

Titolo del progetto / Project title	Creazione di "bridge fistulas" in pazienti in emodialisi con l'uso di scaffold tubulari in Poli-butilene-succinato (PBS). Studio sperimentale su modello suino.
Corso di dottorato / PhD	Oncologia e Chirurgia sperimentali

1 - Sommario / Abstract

L'insufficienza renale cronica è una lenta e progressiva riduzione della capacità dei reni di filtrare le scorie metaboliche dal sangue e rappresenta l'ultimo stadio di numerose patologie che colpiscono i reni. Capisaldi del trattamento sono il trapianto di rene e la dialisi. Il trapianto di rene è il trattamento più efficace, ma può presentare limiti legati al ridotto numero di donatori, all'istocompatibilità, al possibile rigetto d'organo ed alla presenza di comorbidità, pertanto la dialisi al momento rappresenta il trattamento più diffuso per mantenere in vita i pazienti. Tale trattamento consiste nella riproduzione artificiale di alcune delle funzioni renali filtrando il sangue con lo scopo di rimuovere le sostanze tossiche in esso presenti; inoltre essa garantisce il riequilibrio idro-elettrolitico e acido-base. Per eseguire la dialisi è necessario un accesso vascolare che colleghi il sistema vascolare del paziente ad una macchina, definita "rene artificiale".

L'accesso vascolare di prima scelta è la fistola artero-venosa autologa, ovvero una comunicazione artificiale tra un'arteria e una vena generalmente a livello di un arto superiore ottenuta per via chirurgica allo scopo di deviare sangue arterioso ad alta pressione nel sistema venoso ad alta capienza ed ottenere così flussi ematici adeguati ad effettuare il trattamento dialitico. Tuttavia la fistola artero-venosa può fallire nel tempo a causa delle ripetute venopunture con la necessità di confezionare una nuova fistola artero-venosa autologa la quale con il tempo può anch'essa esaurire motivo per cui, in assenza di vasi venosi superficiale sfruttabili, è possibile realizzare le cosiddette "bridge fistulas" attraverso innesti protesici artero-venosi sottocutanei denominati comunemente "graft" o "scaffold". Le protesi utilizzate sono realizzate prevalentemente in Politetrafluoroetilene (PTFE); tuttavia esse presentano numerose complicanze quali trombosi, sanguinamento, stenosi, infezioni, aneurismi e pseudoaneurismi determinando una riduzione del tempo di funzionamento della fistola protesica con successivo fallimento dell'accesso stesso. La comunità scientifica si è sforzata di cercare nuovi materiali maggiormente compatibili al fine di ridurre le complicanze correlate alle vecchie protesi. L'obiettivo di questo progetto di ricerca è sviluppare un sostituto tubulare biorassorbibile per la creazione di neovasi su un modello suino. Nella nostra precedente esperienza abbiamo testato un materiale biocompatibile e biodegradabile con proprietà meccaniche simili a quelle dei vasi sanguigni. Il materiale era costituito da una miscela di a,b-poli(N-2-idrossietil)- D,L-aspartamide (PHEA) e acido polilattico (PLA) in combinazione con policaprolattone (PCL) ottenuta mediante tecnica di elettrospinning e coniugata mediante legame carbossilico con l'eparina a basso peso molecolare. Un campione tubolare PHEA-PLA/PCL è stato quindi utilizzato per creare una bridge fistula artero-venosa in un modello suino tra vasi iliaci esterni. Il flusso è stato valutato mediante ecografia Doppler settimanale e circa tre settimane dopo l'impianto è stata riscontrata una trombosi dell'innesto, quindi si è proceduto al suo espianto. Gli scaffold hanno mostrato una perfetta tenuta al flusso e un'adeguata tensione elastica in relazione alla pressione sanguigna. L'esame istologico ha evidenziato un quadro di infiammazione cronica con presenza di cellule come da corpo estraneo e marcata neovascolarizzazione. Il materiale era stato in gran parte assorbito e residuava solo qualche spot isolato. La biocompatibilità di PHEA-PLA/PCL e le sue proprietà fisiche lo rendono dunque un materiale adatto per la sostituzione di vasi, ma la sua altra trombogenicità rimane un limite. L'obiettivo di questo studio è quello di utilizzare un nuovo materiale per la realizzazione di scaffold in associazione alla somministrazione di anticoagulanti sottocutanei e/o orali ai fini di ridurre l'entità della trombogenicità. Il materiale che utilizzeremo per il confezionamento di "bridge fistulas" su modello suino è il Poli-butilene-succinato (PBS), ottenuto mediante tecnica di elettrospinning e che, secondo dati presenti in letteratura, si è rivelato essere di eccellente biocompatibilità, biodegradabilità e versatilità. Gli animali verranno sacrificati a 1, 3, 6 e 9 mesi dall'impianto per procedere alle necessarie valutazioni istopatologiche. Lo scopo è valutare la rigenerazione tissutale direttamente in vivo, utilizzando lo scaffold per il confezionamento della fistola artero-venosa e lasciando che questo venga colonizzato dalla

quota di cellule staminali circolanti o contigue riducendo il rischio trombotico anche in seguito all'assunzione di anticoagulanti orali. Dopo la colonizzazione si dovrebbe osservare la presenza di un neoendotelio con caratteristiche anatomiche e funzionali totalmente sovrapponibili a quelle dei tessuti nativi dell'animale. I nostri dati, come molti di quelli presenti in letteratura, sono ad oggi preliminari e necessitano di ulteriori approfondimenti, ma è indubbio che i promettenti risultati da noi ottenuti in passato con la sperimentazione su modello suino incoraggiano a studiare ulteriormente l'uso di questa innovativa ed efficiente strategia chirurgica per la realizzazione di "bridge fistulas" nei pazienti che necessitano di terapia emodialitica proponendo oggi scaffold microfibrillari 3D realizzati in PBS. In futuro tale materiale sintetico potrebbe essere legato ad altre molecole in grado di modulare l'entità della risposta infiammatoria, il tempo di degradazione e lo stato coagulativo con lo scopo finale di realizzare dispositivi idonei alla sostituzione dei vasi nativi.

2 - Descrizione del progetto / Project

Background

La malattia renale cronica è caratterizzata da una lenta e progressiva riduzione nell'arco di mesi o anni della capacità dei reni di filtrare le scorie metaboliche dal sangue. Se la malattia renale cronica è causata da un disturbo trattabile e se tale disturbo non ha determinato un danno d'organo, la funzionalità renale può migliorare una volta risolto il disturbo alla base, altrimenti tende a peggiorare nel tempo e può essere fatale. La sopravvivenza in caso di grave insufficienza renale, talvolta definita insufficienza renale terminale, si protrae solitamente per diversi mesi nei soggetti non trattati, ma quelli trattati con dialisi possono vivere molto più a lungo. Esistono due tipi di dialisi: emodialisi e dialisi peritoneale. Nell'emodialisi il sangue viene rimosso dall'organismo e pompato da un dispositivo esterno al corpo in un dializzatore noto come rene artificiale. Il dializzatore filtra le scorie metaboliche dal sangue e, quindi, reintroduce il sangue purificato nel corpo del soggetto. L'emodialisi richiede ripetuti accessi al torrente ematico, pertanto in genere viene creata chirurgicamente una connessione artificiale tra un'arteria e una vena chiamata fistola artero-venosa per semplificare l'accesso a lungo termine. La fistola artero-venosa (FAV) è il collegamento, creato generalmente a livello di un arto superiore, fra una arteria ed una vena allo scopo di far defluire il sangue che scorre nel sistema arterioso direttamente in quello venoso saltando così il circolo capillare. Le FAV sono allestite mediante un intervento chirurgico eseguito solitamente in anestesia locale a livello del polso (fistola distale) o a livello della piega del gomito (fistola prossimale) utilizzando l'arteria e la vena autologa del paziente. La creazione della fistola artero-venosa va affidata a mani esperte in quanto dalla qualità della fistola dipende l'efficacia della depurazione che l'emodialisi potrà assicurare. La vena, sottoposta ai regimi pressori arteriosi nel corso delle settimane si dilata, le pareti si ispessiscono e si irrobustiscono in modo da sopportare le ripetute punture degli aghi per emodialisi. A seguito dell'intervento la vena è percorsa da un flusso maggiore e più veloce di sangue che, procedendo in modo vorticoso, produce un "soffio" (sensazione acustica che si apprezza appoggiando il fonendoscopio sulla fistola) e un "fremito" o thrill alla palpazione che sono segni perenni del buon funzionamento della fistola. Dunque la FAV è l'accesso vascolare indispensabile per effettuare, tre volte a settimana in genere, la circolazione extracorporea con la macchina di dialisi. Essa non è immediatamente utilizzabile dopo l'intervento, infatti è necessario un tempo di maturazione di almeno un mese perché questa connessione tra arteria e vena si possa irrobustire al punto da sopportare una doppia puntura con aghi di grosso calibro. La scelta dell'allestimento distale (al polso) o prossimale (alla piega del gomito) viene fatta dal chirurgo sulla base della condizione venosa e/o arteriosa del paziente. Le complicanze a cui prestare particolare attenzione sono: trombotici, infezioni, ematomi e pseudoaneurismi (1;2). La trombotici consiste nella formazione di un coagulo di sangue all'interno della vena utilizzata per la fistola e si manifesta con l'assenza del "thrill", cioè il tipico fremito o fruscio che si sente alla palpazione. Le infezioni sono abbastanza rare e si manifestano con arrossamento della cute, tensione, gonfiore e dolore locale, febbre e, talora, pus. L'ematoma invece è uno stravasamento e deposito di sangue nei tessuti in seguito alla rottura di un vaso. La sua

comparsa in seguito alla puntura della fistola può comprometterne la funzionalità. Gli pseudoaneurismi si formano invece in seguito a ripetute manovre di incannulazione della stessa fistola. Un ausilio di notevole interesse al giorno d'oggi è rappresentato dalle protesi, ovvero innesti di vasi artificiali costituiti da materiali biocompatibili che vengono impiegate nei pazienti che hanno un'insufficiente e/o depauperamento del patrimonio vascolare arterioso e/o venoso tale da non consentire l'allestimento della fistola autologa (3;4). La scelta delle protesi ricade anche sui pazienti affetti da obesità, vasculopatie periferiche (diabete, aterosclerosi) oppure, in caso di precedenti interventi che abbiano esaurito il patrimonio vascolare superficiale del paziente. Le condizioni da valutare per l'allestimento di una FAV protesica (FAVp) sono un adeguato afflusso arterioso e venoso e l'integrità di cute e sottocute che devono resistere alle tensioni indotte dalle protesi e dalle ripetute incannulazioni. Le linee guida Kidney Disease Outcomes Qualitative Iniziative (KDOQI) del 2006 suggeriscono che per la puntura della FAVp è necessario controllare posizione e forma della protesi, pervietà della stessa, direzione del flusso ematico, stato della cute ed l'adeguata disinfezione. Effettuata questa valutazione si potrà procedere con la puntura della protesi con metodica "a scala di corda" e adeguata angolatura (45°). La metodica adoperata consiste nel cambiare il punto di inserzione dell'ago ad ogni seduta dialitica utilizzando tutto il decorso cutaneo del vaso. In questo modo si ridurranno la traumatizzazione e la cicatrizzazione che verranno distribuite lungo tutta la lunghezza della vena arterializzata. I materiali impiegati, sia sintetici (politetrafluoroetilene espanso, ePTFE, PHEA-PLA/PCL) che biologici, essendo corpi estranei, determinano reattività del paziente (5); le complicanze più comuni sono:

- emorragie ed infezioni: sono più frequenti nella FAVp rispetto alla fistola artero-venosa autologa
- stenosi e trombosi: per la ridotta elasticità delle protesi rispetto ai vasi nativi, con possibile generazione di torsioni e angolazioni in prossimità delle anastomosi
- pseudoaneurismi: a seguito di ripetute manovre di incannulazione della protesi, la perdita di tessuto sintetico che ne consegue, se di dimensioni eccessive e/o non adeguatamente tamponato da tessuto cicatriziale, diventa sede di flusso sanguigno tra gli strati della protesi, dando origine allo pseudoaneurisma
- sieroma periprotesici ed ematomi

Gli innesti vascolari realizzati con materiali sintetici, come il poliestere e il politetrafluoroetilene espanso, vengono abitualmente utilizzati per ripristinare il flusso sanguigno nei pazienti con vari disturbi cardiovascolari, ma ancora molti sono gli svantaggi come trombogenicità, iperplasia intimale, stenosi e occlusione (specialmente negli innesti di piccolo calibro), suscettibilità alle infezioni, formazione di pseudoaneurismi e mancanza di potenziale di crescita. Pertanto un graft vascolare completamente bioassorbibile, in grado di indurre la rigenerazione del vaso, può superare i limiti degli attuali devices artificiali, fungendo da supporto architettonico per lo sviluppo di neotessuto.

La chirurgia rigenerativa è un settore della ricerca e delle applicazioni cliniche focalizzato proprio sulla riparazione, sostituzione e rigenerazione di tessuti o organi per ripristinarne la funzionalità danneggiata da una qualsiasi causa, compresi i difetti congeniti, le malattie degenerative e i traumi (6). Questo campo comprende aree terapeutiche che inizialmente si credevano separate, come la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (creazione in vitro di tessuti/organi per un successivo trapianto). In particolare si parla di "terapia cellulare" quando non è richiesto l'uso di uno scaffold e di "ingegneria tissutale" quando invece esso è necessario per supportare la rigenerazione del tessuto danneggiato (7). La sostituzione, riparazione e la rigenerazione del tessuto può avvenire anche attraverso la mobilitazione del pool di cellule endogene, come per esempio le staminali. Lo scopo non è solo quello di rimpiazzare ciò che è danneggiato, bensì di fornire gli elementi richiesti per la riparazione in vivo progettando sostituti che interagiscano con l'organismo vivente e allo stesso tempo ne stimolino le capacità intrinseche di rigenerazione. Nella nostra esperienza precedente, abbiamo impiantato su modello suino scaffold per la rigenerazione di dotti (vasi, dotti biliari, ureteri e uretra) e tessuti (parete addominale) realizzati 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 combinazione con policaprolattone (PHEA-g-PLA/PCL) mediante tecniche di elettrospinning e successivamente eparinizzato (8;9;10). Il materiale è risultato essere

biocompatibile e biodegradabile e con proprietà meccaniche simili a quelle dei vasi sanguigni. Un campione tubolare PHEA-PLA/PCL è stato utilizzato per creare un fistola artero-venosa tra arteria iliaca sinistra esterna e vena iliaca sinistra su un modello suino di 4 mesi e del peso di 40 kg. La protesi tubolare biorisorbibile si è rivelata resistente alla trazione durante il confezionamento dell'anastomosi ed è risultata anche resistente al flusso ematico ad alta pressione come quello arterioso, come evidenziato dall'assenza di segni di sanguinamento intraoperatorio e complicanze precoci. Lo scaffold è rimasto perfettamente integro ed impermeabile al siero sanguigno, inoltre ha mostrato una grande flessibilità, permettendogli di pulsare allo stesso modo delle arterie adiacenti. Il flusso è stato valutato mediante ecografia Doppler settimanale e tali valutazioni ecografiche hanno rivelato la pervietà dello scaffold nella prima e nella seconda settimana, mentre una trombosi si è manifestata al controllo doppler della terza settimana. Lo scaffold è stato pertanto rimosso per la valutazione istopatologica. L'esame istologico ha mostrato un quadro di infiammazione cronica con presenza di cellule di corpo estraneo e marcata neovascolarizzazione. Il materiale era stato in gran parte assorbito, lasciando qualche spot isolato residuo. Si può dunque affermare con sicurezza che la biocompatibilità di PHEA-PLA/PCL e le sue proprietà fisiche lo rendono un materiale adatto per la sostituzione di vasi come confermato dal presente esperimento su modello suino. La biocompatibilità di PHEA-PLA/PCL e le sue proprietà lo rendono adatto alla sostituzione dei vasi. Lo svantaggio principale è la sua trombogenicità solo parzialmente risolta aggiungendo eparina allo scaffold (11;12). L'ambizione di questo nuovo progetto è quella di raggiungere l'obiettivo della rigenerazione direttamente in vivo, utilizzando un nuovo materiale, il Poli-butilene-succinato (PBS), in associazione con anticoagulanti sottocutanei e/o orali e valutarne la capacità rigenerativa lasciando che questo venga colonizzato dalla quota di cellule staminali circolanti o contigue. Questo materiale inizialmente dovrebbe comportarsi come una comune protesi vascolare e fornire l'impalcatura strutturale per permettere la colonizzazione da parte del tessuto nativo; in seguito alla degradazione ed al riassorbimento dello scaffold si dovrebbe quindi osservare la presenza di un neoendotelio con caratteristiche anatomiche e funzionali totalmente sovrapponibili a quelle dei vasi nativi dell'animale.

Scopo della ricerca

Verificare su modello suino la capacità di uno scaffold sintetico biofunzionale e riassorbibile di determinare o comunque favorire o guidare la sostituzione completa della fistola artero-venosa.

Materiali e Metodi

Il materiale che utilizzeremo su modello suino nella realizzazione di "bridge fistulas", in associazione agli anticoagulanti sottocutanei e/o orali, è il Poli-butilene-succinato (PBS), che presenta eccellente biocompatibilità, biodegradabilità e versatilità. Il PBS è un biopolimero insolubile in acqua sintetizzato dalla policondensazione di 1,4-butandiolo con acido succinico. Data la sua struttura chimica, il PBS mostra un'eccellente processabilità allo stato fuso, una comprovata biocompatibilità e biodegradabilità ed una buona versatilità quando impiegato come materiale per varie applicazioni biomediche. La sua versatilità include l'applicazione nella rigenerazione ossea o nella sostituzione del tessuto miocardico e diversi approcci di produzione tra cui tecniche di lisciviazione del sale, elettrospinning o estrusione. Gli scaffold in PBS sono stati già testati come biomateriali per la produzione di condotti nanostrutturati per la rigenerazione dei nervi su modelli di ratto (13). Nel nostro studio gli scaffold in PBS verranno prodotti previa solubilizzazione al 15% p/v in 1,1,1,3,3,3-esafluoroisopropanolo (HFIP) sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente. La soluzione polimerica verrà raccolta da una siringa e sottoposta ad elettrospinning con un Elettrospinning NF 103 (MECC, Fukuoka, Giappone). Le condizioni operative utilizzate saranno: generatore di alta tensione con una tensione positiva di +12,5 kV; velocità di rotazione e movimento di traslazione 40 rpm, 0,8 cm/s, span 5 cm). Gli scaffold depositati verranno immersi in acqua per 10 minuti, quindi saranno rapidamente fatti scivolare attraverso l'asta di metallo ed asciugati. Ottenuto lo scaffold, il nostro obiettivo è quello di testarlo su modello suino reclutandone otto di 40-45 kg di peso (n:8), che verranno sottoposti in anestesia generale al confezionamento di una "bridge fistulas" tra arteria e vena iliaca esterna attraverso l'interposizione di uno scaffold tubolare di circa 6 cm. Gli animali verranno

sottoposti a prelievi ematici di controllo nei primi sette giorni quotidianamente e successivamente a cadenza settimanale. Tutti gli animali verranno inoltre sottoposti a controllo Doppler settimanale. Dalla terza giornata postoperatoria agli animali verrà somministrato Apixaban 2,5 mg 1 compressa 2 volte al giorno. Due animali verranno poi sacrificati rispettivamente a 1, 3, 6 e 9 mesi dall'impianto per procedere alle necessarie valutazioni istopatologiche mediante esame macroscopico, microscopico e immunohistochimico per la ricerca di markers specifici per l'endotelio.

3 - Bibliografia / References

- [1] Kingsmore DB, Stevenson KS, Jackson A, Desai SS, Thompson P, Karydis N, Franchin M, White B, Tozzi M, Isaak A. Arteriovenous Access Graft Infection: Standards of Reporting and Implications for Comparative Data Analysis. *Ann Vasc Surg*. 2020 Feb;63:391-398. doi: 10.1016/j.avsg.2019.08.081. Epub 2019 Oct 15.
- [2] Demir D, Ceviker K, Aydin MS, Sahinalp S. Complications of arteriovenous fistula with polytetrafluoroethylene grafts in hemodialysis patients. *Niger J Clin Pract*. 2015 Jan-Feb;18(1):120-3. doi: 10.4103/1119-3077.146993.
- [3] l'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:389e95.
- [4] Buttery L, Shakesheff KM. A brief introduction to different cell types. In: Polak J, Mantalaris S, Harding SE, editors. *Advances in tissue engineering*. London: Imperial College Press; 2008. p. 16e32.
- [5] Wong P, Hopkins S, Vincente D, Williams K, Macri N, Berguer R. Differences in neointima formation between impervious and porous polytetrafluoroethylene vascular patch material. *Ann Vasc Surg* 2002;16:407e12.
- [6] Daar AS. Regenerative medicine: a taxonomy for addressing ethical, legal and social issues. In: Gutmann T, Daar AS, Sells RA, Land W, editors. *Ethical, legal, and social issues in organ transplantation*. Munich: Pabst; 2005. p. 368e77.
- [7] Takahashi H, Yokota T, Uchimura E, Miyagawa S, Ota T, Torikai K, et al. Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1269e76.
- [8] Rim NG, Shin CS, Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomed Mater* 2013;8:014102.
- [9] Xu W, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Controllable dual protein delivery through electrospun fibrous scaffolds with different hydrophilicities. *Biomed Mater* 2013;8:014104.

[10] Lo Monte AI, Licciardi M, Bellavia M, Damiano G, Palumbo VD, Palumbo FS, et al. Biocompatibility and biodegradability of electrospun PHEA-PLA scaffolds: our preliminary experience in a murine animal model. *Dig J Nanomater Biostruct* 2012: 841e51.

[11] S. Buscemi, V.D. Palumbo, A. Maffongelli, S. Fazzotta, F.S. Palumbo, M. Licciardi, C. Fiorica, R. Puleio, G. Cassata, L. Fiorello, G. Buscemi, and A.I. lo Monte. *Electrospun A Preliminary in Vivo PHEA-PLA/PCL Scaffold for Vascular Regeneration: a preliminary in vivo evaluation*. 2017 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.017>

[12] Pitarresi G, Fiorica C, Palumbo FS, Rigogliuso S, Ghersi G, Giammona G. Heparin functionalized polyaspartamide/polyester scaffold for potential blood vessel regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:1334e41.

[13] Cicero, L., Licciardi, M., Cirincione, R., Puleio, R., Giammona, G., Giglia, G., Sardo, P., Edoardo Vigni, G., Cioffi, A., Sanfilippo, A., & Cassata, G. (2022). Polybutylene succinate artificial scaffold for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(1), 125–134.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34896>