ICG. Per definire la presenza di fluorescenza, la telecamera utilizzata in laparoscopia deve essere posta a una distanza di circa 5 cm dalle strutture (linfonodi, dotti linfatici, altre strutture come il tessuto adiposo). In caso di mancata colorazione dei linfonodi, verrà eseguita la procedura di "salvataggio" ("rescue") come descritto più avanti.

4.2.4 Endpoint secondari

La valutazione dell'efficacia della tecnica ICG rispetto alla tecnica standard (senza ICG) sarà effettuata confrontandola con un gruppo storico di pazienti trattati con biopsia linfonodale laparoscopica senza l'uso del colorante ICG. Per questo secondo parametro saranno presi in considerazione anche i pazienti sottoposti alla procedura di "salvataggio". Per il sottogruppo di pazienti sottoposti alla procedura di "salvataggio", verranno estrapolati gli stessi parametri per effettuare, come per il primo gruppo, un'analisi dell'efficacia dell'uso dell'ICG.

4.2.5 Criteri di inclusione ed esclusione

Criteri di inclusione:

- Età \geq 18 anni
- Assenza di controindicazioni cliniche alla chirurgia
- Assenza di linfonodi patologici accessibili a una biopsia chirurgica superficiale
- Indicazione alla dissezione linfonodale addominale per stabilire o confermare una diagnosi di malattia linfoproliferativa
- Capacità di comprendere e seguire le procedure dello studio
- Aver fornito il consenso firmato

Criteri di esclusione:

- Allergia nota al verde indocianina, allo ioduro di sodio o allo iodio.
- Iperfunzione della ghiandola tiroidea o tumore benigno della tiroide.
- Coagulopatia
- Gravidanza: le donne in premenopausa con potenziale fertile devono eseguire un test di gravidanza negativo prima dell'inclusione nello studio
- Grave insufficienza renale
- Assunzione dei farmaci elencati di seguito, in quanto possono alterare il modo in cui il verde indocianina viene assorbito dall'organismo e possono rendere la diagnosi imprecisa:

- anticonvulsivanti (farmaci antiepilettici)
- ciclopropano (farmaco anestetico)
- bisolfiti (conservanti)
- aloperidolo (farmaco antipsicotico)
- di morfina (farmaco narcotico)
- petidina (farmaco che allevia il dolore grave)
- metamizolo (farmaco antidolorifico)
- metadone (farmaco sostitutivo per il trattamento dei tossicodipendenti da oppiacei)
- morfina (farmaco che allevia il dolore intenso)
- nitrofurantoina (antibiotico)
- alcaloidi dell'oppio (farmaci antidiarroici)
- fenobarbital (farmaco antiepilettico e anestetico)
- fenilbutazone (farmaco antidolorifico)
- probenecid (farmaco per il trattamento della gotta)
- rifamicina (antibiotico)
- qualsiasi farmaco iniettabile contenente bisolfito di sodio (conservante)

4.2.6 Visite ed esami di controllo

Prima dell'intervento chirurgico il paziente dovrà necessariamente essere sottoposto ad uno screening radiologico con tomografia a emissione di positroni/tomografia computerizzata (PET)/(TC), con la quale verranno valutati i linfonodi patologici, la loro localizzazione e soprattutto il grado di SUV. Come da prassi consolidata, la biopsia deve essere eseguita sul tessuto patologico con il SUV più elevato.

Possiamo identificare principalmente tre aree anatomiche addominali: sottomesocolica, sopramesocolica e mesenterica.

- Nell'area sottomesocolica si identificano i linfonodi situati al di sotto del mesocolon trasverso, localizzati principalmente nella regione periaortica, dalla flessura duodeno-digiunale alla biforcazione aortica; comprende anche i

linfonodi situati lungo l'arteria iliaca comune, l'arteria iliaca esterna e interna, nonché i linfonodi paracavali.

- Nell'area sovramesocolica sono compresi i linfonodi periaortici del tronco celiaco e dei suoi assi arteriosi epatico, gastrico e splenico, l'asse retroportale e quello pancreatico.
- L'area mesenterica comprende i linfonodi dell'intero tratto mesenterico dell'intestino tenue, dal Treitz al cieco.

4.3 Strumentazione

Gli interventi vengono realizzati in laparoscopia (anche detta video-laparo-chirurgia) tecnica chirurgica minimamente invasiva che consiste nell'accedere alla cavità addominale e pelvica del paziente senza dover ricorrere alle grandi incisioni che sono invece richieste nella chirurgia tradizionale; attraverso piccole incisioni nella cavità addominale del paziente si inseriscono una telecamera e gli strumenti con cui eseguire le manovre di dissezione, taglio e sutura.

Per ottenere uno spazio sufficiente per eseguire la laparoscopia, che sia essa a scopo diagnostico o terapeutico, viene insufflato un gas inerte (principalmente anidride carbonica) nella cavità addominale generando uno pneumoperitoneo. Successivamente vengono introdotti gli strumenti attraverso dei dispositivi chiamati "trocar", delle cannule che permettono l'inserimento e l'estrazione degli strumenti. Recentemente sono stati creati trocar che permettono l'introduzione di più strumenti con angolazione differente che consentono di poter eseguire un'unica incisione, solitamente in corrispondenza della cicatrice ombelicale per un miglior risultato estetico.

La visibilità dell'interno della cavità è garantita da una telecamera che permette anche l'illuminazione del campo operatorio grazie ad una fonte luminosa ad essa collegata. Gli operatori possono controllare gli strumenti e gestire il campo operatorio utilizzando uno o più schermi che vengono disposti nella sala operatoria (come mostrato in Figura 4.3.1).

Gli strumenti utilizzati sono:

- Il laparoscopio, che contiene la telecamera e la fonte di luce, collegata con un cavo a fibra ottica
- La colonna laparoscopica, che comprende l'insufflatore per generare e mantenere lo pneumoperitoneo.
- Uno o più schermi per visualizzare il campo operatorio
- I trocar, cannule che permettono l'inserimento degli strumenti; hanno un diametro variabile tra i 5 e i 12 mm. Nel primo viene inserita l'ottica per facilitare l'accesso dei successivi.

- Gli strumenti chirurgici veri e propri come forbici, dissettori, porta-ago, porta-clip, pinze monopolari, elettrobisturi, aspiratore, suturatrice, endobag ecc. adattati per poter passare attraverso i trocar ed essere manovrati dall'esterno (alcuni esempi alla Figura 4.3.2).



Figura 4.3.1



Figura 4.3.2

Oltre alla classica strumentazione laparoscopica si utilizzano:

- Un dissettore che sfrutta la combinazione tra l'energia bipolare avanzata e l'energia ad ultrasuoni denominato Thunderbeat™ (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan) per la dissezione.

- Un sistema endoscopico clinico dedicato (Visera Elite II, Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan) dotato di sorgente luminosa a infrarossi (IR) e telescopio IR UHD per illuminare i linfonodi regionali (Figura 4.3.3).

Il nuovo sistema VISERA ELITE II offre diverse possibilità di osservazione come la Narrow Band Imaging (NBI) e imaging a infrarossi (IR). Queste tecnologie aiutano a migliorare le condizioni del paziente durante la diagnostica o l'intervento chirurgico.

Osservazione a infrarossi

Il sistema a infrarossi di Olympus fornisce, oltre alla modalità luce bianca, due diverse modalità IR.

Immagine a luce bianca



Modalità IR 1



- Luce bianca parziale e luce IR utilizzate contemporaneamente.
- Consente di eseguire interventi chirurgici con gli infrarossi mantenendo la qualità dell'immagine e il contrasto con l'ambiente.

Modalità IR 2



- Immagine fluorescente pura.
- Messa a fuoco e osservazione dell'area target eliminando le informazioni non necessarie.

La modalità di imaging può essere facilmente modificata premendo semplicemente un pulsante.



Una nuova ondata di possibilità per la diagnostica

La Narrow Band Imaging (NBI) di Olympus è una tecnologia ottica disponibile per una varietà di discipline mediche che consente di esplorare dettagliatamente pattern vascolari e della mucosa. Numerosi studi evidenziano il valore clinico della NBI, con particolare riguardo alla diagnosi del cancro e alla caratterizzazione di mucose sospette.

- Piattaforma multidisciplinare.
- Migliore qualità dei risultati grazie alla diagnosi precoce del cancro e delle alterazioni della mucosa.
- Maggiore accuratezza per il rilevamento delle lesioni maligne nella gestione di tumori uroteliali.
- Nessuna preparazione richiesta: utilizzabile con un semplice pulsante e nessun costo aggiuntivo.
- Ampia offerta di corsi di formazione disponibile per tutte le discipline mediche.

Come funziona l'NBI

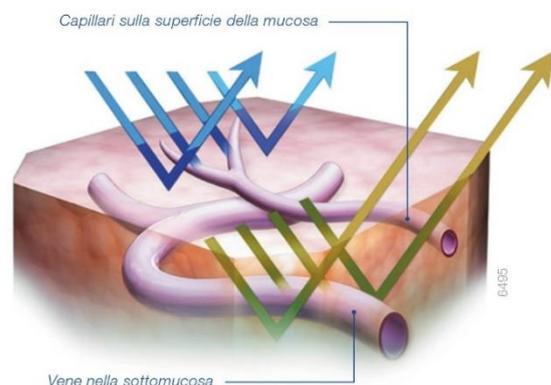
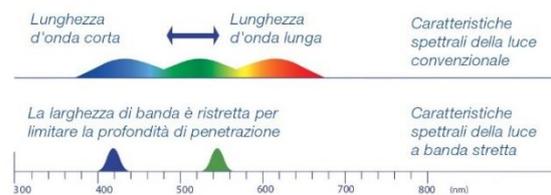


Figura 4.3.3

4.4 Tecnica chirurgica

L'intervento chirurgico per tutti i pazienti consiste in una biopsia laparoscopica del tessuto linfonodale, del linfonodo "in toto" o di un frammento di linfonodo o della placca linfomatosa in caso di tessuto linfatico extranodale patologico. La biopsia è mirata al sito con il SUV più elevato.

Per i linfonodi patologici localizzati nell'area sottomesocolica, l'iniezione di ICG deve essere eseguita in entrambe le regioni inguinali del paziente in posizione sottocutanea e, se ritenuto possibile, intranodale.

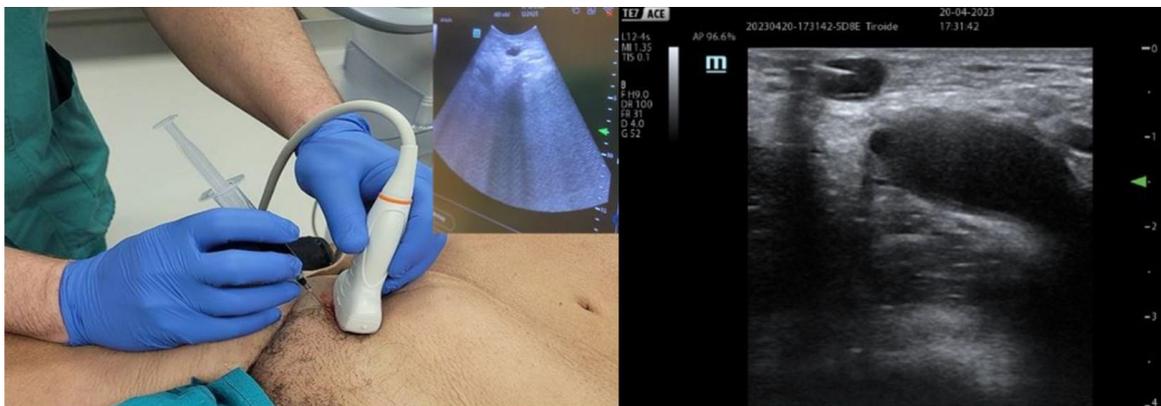


Figura 4.4.1 Iniezione intranodale in sede inguinale del verde indocianina sotto guida ecoscopica



Figura 4.4.2 Linfonodi fluorescenti dopo iniezione

Durante la procedura si utilizza una soluzione ottenuta diluendo una fiala da 25 g di verde indocianina in polvere (Verdye, Diagnostic Green GmbH, Aschheim-Dornach, Germania) con 10 ml di acqua sterile. La concentrazione della soluzione da iniettare è mantenuta costante per tutti i pazienti dello studio. Il sito di somministrazione del colorante ICG varia in base alla sede anatomica del campione da prelevare. In caso di biopsia dei linfonodi sottomesocolici, l'iniezione di 2 ml della suddetta soluzione viene

effettuata in ciascuna delle regioni inguinali, in posizione sottocutanea/intra linfonodale. In caso di biopsia dei linfonodi sopramesocolici e mesenterici si effettua un'iniezione di 2 mL nel peritoneo in prossimità dei linfonodi patologici (cioè, perilesionale). La somministrazione endovenosa della soluzione precedentemente descritta ai dosaggi normalmente utilizzati per questa via di somministrazione (0,5 mg/kg) può essere invece eseguita per 2 motivi: in caso di mancata colorazione dei linfonodi attraverso le vie sopracitate, eseguendo una "procedura di salvataggio" (rescue) oppure in caso di voluminosa lesione linfatica in cui la fluorescenza non ha lo scopo di facilitare la ricerca linfonodale bensì quello di eseguire la biopsia in una zona vitale (come mostrato in figura 4.4.3).



Figura 4.4.3

L'intervento chirurgico inizia con la creazione dello pneumoperitoneo attraverso l'ombelico con una tecnica "open"; si inserisce un trocar da 10 mm per alloggiare l'ottica con angolo di 30°. Un trocar da 10 mm si inserisce nella fossa iliaca destra ed un trocar da 5 mm nell'ipocondrio destro.

Il chirurgo e l'aiuto che tiene la telecamera si trovano sul lato destro del paziente. Il lettino è inclinato a destra e in leggera posizione di Trendelenburg. Sfruttando il drenaggio linfatico che dai linfonodi inguinali superficiali si dirige prima verso i linfonodi iliaci esterni, poi verso i linfonodi pelvici e infine verso i linfonodi para-aortici, 20 minuti circa dopo l'iniezione si possono osservare i linfonodi colorati con ICG nella sottosierosa

lungo questi vasi. Le linfadenopatie para-aortiche vengono raggiunte mediante un'incisione del peritoneo che copre la parte superiore dell'arteria iliaca comune destra. Questa incisione viene portata lungo il limite sinistro dell'aorta, appena sopra l'arteria mesenterica inferiore.

Per la dissezione si utilizza un dispositivo Thunderbeat™ (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Giappone). Per elicitarne la fluorescenza dei linfonodi regionali si utilizza un sistema endoscopico dedicato (Visera Elite II, Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Giappone) dotato di sorgente luminosa a infrarossi (IR) ed un'ottica IR UHD.



Figura 4.4.4 Posizionamento del chirurgo

In caso di biopsia dei linfonodi sopramesocolici, il chirurgo si posiziona tra le gambe del paziente ed il lettino operatorio è posizionato in leggero anti-Trendeleburg. La telecamera viene inserita all'ombelico e altri due trocar vengono aggiunti al fianco destro e sinistro. L'iniezione della soluzione ICG si effettua nel grasso peri-lesionale attraverso un catetere dotato di un ago, introdotto attraverso un trocar. L'intervento chirurgico per tutti i pazienti consiste in una biopsia laparoscopica del tessuto linfatico. I

piccoli linfonodi possono essere prelevati "in toto" realizzando una biopsia escissionale; se il tessuto patologico si presenta sotto forma di placca linfomatosa dovuta alla fusione di più linfonodi o in caso di tessuto linfatico extranodale patologico occorrerà eseguire una biopsia incisionale.

4.5 Analisi statistica

I pazienti saranno seguiti per 30 giorni dopo l'intervento per monitorare l'insorgenza di eventi avversi e/o complicanze postoperatorie.

La procedura diagnostica sperimentale basata sulla somministrazione sottocutanea o perilesionale di ICG, sarà considerata clinicamente utile se associata a un tasso di successo superiore al 70%. Per successo si intende la capacità di determinare la fluorescenza e l'identificazione di almeno due linfonodi addominali. Il gruppo di controllo storico sarà identificato retrospettivamente consisterà in procedure diagnostiche eseguite senza l'uso di verde indocianina o di qualsiasi altro colorante nei due anni precedenti l'inizio dell'arruolamento prospettico.

Tutte le analisi statistiche sugli endpoint primari e secondari saranno eseguite sulla popolazione dei casi arruolati in cui sarà completata la prima somministrazione di ICG sottocutaneo.

La stima puntuale del tasso di successo sarà riportata come rapporto tra il numero di successi osservati e il numero totale di pazienti operati. Verrà inoltre riportato l'intervallo di confidenza del 90% della stima puntuale.

La durata della procedura chirurgica, il numero di trocar utilizzati nella procedura e il numero di trocar eventualmente aggiunti, la perdita di sangue e la durata della degenza saranno descritti come media, deviazione standard, mediana e range interquartile. Il confronto della distribuzione di questi risultati tra il gruppo sperimentale e il gruppo di controllo storico sarà eseguito secondo il test non parametrico di Wilcoxon Mann Whitney.

Verrà riportata la percentuale di casi in cui sarà necessario il posizionamento di un drenaggio addominale e la conversione chirurgica, nonché la percentuale di biopsie positive. Il confronto della distribuzione di questi risultati tra il gruppo sperimentale e quello di controllo storico sarà effettuato mediante il test del chi quadrato per l'eterogeneità o il test esatto di Fisher, se appropriato.

Per ogni paziente arruolato nel gruppo sperimentale verranno raccolti i seguenti dati:

- Caratteristiche del paziente
 - Età
 - Sesso
 - BMI
 - Classificazione ASA
 - Comorbilità
 - Indicazione chirurgica (prima diagnosi / ristadiatione)
 - Terapie concomitanti
- Dati preoperatori
 - Localizzazione della malattia alla TAC
 - Valore SUV alla PET/TC (valore minimo e massimo)
 - Valore SUV alla PET/TC nel sito di biopsia previsto
 - Dose di ICG somministrata (mg / kg)
 - Tempi di somministrazione dell'ICG: minuti tra la somministrazione e la comparsa della fluorescenza nelle strutture interessate.
- Dati intraoperatori
 - Data e durata dell'intervento
 - Numero di trocar utilizzati nell'intervento
 - Numero di trocar eventualmente aggiunti a causa di difficoltà operatorie
 - Perdita ematica stimata
 - Posizionamento del drenaggio addominale (si/no)
 - Necessità di conversione chirurgica e cause
 - Tipo di biopsia: escissione (intero linfonodo) o biopsia incisionale; posizione anatomica
 - Sito di iniezione dell'ICG e quantità somministrata
 - Comparsa della fluorescenza nel sito biotico in relazione alla via di somministrazione dell'ICG e tempo di latenza
- Dati postoperatori
 - Durata della degenza dopo l'intervento (notti)

- Complicanze post-operatorie (complicanze che si verificano durante il ricovero e comunque non oltre i 30 giorni)
- Diagnosi istologica
- Valutazione soggettiva del contributo diagnostico della fluorescenza alla procedura chirurgica.
- Per il gruppo storico verranno raccolti i seguenti dati:
 - Età al momento dell'intervento
 - Genere
 - Durata dell'intervento dall'incisione cutanea alla chiusura della cute
 - Numero di trocar utilizzati nell'intervento
 - Numero di trocar eventualmente aggiunti a causa di difficoltà operative
 - Perdita ematica stimata
 - Posizionamento del drenaggio addominale
 - Necessità di conversione chirurgica e cause
 - Durata della degenza dopo l'intervento (notti)
 - Complicanze post-operatorie (complicanze che si verificano durante il ricovero e comunque non oltre i 30 giorni)

5. Casistica di reparto

5.1 Materiali e metodi

Nell'ottobre 2021, la biopsia linfonodale laparoscopia guidata dalla fluorescenza (BLLGF) è stata introdotta per la prima volta nella nostra divisione. Da allora i dati relativi alle procedure eseguite sono stati raccolti in un database prospettico. Le caratteristiche cliniche dei pazienti includevano sesso, età, precedenti interventi chirurgici addominali e comorbilità associate. Lo scopo della biopsia era stabilire una diagnosi o confermare la progressione del linfoma. Tutti i pazienti presentavano una linfadenopatia intra-addominale in assenza di linfadenopatia accessibile a una biopsia superficiale. Il work-up preoperatorio comprendeva una tomografia computerizzata (TC) e una tomografia a emissione di positroni (PET) per tutti i pazienti.

Secondo la tecnica chirurgica descritta più sopra, per ogni paziente è stata valutata la comparsa di fluorescenza dopo iniezione sottocutanea, perilesionale ed endovenosa. L'operatore dovrà dare una valutazione soggettiva del contributo diagnostico della fluorescenza alla procedura chirurgica su 3 gradi (utile, inutile o dannosa).

Verranno indicate poi diagnosi istologica e accuratezza diagnostica (percentuale di casi di biopsia diagnostica sul totale delle procedure). Il prelievo bioptico sarà considerato contributivo per la diagnosi quando cade su tessuto linfatico vitale e non su tessuto necrotico, acellulare o fibroso. Infine, verranno presi in considerazione i parametri di outcome della procedura per determinare la validità della tecnica ed una analisi comparativa con una serie storica di pazienti sottoposti a BLL senza ICG.

5.2. Risultati e analisi statistica

Da ottobre 2021 a maggio del 2023 sono state registrate 16 procedure di BLL guidata dalla fluorescenza. Il rapporto tra i sessi era di nove maschi e sette femmine. L'età media dei pazienti era di 61,6 anni (range: 38-77 anni). Il BMI medio dei pazienti era 26,6 (intervallo: 20,4-38,7). Una pregressa chirurgia addominale era presente in sette pazienti. La BLLGF è stata completata per via laparoscopica in 15 casi. In un caso è stata necessaria una conversione laparotomica a causa di sanguinamento e in questo paziente è stato lasciato un drenaggio addominale. Nella maggior parte dei casi sono stati necessari tre trocar; tuttavia, tre pazienti hanno necessitato di un trocar supplementare per esporre meglio il campo chirurgico. La perdita ematica stimata è stata nulla in tutti i pazienti tranne in quello convertito dalla laparoscopia alla laparotomia.

I linfonodi addominali campionati erano sottomesocolici (periiliaci, periaortici) in 13 casi e sovramesocolici (tronco celiaco, peduncolo epatico ecc.) in 3. La biopsia è stata escissionale in 9 casi, incisionale in 4 casi ed entrambi i metodi sono stati utilizzati in 3 casi. I dati clinici dei pazienti sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Dati clinici dei pazienti (n=16)	
Sesso, F/M	7/9
Età, anni (media)	61,6
BMI (media)	26,6
Scopo biopsia: diagnosi/ristadiazione	7/9
Durata procedura, minuti (mediana)	80
Numero di trocar utilizzati/aggiunti (mediana)	3/0
Perdita ematica stimata, ml (mediana)	0
Conversione chirurgica: n (%)	1 (6,3%)
Posizionamento di drenaggi addizionali: n (%)	1 (6,3%)
Tipo di biopsia: incisionale/escissionale/entrambe	4/9/3
Durata degenza: (mediana)	1,5
Morbidity: n (%)	1 (6,3%)
Accuratezza diagnostica: n (%)	16/16 (100%)

Complessivamente è stata ottenuta la fluorescenza del sito da prelevare in 13 pazienti (81,2%). Poiché alcuni pazienti hanno avuto una iniezione in più siti, di solito 2, la fluorescenza ottenuta in base al sito di iniezione utilizzato è stata di 15 su 23 siti di iniezione testati (65,2%). (Tabelle 3-5)

Tabella 3. Comparsa di fluorescenza Overall	
In base al sito di iniezione; n=23, (%)	15/23 (65,2%)
Nei singoli pazienti; n=16, (%)	13/16 (81.2%)

Tabella 4. Linfonodi sovramesocolici (tripode, ped epatico etc) n=3	
Comparsa di fluorescenza dopo somm. perilesionale di ICG	0/2
Comparsa di fluorescenza dopo somm. ev di ICG	2/3

Tabella 5. Linfonodi sottomesocolici (periaortici, periliaci) n=13	
Comparsa di fluorescenza dopo somm. inguinale sc di ICG 24h prima	3/3
Comparsa di fluorescenza dopo somm. inguinale sc di ICG perioperatoria	7/9
Comparsa di fluorescenza dopo somm. ev di ICG	3/6

La durata mediana dell'intervento è stata di 80 minuti (range: 60-160 min). La durata media del ricovero è stata di 2,4 giorni (range: 1-11 giorni). Si è avuta una sola complicanza in un paziente non direttamente legata alla procedura. Infatti, in tale paziente la degenza postoperatoria è stata prolungata a undici giorni per via dello sviluppo di un'ostruzione ureterale completa a seguito della compressione tumorale che ha necessitato il confezionamento di una nefrostomia e il posizionamento di uno stent. Una scansione preoperatoria con tomografia a emissione di positroni/tomografia computerizzata (PET/TC) ha mostrato tessuto linfomatoso solido che avvolgeva la porzione terminale dell'aorta addominale sotto-renale e l'arteria iliaca comune sinistra.

In 9 pazienti la BLLGF è stata utilizzata per seguire la progressione di una malattia linfoproliferativa ed in 7 pazienti per stabilire una diagnosi. La diagnosi istopatologica è

stata: linfoma non-Hodgkin in 11 pazienti, reazione infiammatoria specifica in 3 pazienti e metastasi da carcinoma prostatico in 2 casi, rispettivamente.

In tutti i casi la BLLGF è stata in grado di fornire una completa accuratezza diagnostica (16/16, 100%) ottenendo campioni adeguati di tessuto linfatico e una diagnosi corretta con il raggiungimento delle successive decisioni terapeutiche.

Tabella 6. Diagnosi istopatologica		
Prima diagnosi (n=7)	Linfoma non-Hodgkin	4/7
	Metastasi da tumore solido (prostata)	1/7
	Linfonodo privo di neoplasia (iperplasia mista)	2/7
Re-staging (n=9)	Linfoma non-Hodgkin	7/9
	Metastasi da tumore solido (prostata)	1/9
	Linfonodo privo di neoplasia (iperplasia mista)	1/9

L'operatore che ha eseguito tutte le procedure di BLLGF ha dato poi una valutazione soggettiva del contributo diagnostico della fluorescenza alla procedura chirurgica, distinto in 3 gradi: utile, inutile o dannosa. Il contributo dato dall'utilizzo del verde indocianina e la successiva fluorescenza è risultato utile in 13 casi su 16, inutile nei restanti 3. In questi ultimi casi in cui non è stato utile, 2 interessavano i linfonodi sottomesocolici ed uno i sovramesocolici ed anche la procedura "rescue" non aveva dato esito.

Occorre poi sottolineare che negli ultimi 3 pazienti della serie, che presentavano linfadenopatie sottomesocoliche da biopsiare, vi è stata una variazione nei tempi di somministrazione della iniezione inguinale del verde indocianina. Infatti, si è passati da una iniezione effettuata 20-30 minuti prima della procedura ad una iniezione realizzata 24 ore circa prima. In questi ultimi pazienti si è sempre ottenuta la fluorescenza dei linfonodi interessati senza necessità di effettuare procedure "rescue".

6. Discussione

La suddivisione dei siti linfonodali addominali coinvolti nella biopsia laparoscopica riflette essenzialmente le diverse vie del flusso linfatico. Infatti, per i linfonodi sottomesocolici l'iniezione del colorante è avvenuta nella regione inguinale. Tuttavia, questa via di somministrazione non è efficace per i sovramesocolici, poiché le vie del flusso linfatico sono più complesse.

Purtroppo, per questi ultimi l'iniezione nelle regioni adiacenti ai linfonodi si è rivelata inefficace nella colorazione dei linfonodi e in due casi su tre la colorazione è stata ottenuta solo dopo l'iniezione endovenosa, cioè con la "procedura di salvataggio".

L'iniezione sottocutanea all'inguine si è dimostrata sicuramente più efficace nei casi di linfonodi sottomesocolici patologici. Infatti, in 10 casi su 12, le catene para-iliache e periaortiche erano colorate, il che ha facilitato il prelievo. In 6 pazienti è stata effettuata anche una iniezione endovenosa di ICG ottenendo la fluorescenza in 3 casi. Va notato che in questi ultimi casi la malattia si presentava sotto forma di una grande massa tumorale e di origine extra-linfonodale.

L'interessamento extranodale è presente nel linfoma in circa il 25-40% dei casi e può coinvolgere quasi tutti gli organi (36). Ciò potrebbe spiegare la mancanza di colorazione vitale poiché il tessuto linfomatoso extranodale è escluso dal drenaggio linfatico e potrebbe limitare ulteriormente l'utilità del colorante nel rilevare i linfonodi patologici. Tuttavia, nel nostro caso, era obbligatorio eseguire una biopsia sulla lesione più grande poiché aveva il SUV più alto ed era, quindi, in grado di fornire le migliori indicazioni diagnostiche (37).

Un'altra peculiarità osservata durante la biopsia laparoscopica di linfonodi sottomesocolici patologici è stata la possibilità che i linfonodi fortemente ingranditi a causa della malattia costituiscano uno "stop" del flusso ascendente del colorante, impedendone l'ingresso nel linfonodo stesso e nella catena linfatica immediatamente a valle.

Attualmente non è noto se il colorante venga trattenuto dal linfonodo patologico come in quelli sani. Nel cancro colo-rettale o gastrico, dopo l'iniezione peri-tumorale di ICG, il colorante segue le vie linfatiche e colora i linfonodi che trova lungo i collettori. La presenza di cellule tumorali all'interno del linfonodo metastatico non sembra diminuire l'intensità della colorazione (38).

Tuttavia, questa affermazione non è univoca. È stato osservato che metastasi linfonodali diffuse inducono un'ostruzione dei canali linfatici e il drenaggio linfatico viene bypassato verso altri linfonodi (non sentinella) (39). Forse una possibile soluzione sarebbe quella di iniettare il colorante 24 ore prima della procedura per dargli la possibilità di risalire nei dotti linfatici anche se il flusso è patologicamente rallentato. Infatti, quando si deve eseguire una mappatura dei linfonodi come quella eseguita in chirurgia gastrica, un'iniezione sottomucosa peri-tumorale del colorante avviene 24 ore prima per via endoscopica. In questi casi la visualizzazione avviene a causa della persistenza del colorante anche molto tempo dopo l'iniezione (40).

Proprio seguendo questo principio abbiamo eseguito negli ultimi 3 pazienti della serie con linfonodi sottomesocolici patologici, una iniezione inguinale bilaterale 24 ore prima della procedura chirurgica. In effetti i linfonodi patologici, benché ingranditi dalla malattia si sono resi fluorescenti in tutti i casi, anche se con una colorazione più tenue del solito. La fluorescenza ha comunque reso più semplice il reperimento e l'effettuazione della biopsia chirurgica.

Venendo all'endpoint primario dello studio che mirava a valutare se la procedura diagnostica sperimentale basata sulla somministrazione sottocutanea o perilesionale di ICG, sia da considerarsi clinicamente utile in quanto associata a un tasso di successo superiore al 70%, l'obiettivo è stato raggiunto. In tutti i pazienti è stato raccolto un campione di tessuto linfonodale vitale utile alla diagnosi. Non si sono verificati campionamenti insufficienti per quantità o per qualità.

La valutazione dell'efficacia della tecnica di BLLGF rispetto alla tecnica standard (senza ICG) ossia di un gruppo storico di pazienti trattati con biopsia linfonodale laparoscopica senza l'uso del colorante ICG rappresentava l'endpoint secondario dello

studio. Ad oggi però l'esiguità dei casi della metodica con ICG ci darebbe risposte statisticamente poco attendibili per cui occorrerà attendere un arruolamento di casi più cospicuo eventualmente anche oltre quella che era prevista come durata massima dello studio di 25 mesi.

Complessivamente la metodica di BLL associate alla fluorescenza con ICG si è rivelata molto utile assicurando un più facile reperimento dei linfonodi patologici nel 81.2 % dei casi e quindi un prelievo più rapido e sicuro. Questo vantaggio è tanto più grande quanto più piccoli sono i linfonodi.

Nelle masse linfomatose extra-nodali dove la difficoltà non è il reperimento della lesione viste le dimensioni talvolta enormi della stessa, l'utilità della colorazione potrebbe avere il significato di indirizzare il prelievo bioptico in una zona fluorescente e come tale vascolarizzata e vitale. Ciò eviterebbe tutti i prelievi non diagnostici perché ottenuti su tessuto patologico necrotico o fibroso che non porterebbero alla necessaria diagnosi.

7. Conclusioni

In conclusione, lo studio ha dimostrato che il tropismo elettivo del colorante verde indocianina verso i linfonodi è mantenuto anche nei casi di malattia linfonodale primitiva.

Venendo all'endpoint primario dello studio che mirava a valutare se la procedura diagnostica sperimentale basata sulla somministrazione sottocutanea o perilesionale di ICG, sia da considerarsi clinicamente utile in quanto associata a un tasso di successo superiore al 70%, l'obiettivo è stato raggiunto. In tutti i pazienti è stato raccolto un campione di tessuto linfonodale vitale utile alla diagnosi. Non si sono verificati campionamenti insufficienti per quantità o per qualità.

La valutazione dell'efficacia della tecnica di BLLGF rispetto alla tecnica standard (senza ICG) ossia di un gruppo storico di pazienti trattati con biopsia linfonodale laparoscopica senza l'uso del colorante ICG rappresentava l'endpoint secondario dello studio. Ad oggi però l'esiguità dei casi della metodica con ICG ci darebbe risposte statisticamente poco attendibili per cui occorrerà attendere un arruolamento di casi più cospicuo eventualmente anche oltre quella che era prevista come durata massima dello studio di 25 mesi.

Complessivamente la metodica di BLL associate alla fluorescenza con ICG si è rivelata molto utile assicurando un più facile reperimento dei linfonodi patologici nel 81.2 % dei casi e quindi un prelievo più rapido e sicuro. Questo vantaggio è tanto più grande quanto più piccoli sono i linfonodi.

Nelle masse linfomatose extra-nodali dove la difficoltà non è il reperimento della lesione viste le dimensioni talvolta enormi della stessa, l'utilità della colorazione potrebbe avere il significato di indirizzare il prelievo bioptico in una zona fluorescente e come tale vascolarizzata e vitale. Ciò eviterebbe tutti i prelievi non diagnostici perché ottenuti su tessuto patologico necrotico o fibroso che non porterebbero alla necessaria diagnosi.

Anche l'accuratezza diagnostica si è dimostrata molto alta e superiore ai dati della letteratura riguardanti la biopsia chirurgica, poiché in tutti i pazienti è stato raccolto un campione di tessuto linfonodale vitale utile alla diagnosi. Non si sono verificati campionamenti insufficienti per quantità o per qualità.

In conclusione, la fluorescenza indotta da ICG in corso di BLL sembra fornire diversi vantaggi, consentendo sia di identificare meglio l'anatomia chirurgica sia di ridurre potenzialmente il tempo chirurgico grazie a una dissezione più sicura. Ulteriori studi con ampie casistiche sono necessari per confermare questi dati promettenti.

8. Bibliografia

1. Moody ED, Viskari PJ, Colyer CL. Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 1999 Jun 11;729(1):55–64.
2. Wissler EH. Identifying a long standing error in single-bolus determination of the hepatic extraction ratio for indocyanine green. *Eur J Appl Physiol.* 2011 Apr;111(4):641–6.
3. Schneider PD. Preoperative assessment of liver function. *Surg Clin North Am.* 2004 Apr;84(2):355–73.
4. Faybik P, Hetz H. Plasma disappearance rate of indocyanine green in liver dysfunction. *Transplant Proc.* 2006 Apr;38(3):801–2.
5. Mordon S, Devoisselle JM, Soulie-Begu S, Desmettre T. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res.* 1998 Mar;55(2):146–52.
6. Hoekstra LT, de Graaf W, Nibourg GAA, Heger M, Bennink RJ, Stieger B, et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. *Ann Surg.* 2013 Jan;257(1):27–36.
7. de Graaf W, Häusler S, Heger M, van Ginhoven TM, van Cappellen G, Bennink RJ, et al. Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol.* 2011 Apr;54(4):738–45.
8. Sathirakul K, Suzuki H, Yasuda K, Hanano M, Tagaya O, Horie T, et al. Kinetic analysis of hepatobiliary transport of organic anions in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Jun;265(3):1301–12.
9. Desmettre T, Devoisselle JM, Mordon S. Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Surv Ophthalmol.* 2000 Jul 15;45(1):15–27.
10. Tajima Y, Murakami M, Yamazaki K, Masuda Y, Kato M, Sato A, et al. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging during laparoscopic surgery in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010 Jul;17(7):1787–93.
11. Lu CH, Hsiao JK. Indocyanine green: An old drug with novel applications. *Tzu-Chi Med J.* 2021 Apr 1;33(4):317–22.
12. Paumgartner G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz Med Wochenschr.* 1975;105(17 Suppl):1–30.

13. Lau H, Man K, Fan ST, Yu WC, Lo CM, Wong J. Evaluation of preoperative hepatic function in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Br J Surg.* 1997 Sep;84(9):1255–9.
14. Yannuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina Phila Pa.* 1992;12(3):191–223.
15. Chen L, Yang P, Curcio CA. Visualizing lipid behind the retina in aging and age-related macular degeneration, via indocyanine green angiography (ASHS-LIA). *Eye.* 2022 Sep;36(9):1735–46.
16. Scatliff JH, Morris PJ. From Roentgen to magnetic resonance imaging: the history of medical imaging. *N C Med J.* 2014;75(2):111–3.
17. National Research Council (US) and Institute of Medicine (US) Committee on the Mathematics and Physics of Emerging Dynamic Biomedical Imaging. *Mathematics and Physics of Emerging Biomedical Imaging* [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1996 [cited 2023 Feb 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232487/>
18. Nguyen QT, Tsien RY. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge. *Nat Rev Cancer.* 2013 Sep;13(9):653–62.
19. Orosco RK, Tsien RY, Nguyen QT. Fluorescence Imaging in Surgery. *IEEE Rev Biomed Eng.* 2013;6:178–87.
20. Egloff-Juras C, Bezdetnaya L, Dolivet G, Lassalle HP. NIR fluorescence-guided tumor surgery: new strategies for the use of indocyanine green. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:7823–38.
21. Catapano G, Sgulò F, Laleva L, Columbano L, Dallan I, de Notaris M. Multimodal use of indocyanine green endoscopy in neurosurgery: a single-center experience and review of the literature. *Neurosurg Rev.* 2018 Oct;41(4):985–98.
22. Pesce A, Piccolo G, Greca GL, Puleo S. Utility of fluorescent cholangiography during laparoscopic cholecystectomy: A systematic review. *World J Gastroenterol WJG.* 2015 Jul 7;21(25):7877.
23. Meyer J, Joshi H, Buchs NC, Ris F, Davies J. Fluorescence angiography likely protects against anastomotic leak in colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Surg Endosc.* 2022 Oct 1;36(10):7775–80.
24. Blanco-Colino R, Espin-Basany E. Intraoperative use of ICG fluorescence imaging to reduce the risk of anastomotic leakage in colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Tech Coloproctology.* 2018 Jan 1;22(1):15–23.

25. Cassinotti E, Al-Taher M, Antoniou SA, Arezzo A, Baldari L, Boni L, et al. European Association for Endoscopic Surgery (EAES) consensus on Indocyanine Green (ICG) fluorescence-guided surgery. *Surg Endosc.* 2023 Mar;37(3):1629–48.
26. Burghgraef TA, Zweep AL, Sikkenk DJ, van der Pas MHGM, Verheijen PM, Consten ECJ. In vivo sentinel lymph node identification using fluorescent tracer imaging in colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021 Feb 1;158:103149.
27. Keller DS, Joshi HM, Rodriguez-Justo M, Walsh D, Coffey JC, Chand M. Using fluorescence lymphangiography to define the ileocolic mesentery: proof of concept for the watershed area using real-time imaging. *Tech Coloproctology.* 2017 Sep;21(9):757–60.
28. Rossi G, Tarasconi A, Baiocchi G, Angelis GL de', Gaiani F, Mario FD, et al. Fluorescence guided surgery in liver tumors: applications and advantages. *Acta Biomed Atenei Parm.* 2018 Dec 17;89(9-S):135–40.
29. Campbell C, Reames MK, Robinson M, Symanowski J, Salo JC. Conduit Vascular Evaluation is Associated with Reduction in Anastomotic Leak After Esophagectomy. *J Gastrointest Surg.* 2015 May 1;19(5):806–12.
30. He M, Jiang Z, Wang C, Hao Z, An J, Shen J. Diagnostic value of near-infrared or fluorescent indocyanine green guided sentinel lymph node mapping in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2018;118(8):1243–56.
31. Zapardiel I, Alvarez J, Barahona M, Barri P, Boldo A, Bresco P, et al. Utility of Intraoperative Fluorescence Imaging in Gynecologic Surgery: Systematic Review and Consensus Statement. *Ann Surg Oncol.* 2021 Jun 1;28(6):3266–78.
32. Pathak RA, Hemal AK. Intraoperative ICG-fluorescence imaging for robotic-assisted urologic surgery: current status and review of literature. *Int Urol Nephrol.* 2019 May 1;51(5):765–71.
33. Gilbert RWD, Bird BH, Murphy MG, O'Boyle CJ. Should laparoscopic lymph node biopsy be the preferred diagnostic modality for isolated abdominal lymphadenopathy? *Curr Oncol Tor Ont.* 2019 Jun;26(3):e341–5.
34. Sando M, Terasaki M, Okamoto Y, Suzumura K, Tsuchiya T. The Utility of Diagnostic Laparoscopic Biopsy for Mesenteric and Retroperitoneal Lymph Nodes. *Am J Case Rep.* 2017 Aug 10;18:878–82.
35. Casaccia M, Fornaro R, Papadia FS, Testa T, Mascherini M, Ibatizi A, et al. Single-Port vs. Conventional Multi-Port Laparoscopic Lymph Node Biopsy. *JSL S J Soc Laparosc Robot Surg.* 2020;24(4):e2020.00045.

36. Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 1997 Dec 15;80(12):2311–20.
37. Noy A, Schöder H, Gönen M, Weissler M, Ertelt K, Cohler C, et al. The majority of transformed lymphomas have high standardized uptake values (SUVs) on positron emission tomography (PET) scanning similar to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009 Mar;20(3):508–12.
38. Chen QY, Zhong Q, Li P, Xie JW, Liu ZY, Huang XB, et al. Comparison of submucosal and subserosal approaches toward optimized indocyanine green tracer-guided laparoscopic lymphadenectomy for patients with gastric cancer (FUGES-019): a randomized controlled trial. *BMC Med*. 2021 Oct 27;19(1):276.
39. Kelder W, Braat AE, Karrenbeld A, Grond JAK, De Vries JE, Oosterhuis JWA, et al. The sentinel node procedure in colon carcinoma: a multi-centre study in The Netherlands. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Dec;22(12):1509.
40. Baiocchi GL, Molfino S, Molteni B, Quarti L, Arcangeli G, Manenti S, et al. Fluorescence-guided lymphadenectomy in gastric cancer: a prospective western series. *Updat Surg*. 2020 Sep;72(3):761–72.