

CONTRATTO DI RICERCA COMMISSIONATA PER LA "VALUTAZIONE DELLA STABILITA' DEL

COAGULO DI SANGUE IN PRESENZA DI CAMPO MAGNETICO AL FINE DI UNA

RIGENERAZIONE OSSEA GUIDATA".

Tra

Osteophoenix Italia Srls, C.F. e Partita I.V.A. 12046720012, nel prosieguo

del presente atto denominata semplicemente "Società", con sede legale in

Settimo Torinese (TO) - Via Regio Parco n. 9, rappresentata per questo atto

dal suo Amministratore Delegato, Dott. Sherdil Singh Bhullar, nato a Panama

City 25.10.1966, domiciliato per la carica presso la sede legale della

Società.

e

Università degli Studi di Foggia - Dipartimento di Scienze Mediche e

Chirurgiche (C.F. 94045260711- P. IVA. 03016180717) nel prosieguo del

presente atto denominato semplicemente "Dipartimento", con sede legale in

Foggia - via Luigi Pinto, rappresentato dal Direttore pro-tempore Prof.

Gaetano Serviddio, nato a Bari il 22.08.1971, domiciliato per la carica

presso la sede legale del Dipartimento autorizzato dal proprio Consiglio in

data 26.04.2021.

PREMESSO CHE

1. Il dott. Sherdil Singh Bhullar dirige una società che si occupa della

vendita di Biomateriali del settore dentale con particolare riguardo alla

Rigenerazione Ossea GUIDATA.

2. La Società, al fine di apportare migliorie ai protocolli adottati ha intenzione di procedere: alla verifica sperimentale della stabilità del coagulo di sangue in presenza di un campo magnetico

CONVENGONO E STIPULANO QUANTO SEGUE

Articolo 1 - Le premesse

Le premesse fanno parte integrante del presente contratto.

Articolo 2 - Oggetto

La Società propone all'Università degli Studi di Foggia - Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, che accetta, lo svolgimento dell'attività sperimentale avente per titolo "VALUTAZIONE DELLA STABILITA' DEL COAGULO DI SANGUE IN PRESENZA DI CAMPO MAGNETICO AL FINE DI UNA RIGENERAZIONE OSSEA GUIDATA" che si articolerà secondo quanto sinteticamente si riporta di seguito:

Obiettivo 1: Valutazione della stabilità del coagulo in presenza di un campo magnetico: Fasi: Preparazione del coagulo da sangue intero; esposizione del coagulo (in presenza o assenza di cellule staminali mesenchimali [MSC]) al campo prodotto da una piastra magnetica per vari intervalli di tempo; valutazione della stabilità del coagulo come rilascio di D-dimeri.

Obiettivo 2: Valutazione della vitalità delle MSC: Fasi: isolamento di MSC da tessuto adiposo; formazione del coagulo in presenza di MSC; valutazione della vitalità delle MSC mediante un saggio live/dead in microscopia di fluorescenza.

Articolo 3 - Responsabile della Prestazione e Diretti Collaboratori

Il Dipartimento individua quale responsabile scientifico e coordinatore delle attività di verifica sperimentale, nel prosieguo del presente atto

denominato "responsabile della prestazione", il prof. Massimo Conese, professore ordinario per il s.s.d. MED/04 "Patologia Generale" presso il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche.

La Società individua quale Direttore scientifico e coordinatore delle attività sperimentali il Dott. Sherdil Singh Bhullar, Amministratore Delegato della Società, che avrà la funzione di cooperare con il prof. Massimo Conese alla realizzazione del progetto nelle su diverse fasi.

In particolare, il dott. Sherdil Singh Bhullar avrà la facoltà di:

- Cooperare con il prof. Massimo Conese e col personale da lui incaricato per progettare insieme le prove sperimentali sui coaguli e discutere i risultati;
- Verificare la congruità dei mezzi messi a disposizione, il rispetto dei tempi e delle modalità programmati;
- Accedere al laboratorio di Patologia Generale del Dipartimento;
- Accedere ai dati archiviati strettamente correlati all'attività progettuale insieme al personale dedicato.

Articolo 4 - Durata

L'attività di sperimentazione di cui al presente accordo avrà la durata di otto mesi decorrenti dalla data di sottoscrizione reciproca del contratto attestata dal numero di registrazione del presente documento nel repertorio contratti del Dipartimento.

L'eventuale proroga del contratto dovrà essere concordata previa motivata richiesta scritta di una delle parti da spedire all'altra parte a mezzo PEC almeno due mesi prima della scadenza. Trascorsi gg trenta dalla data di spedizione della PEC il silenzio della controparte acquisterà valore di

assenso alla proroga del contratto per il periodo e secondo i termini e le condizioni poste dalla parte che propone la proroga stessa.

Articolo 5- Corrispettivo

La Società si impegna a versare al Dipartimento, a titolo di corrispettivo per le attività oggetto del presente contratto, la somma complessiva di € 5.000 (euro cinquemila), oltre IVA per l'effettuazione delle attività previste nell'allegato A (dettaglio delle attività) elaborato dal prof. Conese. Tale somma sarà erogata con la seguente modalità: soluzione unica entro 90 giorni dalla stipula della convenzione.

Si precisa che, ai sensi dell'art. 6 comma 2 del Regolamento di Ateneo per la gestione delle attività di autofinanziamento, su ciascuna tranche sarà effettuata una trattenuta del 10% dovuta per le attività di autofinanziamento dell'Università degli Studi di Foggia.

Articolo 6- Modalità di pagamento

Il Dipartimento provvederà ad emettere regolare fattura elettronica intestata a:

OSTEOPHOENIX ITALIA SRLS

C.F. e Partita I.V.A. 12046720012

Via Regio Parco n. 9 - Settimo Torinese (TO)

CODICE SDI PER FATTURAZIONE ELETTRONICA: M5UXCR1

INDIRIZZO PEC: OSTEOPHOENIXITALIA@PEC.IT

La Società effettuerà il versamento utilizzando la causale "Contratto di ricerca commissionata svolta dall'Università di Foggia a mezzo del prof. Conese per conto della "Osteophoenix Italia Srls" utilizzando le seguenti coordinate:

Banca Popolare Pugliese - Direzione Generale

Via Luttazzi, 8 - 73046 Matino (LE)

c/c n. T20990001240; ABI 05262; CAB 79748; CIN "D"

IBAN IT67D0526279748T20990001240; SWIFT: BPPUIT33

Articolo 7 - Regolamentazione delle attività

Ogni attività si svolgerà nel rispetto delle leggi e dei regolamenti di ciascuna delle parti contraenti. Il Dipartimento svolgerà l'attività di cui all'art. 2 e dell'art. 3 nel rispetto degli obiettivi, dei contenuti, dei tempi, delle modalità organizzative e dei costi previsti nel progetto medesimo.

Il Dipartimento garantisce che il personale universitario impegnato nelle attività didattiche e scientifiche presso le strutture dell'Ente è assicurato per responsabilità civile e contro gli infortuni. La Società analogamente garantisce che il proprio personale eventualmente impegnato nelle attività scientifiche presso le strutture dell'Università è assicurato per responsabilità civile e contro gli infortuni.

Articolo 8- Trattamento dei dati personali

Le parti si impegnano reciprocamente a trattare i dati personali unicamente per le finalità connesse all'esecuzione del presente contratto, ai sensi e con le modalità previste dal D.Lgs. 30 giugno 2003, n.96 e s.m.i. Le parti si impegnano ad osservare quanto disposto dal Regolamento europeo (UE) 2016/679 e dal D. Lgs. N. 196 del 30 giugno 2003 in materia di protezione dei dati personali eventualmente acquisiti e/o utilizzati per lo svolgimento della presente ricerca.

Il responsabile del trattamento dei dati personali per l'Università è il

Prof. Michele Trimarchi, Via Gramsci n. 89/91, 71122 Foggia, PEC

rpd@cert.unifg.it.

Il responsabile del trattamento dei dati personali per la Società è il dott.

Sherdil Singh Bhullar.

Il Dipartimento e la Società considerano riservato il programma di attività

e reciprocamente si impegnano, usando la migliore diligenza, ad osservare e

a far osservare ai loro rispettivi collaboratori il segreto per quanto

riguarda fatti, informazioni, cognizioni, documenti.

Art. 9 - Recesso

Ad ognuna delle parti del presente accordo, ai sensi dell'art.1373 c.c., è

attribuita la facoltà di recedere e tale facoltà può essere esercitata

finché l'accordo stesso non abbia avuto un principio di esecuzione.

Art. 10 - Risoluzione

Il presente accordo potrà essere risolto in ogni momento qualora uno dei

contraenti dichiari l'impossibilità, per causa ad esso non imputabile, di

proseguire la collaborazione. In caso di inadempimento la relativa

risoluzione verrà disciplinata dagli artt.1453 e segg. c.c. Il contratto

dovrà intendersi risolto anche nella circostanza in cui La Società non

ottemperi al versamento del quantum debeatur alle scadenze prefissate salvo

che non ricorra una giusta causa. In ogni caso la Società dovrà darne

immediata comunicazione al Dipartimento che si riserverà il diritto di

chiedere informazioni e chiarimenti e, qualora lo ritenga opportuno, di

interessare l'ufficio legale dell'Amministrazione Centrale per la tutela

delle proprie ragioni.

Art. 11 - Risultati della collaborazione

Il Responsabile Scientifico individuato dal Dipartimento, Prof. Massimo Conese, consegnerà alla Società al termine dell'attività o, comunque, nei tempi e con le modalità riportate nel programma, apposita relazione tecnica e saranno di proprietà esclusiva della Osteophoenix Italia Srls.

Le pubblicazioni e le diffusioni dei risultati parziali o finali della ricerca potranno avvenire, con l'indicazione dei soggetti che hanno condotto lo studio e di quelli che lo hanno finanziato, solo previo consenso scritto tra le parti.

Art. 12 - Spese di registrazione

Il presente atto è soggetto a registrazione solo in caso d'uso ai sensi del disposto dell'art. 1 lettera b) della Tariffa - parte seconda - di cui al D.P.R. n. 131 del 26 aprile 1986.

Il presente contratto è redatto in n. 2 originali ed è soggetto all'imposta di bollo assolta in modo virtuale dall'Università degli Studi di Foggia - Autorizzazione Agenzia delle Entrate di Foggia prot. n. 7406 del 10/07/2000.

Art. 13- Foro

In caso di controversia nell'interpretazione o nell'esecuzione del presente accordo, la questione verrà definita in prima istanza in via amichevole. Qualora non fosse possibile, il foro competente sarà quello di Foggia.

Art. 14 - Disposizione di chiusura

Per tutto quanto non espressamente previsto dal presente contratto si rinvia alle norme del Codice Civile.

Foggia, --/--/---

Per il DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Il Direttore

Prof. Gaetano SERVIDDIO

Per la OSTEOPHOENIX ITALIA Srls

L'Amministratore Delegato

Dott. Sherdil Singh BHULLAR

VALUTAZIONE DELLA STABILITA' DEL COAGULO DI SANGUE IN PRESENZA DI UN CAMPO MAGNETICO AL FINE DI UNA RIGENERAZIONE OSSEA GUIDATA

Proponenti dello studio:

Prof. Massimo Conese e Prof. Sante Di Gioia

Laboratorio di Medicina Sperimentale e Rigenerativa

Centro di Ricerche Biomediche "E. Altomare"

Via Napoli 121 – 71122 Foggia

E-mail: massimo.conese@unifg.it; sante.digioia@unifg.it

Background

La Rigenerazione Ossea GUIDATA (ROG) è un trattamento dei difetti ossei attuata mediante l'applicazione di membrane occlusive, le quali non solo proteggono il coagulo di sangue ma anche escludono le popolazioni cellulari non osteogeniche dai circostanti tessuti molli, pertanto permettendo alle popolazioni cellulari osteogeniche, staminali e/o progenitrici, provenienti dall'osso circostante, di colonizzare la ferita ossea. Le evidenze precliniche e cliniche indicano che la ROG è un approccio terapeutico utile per il trattamento di difetti ossei peri-impianto [1], eppure tutti i meccanismi a livello cellulare e molecolare non sono ben conosciuti.

La prima fase della guarigione di una ferita ossea riguarda l'emostasi e la formazione di un coagulo di sangue, in seguito all'attivazione della cascata della coagulazione e della formazione di un reticolo di fibrina [2]. Quest'ultima viene formata dal fibrinogeno, una proteina eterotrimerica con tre domini globulari (due D ed uno E), in seguito all'azione proteolitica della trombina, permettendo ai domini D di interagire "end to end" e quindi di essere stabilmente legati mediante l'azione del fattore XIII. Il coagulo di fibrina include al suo interno elementi cellulari, quali piastrine, eritrociti e leucociti. Sono le piastrine attivate che producono una serie di fattori solubili, i quali stimolano la chemiotassi di cellule osteogeniche progenitrici (MSC, mesenchymal stem cells), provenienti dal periostio dell'osso danneggiato circostante.

La struttura del network di fibrina influenza il comportamento cellulare, come quello delle cellule endoteliali durante le varie fasi dell'angiogenesi, nonché la vitalità, proliferazione e la differenziazione osteogenica delle MSC, le quali giocano un ruolo fondamentale nella guarigione ossea [3-7].

Sebbene l'applicazione di campi magnetici possa avere parecchie applicazioni in campo ortodontico e protesico [8], l'effetto del campo magnetico sul coagulo di sangue ricoperto da membrane protettive non è ancora stato studiato. Inoltre, solo poche evidenze suggeriscono che i campi magnetici possono influenzare il processo fibrinolitico all'interno di un coagulo di sangue in vitro [9] e in vivo [10].

Scopo dello studio

Lo scopo primario di questo studio è la valutazione della stabilità di un coagulo di sangue intero in presenza di un campo magnetico. Inoltre verrà indagata la modulazione della stabilità del coagulo in campo magnetico da parte di cellule staminali mesenchimali.

Tempo di esecuzione della ricerca: 6-8 mesi.

Materiali e metodi

Preparazione del coagulo

La preparazione del coagulo avverrà come precedentemente descritto [4]. In breve, il sangue ottenuto da 4-6 soggetti diversi, prelevato in assenza di anticoagulanti, verrà pipettato in pozzetti di piastre da 24 pozzetti e la formazione del coagulo verrà fatta avvenire per almeno 60 minuti a 37 °C in un incubatore per cellule. Le cellule staminali mesenchimali verranno seminate sul coagulo (5×10^5 /mL) per 24 ore a 37°C.

Isolamento delle MSC da tessuto adiposo

Un lipoaspirato verrà sottoposto ad emulsione mediante passaggi in siringhe [11] e quindi verrà centrifugato in modo da ottenere la cosiddetta “stromal vascular fraction” in cui sono presenti le MSC [12]. La SVF verrà prima trattata con una soluzione di collagenasi allo 0.2% e poi piastrata in medium di coltura in modo da ottenere una coltura di MSC (in DMEM:F12 1:1 supplementato con 40% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% Antibiotic Antimycotic (ABAM) e 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). che verranno portate al passaggio 2-3 e quindi staccate ed utilizzate, come precedentemente messo a punto nel nostro laboratorio [13].

Valutazione della stabilità del coagulo in presenza di un campo magnetico

Il coagulo (in presenza o assenza di MSC) verrà esposto al campo prodotto da una piastra magnetica (OZ Biosciences, Marseille, France) per vari intervalli di tempo. La stabilità del coagulo, valutata come fibrinolisi, verrà eseguita come precedentemente descritto [2]. Ad ogni tempo, il coagulo verrà immerso in una soluzione di phosphate buffered saline (PBS, 3 mL) contenente plasminogeno umano (Glu-plasminogen, 5.4 mg/mL concentrazione finale; Sigma-Aldrich) La lisi verrà indotta dall'aggiunta di tPA ricombinante (0.25 mg/mL concentrazione finale, Sigma-Aldrich) a 37°C con blanda agitazione. Aliquote di 300 µL saranno rimosse a vari intervalli di tempo e centrifugate a 1000 xg per 3 min. Lo stesso volume di PBS verrà aggiunto ad ogni prelievo. La quantità di D-dimeri rilasciata dal coagulo verrà misurata mediante kit ELISA (Abcam, Cambridge, UK). Il coagulo in PBS verrà usato come controllo per la fibrinolisi spontanea.

Valutazione della vitalità delle MSC

la vitalità delle MSC verrà indagata mediante un saggio live/dead [14]. In breve, al coagulo incubato in presenza delle MSC verrà aggiunta prima calceina-AM (1 µM) for 30 min. Il coagulo

verrà quindi lavato con RPMI e incubato con propidium iodide (57 µg/ml) per 15 min al buio a temperatura ambiente. Il coagulo verrà quindi osservato al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse E200, Nikon). La fluorescenza verde sarà associata alle cellule vive, quella rossa alle cellule morte.

Bibliografia

1. Retzepi M., and Donos N., Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin. Oral Impl. Res.* 21: 567–576, 2010.
2. Shiu H.T., Goss B., Lutton C., Crawford R., Xiao Y. Formation of Blood Clot on Biomaterial Implants Influences Bone Healing. *Tissue Engineering Part B* 20: 697-712, 2014.
3. Catelas I., Sese N., Wu B.M., Dunn J.C., Helgerson S., and Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12, 2385, 2006.
4. Sabino R.M. and Papat K.C. Evaluating Whole Blood Clotting in vitro on Biomaterial Surfaces. *Bio-protocol* 10(03), e3505, 2020.
5. Ghajar C.M., Blevins K.S., Hughes C.C.W., George S.C., and Putnam A.J. Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue Eng* 12, 2875, 2006.
6. Ho W., Tawil B., Dunn J.C., and Wu B.M. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 12, 1587, 2006.
7. Kniazeva E., Kachgal S., and Putnam A.J. Effects of extracellular matrix density and mesenchymal stem cells on neovascularization in vivo. *Tissue Eng Part A* 17, 905, 2011.
8. Bhat V.S., Shenoy K.K., and Premkumar P. Magnets in Dentistry. *Archives of Medicine and Health Sciences*, 1, 73-79, 2013.
9. Iwasaka M., and Ueno S. Dissolution of thrombus under high gradient magnetic fields. *IEE Transactions on Magnetism* 32, 5130-5132, 1996.
10. Gorczynska E., and Wegrzynowicz R. The effect of magnetic fields on platelets, blood coagulation and fibrinolysis in guinea pigs. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* 15, 459-468, 1983.
11. Tonnard P., Verpaele A., Peeters G., Hamdi M., Cornelissen M., and Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery* 132, 1017, 2013.
12. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L., Redl H., Rubin J.P., Yoshimura K., Gimble J.M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641-648, 2013.
13. Carbone A., Valente M., Annacontini L., Castellani S., Di Gioia S., Parisi D., Rucci M., Belgiovine G., Colombo C., Di Benedetto A., Mori G., Lo Muzio L., Maiorella A., Portincasa A.,

and Conese M. Adipose-derived mesenchymal stromal (stem) cells differentiate to osteoblast and chondroblast lineages upon incubation with conditioned media from dental pulp stem cell-derived osteoblasts and auricle cartilage chondrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents*. 30, 111-122, 2016.

14. Gessmann J., Seybold D., Peter E., Schildhauer T., and Koller M. Plasma clots gelled by different amounts of calcium for stem cell delivery. *Langenbecks Arch Surg* 398, 161, 2013.