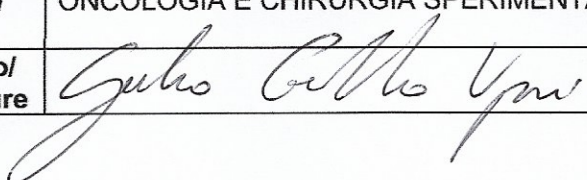


PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

Cognome/Surname	VIGNI
Nome / Name	GIULIO EDOARDO
Titolo del progetto / Project title	SCAFFOLD DI POLIBUTILENE SUCCINATO PER IL TESSUTO OSSEO: STUDIO IN VIVO SU CONIGLIO
Corso di dottorato / PhD	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
Firma del candidato/ Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

Negli ultimi anni l'ingegneria tissutale è diventata fulcro della medicina rigenerativa attraverso lo studio e la ricerca dei biomateriali in grado di stimolare la crescita di tessuti, di mimarne le caratteristiche e velocizzarne la guarigione. I difetti ossei rappresentano una delle maggiori sfide in questo campo.

Nonostante l'elevata capacità di riparazione, la guarigione spontanea di difetti ossei rilevanti, come quelli in esiti di resezioni tumorali, infezioni o traumi severi, non è quasi mai possibile. Sebbene innesti allogenici e xenogenici siano stati utilizzati per questi scopi, il gold standard è rappresentato dal trapianto autogeno, in particolar modo quello dalle ossa iliache. [1] Nonostante questa tecnica sia largamente utilizzata, presenta diverse criticità: la conformità della forma del graft rispetto al difetto, l'aumento del tempo dell'operazione, il riassorbimento del graft, la insufficiente o mancata disponibilità del tessuto, come nei bambini, e le comorbidità correlate al sito di prelievo del graft. In questo contesto si sono create le motivazioni per lo sviluppo di materiali sostitutivi (scaffold). I tessuti ingegnerizzati, che sono fabbricati utilizzando materiali biocompatibili adatti e contengono cellule staminali o specifiche del tessuto, hanno la capacità di mimare e sostenere le funzioni biologiche ossee.

L'ingegneria tissutale ha trovato negli scaffold tridimensionali una tra le risorse più promettenti per la rigenerazione del tessuto osseo. Questi biomateriali devono avere caratteristiche specifiche, come una elevata resistenza meccanica o proprietà fisiche adatte alla forma ed alla funzione della struttura ossea nella quale dovranno essere impiantati [2]. Nel 2018, Preethi Soundarya S et al. [3] hanno fornito una panoramica delle diverse tecniche di fabbricazione per la preparazione di scaffold (macromolecole biologiche come chitina/chitosano, collagene/gelatina, alginato, acido ialuronico, seta, polimeri sintetici, ceramica). Lo studio, analizzando più di 40 tecniche e composizioni differenti, ha mostrato buoni risultati, concludendo però che un metodo di fabbricazione ideale per uno scaffold deve ancora essere definito. La reale applicabilità in vivo di scaffold ossei si basa sulla biocompatibilità e la biodegradabilità del materiale utilizzato.

È stato osservato infatti che un'eccessiva risposta infiammatoria può compromettere la capacità di guarigione dei tessuti. Inoltre, i derivati di degradazione possono provocare reazioni immunogeniche. Pertanto, come sottolineato da uno studio pubblicato nel 2019 [4], è necessaria la comprensione delle caratteristiche di degradazione dei vari biomateriali e il monitoraggio non invasivo degli scaffolds impiantati. Quindi ogni modello di scaffold necessita di studi accurati per determinarne biocompatibilità e biodegradabilità. L'ingegneria tissutale basata su scaffold deve tenere conto inoltre sia della dimensione dei pori che delle proprietà meccaniche: un aumento della dimensione dei pori è generalmente accompagnato da una diminuzione della resistenza meccanica [2]. Per ottenere proprietà meccaniche e porosità adeguate, lo studio di Derja Algul, et al. del 2015 [5] indaga sulla possibilità di utilizzare uno scaffold monolitico biomimetico a tre strati con chitosano, alginato e β -TCP, imitando perciò la struttura dell'osso spongioso e dell'osso corticale. I risultati della caratterizzazione hanno mostrato l'esistenza di forti interazioni ioniche tra gli strati, indicando che le impalcature utilizzate sono considerate non tossiche e quindi adatte per applicazioni osteocondrali. Nel 2017, il gruppo di ricerca di Hwan D Kim [6], ha incorporato negli scaffold 3D materiali osteoinduttivi e osteoconduttivi, quali il calcio e fosfato, per stimolare il differenziamento osteogenico di cellule staminali. Inoltre, è stato dimostrato che l'aumento della concentrazione locale dello ione fosfato negli scaffold favorisce l'attivazione di fattori di trascrizione, quali l'osteocalcina e l'osteopontina, che inducono la differenziazione osteogenica nelle cellule staminali. Stesso risultato è stato ottenuto utilizzando scaffold polimerico biodegradabile, composto di fosfato di calcio e fattori di crescita correlati alla formazione ossea (BMP-2 e TGF- β 3).

Tra le varie strategie alternative di ingegneria del tessuto osseo, una delle più innovative è l'applicazione su scaffold ossei di cellule sottoposte a trasfezione o transduzione con microRNAs (miRNAs) o anti-microRNAs (anti-miRNAs), in grado di indurre l'espressione del fattore di trascrizione 2 correlato al runt (RUNX2): regolatore principale dell'osteogenesi. Arriaga, et al. nel 2019 [7], hanno ottenuto in tal senso risultati positivi, sia in termini di rigenerazione ossea che di vascolarizzazione. Futuri studi potrebbero concentrarsi anche sullo sviluppo di impalcature di biomateriali per fornire direttamente miRNAs o anti-miRNAs nelle cellule in vivo.

I sostituti ossei con antibiotici trovano invece specifica applicazione nella chirurgia ortopedica e traumatologica per la prevenzione o la cura delle infezioni ossee. Tuttavia, il loro utilizzo come innesto osseo rivela alcune preoccupazioni a causa della loro rapida biodegradazione [8]. L'aggiunta di carbonato di calcio e tripalmitina rende le formulazioni di solfato di calcio più resistenti al riassorbimento. Pförringer et al. [8] nel 2018, hanno impiantato nella metafisi tibiale dei conigli scaffold di solfato di calcio e antibiotici, dimostrando un'eccellente biocompatibilità e capacità di migliorare la stabilità meccanica. Nel 2018, un gruppo di ricerca cinese [9], su un modello animale di coniglio con difetto radiale, ha dimostrato che è possibile ottenere un effetto osteogenico potenziato, utilizzando uno scaffold ingegnerizzato con periostio osteoinduttivo mimetico. Uno studio coreano del 2019 ha confrontato due modelli strutturali di scaffold stampati in 3D. Su un modello di difetto osseo calvariale nel coniglio sono stati confrontati uno scaffold con una convenzionale struttura a griglia ed uno con una struttura tipo kagome. La ricerca ha dimostrato che la struttura kagome ha fornito un'eccellente robustezza meccanica e una migliore osteoconduttività rispetto al gruppo di controllo, ponendo così le basi per futuri studi anche sulla geometria della struttura di base degli scaffold [10]. Nel 2020 Teotia et al. [11], ha confrontato in vivo sul coniglio l'utilizzo di scaffold porosi composti stampati in 3D con resine e fattori di crescita osteoinduttivi in difetti ossei critici su ossa piatte (cranio) e lunghe (tibia). Rispetto al gruppo di controllo senza scaffold è stata dimostrata in entrambi i distretti una più rapida guarigione dei difetti ossei. Inoltre, grazie alla loro grande versatilità, gli scaffold vengono studiati anche come substrato per la guarigione dell'interfaccia tendine e osso [12]. Specialmente negli ultimi anni, questo rappresenta un altro ambito di grande interesse nell'applicazione dell'ingegneria tissutale al campo ortopedico.

Nel 2021, Cicero et al. [13] hanno studiato uno scaffold 3D microfibrillare a base di PBS (Poli 1,4-butilene succinato) prodotto con la tecnica dell'elettrospinning, senza l'aggiunta di fattori di crescita, nelle lesioni del nervo sciatico su modello murino. Oltre ad un miglioramento nel processo rigenerativo del nervo periferico, sono state dimostrate la biocompatibilità e la biodegradabilità di questo modello di scaffold. Le proprietà meccaniche di questo biomateriale, insieme alla sua capacità di limitare l'azione macrofagica e il processo infiammatorio controproducente per la rigenerazione nervosa, potrebbero dimostrarsi efficaci anche nella guarigione dei difetti ossei.

Il presente progetto prevede lo studio, in vivo su coniglio, delle possibili applicazioni dello scaffold 3D microfibrillare a base di PBS al tessuto osseo. Creati due difetti ossei uguali, si confronta la rigenerazione ossea nei casi del gruppo studio trattati mediante lo scaffold proposto con quelli lasciati a guarigione spontanea nel gruppo controllo.

Scopo principale dello studio è quello di dimostrare, in vivo, su modello animale, la osteointegrazione dello scaffold e la sua capacità di incrementare la rigenerazione ossea.

Obiettivo secondario è valutare l'applicabilità del device durante la chirurgia e le sue capacità meccaniche nei due differenti contesti di un osso piatto e di un osso lungo, di diversa composizione e sottoposto allo stress del carico.

Ulteriore scopo sarà quello di confermare la biocompatibilità e la biodegradabilità di questa tipologia di scaffold anche in una differente tipologia di tessuto, rispetto a quanto dimostrato in precedenti applicazioni. [13]

Valutate queste caratteristiche l'obiettivo successivo dello studio sarà quello di ingegnerizzare lo scaffold con fattori di crescita specifici per l'attività osteogenica e valutarne la capacità di migliorare la rigenerazione ossea, potenziando le sue proprietà osteoinduttive e osteoconduttive.

2 - Descrizione del progetto / Project

In questo studio sarà previsto l'utilizzo di conigli bianchi neozelandesi maschi. La selezione e la gestione degli animali, il protocollo chirurgico e la preparazione, così come l'età, il peso dei conigli e la numerosità del campione dovranno seguire le procedure previste dalle normative ministeriali ed essere sottoposte ad approvazione ministeriale prima dell'inizio dello studio.

Saranno previsti quattro gruppi di conigli. Al gruppo A apparterranno i soggetti sottoposti alla creazione di due difetti calvariali circolari uguali a livello delle ossa frontali del cranio (diametro circa 8mm, a tutto spessore) mentre al gruppo B apparterranno i conigli sottoposti alla creazione di un difetto cilindrico nella regione prossimale di una tibia (diametro circa 8mm a livello della corticale ossea, profondo circa 5-6mm nell'osso trabecolare). Quindi, ciascun coniglio del gruppo A presenterà due difetti ossei trattati, uno mediante l'applicazione dello scaffold e l'altro lasciato a guarigione spontanea. Mentre, nel gruppo B ogni coniglio presenterà un singolo difetto osseo e questo sarà trattato in metà del campione (B1) mediante scaffold e nell'altra metà (B2) verrà lasciato a guarigione spontanea. Al gruppo C apparterrà una popolazione ridotta di soggetti, nei quali sarà creato un solo difetto osseo (cranio o tibia in maniera casuale) trattato poi mediante l'utilizzo dello scaffold.

Infine, al gruppo D verrà impiantato, secondo lo stesso schema del gruppo C, lo scaffold ingegnerizzato con fattori di crescita specifici per l'attività osteogenica. Lo studio dei conigli del gruppo D sarà successivo al completamento della raccolta campioni dei gruppi A, B e C.

Protocollo chirurgico

L'anestesia generale verrà indotta in tutti gli animali con isoflurano e iniezioni intramuscolari di benzodiazepine sulla base del peso. Tutti gli animali riceveranno una profilassi antibiotica e una terapia analgesica sempre sulla base del peso. La procedura chirurgica sarà eseguita in campo sterile dopo rasatura e disinfezione con soluzione iodata della cute.

Cranio

Verrà eseguita un'incisione lungo la linea mediana del cranio esponendo entrambe le ossa frontali e parietali. Sollevato il lembo cutaneo, sarà creato, mediante una fresa (trapano a mano), sotto l'irrigazione salina costante, un difetto circolare di circa 8mm a tutto spessore su un osso frontale. Un difetto uguale verrà creato sull'osso frontale controlaterale. Le ossa reseccate saranno rimosse con attenzione per evitare lesioni alla dura madre e al tessuto cerebrale sottostante. Lo scaffold di dimensioni 8mmx2.5mm sarà collocato nel difetto osseo. Senza suturare il periostio, il difetto verrà chiuso suturando la cute con suture di seta 3-0.

Tibia

Sarà eseguita una incisione lunga circa 2 cm dal terzo prossimale della tibia, in prossimità del ginocchio, lungo l'asse maggiore della stessa esponendo il tessuto molle sottostante. Il muscolo verrà rimosso per via smussa fino a raggiungere lo strato di periostio sottostante. Rimosso il flap periostale, l'osso sarà esposto e pulito con soluzione fisiologica. Mediante una fresa (trapano a mano) sarà creato, sotto l'irrigazione salina costante, un difetto circolare di circa 8mm sulla corticale ossea. Rimosso l'osso corticale verrà esposto l'osso trabecolare sottostante. Una spatola sterile sarà poi usata per creare una cavità di circa 5-6mm. Rimossa la corretta quantità di tessuto osseo, si laverà con soluzione salina. Lo scaffold di dimensioni 10mmx5mm verrà quindi collocato nel difetto osseo e applicando una forza delicata, saranno riempite la cavità nell'osso trabecolare e la parete corticale. Senza suturare il periostio o i tessuti molli sovrastanti, il difetto sarà chiuso suturando la cute con suture di seta 3-0.

Gestione post-chirurgica

Nel periodo post-chirurgico gli animali avranno libero accesso a cibo e acqua ad libitum.

Raccolta dei campioni

I conigli dei gruppi A e B saranno suddivisi in gruppi e sottoposti ad eutanasia a 4, 12 e 24 settimane dall'intervento. I conigli del gruppo A saranno divisi in maniera casuale in gruppi di numero uguale. I conigli dei gruppi B1 e B2 verranno suddivisi in maniera casuale in gruppi di numero uguale sia all'interno del loro sottogruppo che tra i due gruppi. I campioni opportunamente preparati verranno sottoposti ad una valutazione istologica e ad uno studio di diagnostica per immagini mediante risonanza magnetica 7T. Allo stesso schema di raccolta dei campioni del gruppo A verrà sottoposta la popolazione di conigli del gruppo D.

I conigli del gruppo C saranno suddivisi in maniera casuale in gruppi di numero uguale e sottoposti ad eutanasia a 12 e 18 mesi dall'intervento.

Prima di essere sottoposti ad eutanasia, i campioni di ogni gruppo saranno sottoposti ad esame Tc.

Analisi statistica

I dati raccolti per l'obiettivo principale saranno analizzati con opportuni metodi statistici quali two-tailed t test e Mann-Whitney test.

3 - Bibliografia / References

- [1] Sen M, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*. 2007;38(Suppl 1):S75–80. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.012.
- [2] Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl*. 2007 Nov;22(3):223-39. doi: 10.1177/0885328206073706. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17255157.
- [3] Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *Int J Biol Macromol*. 2018 Nov;119:1228-1239. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.056. Epub 2018 Aug 11. PMID: 30107161.
- [4] Yang D, Xiao J, Wang B, Li L, Kong X, Liao J. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:109927. doi: 10.1016/j.msec.2019.109927. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31500038.
- [5] Algul D, Sipahi H, Aydin A, Kelleci F, Ozdatli S, Yener FG. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *Int J Biol Macromol*. 2015 Aug;79:363-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.005. Epub 2015 May 14. PMID: 25982954.
- [6] Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2017 Dec;6(23). doi: 10.1002/adhm.201700612. Epub 2017 Nov 24. PMID: 29171714.
- [7] Arriaga MA, Ding MH, Gutierrez AS, Chew SA. The Application of microRNAs in Biomaterial Scaffold-Based Therapies for Bone Tissue Engineering. *Biotechnol J*. 2019 Oct;14(10):e1900084. doi: 10.1002/biot.201900084. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31166084.
- [8] Pörringer D, Harrasser N, Beirer M, Crönlein M, Stemberger A, van Griensven M, Lucke M, Burgkart R, Obermeier A. Influence of Absorbable Calcium Sulfate-Based Bone Substitute Materials on Human Haemostasis-In Vitro Biological Behavior of Antibiotic Loaded Implants. *Materials (Basel)*. 2018 Jun 1;11(6):935. doi: 10.3390/ma11060935. PMID: 29865173; PMCID: PMC6025628.
- [9] Guo HG, Yao FL, Ma XL, Yao KD. [An experimental study on rabbit's radial bone defect healed by application of mimetic periosteum with tissue-engineered bone]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2008 Jan;24(1):63-7. Chinese. PMID: 18437989.
- [10] Lee SH, Lee KG, Hwang JH, Cho YS, Lee KS, Jeong HJ, Park SH, Park Y, Cho YS, Lee BK. Evaluation of mechanical strength and bone regeneration ability of 3D printed kagome-structure scaffold using rabbit calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 May;98:949-959. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.050. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30813102.
- [11] Teotia AK, Dienel K, Qayoom I, van Bochove B, Gupta S, Partanen J, Seppälä J, Kumar A. Improved Bone Regeneration in Rabbit Bone Defects Using 3D Printed Composite Scaffolds Functionalized with Osteoinductive Factors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Oct 28;12(43):48340-48356. doi: 10.1021/acsami.0c13851. Epub 2020 Oct 13. PMID: 32993288.
- [12] Qian S, Wang Z, Zheng Z, Ran J, Zhu J, Chen W. A Collagen and Silk Scaffold for Improved Healing of the Tendon and Bone Interface in a Rabbit Model. *Med Sci Monit*. 2019 Jan 9;25:269-278. doi: 10.12659/MSM.912038. PMID: 30622234; PMCID: PMC6338012.
- [13] Cicero, L., Licciardi, M., Cirincione, R., Puleio, R., Giammona, G., Giglia, G., Sardo, P., Edoardo Vigni, G., Cioffi, A., Sanfilippo, A., & Cassata, G. (2021). Polybutylene succinate artificial scaffold for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 1– 10. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34896>