

1. Anagrafica progetto PON AIM

ID. PROPOSTA	Linea di attività: AIM1892002 – 3
Area	Salute
S.C.	06/C1 “Chirurgia Generale”
S.S.D.	MED/18 “Chirurgia Generale”
Mesi all'estero	6
Tutor	Prof. Attilio Ignazio Lo Monte
Titolo del progetto di ricerca	CHIRURGIA RIGENERATIVA NEI DIFETTI DELLE VIE BILIARI: modellamento e crescita cellulare su scaffold planare e su scaffold tubulare. Studio sperimentale in vivo su modello suino.

2. Descrizione sintetica degli obiettivi generali e degli obiettivi

Scopo di questo progetto è l'impianto su modello animale di uno scaffold sintetico che guidi la rigenerazione di dotti (vasi, dotti biliari, ureteri e uretra) e tessuti (parete addominale), a partire da uno polimero biocompatibile e biorisorbibile tubulizzato di α, β -poli(N-2-idrossietil)(2-aminoetilcarbamato)-D,L-aspartamide-graft-acido polilattico, in presenza di policaprolattone (PHEA-g-PLA/PCL), prodotto dal dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche Biologiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli studi di Palermo..

3. Descrizione dei risultati ottenuti

4. Elenco Pubblicazioni o altri prodotti eseguiti entro l'arco temporale del progetto

5. Elenco altre Pubblicazioni o prodotti

6. Descrizione sintetica di eventuali collaborazioni da parte di enti/organismi pubblici e privati esterni per il raggiungimento dei risultati

Abbiamo avviato una convenzione con il Prof. Dr. med. Pietro Majno-Hurst, primario e capo dipartimento del reparto di Chirurgia Ospedale Regionale di Lugano - Civico e Italiano. Il

Professore Hurst è professore ordinario (full professor) presso l'Università della Svizzera Italiana (USI), Facoltà di scienze biomediche e dal 2014 dirige il Centro pluridisciplinare delle malattie epato-bilio-pancreatiche.

È autore di oltre 150 articoli pubblicati nelle principali riviste mediche, tra le quali The Lancet, Lancet Oncology, Hepatology, Journal of Hepatology, Annals of Surgery e British Journal of Surgery. Ha ottenuto premi della Società Svizzera di Chirurgia e della Società Svizzera di Trapianti. Dal 2012 dirige il programma di Medicina complessa epatobiliare e pancreatico dell'EOC (Unità Cantonale Epatobilio-Pancreatica - UCEP) ed è un esperto riconosciuto a livello internazionale di chirurgia epatobiliopancreatica e di chirurgia ricostruttiva delle vie biliari.

<https://www.eoc.ch/Dettagli/Medico.Majno-Hurst-Pietro.9772.html>

7. Descrizione delle attività programmate

Il progetto prevede l'impianto di scaffolds che guidino la rigenerazione di dotti biliari a partire da un polimero biocompatibile e biorisorbibile di α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-aminoetilcarbamato)-D,L-aspartamide-graft-acido polilattico, in presenza di policaprolattone (PHEA-g-PLA/PCL), eparinizzato (1-3). Negli ultimi anni l'uso di questo polimero ha trovato largo impiego, con la tecnica dell'elettrospinning (FDA), una tecnica che consente l'ottenimento di materiali costituiti da fibre con un diametro nano-/micrometrico che mimano la morfologia della matrice extracellulare dei tessuti nativi (4). Questo permette alle cellule staminali circolanti di aderire allo scaffold impiantato e di favorire la rigenerazione di un tessuto vitale, sovrapponibile per caratteristiche meccaniche e biologiche a quello nativo dell'organismo ospite. Lo scaffold fibrillare utilizzato, in forma tubulare e planare, viene preparato dal laboratorio di polimeri biocompatibili del dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche Biologiche e farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo. La biocompatibilità del PHEA-g-PLA/PCL è già stata valutata in vivo impiantando il materiale nella fascia dorsale di ratti (5). Per estrapolare dati preclinici validi e significativi è necessario simulare difetti quanto più vicini alla condizione clinica. Il modello suino pertanto appare ideale per le sue caratteristiche anatomiche. Lo studio prevede

l'impiego di maiali di razza minipig con un'età compresa tra 4 e 6 mesi e un peso variabile da 30 a 40 Kg. Prima delle procedure chirurgiche i soggetti saranno premedicati con Medetomidina 20mcg/Kg intramuscolo e Zolazepam 5mg/kg + Tiletamina 5mg/Kg intramuscolo. Si procederà successivamente all'induzione dell'anestesia generale con propofol 2 mg/kg in tre boli endovena. Gli animali saranno mantenuti in anestesia con isoflurano in O₂, previa intubazione orotracheale. L'analgesia sarà garantita mediante somministrazione endovenosa di tramadolo 2 mg/kg. La terapia antibiotica pre- e postchirurgica verrà eseguita con Benzilpenicillina benzatinica 0.3 ml/kg. I maiali saranno sottoposti ad un'incisione laparotomica mediana e previo isolamento della via biliare principale e del coledoco, si procederà alla simulazione di una lesione della via biliare principale mediante l'asportazione di un tratto di circa 2 cm di coledoco o una lesione parziale dello stesso. La continuità verrà ripristinata mediante l'interposizione dello scaffold nella sua forma planare e/o tubulare, mediante sutura continua in polipropilene 6-0 e l'interposizione di uno stent in silicone. Al fine di garantire un continuo flusso biliare si procederà, inoltre, ad una colecistectomia profilattica. Dopo l'intervento, tutti gli animali verranno stabulati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", dove il personale provvederà a monitorare la degenza di ogni animale, curandone l'alimentazione e garantendo una ripresa ottimale dall'intervento. Ogni soggetto verrà sottoposto a prelievi ematici per il controllo di emocromo, elettroliti, indici di funzionalità epatica; saranno effettuati inoltre controlli ecografici per valutare lo stato di salute del modello suino e il corretto funzionamento degli scaffold impiantati. Si prevede di procedere al sacrificio degli animali secondo un preciso timing temporale a distanza di un mese, di 3 mesi e di 6 mesi dall'intervento, salvo i casi in cui eventuali complicanze post-operatorie non diano indicazioni differenti. In tutti i casi si procederà all'analisi del tratto interessato dall'innesto per valutare l'avvenuta rigenerazione tissutale, mediante esame macroscopico, microscopico e immunoistochimico per la ricerca di markers specifici per l'epitelio, quali per esempio la citocheratina 19 (CK 19). Dopo fissazione e riduzione, i campioni saranno processati di routine per l'inclusione in paraffina. Sezioni seriali di ciascun campione saranno colorate con ematossilina-eosina. Parte dei campioni, dopo essere stata fissata in formalina, sarà trattata con saccarosio al 30%, incluso in OCT e stoccato a -80°C. Previo taglio al criostato in fette dello spessore di 8 µm, si procederà ad immunofluorescenza e ad analisi al confocale per la valutazione dei processi di neoangiogenesi mediante la ricerca di anti CD-31. L'ambizione di questo progetto è quella di rigenerare il tessuto, impiantando lo scaffold sull'animale e lasciando che questo venga colonizzato dalla quota di cellule staminali circolanti o

contigue. Dopo la colonizzazione si dovrebbe osservare la presenza di un neotessuto con caratteristiche anatomiche e funzionali totalmente sovrapponibili a quelle della via biliare nativa dell'animale.

1.Fiorica C, et al. *Injectable in situ forming hydrogels based on natural and synthetic polymers for potential application in cartilage repair. RSC Adv* 2015;5:19715–19723.

2.Fiorica C, et al. *Biocompatible hydrogels based on hyaluronic acid cross-linked with a polyaspartamide derivative as delivery systems for epithelial limbal cells. Int J Pharm* 2011;414:104-111.

3.Fiorica C, et al. *In-situ forming gel-like depot of a polyaspartamide-poly lactide copolymer for once a week administration of sulpiride. J Pharm Pharmacol* 2015;67:78-86.

4.Jiang T, et al. *Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration Prog Polym Sci* 2014;46:1-24.

5.Lo Monte AI, et al. *Biocompatibility and biodegradability of electrospun PHEA-PLA scaffolds: our preliminary experience in a marine animal model. Dig J Nanomater Biostructures* 2012;7:841-851.