



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

*Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali*  
*Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica e Critica (Me.Pre.C.C.)*

*Creazione di “bridge fistulas” tramite scaffold tubulari in Poli-Butilene-  
Succinato funzionalizzati con Concentrati Piastrinici:  
Studio sperimentale in vivo*

Doctoral Dissertation of:

Dott.ssa Giulia Bonventre

Tutor:

Prof. Antonino Agrusa

Co-Tutor:

Prof. Attilio Ignazio Lo Monte

The Chair of the Doctoral Program:

Prof. Antonio Russo

2026 – XXXVIII Cycle

## INDICE

<b>1. Abstract</b>	<b>Pag. 3</b>
<b>2. Riassunto</b>	<b>Pag. 4</b>
<b>3. CAPITOLO 1 Background, Razionale e Obiettivi</b>	<b>Pag. 5</b>
<b>4. CAPITOLO 2 Materiali e Metodi</b>	<b>Pag. 12</b>
<b>5. CAPITOLO 3 Risultati</b>	<b>Pag. 23</b>
<b>6. CAPITOLO 4 Discussione</b>	<b>Pag. 27</b>
<b>7. CAPITOLO 5 Conclusioni e Prospettive Future</b>	<b>Pag. 31</b>
<b>8. Figure e Tabelle</b>	<b>Pag. 33</b>
<b>9. Bibliografia</b>	<b>Pag. 58</b>
<b>10. Ringraziamenti</b>	<b>Pag. 62</b>

## Abstract

Questa tesi esplora la possibilità di realizzare graft vascolari bioassorbibili mediante scaffold tubulari in polibutilene succinato (PBS) funzionalizzati con concentrato piastrinico ad uso non trasfusionale (CPunT) ottenuto da sangue autologo.

L'obiettivo è creare *bridge fistulas* artero-venose in grado di favorire la rigenerazione endogena e la sostituzione progressiva del materiale con tessuto vascolare.

Lo studio è stato condotto su un modello leporino, con valutazioni cliniche e istopatologiche effettuate a 1 mese dall'impianto, con l'intento di estenderle anche ai tempi di 3 e 6 mesi. I risultati preliminari suggeriscono una buona biocompatibilità dello scaffold, un'adeguata resistenza al flusso sanguigno e una possibile attività pro-rigenerativa associata alla funzionalizzazione con CPunT. L'integrazione di un biomateriale biodegradabile con una componente autologa bioattiva costituisce un'alternativa promettente ai tradizionali graft sintetici. Questa soluzione potrebbe rappresentare una strategia promettente nei pazienti nefropatici sottoposti a dialisi e, in generale, in quelli con patrimonio venoso ridotto che presentano difficoltà negli accessi vascolari, in particolare in ambito oncologico.

## Riassunto

La presente tesi è incentrata sullo sviluppo e sulla sperimentazione in vivo di scaffold vascolari biodegradabili in polibutilene succinato (PBS) funzionalizzati con concentrato piastrinico ad uso non trasfusionale (CPunT), tra cui il plasma ricco di piastrine (PRP), con l'obiettivo di offrire un'alternativa per l'accesso vascolare nei casi in cui la fistola artero-venosa autologa (FAV) risulti non realizzabile o non indicata. Il progetto nasce inoltre dall'esigenza clinica di superare i limiti delle protesi vascolari sintetiche spesso soggette a complicanze come trombosi, infezioni e scarsa integrazione biologica.

Lo studio approvato dal Ministero della Salute con Autorizzazione n. 636/2025-PR (Risposta prot. 28875.50) prevede la sperimentazione su 18 conigli, suddivisi in tre gruppi (impianto di scaffold con PRP, impianto di scaffold senza PRP e controlli), con creazione chirurgica di una *bridge fistula* in PBS tra arteria e vena iliaca esterna e con sacrificio programmato a 3 e 6 mesi per l'analisi della risposta biologica al graft, attraverso tecniche macroscopiche, istologiche e immunoistochimiche. L'uso del PRP, ricco di fattori di crescita, secondo dati presenti in letteratura risulta potenzialmente efficace nel favorire la neovascolarizzazione e la maturazione endoteliale.

Il presente lavoro suggerisce, seppur in una fase ancora preliminare e nonostante le limitazioni che verranno discusse nel corso della trattazione, che la combinazione di un polimero bioassorbibile con una componente autologa bioattiva può dare origine a un dispositivo in grado di guidare la rigenerazione vascolare, offrendo una potenziale alternativa biologica e meno invasiva rispetto agli innesti sintetici. Il lavoro si distingue per l'approccio interdisciplinare e l'integrazione di competenze cliniche, ingegneristiche e biotecnologiche, in collaborazione con Advanced Technology Network Center (ATeN Center) dell'Università degli Studi di Palermo e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" (IZS). I risultati ottenuti pongono le basi per future applicazioni cliniche nell'ambito della medicina rigenerativa vascolare.

## Background, Razionale e Obiettivi

### 1.1 Chirurgia rigenerativa vascolare: bisogni clinici e sviluppo di sostituti bioingegnerizzati

La chirurgia rigenerativa rappresenta oggi una delle aree più innovative della medicina traslazionale, proponendosi come un nuovo paradigma terapeutico per la riparazione, la sostituzione e la rigenerazione di tessuti e organi danneggiati [1, 2]. Questo approccio si fonda sull'integrazione tra biologia cellulare, ingegneria tissutale e scienza dei biomateriali, con l'obiettivo di creare condizioni biologiche favorevoli alla rigenerazione endogena dei tessuti.

Nel contesto vascolare, la disponibilità di sostituti vascolari affidabili rappresenta una necessità clinica di primaria importanza [3]. Numerose condizioni patologiche richiedono infatti la ricostruzione o la sostituzione di segmenti vascolari, come nel caso di malattie aterosclerotiche, traumi vascolari, chirurgia oncologica o creazione di accessi vascolari per emodialisi o terapie oncologiche sistemiche [4, 5].

Attualmente, le opzioni disponibili includono graft autologhi, biologici e sintetici. Gli innesti autologhi, come la vena safena, rappresentano il gold standard in molti contesti chirurgici grazie alla loro elevata biocompatibilità e ai buoni risultati di pervietà a lungo termine. Tuttavia, la loro disponibilità è limitata e non sempre i pazienti presentano un patrimonio venoso adeguato.

Gli innesti sintetici, come quelli in politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e in polietilene tereftalato (PET, commercialmente noto come Dacron®), sono ampiamente utilizzati nella pratica clinica, ma presentano limitazioni significative, soprattutto nei vasi di piccolo calibro. Tra le complicanze più frequenti si annoverano trombosi, infezioni e iperplasia intimale, che contribuiscono alla riduzione della pervietà del graft nel tempo [1, 6].

Alla luce di queste limitazioni, la ricerca scientifica si è progressivamente orientata verso lo sviluppo di sostituti vascolari bioingegnerizzati, progettati per imitare le proprietà strutturali e biologiche dei vasi sanguigni naturali. In questo scenario, un ruolo centrale è stato assunto dagli scaffold polimerici, in particolare quelli ottenuti mediante tecniche di elettrofilatura (electrospinning), che consentono di riprodurre una matrice tridimensionale fibrillare simile alla matrice extracellulare.

Studi come quello di Buscemi et al. hanno dimostrato come scaffold copolimerici a base di poli-idrossietil-aspartammide - acido polilattico/policaprolattone (PHEA-PLA/PCL) siano in grado di garantire un'adeguata resistenza meccanica e, al contempo, favorire processi biologici fondamentali

quali infiltrazione cellulare e neovascolarizzazione [7]. In modelli in vivo, tali dispositivi hanno evidenziato una buona integrazione biologica, con formazione di nuovi vasi e organizzazione progressiva del tessuto neoformato, suggerendo un potenziale impiego nella rigenerazione vascolare. Parallelamente, evidenze più recenti confermano che scaffold polimerici bioassorbibili possono essere finemente modulati in termini di porosità, composizione chimica e proprietà meccaniche, così da adattarsi allo specifico microambiente biologico e sostenere le diverse fasi del processo rigenerativo. In particolare, come emerge anche da uno dei nostri studi più recenti, questi materiali sono progettati per mantenere inizialmente un'adeguata integrità strutturale, fornendo supporto meccanico ai tessuti in crescita, per poi degradarsi progressivamente in sincronia con il rimodellamento tissutale [8].

Un aspetto cruciale è rappresentato dalla capacità degli scaffold di promuovere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, facilitando la ricostituzione di strutture funzionalmente simili a quelle native. Inoltre, la possibilità di funzionalizzare chimicamente tali matrici consente l'incorporazione di molecole bioattive (come fattori di crescita o farmaci), ampliandone ulteriormente il potenziale terapeutico.

Nel complesso, questi dati suggeriscono che i sostituti vascolari bioingegnerizzati basati su scaffold polimerici rappresentano una strategia promettente per superare i limiti dei graft tradizionali. Tuttavia, nonostante i risultati incoraggianti in ambito preclinico, rimane ancora necessario un approfondimento attraverso studi a lungo termine e trial clinici, al fine di validarne sicurezza, efficacia e reale applicabilità nella pratica clinica.

## **1.2 Limiti attuali e criteri di valutazione dei graft vascolari di piccolo calibro**

Nonostante i significativi progressi compiuti dalla chirurgia vascolare negli ultimi decenni, la sostituzione di vasi di piccolo calibro (diametro inferiore a 6 mm) continua a rappresentare una sfida clinica rilevante. Gli innesti sintetici tradizionali, costituiti principalmente da politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e polietilene tereftalato (PET, commercialmente noto come Dacron®), hanno dimostrato buoni risultati nella ricostruzione di vasi di medio e grosso calibro; tuttavia, le loro prestazioni nei distretti di piccolo diametro rimangono inferiori rispetto agli innesti autologhi, con tassi di pervietà non ancora soddisfacenti [9,10].

Una delle principali cause di fallimento è rappresentata dalla trombosi precoce, conseguenza della mancanza di una superficie endoteliale funzionale capace di garantire le proprietà antitrombotiche tipiche del vaso nativo. L'assenza di un adeguato rivestimento endoteliale favorisce infatti l'attivazione piastrinica e dei meccanismi della coagulazione, aumentando il rischio di occlusione del graft [11].

Un ulteriore limite è costituito dall'iperplasia intimale, che si sviluppa frequentemente a livello delle anastomosi e rappresenta una delle principali cause di stenosi e perdita di pervietà nel lungo termine. Tale fenomeno è il risultato dell'interazione tra alterazioni emodinamiche locali e risposta biologica del tessuto ospite al materiale impiantato [1,12].

Anche le proprietà meccaniche dei graft sintetici possono influenzarne il comportamento clinico. In particolare, la differenza di compliance tra il sostituto vascolare e il vaso nativo può determinare una distribuzione non fisiologica delle sollecitazioni emodinamiche e meccaniche, favorendo processi di rimodellamento patologico della parete vascolare e contribuendo allo sviluppo di complicanze tardive [13].

Infine, sebbene relativamente rara, l'infezione protesica rappresenta una complicanza severa associata all'impiego di materiali sintetici permanenti, gravata da elevata morbilità e spesso responsabile della necessità di ulteriori procedure chirurgiche [14].

Alla luce di tali limitazioni, negli ultimi anni la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di graft vascolari di nuova generazione basati sui principi dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa, con l'obiettivo di ottenere dispositivi in grado di favorire l'integrazione biologica, il rimodellamento vascolare e il mantenimento della pervietà nel lungo termine [15,16].

Nel percorso di sviluppo preclinico di questi nuovi sostituti vascolari, particolare attenzione viene dedicata alla valutazione delle loro prestazioni biologiche e meccaniche secondo standard internazionalmente riconosciuti. La norma ISO 7198:2016 definisce i principali requisiti prestazionali delle protesi vascolari tubulari, mentre la ISO 10993-4:2017 fornisce indicazioni per la valutazione delle interazioni tra biomateriali e sangue, aspetto particolarmente rilevante per dispositivi destinati all'impianto intravascolare. Analogamente, standard ASTM specifici consentono di valutare parametri quali compliance, resistenza meccanica e tenuta alla pressione. Sebbene tali aspetti siano principalmente utilizzati nell'ambito della ricerca preclinica e dello sviluppo dei dispositivi, essi rappresentano un passaggio fondamentale per garantire la sicurezza e l'efficacia dei nuovi graft prima della loro applicazione clinica.

### **1.3 Ingegneria tissutale vascolare e scaffold biomimetici**

L'ingegneria tissutale vascolare si basa sul concetto di creare strutture tridimensionali in grado di fungere da supporto temporaneo per la rigenerazione di nuovo tessuto vascolare. Queste strutture, denominate scaffold, svolgono il ruolo di impalcatura biologica che guida la colonizzazione cellulare e il rimodellamento tissutale.

Gli scaffold utilizzati in questo ambito devono possedere specifiche caratteristiche:

- biocompatibilità

- adeguate proprietà meccaniche
- porosità controllata
- capacità di favorire adesione e proliferazione cellulare
- degradazione progressiva nel tempo.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato che scaffold con architettura nanofibrosa sono in grado di mimare efficacemente la struttura della matrice extracellulare, favorendo l'integrazione cellulare e la rigenerazione tissutale [7, 17].

Tra le tecniche più utilizzate per la realizzazione di scaffold biomimetici vi è l'electrospinning, un processo che consente di produrre fibre polimeriche di dimensioni micro- o nanometriche mediante l'applicazione di un campo elettrico ad alta tensione. Le fibre così ottenute si organizzano in una matrice altamente porosa che ricorda l'organizzazione strutturale della matrice extracellulare naturale [18, 19].

Questa architettura favorisce non solo l'adesione cellulare ma anche la diffusione di nutrienti e ossigeno, elementi fondamentali per il mantenimento della vitalità cellulare.

#### **1.4 Biomateriali polimerici biodegradabili**

I biomateriali utilizzati per la produzione di scaffold vascolari possono essere classificati in naturali e sintetici. I materiali naturali, come collagene, fibrina o elastina, presentano eccellenti proprietà biologiche, ma limitata stabilità meccanica e maggiore variabilità biologica.

I polimeri sintetici biodegradabili rappresentano quindi un'alternativa particolarmente interessante, in quanto consentono un controllo più preciso delle proprietà meccaniche e della cinetica di degradazione.

Tra i polimeri più studiati in ambito di ingegneria tissutale figurano:

- acido polilattico (PLA)
- policaprolattone (PCL)
- poliidrossialcanoati (PHA)

Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse verso nuovi polimeri biodegradabili caratterizzati da una migliore combinazione di elasticità, biocompatibilità e degradazione controllata.

#### **1.5 Polibutilene succinato come biomateriale emergente**

Tra i polimeri di nuova generazione, il polibutilene succinato (PBS) ha attirato crescente attenzione per le sue proprietà favorevoli in ambito biomedicale [19].

Il PBS è un poliesteri alifatico biodegradabile ottenuto dalla policondensazione dell'acido succinico e dell'1,4-butandiolo. Grazie alla sua struttura chimica, questo materiale presenta un interessante

equilibrio tra proprietà meccaniche, biocompatibilità, biodegradabilità e processabilità, rendendolo particolarmente adatto alla realizzazione di dispositivi per applicazioni di medicina rigenerativa [20]. Dal punto di vista biologico, il PBS è caratterizzato da una buona tollerabilità tissutale e da una degradazione progressiva attraverso meccanismi sia idrolitici sia enzimatici. I prodotti derivanti dalla degradazione vengono generalmente metabolizzati senza indurre significative reazioni tossiche o fenomeni infiammatori persistenti. Tale caratteristica rappresenta un importante vantaggio rispetto ai materiali non degradabili, consentendo una graduale sostituzione del biomateriale con tessuto neoformato durante il processo di guarigione e rimodellamento [21].

Dal punto di vista meccanico, il PBS possiede una buona flessibilità, una resistenza alla trazione adeguata e una cinetica di degradazione relativamente lenta rispetto ad altri poliesteri biodegradabili. Queste proprietà consentono al materiale di mantenere un supporto strutturale sufficiente durante le fasi iniziali della rigenerazione tissutale, favorendo al contempo la progressiva integrazione con i tessuti ospiti.

Un ulteriore vantaggio del PBS è rappresentato dalla sua elevata versatilità nelle tecniche di lavorazione. Il materiale può infatti essere processato mediante stampa 3D, solvent casting, phase separation ed electrospinning. Quest'ultima tecnica permette di ottenere scaffold costituiti da micro- e nanofibre organizzate in una struttura tridimensionale altamente porosa, caratterizzata da un elevato rapporto superficie/volume e da caratteristiche morfologiche in grado di mimare l'architettura della matrice extracellulare naturale. Tali proprietà favoriscono l'adesione cellulare, la proliferazione, la migrazione e l'infiltrazione dei tessuti all'interno del biomateriale [21].

Negli ultimi anni il PBS è stato oggetto di crescente interesse nell'ambito dell'ingegneria tissutale, trovando applicazione in diversi modelli sperimentali dedicati alla rigenerazione ossea, nervosa, cutanea e vascolare. In particolare, scaffold microfibrillari a base di PBS hanno dimostrato una buona biocompatibilità e la capacità di supportare efficacemente i processi di rigenerazione tissutale in vivo, confermandone il potenziale come materiale per applicazioni di medicina rigenerativa avanzata [22]. Alla luce di tali caratteristiche, il PBS rappresenta un candidato particolarmente promettente per lo sviluppo di scaffold destinati alla chirurgia rigenerativa e all'ingegneria tissutale vascolare, ambiti nei quali risultano fondamentali la combinazione di supporto meccanico temporaneo, biodegradabilità controllata e capacità di favorire l'interazione con i tessuti dell'ospite.

## **1.6 CPunT e stimolazione della rigenerazione tissutale**

Parallelamente allo sviluppo di nuovi biomateriali, negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse verso l'utilizzo di componenti biologiche autologhe per stimolare i processi di rigenerazione tissutale [23].

Il concentrato piastrinico ad uso non trasfusionale (CPunT), tra cui il plasma ricco di piastrine (PRP), rappresenta una fonte particolarmente ricca di fattori di crescita. Le piastrine contengono infatti numerose molecole coinvolte nei processi di guarigione e rigenerazione tissutale, tra cui:

- platelet-derived growth factor (PDGF)
- vascular endothelial growth factor (VEGF)
- transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )
- fibroblast growth factor (FGF).

Questi fattori di crescita svolgono un ruolo cruciale nei processi di angiogenesi, proliferazione cellulare e rimodellamento della matrice extracellulare.

Per tale motivo il CPunT è stato ampiamente studiato in diversi ambiti della medicina rigenerativa, inclusi ortopedia, odontoiatria, chirurgia plastica e medicina dello sport.

### **1.7 La nostra revisione sistematica della letteratura**

Prima dell'avvio della fase sperimentale del presente progetto di ricerca è stata condotta una revisione sistematica della letteratura, con l'obiettivo di analizzare le evidenze disponibili riguardanti l'impiego di scaffold in polibutilene succinato e il potenziale ruolo del PRP nelle applicazioni vascolari.

La revisione sistematica, pubblicata sulla rivista *Journal of Functional Biomaterials*, è stata condotta seguendo le linee guida PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), al fine di garantire trasparenza metodologica e riproducibilità dei risultati.

La ricerca bibliografica è stata effettuata interrogando le principali banche dati scientifiche internazionali tra cui PubMed, Scopus e Web of Science. Sono stati selezionati studi sperimentali e preclinici riguardanti:

- l'utilizzo di scaffold polimerici biodegradabili in applicazioni vascolari;
- il ruolo del PRP nei processi di rigenerazione tissutale.

Dall'analisi della letteratura è emerso che numerosi studi hanno valutato separatamente l'impiego di biomateriali biodegradabili per la realizzazione di graft vascolari e l'utilizzo del PRP come stimolo biologico per la rigenerazione tissutale.

In particolare, diversi lavori hanno dimostrato che gli scaffold polimerici possono favorire l'integrazione cellulare e il rimodellamento vascolare nei modelli sperimentali. Parallelamente, numerose evidenze indicano che i fattori di crescita rilasciati dalle piastrine possono stimolare processi di angiogenesi ed endotelizzazione.

Tuttavia, l'analisi sistematica della letteratura ha evidenziato una limitata disponibilità di studi che esplorino l'integrazione di questi due approcci.

In particolare, non sono stati identificati studi che abbiano valutato direttamente l'impiego di scaffold vascolari in polibutilene biofunzionalizzati con PRP per la realizzazione di accessi vascolari o graft rigenerativi [4].

Questo dato suggerisce l'esistenza di un rilevante gap di conoscenza, che giustifica la necessità di ulteriori studi sperimentali in questo ambito.

### **1.8 Razionale dello studio**

Alla luce delle evidenze emerse dalla revisione della letteratura e delle potenzialità offerte dai biomateriali biodegradabili, è stato ipotizzato che la combinazione di uno scaffold vascolare in polibutilene succinato con bioattivazione mediante concentrato piastrinico autologo possa rappresentare una strategia innovativa per la realizzazione di graft vascolari rigenerativi.

In questo approccio, lo scaffold in PBS fornirebbe il supporto strutturale necessario a mantenere la pervietà del vaso nelle fasi iniziali dopo l'impianto, mentre i fattori di crescita rilasciati dalle piastrine favorirebbero la migrazione cellulare, l'endotelizzazione e la maturazione tissutale.

Il dispositivo impiantato non sarebbe quindi destinato a permanere indefinitamente nell'organismo, ma agirebbe come impalcatura temporanea, progressivamente sostituita da tessuto vascolare neoformato.

Il presente progetto di dottorato si propone pertanto di valutare, in un modello animale preclinico, la fattibilità e il comportamento biologico di scaffold tubulari in polibutilene succinato funzionalizzati con PRP con particolare attenzione ai processi di integrazione tissutale e rigenerazione vascolare [24].

## Materiali e Metodi

### 2.1 Iter autorizzativo e considerazioni etiche nella sperimentazione animale

Il progetto di ricerca è stato sottoposto al previsto iter autorizzativo nazionale, in conformità alla normativa vigente in materia di sperimentazione animale (Direttiva 2010/63/UE recepita in Italia con D.Lgs. 26/2014), che disciplina l'utilizzo di animali a fini scientifici e garantisce elevati standard di tutela del benessere animale.

In una fase preliminare, il protocollo sperimentale è stato presentato all'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA) dell'ente proponente, ovvero l'Istituto Zooprofilattico della Sicilia con il quale il nostro Ateneo ormai da anni collabora in termini di ricerca e formazione scientifica.

Tale passaggio ha consentito una valutazione interna approfondita del disegno sperimentale, degli obiettivi scientifici dello studio e della necessità dell'impiego di animali da laboratorio.

In particolare, l'OPBA ha esaminato la scelta della specie e del modello animale, la numerosità campionaria e le procedure previste, con specifica attenzione all'impatto potenziale sul benessere degli animali.

Successivamente alla revisione interna e all'espressione di parere favorevole da parte dell'OPBA, il progetto è stato trasmesso al Ministero della Salute tramite la piattaforma ministeriale dedicata. Il Ministero ha quindi proceduto a una valutazione tecnico-scientifica del protocollo, finalizzata a verificare la solidità metodologica dello studio, la coerenza tra obiettivi e disegno sperimentale e il rispetto dei requisiti normativi ed etici.

Lo studio ha previsto l'impiego di 18 conigli maschi New Zealand White, selezionati in una fascia di età tale da evitare significativi incrementi fisiologici che potessero costituire un fattore confondente per le variabili oggetto di analisi. La scelta del numero di animali e delle loro caratteristiche è stata attentamente giustificata sulla base di criteri scientifici e statistici, al fine di garantire la validità dei risultati limitando al minimo l'uso di animali.

Durante l'intero processo valutativo è stato esplicitamente considerato il principio delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement), cardine della normativa vigente. In particolare, l'impossibilità di sostituire il modello animale con metodi alternativi (Replacement) è stata adeguatamente motivata; la numerosità campionaria è stata ridotta al minimo necessario per ottenere risultati scientificamente robusti (Reduction); infine, le procedure sperimentali sono state progettate

e condotte adottando tutte le misure atte a minimizzare dolore, sofferenza, stress e disagio per gli animali coinvolti (Refinement) [25].

Al termine dell'iter autorizzativo, il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute nel mese di settembre 2025, con autorizzazione n. 636/2025-PR (rif. prot. n. 28875.50). Solo a seguito del rilascio di tale autorizzazione è stato possibile procedere all'avvio dello studio sperimentale, previa acquisizione dei primi tre animali da laboratorio presso la società *Charles River Laboratories Italia s.r.l.*. L'acquisto è stato effettuato dal Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica e Critica (Me.Pre.C.C.) dell'Università degli Studi di Palermo utilizzando i fondi assegnati nell'ambito del bando ProgRic 2024, di cui il gruppo di ricerca proponente è risultato vincitore.

## **2.2 Disegno dello studio**

Il presente studio sperimentale è stato progettato con l'obiettivo di valutare la fattibilità della creazione di una *bridge fistula* artero-venosa mediante l'impiego di scaffold tubulari in PBS funzionalizzati con PRP ottenuto da sangue autologo.

Il progetto sperimentale è stato approvato dal Ministero della Salute con autorizzazione n. 636/2025-PR (prot. 28875.50) e condotto in collaborazione con:

- ATeN Center – Advanced Technology Network Center, Università degli Studi di Palermo, per la produzione degli scaffold
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia “A. Mirri”, per la gestione del modello animale e per l'utilizzo dei loro laboratori e delle sale operatorie all'avanguardia.

Il protocollo approvato prevedeva l'utilizzo di 18 conigli maschi di razza New Zealand White, suddivisi in tre gruppi sperimentali:

- Gruppo A: scaffold PBS funzionalizzato con PRP
- Gruppo B: scaffold PBS non funzionalizzato
- Gruppo C: gruppo controllo

L'obiettivo sperimentale era la creazione chirurgica di una *bridge fistula* tra arteria e vena iliaca esterna, con successiva valutazione della risposta biologica al biomateriale a 3 e 6 mesi dall'impianto.

## **2.3 Produzione dello scaffold vascolare**

Gli scaffold utilizzati nello studio sono stati prodotti presso l'ATeN Center utilizzando il PBS, un poliestere alifatico biodegradabile caratterizzato da buona biocompatibilità e adeguate proprietà meccaniche per applicazioni di ingegneria tissutale.

La fabbricazione dello scaffold è stata realizzata mediante tecnica di electrospinning, che consente la produzione di fibre polimeriche micro e nanometriche attraverso l'applicazione di un campo elettrico ad alta tensione su una soluzione polimerica [19].

Questa tecnica permette di ottenere una struttura fibrosa tridimensionale altamente porosa, con caratteristiche morfologiche simili alla matrice extracellulare naturale, favorendo la colonizzazione cellulare e l'integrazione biologica.

Gli scaffold utilizzati nell'ambito del progetto sono stati prodotti con configurazione tubulare, con lunghezza complessiva di 10 cm e diametro interno di 4 mm.

Al fine di migliorare la visualizzazione radiologica del materiale, il polimero è stato additivato con nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), un ossido di ferro dotato di proprietà magnetiche e di imaging ampiamente impiegato nello sviluppo di biomateriali multifunzionali. L'incorporazione della magnetite ha conferito allo scaffold una parziale radiopacità, consentendone la visualizzazione mediante esami radiografici e il monitoraggio del corretto posizionamento dopo l'impianto. Studi recenti hanno inoltre dimostrato come l'integrazione di nanoparticelle di ossido di ferro in scaffold a base di polibutilene succinato permetta di ottenere biomateriali biocompatibili dotati di proprietà di imaging e potenziale tracciabilità in vivo [32].

Inoltre, per ridurre il rischio di contaminazione batterica, lo scaffold è stato funzionalizzato con Ciprofloxacina al 5% (p/p) (*Figura 1*).

Prima dell'utilizzo chirurgico, il materiale è stato sottoposto a sterilizzazione mediante plasma a gas presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, procedura che consente l'eliminazione di microrganismi senza alterare le proprietà strutturali del biomateriale.

#### **2.4 Preparazione del concentrato piastrinico e biofunzionalizzazione dello scaffold**

Col termine di emocomponenti ad uso non trasfusionale (EunT) si è soliti indicare quella classe di composti, ottenuti solitamente per centrifugazione del sangue intero, utile alla stimolazione dei processi di guarigione. Infatti, oggi questi sono sempre più utilizzati nell'ambito della medicina rigenerativa con l'obiettivo di modulare ed accelerare i processi biologici coinvolti nella riparazione tissutale [26].

Tra i vari EunT, il CPunT rappresenta il prodotto più noto e comprende preparazioni quali il Plasma Ricco di Piastrine (PRP), che negli ultimi anni ha suscitato notevole interesse per il suo potenziale nell'ambito della medicina rigenerativa e della chirurgia sperimentale. Il PRP, che contiene un'elevata concentrazione di piastrine, rappresenta una fonte ricca di fattori di crescita biologicamente attivi tra cui PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  e FGF, coinvolti nei processi di angiogenesi, proliferazione cellulare e rimodellamento della matrice extracellulare [27].

Nel presente studio è stato utilizzato concentrato piastrinico autologo, ottenuto a partire da sangue intero prelevato dagli animali del modello sperimentale. L'utilizzo di sangue autologo rappresenta una strategia consolidata per garantire elevata biocompatibilità e minimizzare il rischio di reazioni immunologiche.

Per valutare qualitativamente e quantitativamente la composizione dell'emocomponente utilizzato, è stato inizialmente eseguito un emocromo su un campione di sangue intero, secondo la procedura standard. Successivamente, la stessa analisi emocromocitometrica è stata ripetuta sul campione dopo la lavorazione. Nel dettaglio, si sono valutate le concentrazioni piastriniche, leucocitarie ed eritrocitarie del sangue intero appena prelevato dall'animale e si sono confrontate con quelle ottenute al termine della preparazione del PRP.

#### **2.4.1 Modalità di prelievo ematico**

Data la labilità e le ridotte dimensioni del modello animale scelto, si è limitato il prelievo intracardiaco finalizzato all'ottenimento del PRP ad appena 10 mL di sangue intero.

Una volta eseguita la puntura intracardiaca su uno dei modelli sperimentali, il sangue così ottenuto è stato suddiviso in due provette Vacutainer tappo viola, contenenti EDTA come anticoagulante. Questo è stato scelto in quanto numerosi studi, sia clinici che preclinici, hanno dimostrato la sua capacità di preservare l'integrità delle piastrine e la loro funzionalità biologica durante le fasi di manipolazione del campione [14].

Una delle provette è stata destinata all'analisi emocromocitometrica basale, l'altra all'ottenimento del PRP.

I valori basali rintracciati sono risultati i seguenti:

- $PLT = 369 \times 10^3 / \mu L$
- $WBC = 7.41 \times 10^3 / \mu L$
- $RBC = 6.47 \times 10^6 / \mu L$

Tali parametri sono indicativi di una cavia sana; è importante sottolineare che possono presentare variazioni individuali, ma rappresentano nel complesso valori di riferimento nella norma.

#### **2.4.2 Protocollo di centrifugazione**

Il protocollo di ottenimento del plasma ricco di piastrine (PRP) è stato sviluppato attraverso una serie di prove sperimentali preliminari finalizzate all'individuazione delle condizioni di centrifugazione più idonee per il modello leporino. Tutte le procedure sono state eseguite sotto cappa biologica a flusso laminare per ridurre il rischio di contaminazione microbiologica, utilizzando una centrifuga da banco Heraeus Labofuge 400 Function Line.

In una fase iniziale è stato valutato il protocollo descritto da Li et al. [27], basato su una centrifugazione a 600 g per 10 minuti. Tale approccio non ha consentito una separazione soddisfacente delle componenti ematiche e non ha permesso di ottenere un concentrato piastrinico adeguato, rendendo necessaria una fase di ottimizzazione dedicata.

Sono stati quindi testati differenti protocolli a doppia centrifugazione. La prima centrifugazione è stata eseguita a 2500 RCF (Relative Centrifugal Force, parametro che esprime la forza centrifuga applicata al campione come multiplo dell'accelerazione di gravità terrestre) variando il tempo di centrifugazione tra 13 e 20 minuti. Al termine della procedura, la frazione plasmatica contenente le piastrine veniva aspirata con estrema cautela, interrompendo il prelievo immediatamente al di sopra del buffy coat al fine di limitare la contaminazione leucocitaria.

La frazione plasmatica ottenuta veniva successivamente sottoposta a una seconda centrifugazione a 3500 RCF, variando il tempo di centrifugazione tra 30 e 45 minuti, con l'obiettivo di favorire la sedimentazione delle piastrine sotto forma di pellet. Dopo la rimozione del platelet-poor plasma (PPP), il pellet veniva risospeso nel plasma residuo mediante tecnica di pipettaggio ripetuto ("up-and-down"), ottenendo così il concentrato piastrinico finale.

L'efficacia dei diversi protocolli è stata valutata mediante analisi emocromocitometrica dei campioni ottenuti. Il sangue intero non processato presentava una concentrazione piastrinica basale pari a  $369 \times 10^3/\mu\text{L}$ . I primi tentativi, basati su una singola centrifugazione a 2500 RCF per tempi compresi tra 15 e 20 minuti, hanno prodotto concentrazioni piastriniche relativamente basse, comprese tra  $9,93$  e  $15,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ . In particolare, il campione sottoposto a centrifugazione per 20 minuti ha mostrato una concentrazione piastrinica pari a  $9,93 \times 10^3/\mu\text{L}$  (con anche WBC  $0.046 \times 10^3/\mu\text{L}$  e RBC  $0.002 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), mentre i campioni centrifugati rispettivamente per 15 e 17 minuti hanno raggiunto valori pari a  $15,8 \times 10^3/\mu\text{L}$  (WBC  $0.019 \times 10^3/\mu\text{L}$ , RBC  $0.006 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e  $14,5 \times 10^3/\mu\text{L}$  (WBC  $0.008 \times 10^3/\mu\text{L}$ , RBC  $0.004 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), rispettivamente.

Successivamente è stato testato un protocollo a doppia centrifugazione comprendente una prima centrifugazione a 2500 RCF per 13 minuti e una seconda centrifugazione a 3500 RCF per 30 minuti. Tale modifica ha determinato un incremento della concentrazione piastrinica fino a  $25,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ , suggerendo una maggiore efficienza nel recupero delle piastrine rispetto ai protocolli precedentemente testati.

L'ulteriore prolungamento della seconda centrifugazione a 45 minuti ha consentito di ottenere il risultato migliore tra tutti i protocolli valutati. In questo caso, il concentrato piastrinico finale ha raggiunto una concentrazione piastrinica pari a  $99,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ , associata a valori di contaminazione leucocitaria ed eritrocitaria estremamente ridotti (WBC  $0,028 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; RBC  $0,018 \times 10^6/\mu\text{L}$ ).

Rispetto al protocollo con seconda centrifugazione di 30 minuti, tale procedura ha determinato un incremento di circa quattro volte della concentrazione piastrinica ottenuta.

Complessivamente, i risultati hanno evidenziato come la progressiva ottimizzazione dei parametri di centrifugazione, in particolare la riduzione del tempo della prima centrifugazione a 13 minuti e l'estensione della seconda centrifugazione a 45 minuti, abbia migliorato significativamente il recupero piastrinico mantenendo al contempo una bassa contaminazione da eritrociti e leucociti. Alla luce di tali evidenze, il protocollo costituito da una prima centrifugazione a 2500 RCF per 13 minuti seguita da una seconda centrifugazione a 3500 RCF per 45 minuti è stato selezionato per tutte le successive fasi sperimentali, rappresentando il metodo più performante tra quelli valutati nelle condizioni operative e strumentali disponibili, pur restando suscettibile di ulteriori ottimizzazioni nell'ambito di studi futuri (*Figura 2*).

## **2.5 Fase di preconditioning dello scaffold**

Nel corso dello studio è stata adottata una strategia di *preconditioning* dello scaffold, intesa come l'insieme di stimolazioni biologiche applicate al biomateriale nella fase pre-impianto. In particolare, tale approccio è stato realizzato mediante biofunzionalizzazione con PRP autologo immediatamente prima dell'impianto, con l'obiettivo di potenziarne le proprietà rigenerative.

Va tuttavia sottolineato che il presente studio non prevedeva analisi specifiche finalizzate a dimostrare l'effettiva incorporazione del concentrato piastrinico all'interno dello scaffold. Pertanto, la funzionalizzazione è stata definita sulla base della procedura di immersione del biomateriale nel concentrato piastrinico prima dell'impianto. Le differenze osservate tra i patch trattati e non trattati, che verranno discusse nel corso della trattazione, rappresentano evidenze indirette di una possibile attività biologica associata a tale procedura, che dovrà essere confermata mediante studi dedicati. Questo approccio consente di ottenere una funzionalizzazione biologica semplice, riproducibile e priva di modificazioni chimiche del materiale. In particolare, il contatto diretto tra PRP e scaffold favorisce l'adesione piastrinica e la conseguente attivazione delle piastrine, con successiva degranolazione e rilascio locale e progressivo di fattori di crescita, tra cui VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1 e IGF, noti per il loro ruolo chiave nei processi di angiogenesi e rigenerazione tissutale [27, 28].

## **2.6 Modello animale e procedura chirurgica**

Il protocollo sperimentale prevedeva inizialmente l'impiego di 18 conigli maschi della razza New Zealand White, suddivisi in tre gruppi sperimentali:

- Gruppo A: scaffold in PBS funzionalizzato con PRP (n = 6)
- Gruppo B: scaffold in PBS non funzionalizzato (n = 6)

- Gruppo C: gruppo “sham”, ovvero controlli sottoposti a laparotomia, ma senza impianto (n = 6). Tuttavia, la fase preliminare della sperimentazione ha evidenziato alcune criticità tecniche legate al modello animale scelto. I primi tre soggetti, acquisiti con fondi destinati alla ricerca presso la società Charles River Laboratories dopo l’autorizzazione ministeriale, sono stati impiegati in una fase esplorativa volta alla messa a punto dell’iter chirurgico e laboratoriale, con l’obiettivo di valutare la fattibilità tecnica della produzione del CPunT e dell’impianto dello scaffold vascolare. I conigli utilizzati presentavano peso corporeo medio di circa 5 kg e un’età approssimativa di 5 mesi (*Figura 3 e 4*).

### **2.6.1 Primo intervento chirurgico (“Esperimento 1”)**

Il primo intervento è stato eseguito in data 27 gennaio 2026.

L’induzione anestesiológica è stata ottenuta mediante somministrazione intramuscolare di medetomidina cloridrato (0,04 ml/kg), con mantenimento dell’anestesia generale mediante isofluorano al 2%.

Inizialmente, si è proceduto col prelievo intracardiaco di sangue intero (10 ml), per permettere di eseguire i primi test di produzione dell’emocomponente autologo.

Successivamente, l’animale è stato posizionato in decubito dorsale e, dopo adeguata preparazione antisettica del campo operatorio mediante soluzione di iodopovidone, è stato eseguito un accesso laparotomico mediano con esposizione della cavità addominale (*Figura 5*).

Dopo apertura della cavità addominale, è stata eseguita la mobilitazione delle anse intestinali e l’esposizione del retroperitoneo per identificare i vasi iliaci in quanto la procedura prevedeva inizialmente l’isolamento dell’arteria iliaca esterna destra e della vena iliaca esterna destra, con l’obiettivo di confezionare una fistola artero-venosa mediante interposizione di uno scaffold tubulare in PBS tra i vasi (*Figura 6*).

Durante la dissezione chirurgica è tuttavia emerso che il calibro dei vasi iliaci del modello leporino risultava eccessivamente ridotto, rendendo tecnicamente complessa e poco sicura la realizzazione di un’anastomosi vascolare con lo scaffold progettato.

Per tale motivo si è deciso intraoperatoriamente di modificare l’approccio chirurgico, procedendo all’isolamento dell’aorta addominale e della vena cava inferiore, strutture vascolari di calibro maggiore e quindi più idonee alla sperimentazione (*Figura 7 e 8*).

Lo scaffold in PBS, precedentemente sezionato in un segmento di circa 5 cm e sagomato con estremità a “becco di flauto”, è stato anastomizzato con l’aorta previa arteriotomia mediante microsutura continua con filo monofilamento non riassorbibile Prolene 7/0 (*Figure 9 e 10*).

Successivamente è stata preparata la vena cava per il confezionamento della seconda anastomosi.

Tuttavia, durante questa fase operatoria si è osservato che lo spessore estremamente ridotto delle pareti venose impediva la realizzazione di un'anastomosi stabile e dotata di adeguata tenuta emostatica (*Figura 11*).

Alla luce dell'impossibilità tecnica di completare l'anastomosi in condizioni di sicurezza, si è reso necessario procedere al sacrificio dell'animale.

È importante sottolineare che, nonostante l'intervento non sia stato completato, lo scaffold ha mostrato una buona resistenza al flusso ematico, senza evidenza di trasudazione attraverso la parete del biomateriale. È stata tuttavia osservata una tendenza allo slaminamento degli strati del materiale in corrispondenza dell'anastomosi, aspetto successivamente discusso con il gruppo di bioingegneri dell'ATeN Center che aveva realizzato il dispositivo.

Si sottolinea nuovamente che, in questo primo esperimento, lo scaffold non era stato funzionalizzato, in quanto il prelievo ematico eseguito prima dell'atto chirurgico era stato destinato all'esecuzione dei test preliminari per l'ottenimento del CPunT.

### **2.6.2 Secondo intervento chirurgico (“Esperimento 2”)**

Il secondo intervento è stato eseguito in data 19 febbraio 2026 su un secondo animale, con l'obiettivo di valutare nuovamente la fattibilità dell'impianto dello scaffold vascolare e di eseguire ulteriori test di produzione dell'EunT.

Sulla base dell'esperienza maturata nel corso del primo intervento e alla luce dell'insuccesso iniziale, si è deciso di procedere con un tentativo di interposizione protesica a livello della vena cava inferiore. Tale approccio avrebbe previsto la resezione di un breve segmento vascolare, seguita dall'anastomosi del vaso con lo scaffold interposto. La scelta è stata motivata dalla maggiore congruenza tra il diametro del distretto venoso e quello dello scaffold impiegato, rendendo questa applicazione tecnicamente più idonea. (*Figure 12 e 13*).

Durante la procedura chirurgica è stata dunque effettuata la sezione di un tratto della vena cava con l'intento di procedere alla ricostruzione mediante graft.

Tuttavia, durante la preparazione del campo operatorio si è verificato un sanguinamento significativo proveniente da un ramo collaterale dell'aorta, che non è stato possibile controllare in modo efficace a causa del ridotto spessore delle pareti vascolari e della fragilità dei tessuti.

Nonostante i tentativi di controllo emostatico, non è stato possibile stabilizzare adeguatamente il quadro intraoperatorio e si è reso necessario procedere alla soppressione del secondo animale.

### 2.6.3 Terzo intervento chirurgico (“Esperimento 3”)

Le criticità riscontrate nei primi due interventi hanno evidenziato come il modello leporino presenti importanti limitazioni per la realizzazione di graft vascolari di questo tipo, principalmente a causa:

- del calibro estremamente ridotto dei vasi iliaci
- del ridotto spessore delle pareti vascolari
- della fragilità dei tessuti durante le manovre di sutura microchirurgica

Alla luce di tali osservazioni si è giunti alla conclusione che, per la tipologia di scaffold progettato e per l’obiettivo di creare una *bridge fistula*, il modello animale scelto non risultava ottimale; pertanto, il terzo animale è stato quindi utilizzato con un obiettivo sperimentale differente, finalizzato a valutare:

- la biocompatibilità dello scaffold
- la possibilità di monitoraggio radiologico del materiale

In data 19 marzo 2026 è stato pertanto eseguito un intervento chirurgico di impianto retromuscolare sottofasciale e preperitoneale di patch realizzati a partire dallo scaffold tubulare.

Subito dopo il prelievo intracardiaco ed a seguito di sedazione e preparazione sterile del campo operatorio, è stata eseguita un’incisione sovra-ombelicale con dissezione dei piani cutanei e sottocutanei fino alla fascia posteriore dei muscoli retti dell’addome.

Lo scaffold tubulare è stato preventivamente sagomato in due patch di circa  $2 \times 2$  cm.

Sono stati quindi creati due siti di impianto nella medesima cavia, destinati rispettivamente all’alloggiamento dello scaffold sperimentale, ovvero quello funzionalizzato, e dello scaffold di controllo interno.

I due scaffold, trasformati in patch, sono stati così disposti:

- lato sinistro: patch non funzionalizzato (*Figura 14*)
- lato destro: patch funzionalizzato mediante immersione nel concentrato piastrinico per 30 minuti (*Figura 15*)

I patch sono stati fissati ai tessuti circostanti mediante punti di sutura in Prolene 2-0, rispettivamente in sede retromuscolare (dietro la fascia posteriore dei muscoli retti dell’addome) e preperitoneale.

È stata eseguita una radiografia della cavia prima dell’inizio dell’intervento e un’ulteriore radiografia al termine dell’impianto del patch; quest’ultima ha consentito di verificare il posizionamento del graft. Ciò è stato permesso grazie alla radiopacità del materiale, ottenuta tramite l’aggiunta di nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) in fase di produzione dello scaffold.

Durante il controllo radiologico si è osservato uno spostamento del patch sinistro, che è stato successivamente riposizionato correttamente (*Figure 16 e 17*).

La ferita chirurgica è stata quindi chiusa per piani anatomici dopo accurato controllo dell’emostasi.

L'intervento si è concluso senza complicanze intraoperatorie.

#### **2.6.4 Espianto da “Esperimento 3”**

In data 20/04/2026 si è deciso di procedere all'espianto dei due patch a poco più di un mese dall'impianto. La scelta di ottenere risultati a brevissimo termine, anziché a tre mesi, è stata motivata dall'impossibilità di portare a termine l'idea progettuale iniziale. Si è ipotizzato, infatti, che lo scaffold planare potesse integrarsi più rapidamente ed eventualmente andare incontro a riassorbimento; pertanto, si è ritenuto opportuno valutare precocemente le condizioni dello scaffold utilizzato come patch in sede preperitoneale. L'obiettivo era anche quello di ottenere dati istologici a breve termine che permettessero di confrontare la colonizzazione cellulare tra il patch funzionalizzato e quello non funzionalizzato.

L'animale è stato sottoposto ad anestesia generale secondo protocollo e il campo operatorio è stato preparato in condizioni di sterilità. La ferita chirurgica addominale, esito del precedente intervento, risultava ben consolidata e guarita per prima intenzione.

Mediante relaparotomia sulla medesima incisione, si è proceduto al reperimento dei piani tissutali, eseguendo l'incisione di cute e sottocute fino al raggiungimento della fascia posteriore dei muscoli retti. In tale sede sono stati identificati i patch precedentemente impiantati. Successivamente, i patch sono stati accuratamente rimossi insieme al tessuto neoformato adiacente e i campioni sono stati inviati a fresco al Servizio di Anatomia Patologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" per la preparazione dei vetrini e la successiva valutazione istologica.

All'osservazione macroscopica, il patch funzionalizzato appariva circondato da tessuto maggiormente infiammato, verosimilmente in risposta a uno stimolo locale (*Figure 18, 19 e 20*).

La chiusura della breccia chirurgica è stata eseguita per piani, con attento controllo dell'emostasi. L'intervento si è svolto senza complicanze.

#### **2.6.5 Valutazione istologica dei campioni espantati**

I campioni ottenuti al momento dell'espianto sono stati inviati a fresco al Servizio di Anatomia Patologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia “A. Mirri” per la preparazione dei vetrini e la successiva valutazione istologica.

Le sezioni istologiche sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina (H&E) e successivamente esaminate mediante microscopia ottica. L'analisi è stata condotta con finalità prevalentemente qualitative e descrittive, al fine di valutare la risposta tissutale indotta dall'impianto degli scaffold.

In particolare, sono stati presi in esame il grado di integrazione del biomateriale nei tessuti circostanti, la presenza e l'entità dell'infiltrato infiammatorio, il grado di vascolarizzazione locale e le caratteristiche morfologiche del tessuto neoformato in prossimità dell'impianto. L'osservazione comparativa dei campioni ha inoltre consentito di evidenziare eventuali differenze nella risposta biologica tra lo scaffold funzionalizzato con concentrato piastrinico e quello non funzionalizzato.

## Risultati

Ad oggi, tre animali sono stati inclusi nella fase preliminare della sperimentazione e, in particolare:

- due animali sono stati soppressi nel corso dei primi tentativi di impianto vascolare, a causa delle difficoltà tecniche incontrate e delle complicanze intraoperatorie descritte;
- il terzo animale è stato impiegato per la valutazione della biocompatibilità dello scaffold, sia in forma funzionalizzata con concentrato piastrinico sia in forma non funzionalizzata, oltre che per l'analisi della radiovisibilità del materiale, mediante impianto preperitoneale di patch.

Questa fase preliminare ha consentito di acquisire informazioni rilevanti sia sulle proprietà biomeccaniche dello scaffold sia sui limiti intrinseci del modello animale selezionato.

In particolare, le osservazioni raccolte hanno evidenziato criticità tecniche significative che hanno influenzato l'ottenimento del concentrato piastrinico, l'esecuzione delle procedure microchirurgiche e dunque la riuscita degli impianti.

Le difficoltà riscontrate nei primi due interventi hanno infatti messo in luce come il modello leporino presenti alcune limitazioni strutturali rilevanti per la realizzazione di graft vascolari di questo tipo, riconducibili principalmente a:

- calibro estremamente ridotto dei vasi iliaci;
- ridotto spessore delle pareti vascolari;
- elevata fragilità dei tessuti durante le manovre di sutura microchirurgica.

Inoltre, la poca resistenza e le dimensioni ridotte dell'animale hanno impedito di eseguire prelievi ematici in quantità sufficiente all'ottenimento di EunT ad alta concentrazione piastrinica, per i quali sarebbero stati necessari volumi almeno doppi di sangue intero a disposizione.

Nonostante tali criticità, i risultati preliminari hanno comunque fornito indicazioni utili.

Durante il primo intervento, sebbene non sia stato possibile completare l'anastomosi, è stata verificata una buona resistenza dello scaffold al flusso ematico: non sono stati osservati fenomeni di trasudazione ematica attraverso il materiale. Tuttavia, è stata rilevata una tendenza allo slaminamento degli strati dello scaffold in corrispondenza della sede anastomotica, aspetto che è stato successivamente condiviso e discusso con il gruppo di bioingegneria responsabile della progettazione e realizzazione del dispositivo, al fine di valutarne le possibili implicazioni strutturali e migliorative.

Per quanto riguarda la componente radiovisibile del materiale, lo scaffold addizionato con magnetite ha permesso di confermare la possibilità di monitorarne il corretto posizionamento mediante imaging radiografico. Tale caratteristica rappresenta un elemento di potenziale interesse sia per la valutazione intraoperatoria del corretto posizionamento sia per il follow-up nel tempo, inclusa l'eventuale valutazione dei processi di integrazione e riassorbimento del materiale.

In relazione alla biofunzionalizzazione dello scaffold, è opportuno sottolineare come la preparazione del concentrato piastrinico sia una procedura caratterizzata da molteplici variabili operative, dipendenti dall'operatore e dalle specifiche apparecchiature utilizzate, nonché dalla quantità di sangue prelevato. Tali elementi introducono una componente di variabilità intrinseca nel processo, che può influenzare la riproducibilità del protocollo e la concentrazione finale del prodotto ottenuto, rendendo pertanto necessaria una progressiva standardizzazione delle condizioni operative.

Per quanto riguarda l'aspetto istologico, l'analisi microscopica ha rappresentato un elemento fondamentale per la corretta interpretazione dei reperti osservati macroscopicamente.

All'osservazione macroscopica iniziale, il patch funzionalizzato con PRP appariva circondato da una maggiore quantità di tessuto reattivo rispetto allo scaffold non funzionalizzato (*Figure 18, 19 e 20*). Tale aspetto, caratterizzato da una colorazione macroscopicamente più intensa e da un evidente aumento della vascolarizzazione locale, aveva inizialmente suggerito la possibile presenza di una reazione flogistica più marcata in corrispondenza del dispositivo modificato. In una prima interpretazione, questo reperto poteva essere attribuito sia a una maggiore reattività tissutale indotta dalla funzionalizzazione, sia a un incremento dei processi biologici di integrazione e riorganizzazione tissutale nelle fasi precoci post-impianto.

Tuttavia, l'analisi istologica ha permesso di riconsiderare criticamente tali osservazioni macroscopiche, fornendo un'interpretazione sostanzialmente differente e biologicamente più rilevante dei risultati ottenuti. In particolare, la valutazione microscopica ha dimostrato che il patch funzionalizzato con PRP risultava ben conservato e correttamente integrato nei tessuti circostanti, senza evidenza di fenomeni di degradazione patologica del materiale né di infiltrato flogistico significativo (*Figure 21, 22 e 23*).

Dal punto di vista morfologico, il tessuto circostante mostrava caratteristiche compatibili con un processo di integrazione biologica e rimodellamento riparativo. In particolare, si osservava la presenza di tessuto fibroconnettivale organizzato, associato a deposizione di matrice extracellulare e a una moderata cellularità compatibile con fibroblasti e cellule stromali coinvolte nei processi di riparazione tissutale. Inoltre, la maggiore vascolarizzazione osservata macroscopicamente appariva coerente con fenomeni di neoangiogenesi e colonizzazione cellulare dello scaffold, piuttosto che con una risposta flogistica patologica. La presenza di rare cellule infiammatorie croniche, verosimilmente

riconducibili a macrofagi e piccoli aggregati linfocitari tipici della fisiologica risposta da corpo estraneo ai biomateriali impiantabili, risultava limitata e non associata a segni di danno tissutale.

La maggiore “reattività” osservata macroscopicamente non era quindi espressione di un processo infiammatorio dannoso, bensì verosimilmente correlata a una più efficiente attività di integrazione biologica dello scaffold, associata a fenomeni di colonizzazione cellulare, neoformazione tissutale e rimodellamento locale favoriti dalla presenza del PRP. Questo rappresenta un dato di particolare interesse, poiché suggerisce che la funzionalizzazione non solo non induca una risposta avversa dell’ospite, ma possa addirittura promuovere un microambiente più favorevole alla rigenerazione tissutale.

Al contrario, lo scaffold di controllo non funzionalizzato mostrava una minore conservazione della propria integrità strutturale ed era associato a una risposta infiammatoria maggiormente evidente (*Figure 24, 25 e 26*). L’analisi istologica evidenziava infatti una disorganizzazione del materiale impiantato, con perdita della continuità strutturale del patch e presenza di infiltrato flogistico diffuso nei tessuti circostanti. Sebbene la valutazione morfologica effettuata mediante colorazione standard ematossilina-eosina non consenta una caratterizzazione immunofenotipica delle popolazioni cellulari coinvolte, il quadro istologico osservato risultava compatibile con una risposta infiammatoria cronica associata ai processi di degradazione e rimodellamento del biomateriale. In particolare, lungo l’interfaccia tra scaffold e tessuto ospite si osservava un denso infiltrato di cellule infiammatorie mononucleate associato a tessuto fibrovascolare reattivo. Inoltre, in alcune aree erano presenti elementi cellulari di maggiori dimensioni, potenzialmente riconducibili a una reazione da corpo estraneo; tuttavia, in assenza di approfondimenti immunohistochimici, non è stato possibile definirne con certezza la natura. Complessivamente, tali reperti suggerivano una risposta tissutale meno favorevole nei confronti dello scaffold non funzionalizzato rispetto al corrispondente scaffold trattato con concentrato piastrinico.

Questi risultati assumono pertanto un valore particolarmente significativo poiché hanno consentito di superare una possibile interpretazione fuorviante basata esclusivamente sull’osservazione macroscopica. L’associazione tra valutazione macroscopica e analisi istologica si è dimostrata fondamentale per comprendere la reale natura della risposta biologica ai biomateriali studiati e per distinguere un’effettiva reazione flogistica patologica da un processo fisiologico di integrazione e rigenerazione tissutale.

È importante sottolineare che le valutazioni istologiche effettuate nel presente studio hanno avuto prevalentemente carattere morfologico-descrittivo. La caratterizzazione specifica delle popolazioni cellulari coinvolte nella risposta tissutale richiederà ulteriori approfondimenti mediante analisi

immunoistochimiche e molecolari dedicate, finalizzate all'identificazione dei principali marker infiammatori e rigenerativi.

Questa fase preliminare dello studio ha quindi rappresentato un passaggio cruciale nell'ottimizzazione del protocollo sperimentale. I dati raccolti hanno permesso di identificare aspetti tecnici e biologici fondamentali, confermando il potenziale vantaggio della funzionalizzazione con PRP nel migliorare l'integrazione dello scaffold e nel modulare favorevolmente la risposta dell'ospite. Le osservazioni ottenute costituiscono pertanto una solida base per il perfezionamento del disegno sperimentale e per lo sviluppo delle successive fasi dello studio.

## Discussione

Lo sviluppo di sostituti vascolari di piccolo calibro rappresenta tuttora una delle principali sfide della chirurgia vascolare e della medicina rigenerativa. Sebbene i graft sintetici convenzionali, come il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e il polietilene tereftalato (PET, commercialmente noto come Dacron®), abbiano dimostrato buone prestazioni nella sostituzione di vasi di grande calibro, il loro impiego nei distretti vascolari di piccolo diametro rimane limitato dagli elevati tassi di trombosi, iperplasia intimale e scarsa endotelizzazione. Tali criticità hanno progressivamente orientato la ricerca verso lo sviluppo di sostituti biodegradabili capaci non solo di ripristinare la continuità del flusso sanguigno, ma anche di favorire processi di rigenerazione tissutale.

In tale prospettiva si inserisce il crescente interesse per i vascular grafts bioingegnerizzati, concepiti come supporti temporanei destinati a guidare la rigenerazione vascolare e a essere progressivamente sostituiti da tessuto neoformato. Tra le strategie più promettenti rientra l'impiego di scaffold polimerici biodegradabili ottenuti mediante electrospinning, tecnica che consente di realizzare architetture fibrose nanometriche capaci di mimare la matrice extracellulare naturale e favorire l'interazione tra biomateriale e tessuti ospiti.

Nel presente studio è stato valutato uno scaffold tubulare in polibutilene succinato (PBS), successivamente biofunzionalizzato mediante concentrato piastrinico autologo. L'interesse nei confronti del PRP deriva dalla presenza di numerosi fattori di crescita coinvolti nei processi di angiogenesi, proliferazione cellulare e rimodellamento tissutale, tra cui vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) e transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ). Sebbene l'utilizzo dei concentrati piastrinici sia ampiamente diffuso in medicina rigenerativa, la loro applicazione nella bioattivazione di scaffold vascolari biodegradabili rappresenta ancora un ambito relativamente poco esplorato.

L'ipotesi alla base del lavoro era che la combinazione tra uno scaffold biodegradabile e una stimolazione biologica autologa potesse modulare favorevolmente la risposta dell'ospite, promuovendo processi di colonizzazione cellulare e integrazione del biomateriale. In tale contesto, l'analisi istologica ha assunto un ruolo determinante nell'interpretazione della risposta biologica osservata.

In una prima fase, il patch funzionalizzato con PRP appariva macroscopicamente caratterizzato da una maggiore reattività tissutale rispetto allo scaffold non funzionalizzato, suggerendo inizialmente

la possibile presenza di una risposta infiammatoria più accentuata. Tuttavia, l'analisi microscopica ha consentito di reinterpretare criticamente tale osservazione, evidenziando come lo scaffold biofunzionalizzato risultasse meglio integrato nei tessuti circostanti e privo di significativa reazione flogistica patologica. Al contrario, il controllo non funzionalizzato mostrava una minore integrità strutturale associata a più evidenti segni di infiammazione locale.

È noto come, nelle fasi iniziali dei processi rigenerativi, una moderata attivazione biologica e infiammatoria possa rappresentare un fenomeno fisiologico necessario alla colonizzazione cellulare, alla neoangiogenesi e alla riorganizzazione tissutale [29].

In tale prospettiva, i reperti osservati nel gruppo funzionalizzato sembrano riflettere una risposta biologica pro-rigenerativa piuttosto che una reazione infiammatoria patologica.

In accordo con precedenti studi che hanno evidenziato il ruolo del PRP nella promozione della maturazione vascolare e dei processi di rimodellamento tissutale [30], lo scaffold trattato con PRP ha infatti mostrato una maggiore colonizzazione cellulare, un'aumentata vascolarizzazione locale e una migliore preservazione dell'integrità strutturale rispetto al controllo non funzionalizzato. Coerentemente con quanto riportato in letteratura, il PRP sembra favorire integrazione tissutale e neoangiogenesi senza indurre una marcata risposta infiammatoria.

Nel nostro studio, l'assenza di significativa infiammazione supporta l'ipotesi che i fenomeni osservati riflettano processi fisiologici di integrazione e rimodellamento tissutale piuttosto che una risposta avversa al biomateriale [31].

L'apparente maggiore 'reattività' osservata macroscopicamente potrebbe pertanto riflettere un'attività biologica più intensa, verosimilmente correlata ai processi di colonizzazione cellulare e neoformazione tissutale. Tale osservazione appare particolarmente rilevante nell'ambito dell'ingegneria tissutale vascolare, dove la modulazione della risposta infiammatoria rappresenta uno degli aspetti chiave per il successo a lungo termine dei dispositivi rigenerativi.

I risultati ottenuti evidenziano inoltre l'importanza di integrare le osservazioni macroscopiche con l'analisi istologica nella valutazione dei biomateriali rigenerativi, poiché la sola osservazione visiva potrebbe non riflettere accuratamente la reale natura della risposta biologica dell'ospite.

I risultati preliminari ottenuti suggeriscono inoltre la fattibilità tecnica dell'approccio proposto, sia dal punto di vista della produzione del biomateriale sia in termini di manipolazione e applicazione chirurgica. Lo scaffold in PBS ottenuto mediante electrospinning, soprattutto dopo biofunzionalizzazione con PRP, ha mostrato caratteristiche morfologiche e strutturali compatibili con un potenziale impiego come supporto vascolare temporaneo.

Parallelamente, è stata valutata la possibilità di ottenere un concentrato piastrinico autologo mediante protocolli di centrifugazione adattati al modello sperimentale utilizzato. Sebbene le concentrazioni

piastriniche ottenute non abbiano raggiunto i livelli generalmente riportati nella letteratura relativa al PRP, l'esperienza maturata ha comunque consentito di definire un protocollo preliminare applicabile nel contesto dello studio. Le principali criticità osservate sono risultate prevalentemente correlate alla limitata disponibilità di volumi ematici del modello leporino piuttosto che alla procedura stessa, rappresentando pertanto un importante punto di partenza per future ottimizzazioni metodologiche. Nel complesso, l'approccio proposto si inserisce nel più ampio filone di ricerca volto allo sviluppo di graft vascolari rigenerativi, nei quali il biomateriale non rappresenta una semplice protesi permanente, bensì una struttura temporanea capace di guidare e sostenere i processi di rigenerazione del tessuto vascolare.

Dal punto di vista clinico, il perfezionamento di tali strategie potrebbe avere implicazioni rilevanti in diversi ambiti della chirurgia, in particolare nella creazione di accessi vascolari per emodialisi o chemioterapia nei pazienti con patrimonio venoso limitato, nella chirurgia ricostruttiva e, più in generale, in tutte quelle condizioni in cui non siano disponibili vasi autologhi adeguati per procedure di bypass o sostituzione vascolare.

Lo studio in oggetto presenta tuttavia alcune limitazioni che devono essere attentamente considerate. In primo luogo, il numero di analisi effettuate e di campioni analizzati in questo studio è limitato dalla sua natura preliminare, in quanto trattasi soltanto di uno studio pilota, di fattibilità. Inoltre, il protocollo di preparazione del concentrato piastrinico necessita di ulteriori ottimizzazioni al fine di ottenere combinazioni e concentrazioni di emocomponenti potenzialmente più efficaci dal punto di vista biologico. Nonostante ciò, le osservazioni istologiche hanno fornito indicazioni biologiche particolarmente rilevanti riguardo ai processi di integrazione tissutale e alla modulazione della risposta infiammatoria indotta dai diversi scaffold.

Tuttavia, un limite del presente studio è rappresentato dalla natura prevalentemente qualitativa dell'analisi istologica effettuata. La valutazione microscopica è stata infatti condotta mediante colorazione standard ematossilina-eosina, consentendo una descrizione morfologica della risposta tissutale allo scaffold, ma non una caratterizzazione specifica delle popolazioni cellulari coinvolte.

Analisi immunoistochimiche dedicate avrebbero potuto fornire informazioni più dettagliate riguardo ai processi di angiogenesi, infiltrazione macrofagica, risposta infiammatoria e rimodellamento tissutale. Analogamente, l'esecuzione di valutazioni morfometriche quantitative associate ad analisi statistiche avrebbe consentito confronti più oggettivi tra scaffold funzionalizzati e non funzionalizzati.

Nonostante ciò, considerata la natura preliminare e di fattibilità del presente studio, l'obiettivo principale era verificare la biocompatibilità del biomateriale e raccogliere evidenze iniziali sulla risposta biologica dell'ospite. Pertanto, le osservazioni ottenute devono essere considerate esplorative

e generatrici di ipotesi, da confermare mediante studi successivi specificamente disegnati per includere analisi immunohistochimiche e quantitative.

Un ulteriore limite metodologico riguarda la fase di biofunzionalizzazione dello scaffold. Sebbene il biomateriale sia stato immerso nel concentrato piastrinico prima dell'impianto secondo il protocollo descritto, il presente studio non prevedeva analisi specifiche finalizzate a dimostrare quantitativamente l'effettiva incorporazione o ritenzione del concentrato piastrinico all'interno della matrice dello scaffold. Pertanto, la funzionalizzazione è stata definita sulla base della procedura di trattamento effettuata. Le differenze osservate tra i patch trattati e non trattati rappresentano evidenze indirette di una possibile attività biologica associata a tale procedura; tuttavia, tali osservazioni dovranno essere confermate da futuri studi mediante tecniche di caratterizzazione dedicate, quali analisi microscopiche, dosaggi proteici o valutazioni immunohistochimiche.

Pur trattandosi di uno studio preliminare, i risultati ottenuti suggeriscono che la combinazione tra scaffold biodegradabili e bioattivazione mediante fattori di crescita autologhi possa rappresentare una strategia promettente per lo sviluppo di graft vascolari rigenerativi di nuova generazione, capaci non solo di sostituire il vaso danneggiato, ma anche di promuoverne la rigenerazione biologica.

## Conclusioni e Prospettive Future

Il presente studio ha esplorato un approccio innovativo nel campo della chirurgia rigenerativa e dell'ingegneria tissutale vascolare, basato sull'associazione tra uno scaffold tubulare o planare biodegradabile in polibutilene succinato (PBS), ottenuto mediante electrospinning, e una biofunzionalizzazione con concentrato piastrinico autologo.

I risultati preliminari ottenuti hanno confermato la fattibilità tecnica del modello proposto, evidenziando come lo scaffold sviluppato possieda caratteristiche morfologiche e strutturali compatibili con un potenziale impiego come supporto temporaneo per la rigenerazione vascolare in ambito chirurgico. Parallelamente, il lavoro ha consentito di definire un primo protocollo sperimentale per l'utilizzo del concentrato piastrinico autologo nel contesto del modello adottato, ponendo le basi per successive ottimizzazioni metodologiche.

L'aspetto più rilevante emerso dal presente studio riguarda tuttavia l'interpretazione della risposta biologica indotta dal biomateriale. L'analisi istologica ha infatti dimostrato come la maggiore reattività macroscopica osservata nel patch funzionalizzato con PRP non fosse espressione di una risposta infiammatoria patologica, bensì compatibile con un processo biologicamente più attivo di integrazione tissutale. Lo scaffold biofunzionalizzato ha mostrato una migliore integrazione nei tessuti circostanti, associata a maggiore colonizzazione cellulare, aumentata vascolarizzazione locale e migliore preservazione strutturale, in assenza di significativa infiammazione.

Questi risultati suggeriscono che la funzionalizzazione con PRP possa modulare favorevolmente la risposta dell'ospite, promuovendo rimodellamento vascolare e rigenerazione tissutale piuttosto che fenomeni di reazione avversa al biomateriale. Tale osservazione appare particolarmente significativa nell'ambito dei vascular grafts rigenerativi, dove il controllo della risposta infiammatoria e la capacità di guidare una rigenerazione ordinata rappresentano elementi fondamentali per il successo del dispositivo nel lungo termine.

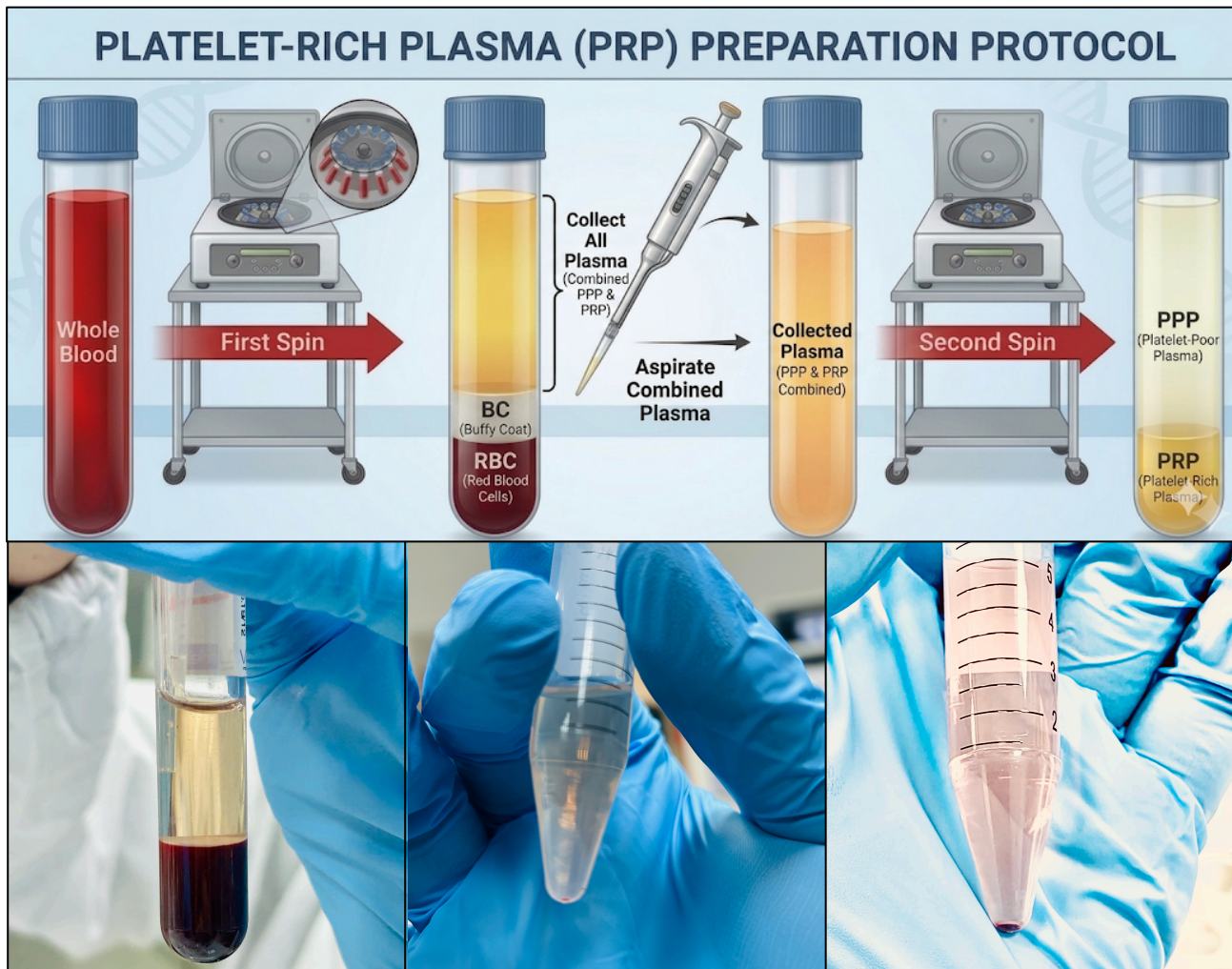
Pur nel contesto di uno studio preliminare e con le limitazioni legate alla numerosità campionaria e alla necessità di ulteriori ottimizzazioni del protocollo di preparazione del concentrato piastrinico, i risultati ottenuti supportano il potenziale interesse della combinazione tra scaffold biodegradabili e bioattivazione mediante fattori di crescita autologhi come strategia promettente per applicazioni vascolari rigenerative.

Le prospettive future di questa linea di ricerca dovranno essere orientate all'ottimizzazione delle proprietà biomeccaniche dello scaffold, alla standardizzazione dei protocolli di biofunzionalizzazione e alla valutazione a medio e lungo termine dei processi di endotelizzazione, rimodellamento vascolare e degradazione del biomateriale. Ulteriori studi saranno inoltre necessari per chiarire il ruolo specifico della stimolazione biologica mediata dal PRP nella modulazione della risposta cellulare e infiammatoria dell'ospite.

In prospettiva, l'integrazione tra biomateriali biodegradabili, strategie di bioattivazione e chirurgia rigenerativa potrebbe contribuire allo sviluppo di nuovi sostituti vascolari capaci non soltanto di ripristinare la continuità del flusso ematico, ma anche di favorire una reale rigenerazione tissutale. In questo contesto, il presente studio rappresenta un primo contributo sperimentale verso la comprensione delle dinamiche biologiche che regolano l'interazione tra scaffold vascolari biofunzionalizzati e tessuti ospiti.



*Figura 1: Scaffold in PBS a confronto (senza e con magnetite)*

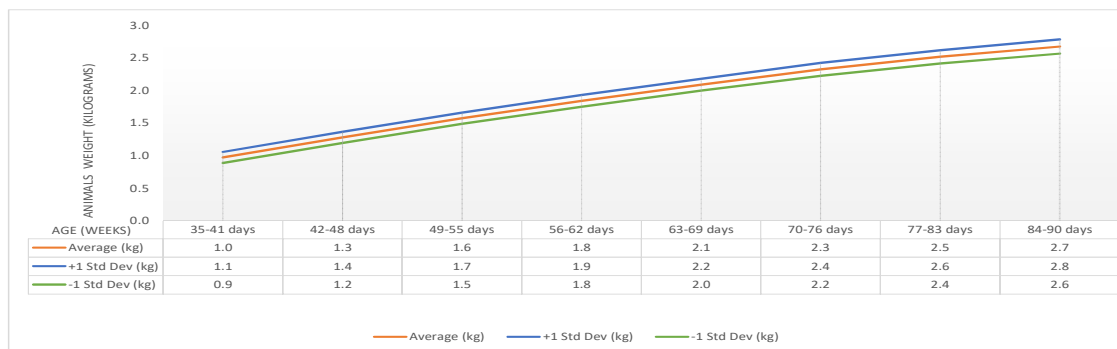


*Figura 2: In alto = Rappresentazione schematica del processo di ottenimento del PRP; In basso, a sx = Risultato dopo prima centrifuga (first spin); In basso, al centro = Risultato dopo seconda centrifuga (second spin) con pellet piastrinico appena visibile in basso; In basso, a dx = Risultato dopo seconda centrifuga (second spin) con evidenza di co-precipitazione di globuli rossi all'interno del pellet piastrinico.*



Figura 3: esemplare maschio di coniglio razza NZW di 5 mesi

**New Zealand White Males**  
2019 Age-Weight Study, France



Feed  
Kliba 3409.PA.D15

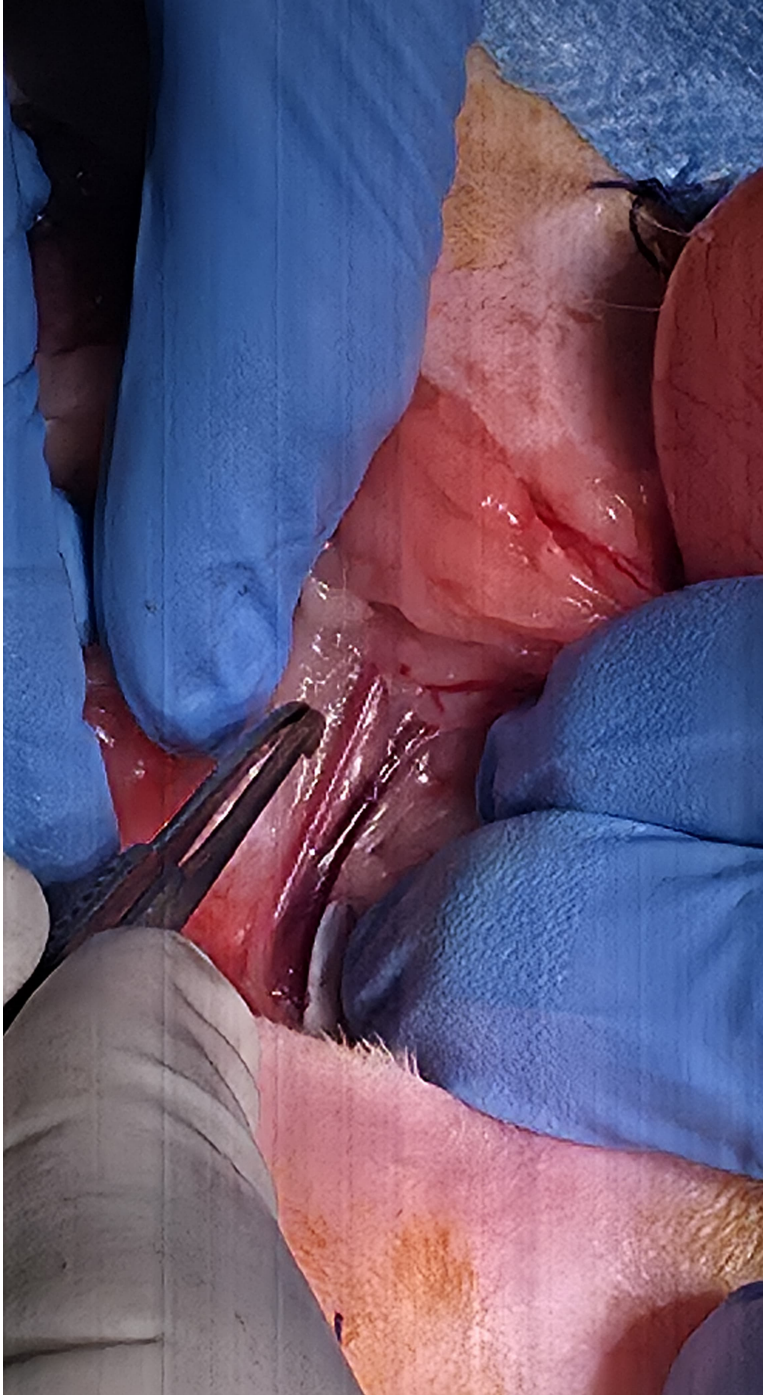
Growth chart data should be used as a guideline only

charles river

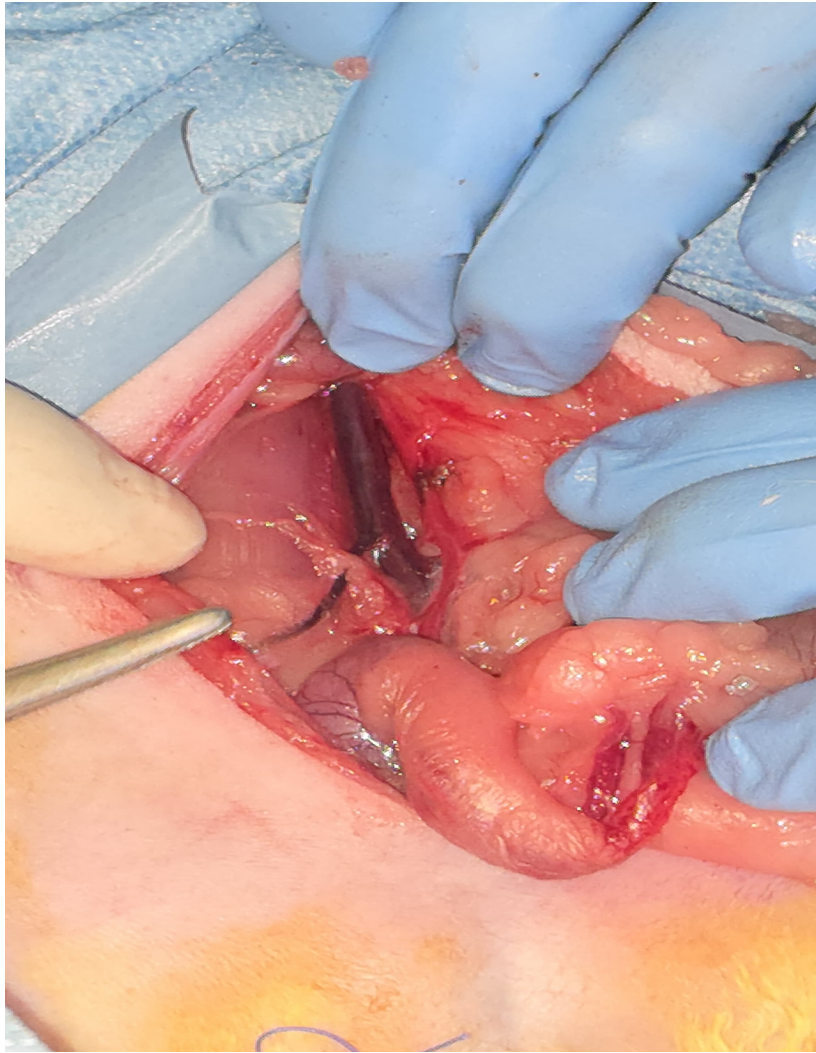
Figura 4: growth chart del coniglio razza NZW



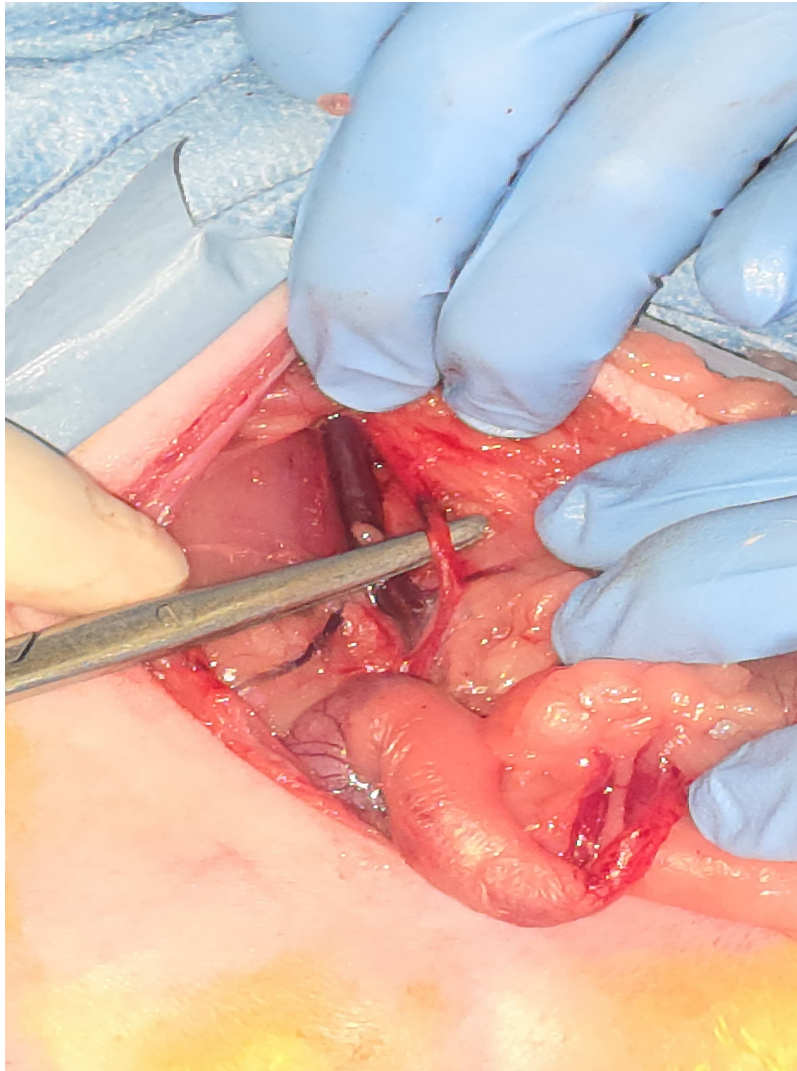
*Figura 5: cavia disposta sul letto operatorio*



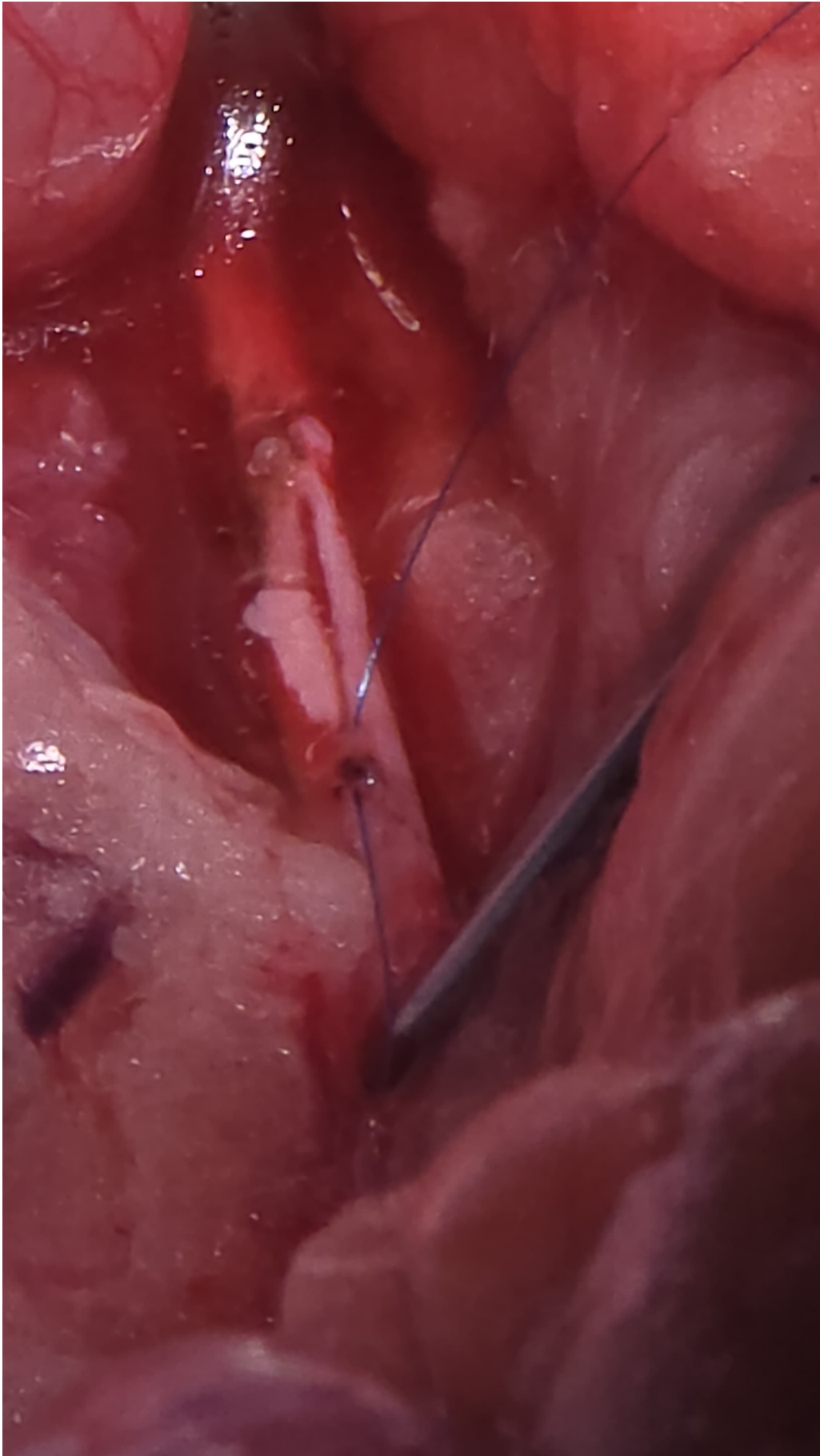
*Figura 6: arteria e vena iliaca di destra*



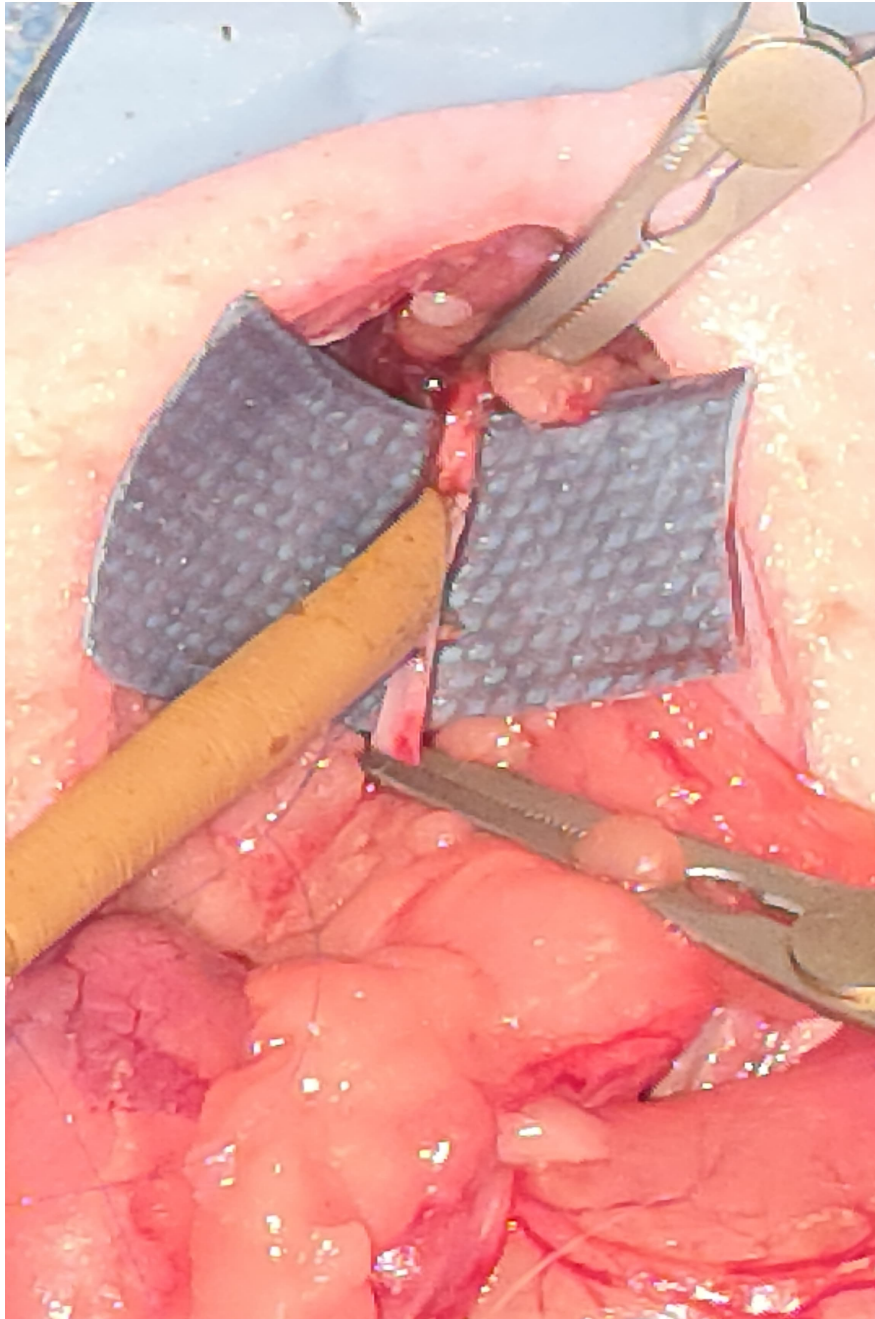
*Figura 7: aorta e vena cava*



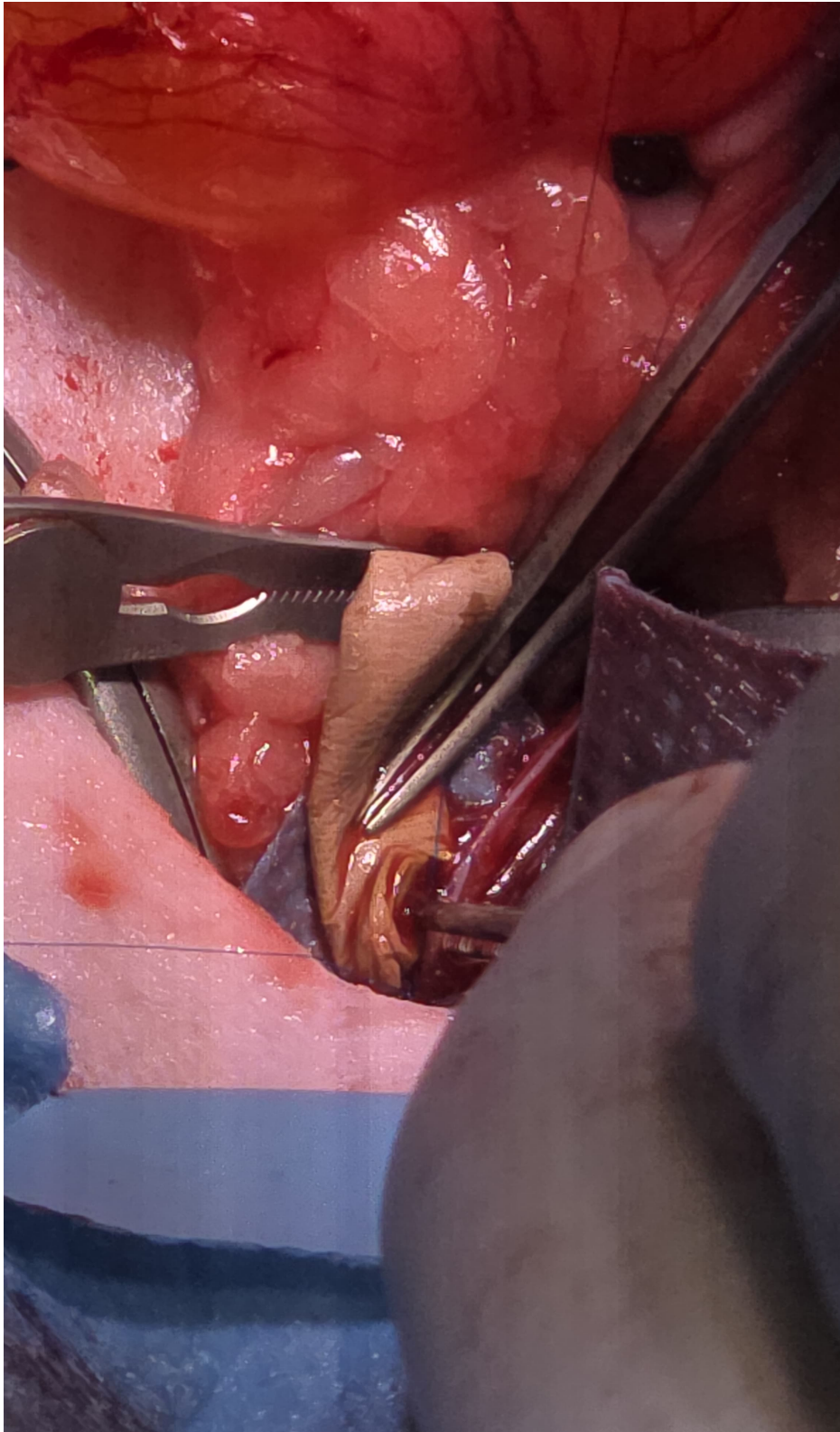
*Figura 8: aorta e vena cava*



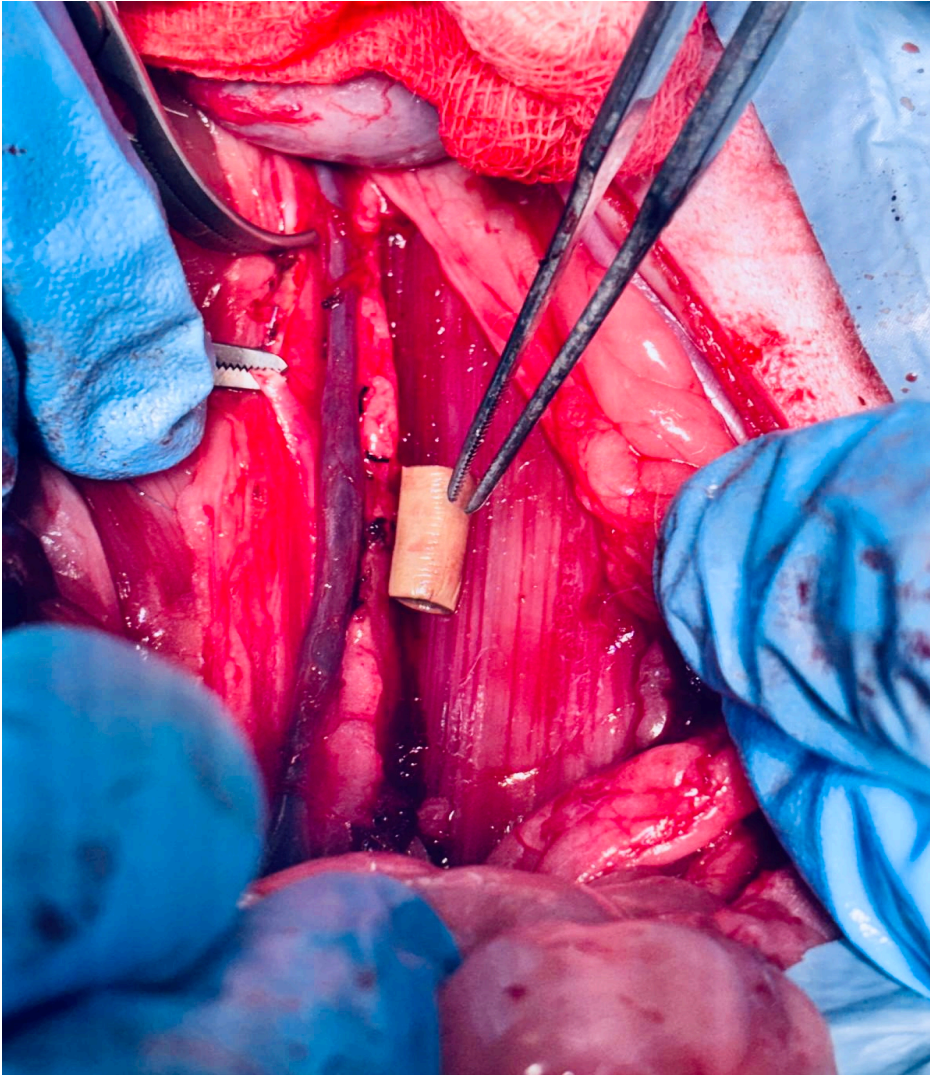
*Figura 9: arteriotomia dell'aorta su "Esperimento 1"*



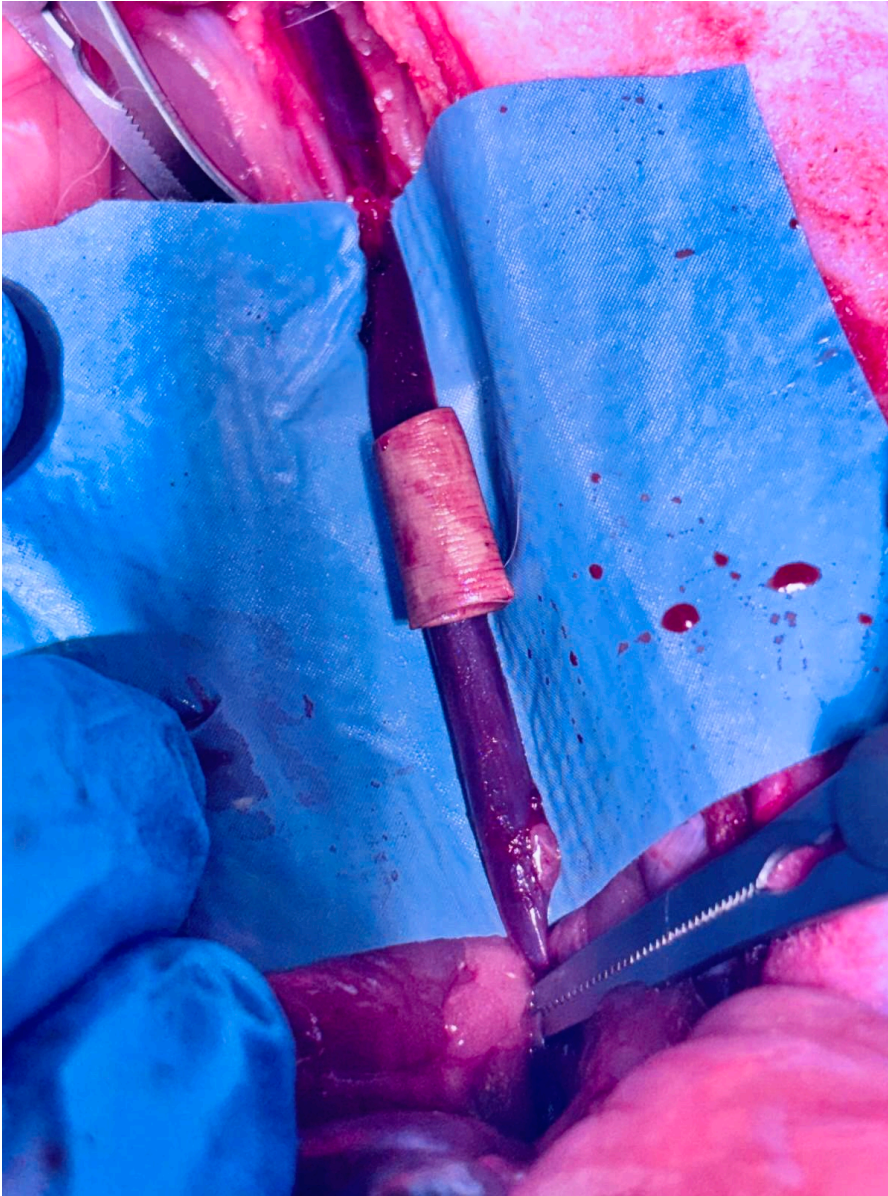
*Figura 10: anastomosi tra scaffold in PBS e aorta su "Esperimento 1"*



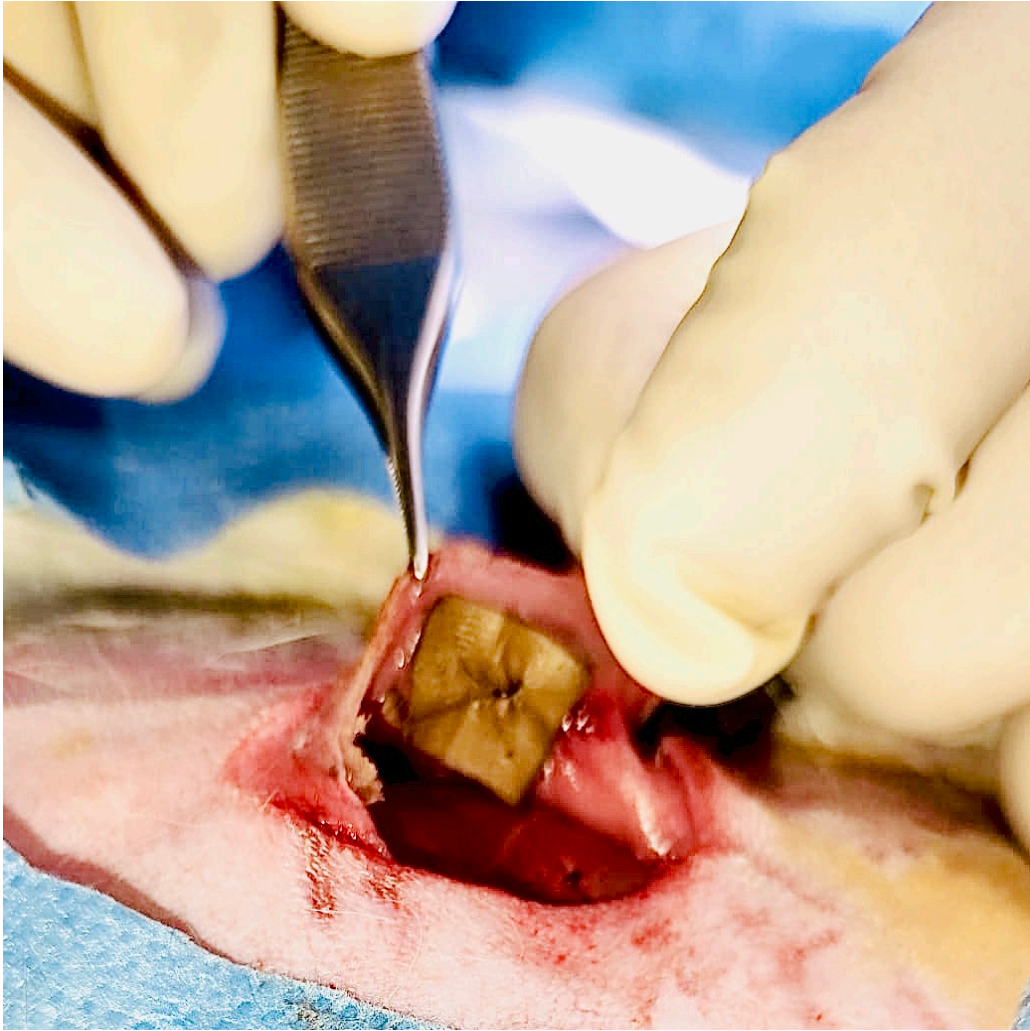
*Figura 11: Bridge fistula (incompleta) tra aorta e vena cava su “Esperimento 1”*



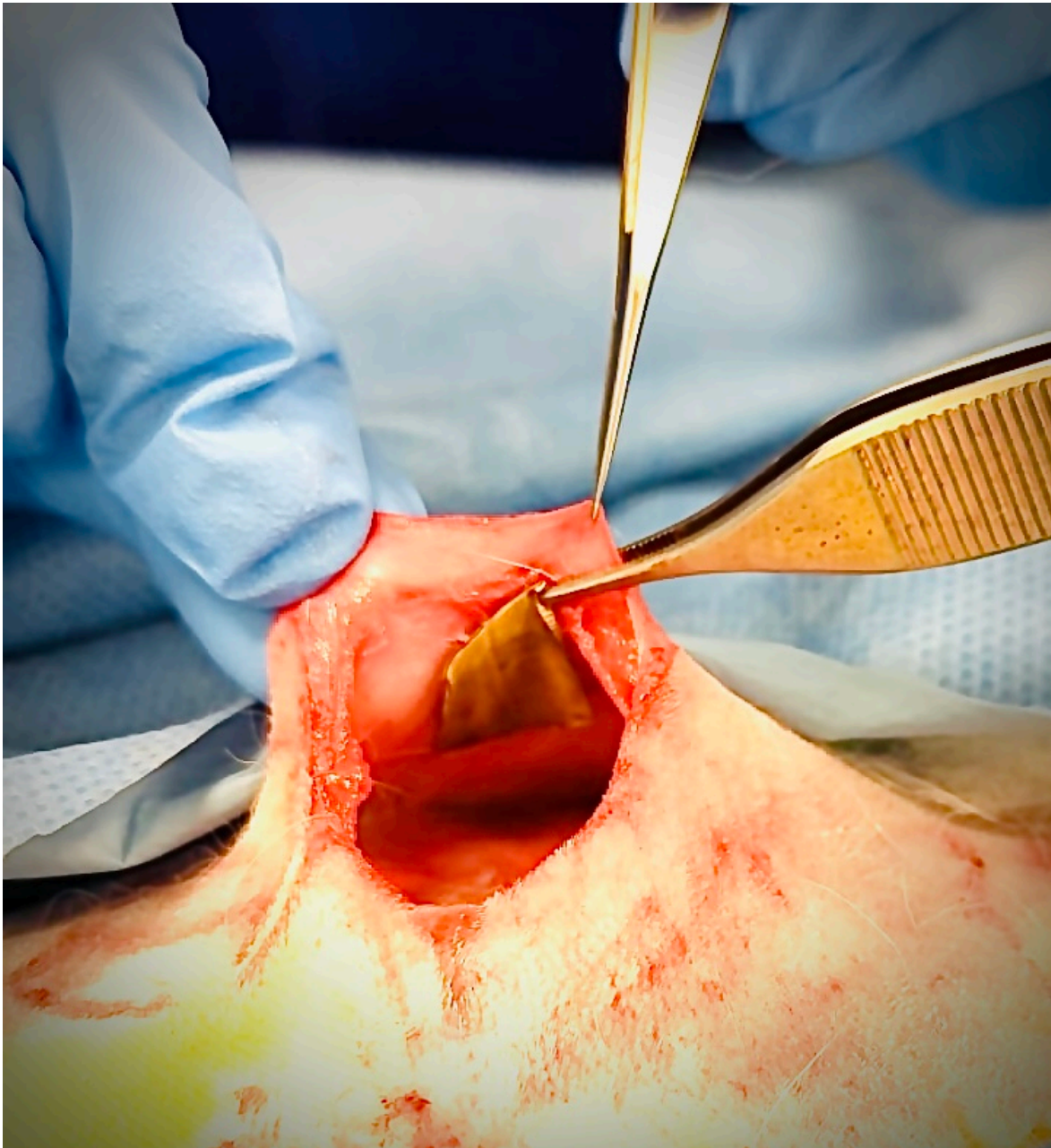
*Figura 12: Vena cava e scaffold, confronto tra calibri su “Esperimento 2”*



*Figura 13: Vena cava e scaffold, confronto tra calibri su “Esperimento 2”*



*Figura 14: Impianto in sede retromuscolare e preperitoneale di patch in PBS non funzionalizzato a sinistra su “Esperimento 3”*



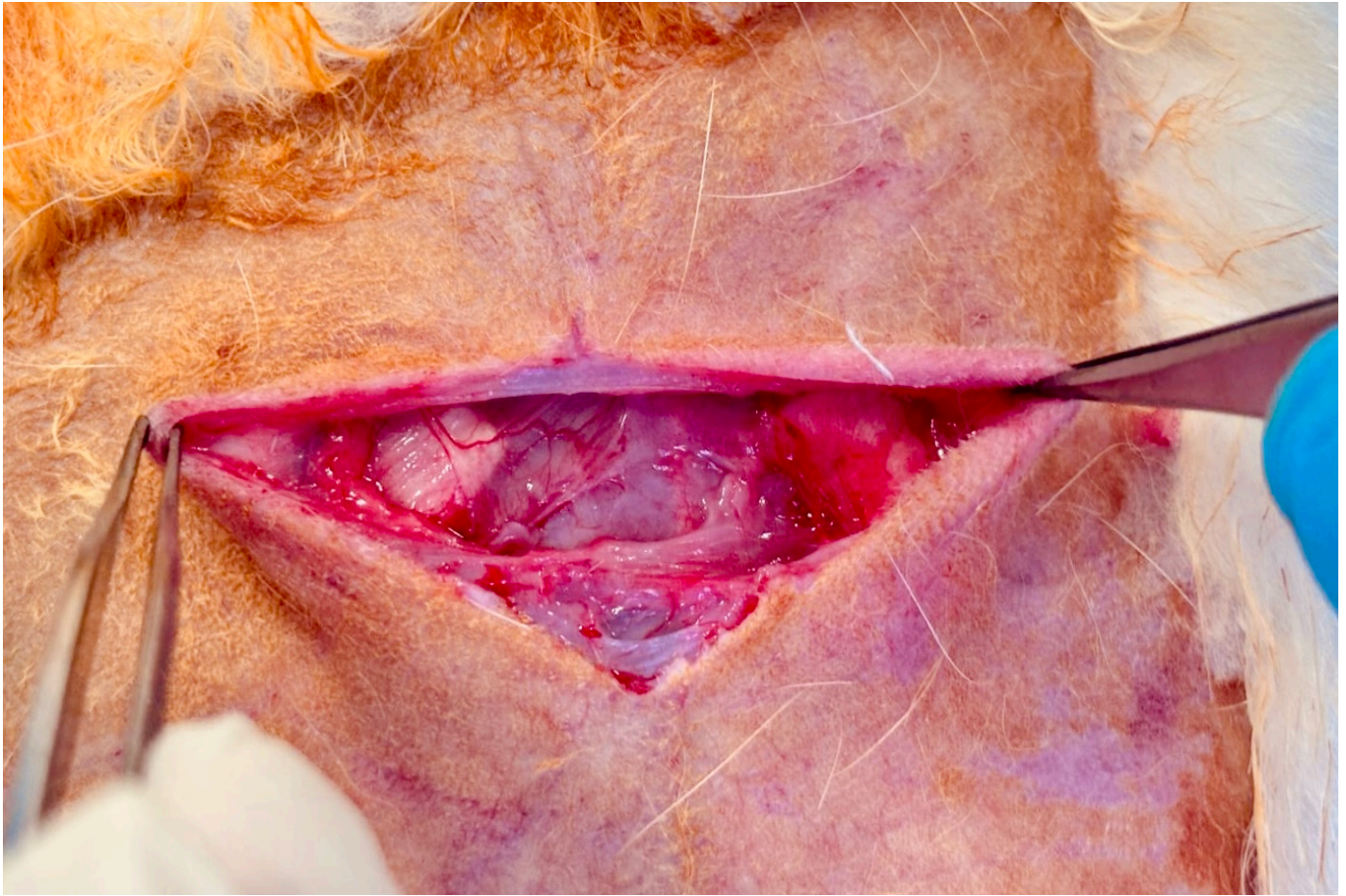
*Figura 15: Impianto in sede retromuscolare e preperitoneale di patch in PBS funzionalizzato a destra su “Esperimento 3”*



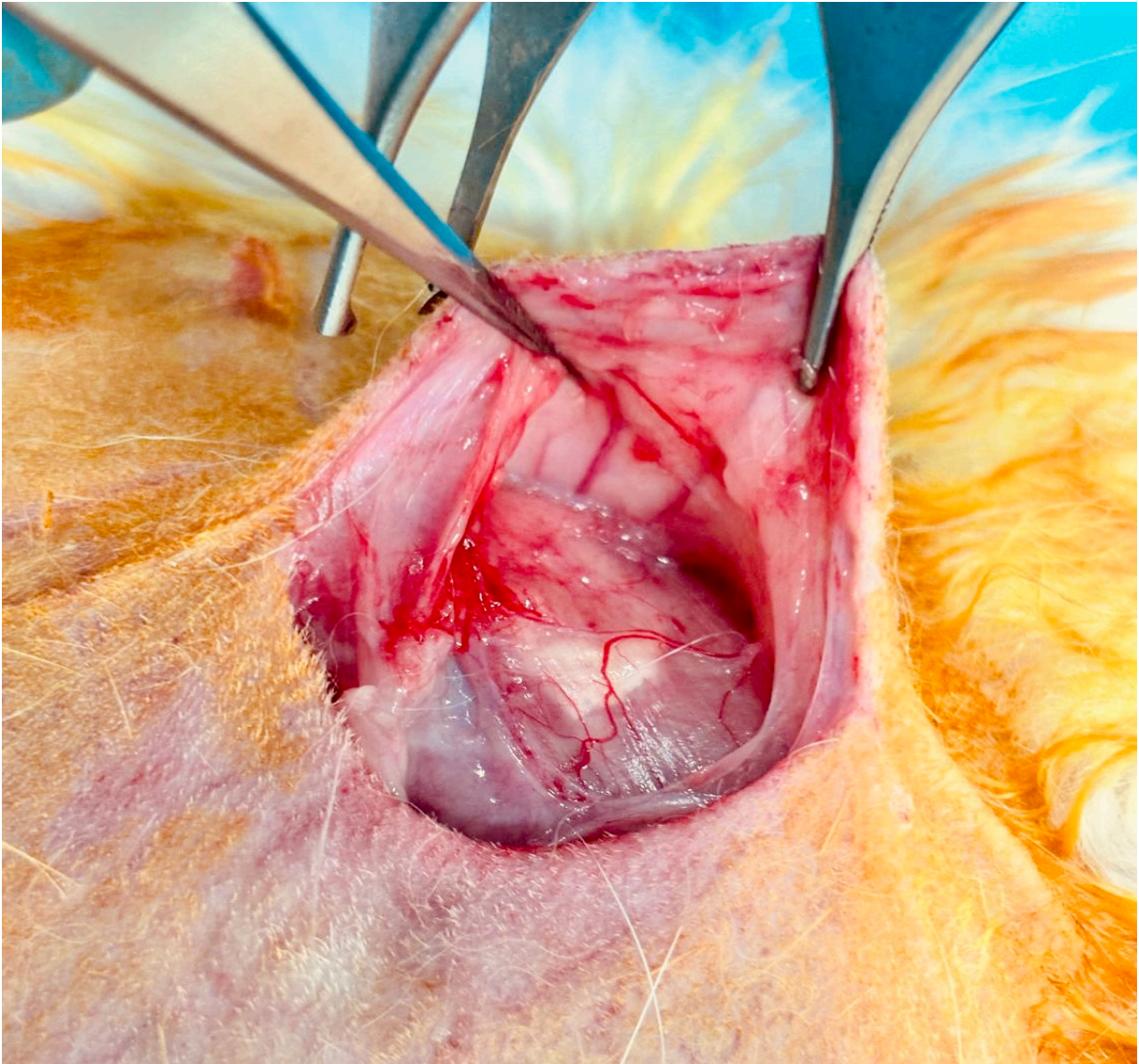
*Figura 16: Radiografia preoperatoria su “Esperimento 3”*



*Figura 17: Radiografia su “Esperimento 3” dopo impianto dei patch in PBS trattati con magnetite*



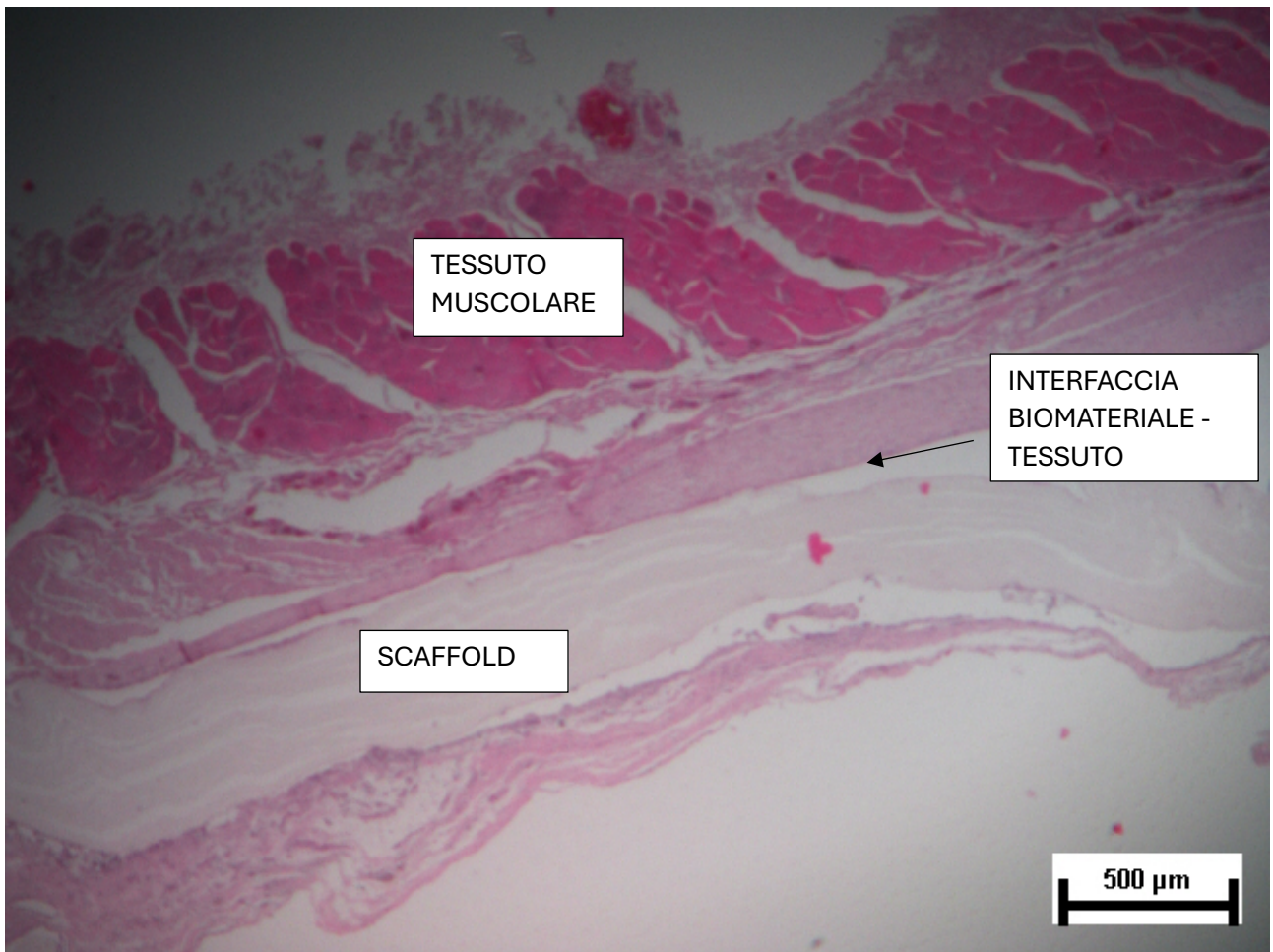
*Figura 18: Confronto tra patch ad 1 mese dall'impianto su "Esperimento 3"*



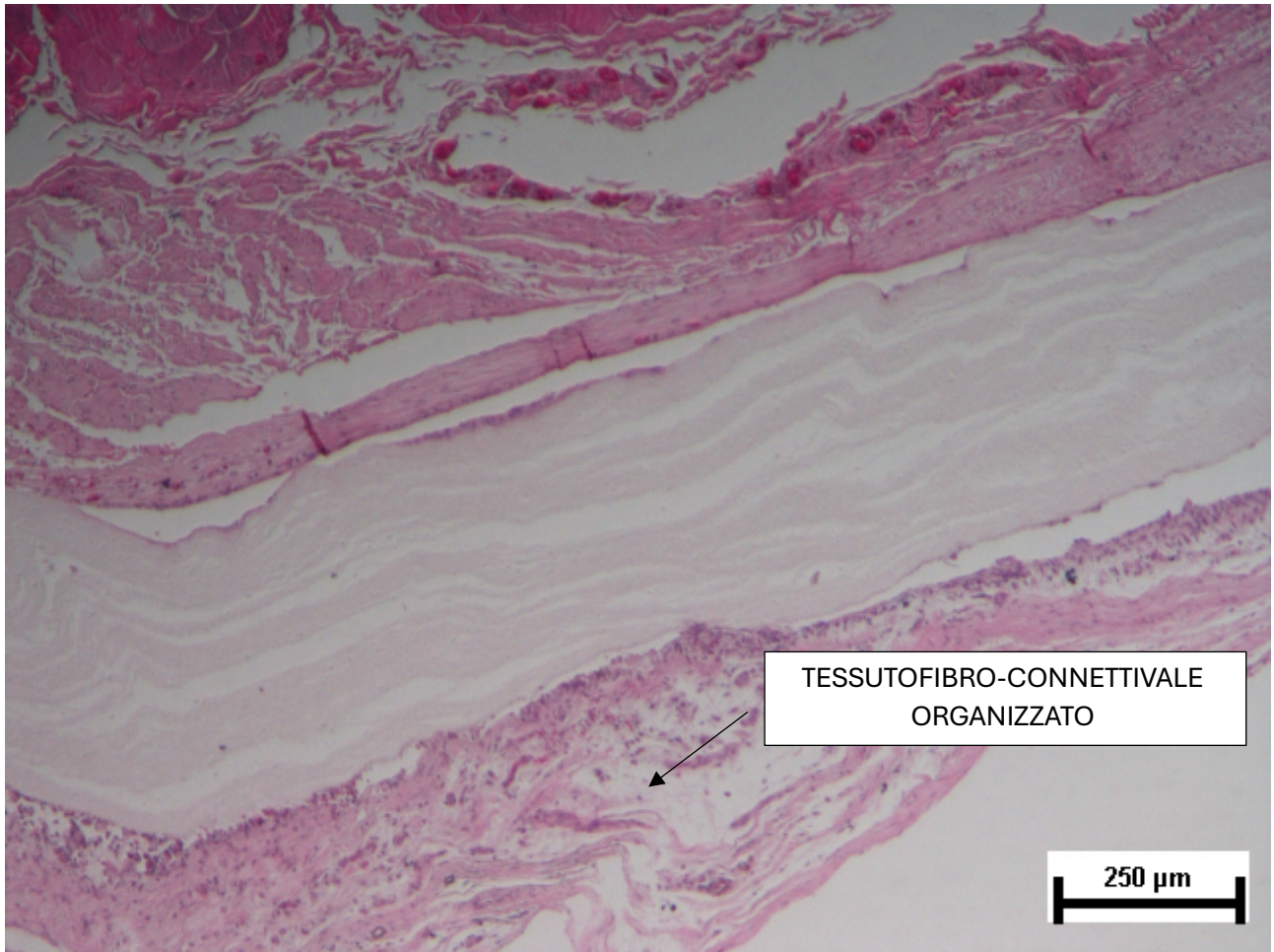
*Figura 19: Patch sinistro non funzionalizzato dopo 1 mese dall'impianto su "Esperimento 3"*



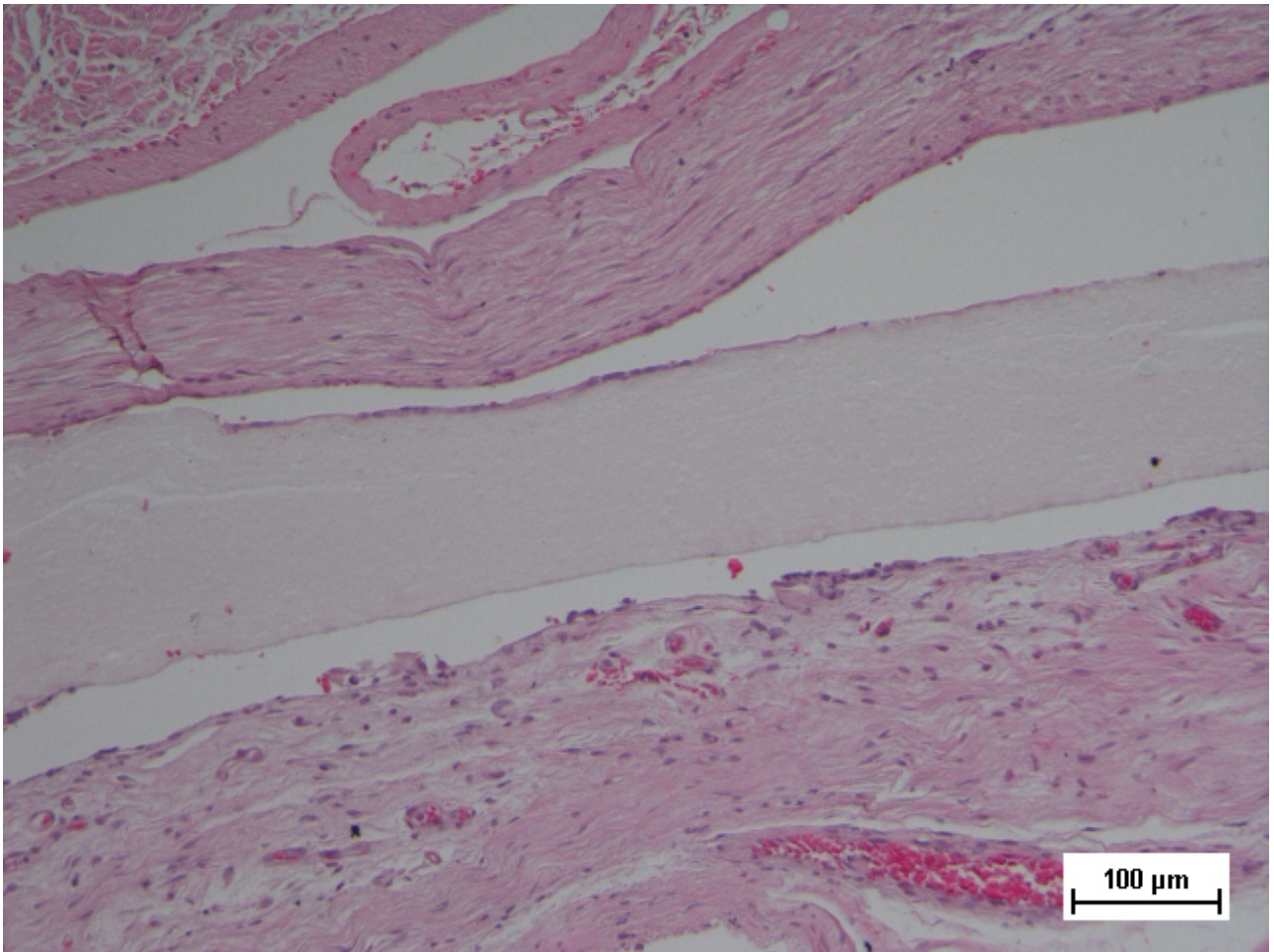
*Figura 20: Patch destro funzionalizzato dopo 1 mese dall'impianto su "Esperimento 3"*



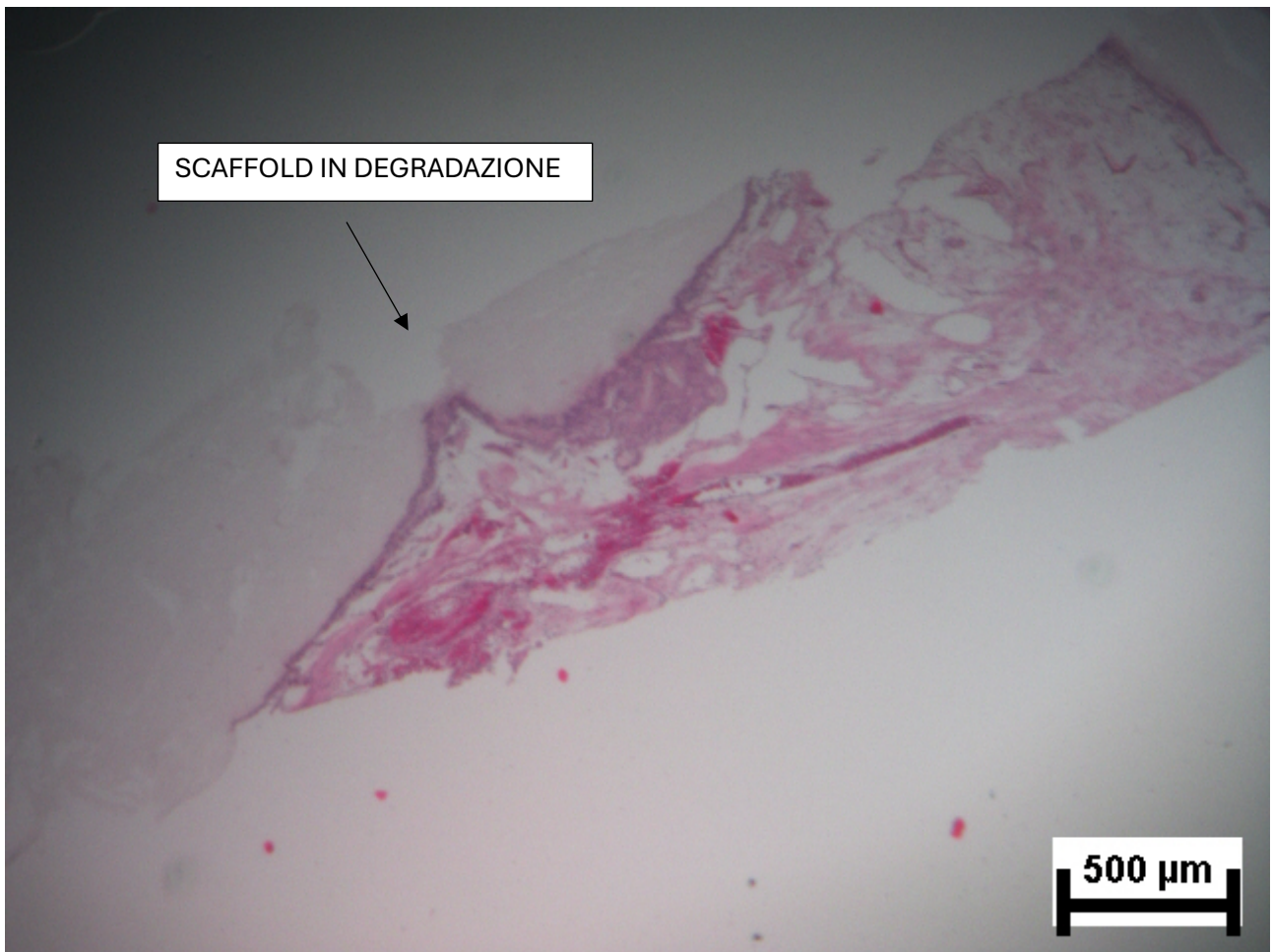
*Figura 21. Sezione istologica del patch funzionalizzato con PRP (H&E, 2,5 $\times$ ). Evidenza del biomateriale e dell'interfaccia con il tessuto ospite.*



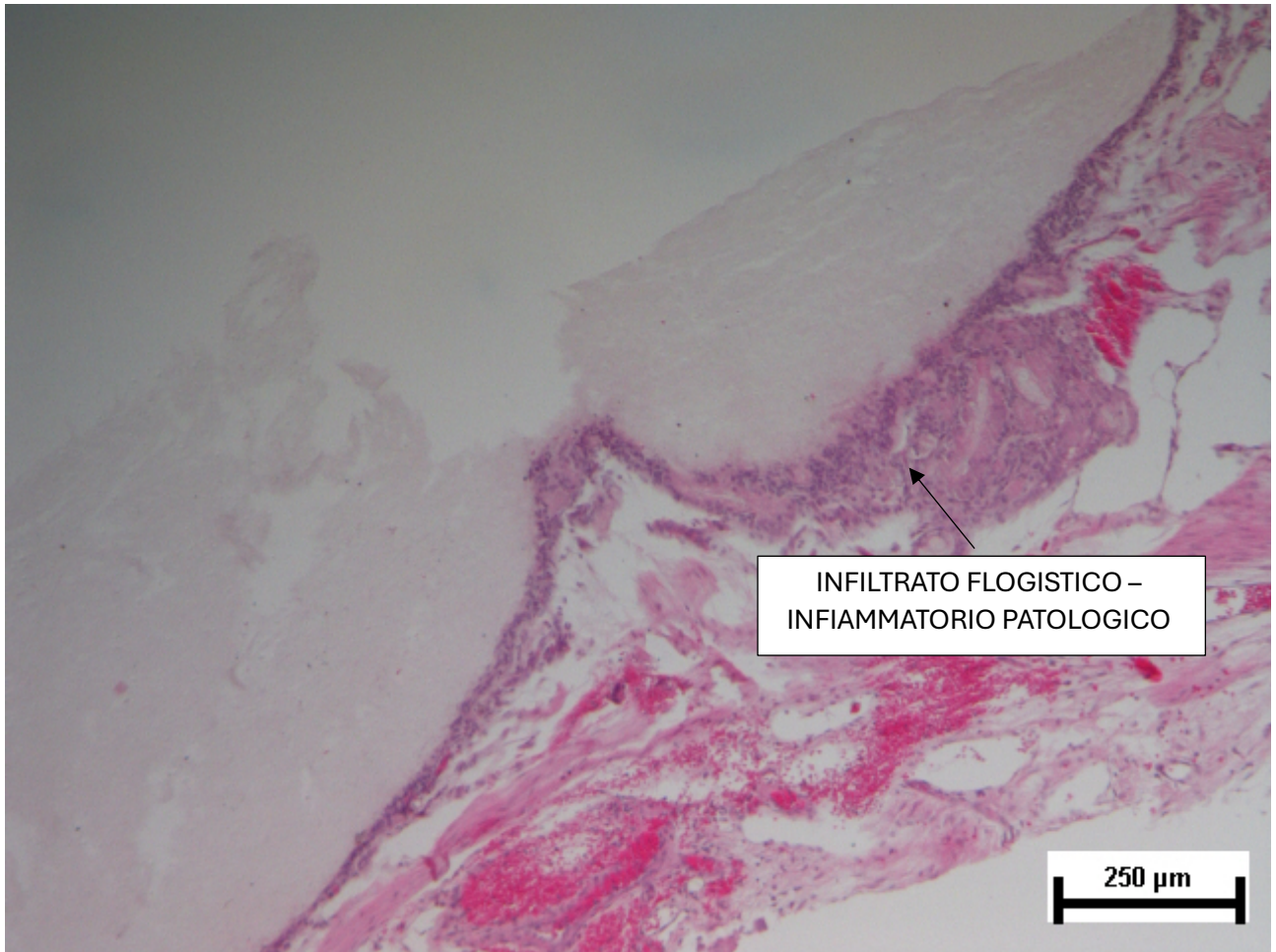
*Figura 22: Sezione istologica del patch funzionalizzato con PRP (H&E, 5 $\times$ ). Lo scaffold risulta circondato da tessuto connettivo in fase di organizzazione, compatibile con processi di rimodellamento e integrazione tissutale.*



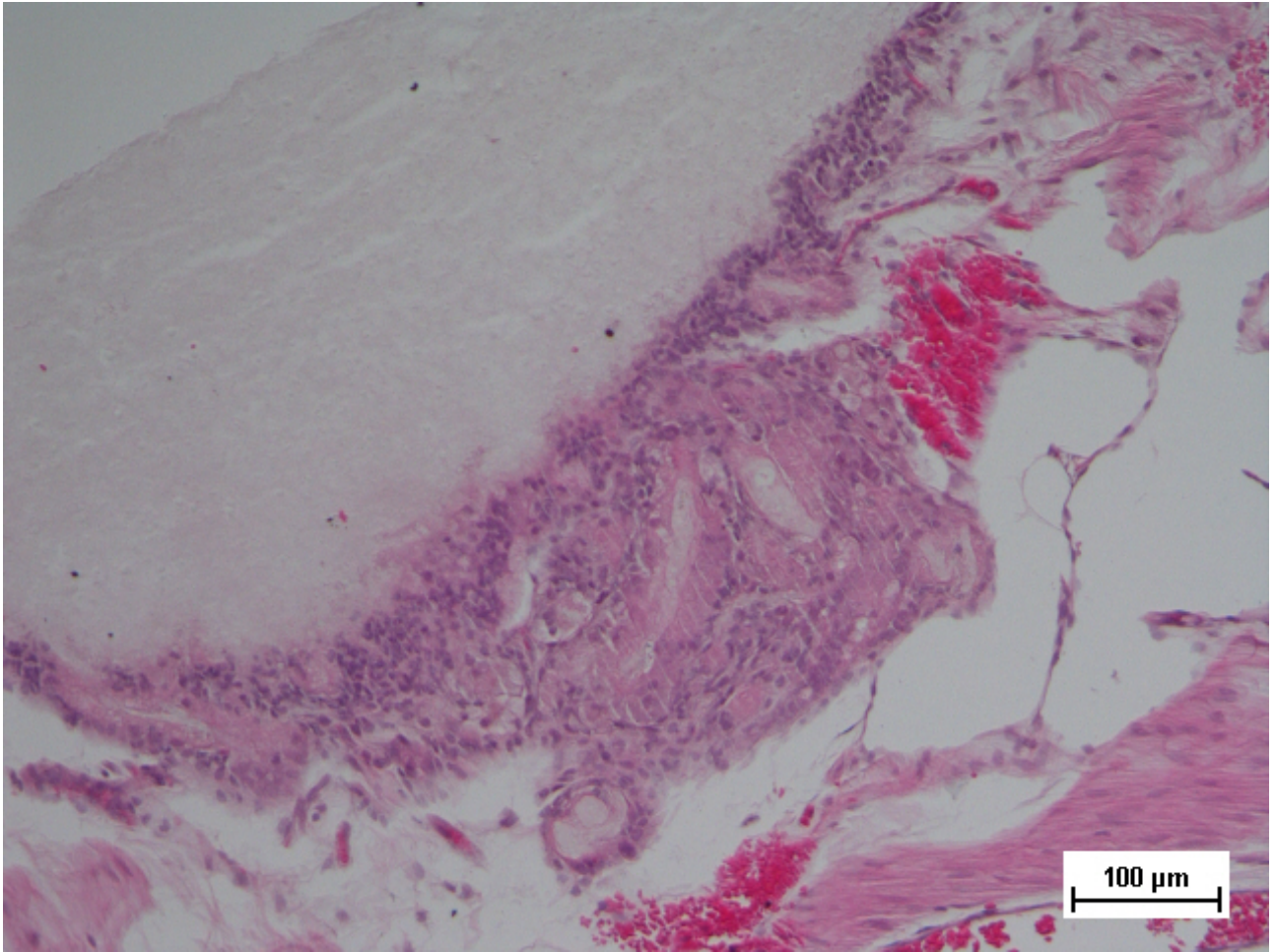
*Figura 23: Sezione istologica del patch funzionalizzato con PRP (H&E, 10×). Lo scaffold risulta circondato da tessuto connettivo in fase di organizzazione, compatibile con processi di rimodellamento e integrazione tissutale.*



*Figura 24: Sezione istologica del patch non funzionalizzato (H&E, 2,5 $\times$ ). Aspetto frammentato del biomateriale compatibile con fenomeni di degradazione.*



*Figura 25: Sezione istologica del patch non funzionalizzato (H&E, 5×). Presenza di infiltrato infiammatorio periscaffold e tessuto reattivo associato al biomateriale.*



*Figura 26: Sezione istologica del patch non funzionalizzato (H&E, 10×). Presenza di infiltrato infiammatorio periscaffold e tessuto reattivo associato al biomateriale.*

## Bibliografia

1. Thottappillil N, Nair PD. Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vasc Health Risk Manag.* 2015 Jan 19;11:79-91. doi: 10.2147/VHRM.S50536. PMID: 25632236; PMCID: PMC4304530.
2. Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghirolli DI, Pranke P. Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jan 11;7:592361. doi: 10.3389/fcvm.2020.592361. PMID: 33585576; PMCID: PMC7873993.
3. Fathi-Karkan S, Banimohamad-Shotorbani B, Saghati S, Rahbarghazi R, Davaran S. A critical review of fibrous polyurethane-based vascular tissue engineering scaffolds. *J Biol Eng.* 2022 Mar 24;16(1):6. doi: 10.1186/s13036-022-00286-9. PMID: 35331305; PMCID: PMC8951709.
4. Gottardo A, **Bonventre G**, Bazan Russo TD, Zanatta P, Lo Monte G, Gristina V, Galvano A, Russo A, Lo Monte AI. Potential Applications of PRP-Enhanced Polybutylene Succinate Graft as Vascular Access for Chemotherapy in Oncological Patients: A Systematic Review. *J Funct Biomater.* 2025 Jun 19;16(6):228. doi: 10.3390/jfb16060228. PMID: 40558914; PMCID: PMC12193876.
5. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med.* 2010 Jan;5(1):107-20. doi: 10.2217/rme.09.77. PMID: 20017698; PMCID: PMC2822541.
6. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004 Apr;27(4):357-62. doi: 10.1016/j.ejvs.2003.12.027. PMID: 15015183.
7. Buscemi S, Palumbo VD, Maffongelli A, Fazzotta S, Palumbo FS, Licciardi M, Fiorica C, Puleio R, Cassata G, Fiorello L, Buscemi G, Lo Monte AI. Electrospun PHEA-PLA/PCL Scaffold for Vascular Regeneration: A Preliminary in Vivo Evaluation. *Transplant Proc.* 2017 May;49(4):716-721. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.02.017. PMID: 28457379.
8. Buscemi S, **Bonventre G**, Gottardo A, Licciardi M, Palumbo FS, Cassata G, Cicero L, Lo Monte G, Puleio R, Lo Monte AI. Biliary Injuries Repair Using Copolymeric Scaffold: A Systematic Review and In Vivo Experimental Study. *J Funct Biomater.* 2025 Aug 18;16(8):297. doi: 10.3390/jfb16080297. PMID: 40863317; PMCID: PMC12387130.
9. Al-Jaishi AA, Liu AR, Lok CE, Zhang JC, Moist LM. Complications of the Arteriovenous Fistula: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jun;28(6):1839-1850. doi: 10.1681/ASN.2016040412. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28031406; PMCID: PMC5461784.

10. Lejay A, Bratu B, Kuntz S, Neumann N, Heim F, Chakfé N. Calcification of Synthetic Vascular Grafts: A Systematic Review. *EJVES Vasc Forum*. 2023 May 29;60:1-7. doi: 10.1016/j.ejvsf.2023.05.013. PMID: 37416860; PMCID: PMC10320244.
11. Lok CE, Huber TS, Orchanian-Cheff A, Rajan DK. Arteriovenous Access for Hemodialysis: A Review. *JAMA*. 2024 Apr 16;331(15):1307-1317. doi: 10.1001/jama.2024.0535. PMID: 38497953.
12. Gong K, Wei S, Zhang X, Liu W. Synthetic and Tissue-Engineered Vascular Grafts: Current Status, Emerging Technologies, and Clinical Prospects. *Rev Cardiovasc Med*. 2025 Dec 23;26(12):45083. doi: 10.31083/RCM45083. PMID: 41524039; PMCID: PMC12781010.
13. Place ES, George JH, Williams CK, Stevens MM. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem Soc Rev*. 2009 Apr;38(4):1139-51. doi: 10.1039/b811392k. Epub 2009 Feb 16. PMID: 19421585.
14. Carvalho A, Ferreira AF, Soares M, Santos S, Tomé P, Machado-Simões J, Pais AS, Sousa AP, Paiva A, Almeida-Santos T. Optimization of Platelet-Rich Plasma Preparation for Regenerative Medicine: Comparison of Different Anticoagulants and Resuspension Media. *Bioengineering (Basel)*. 2024 Feb 23;11(3):209. doi: 10.3390/bioengineering11030209. PMID: 38534483; PMCID: PMC10967741.
15. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018 Mar 1;22(3):340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009. Erratum in: *Cell Stem Cell*. 2018 Apr 5;22(4):608. doi: 10.1016/j.stem.2018.03.014. PMID: 29499152; PMCID: PMC5849079.
16. Benrashid E, McCoy CC, Youngwirth LM, Kim J, Manson RJ, Otto JC, Lawson JH. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application. *Methods*. 2016 Apr 15;99:13-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.07.014. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26216054.
17. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int J Artif Organs*. 2014 Jul 31;37(7):503-12. doi: 10.5301/ijao.5000343. Epub 2014 Jul 4. PMID: 25044387.
18. Terracina, F., Scirè, S., Puleo, G., Catania, V., Lo Monte, A.I., Schillaci, D., et al. (2025). Polybutylene succinate-based electrospun scaffolds improving skin permeation of the antibacterial ciprofloxacin. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 107, 1-11 [10.1016/j.jddst.2025.106815].

19. Miceli GC, Palumbo FS, Bonomo FP, Zingales M, Licciardi M. Polybutylene Succinate Processing and Evaluation as a Micro Fibrous Graft for Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel)*. 2022 Oct 23;14(21):4486. doi: 10.3390/polym14214486. PMID: 36365480; PMCID: PMC9655432.
20. Kozłowska A, Gorący K, El Fray M. Biodegradable Polymer Composites Based on Poly(butylene succinate) Copolyesters and Wood Flour. *Polymers (Basel)*. 2025 Mar 26;17(7):883. doi: 10.3390/polym17070883. PMID: 40219273; PMCID: PMC11991324.
21. Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Advanced Materials*, 16(14), 1151-1170. <https://doi.org/10.1002/adma.200400719>
22. Cicero L, Licciardi M, Cirincione R, Puleio R, Giammona G, Giglia G, Sardo P, Edoardo Vigni G, Cioffi A, Sanfilippo A, Cassata G. Polybutylene succinate artificial scaffold for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022 Jan;110(1):125-134. doi: 10.1002/jbm.b.34896. Epub 2021 Jun 27. PMID: 34180135; PMCID: PMC9290626.
23. Palumbo VD, Rizzuto S, Damiano G, Fazzotta S, Gottardo A, Mazzola G, Lo Monte AI. Use of platelet concentrate gel in second-intention wound healing: a case report. *J Med Case Rep*. 2021 Feb 18;15(1):85. doi: 10.1186/s13256-020-02649-6. PMID: 33597001; PMCID: PMC7890957.
24. Hampshire VA, Gilbert SH. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices. *Toxicol Pathol*. 2019 Apr;47(3):329-338. doi: 10.1177/0192623318797289. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30270765.
25. Beitia M, Delgado D, Mercader J, Gimeno I, Espregueira-Mendes J, Aizpurua B, Sánchez M. The effect of short-term cryopreservation on the properties and functionality of platelet-rich plasma. *Platelets*. 2023 Dec;34(1):2210243. doi: 10.1080/09537104.2023.2210243. PMID: 37165543.
26. Mehdipour Chari K, Enderami SE, Mansour RN, Hasanzadeh E, Amini Mahabadi J, Abazari M, Asadi P, Hojjat A. Applications of blood plasma derivatives for cutaneous wound healing: A mini-review of clinical studies. *Regen Ther*. 2024 Apr 6;27:251-258. doi: 10.1016/j.reth.2024.02.011. PMID: 38596823; PMCID: PMC11002853.
27. Li G, Yang T, Liu Y, Su H, Liu W, Fang D, Jin L, Jin F, Xu T, Duan C. The proteins derived from platelet-rich plasma improve the endothelialization and vascularization of small diameter vascular grafts. *Int J Biol Macromol*. 2023 Jan 15;225:574-587. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.116. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36395946.

28. Ding Z, Du W, Huang J, Han J, Bai J, Yang G, Zhang Y, Ding Y. Allogeneic platelet lysate activates the SIRT1-PINK1/Parkin pathway: A promising approach for improving mitochondrial function in an in vitro model of intervertebral disc degeneration. *Int Immunopharmacol.* 2025 Jan 10;144:113700. doi: 10.1016/j.intimp.2024.113700. Epub 2024 Dec 3. PMID: 39626535.
29. Kwee BJ, Mooney DJ. Manipulating the intersection of angiogenesis and inflammation. *Ann Biomed Eng.* 2015 Mar;43(3):628-40. doi: 10.1007/s10439-014-1145-y. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25316589; PMCID: PMC4380659.
30. Nagao RJ, Marcu R, Wang Y, Wang L, Arakawa C, DeForest C, Chen J, López JA, Zheng Y. Transforming Endothelium with Platelet-Rich Plasma in Engineered Microvessels. *Adv Sci (Weinh).* 2019 Oct 16;6(24):1901725. doi: 10.1002/advs.201901725. PMID: 31871858; PMCID: PMC6918119.
31. Griffin MF, Naderi N, Kalaskar DM, Seifalian AM, Butler PE. Argon plasma surface modification promotes the therapeutic angiogenesis and tissue formation of tissue-engineered scaffolds in vivo by adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 29;10(1):110. doi: 10.1186/s13287-019-1195-z. Erratum in: *Stem Cell Res Ther.* 2025 Sep 15;16(1):490. doi: 10.1186/s13287-025-04634-6. PMID: 30922398; PMCID: PMC6440049.
32. Sergio Sciré, Achraf Derbel, Francesca Terracina, Emanuela Fabiola Craparo, Luca Cicero, Giovanni Cassata, Carlo Trigona, Mariano Licciardi, Novel nano-electrospun with superparamagnetic and NIR photo-responsive behaviors as smart drug delivery systems and biomedical applications, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 120, 2026, 108250, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2026.108250>.

## Ringraziamenti

Al termine di questo percorso di dottorato, desidero esprimere la mia più gratitudine al Professore Antonino Agrusa, con il quale ho avuto il privilegio di crescere sia professionalmente sia scientificamente nel corso di questi anni. La sua guida costante, pur nelle fasi in cui la distanza ha reso il confronto meno diretto, ha rappresentato per me un riferimento solido e imprescindibile, contribuendo in modo significativo alla mia formazione.

Un sentito e particolare ringraziamento è rivolto al Professore Attilio Ignazio Lo Monte.

Il Professore Lo Monte ha rappresentato la figura scientifica di riferimento e il principale punto di orientamento nello sviluppo di questo lavoro. La sua visione scientifica, unita a un rigoroso approccio metodologico, a una consolidata esperienza nel campo della chirurgia rigenerativa e sperimentale e a una costante attenzione all'innovazione, ha costituito un elemento determinante per la realizzazione del presente studio. Il confronto scientifico con il Professore Lo Monte ha rappresentato un contributo fondamentale al mio percorso formativo, incidendo in maniera sostanziale sul mio sviluppo professionale e accademico.

Desidero inoltre esprimere la mia più sincera gratitudine al Dottore Luca Cicero, biologo ricercatore sanitario presso il Centro Mediterraneo di Ricerca e Training (Ce.Me.Ri.T.) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, per la competenza e la disponibilità dimostrate nella gestione delle attività sperimentali. In particolare, il Dottore Cicero ha curato con precisione l'organizzazione della sala operatoria e la conduzione delle procedure sperimentali, garantendo le condizioni operative necessarie per la corretta esecuzione dello studio.

Un riconoscimento va esteso a tutto il personale coinvolto nelle attività sperimentali, con un ringraziamento particolare ad Antonio e Giuseppe per la gestione delle cavie dentro e fuori la sala operatoria e a Tiziana per il supporto durante le attività di laboratorio.

Il presente lavoro non sarebbe stato possibile senza l'autorizzazione del Dottore Giovanni Cassata, Responsabile del Ce.Me.Ri.T., al quale esprimo la mia più sentita riconoscenza.

Un sentito ringraziamento va al Dottore Roberto Puleio, Dirigente responsabile del Laboratorio di Istopatologia presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, per il contributo fornito nell'esecuzione delle analisi istologiche, elemento essenziale per la corretta interpretazione dei risultati.

Ringrazio inoltre il Professore Mariano Licciardi dell'ATeN Center dell'Università degli Studi di Palermo per aver fornito lo scaffold oggetto di studio e per il supporto scientifico offerto nella fase di impostazione e sviluppo del progetto.

Infine, desidero esprimere la mia più sincera gratitudine al Dottore Andrea Gottardo per il costante supporto, la disponibilità e la presenza assicurata lungo l'intero percorso di dottorato. Il suo contributo ha rappresentato per me un riferimento costante sia sul piano scientifico che umano.