

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Progettazione e assemblaggio
multiscala di scaffold elettrofilati per
la ricostruzione di tendini**

Tesi in
Comportamento Meccanico dei Materiali LT

Relatore:
Prof. Ing. Luca Cristofolini

Presentata da:
Elisa Bendanti

Correlatori:
Ing. Alberto Sensini
Ing. Juri Belcari

Sessione III
Anno Accademico 2015-2016

INDICE

1 ABSTRACT	5
2 INTRODUZIONE	7
2.1 STRUTTURA TENDINEA	7
2.1.1 ORGANIZZAZIONE MULTISCALE	7
2.1.2 ELEMENTI CELLULARI E LORO PROPRIETA' BIOCHIMICHE	10
2.1.3 PROPRIETA' BIOMECCANICHE	12
2.2 TENDINE D'ACHILLE UMANO	17
2.2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA	17
2.2.2 CARATTERISTICHE MECCANICHE	20
2.3 SCAFFOLD DEL TENDINE IN BIOINGEGNERIA	22
2.3.1 CARATTERIZZAZIONE E PROPRIETA'	23
2.3.2 ACIDO POLILATTICO	24
2.4 ELECTROSPINNING	26
2.4.1 PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO	26
2.4.2 SCAFFOLD ELETTROFILATI	28
3 SCOPO DELLA TESI	30
4 PARTE SPERIMENTALE	31
4.1 MATERIALI	31
4.2 METODI	32
4.2.1 PRODUZIONE DEI BUNDLES ELETTROFILATI	32
4.2.2 ASSEMBLAGGIO SCAFFOLD TENDINE COMPLETO	34
4.2.3 ELETTROFILATURA DELLA CAMICIA	34

4.2.4 ELABORAZIONE DATI	36
4.3 METODI DI CARATTERIZZAZIONE	36
4.3.1 MICROSCOPIA OTTICA	36
4.3.2 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE	37
4.3.3 PROVE MECCANICHE A TRAZIONE	38
<u>5 RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	<u>42</u>
5.1 OTTIMIZZAZIONE DELLA MORFOLOGIA DEI BUNDLES	42
5.2 OTTIMIZZAZIONE DELLA FILATURA DELLA CAMICIA	43
5.2 PROPRIETA' MECCANICHE SINGOLI BUNDLES E SCAFFOLD MULTICALA	45
<u>6 CONCLUSIONI</u>	<u>49</u>
<u>7 RINGRAZIAMENTI</u>	<u>51</u>
<u>8 BIBLIOGRAFIA</u>	<u>52</u>
<u>9 SITOGRAFIA</u>	<u>56</u>

1 ABSTRACT

Con la presente tesi si intende descrivere il progetto di ricostruzione della struttura multiscala del tendine di Achille, esplicando le varie fasi che conducono alla realizzazione di uno scaffold artificiale. Alla struttura tendinea, infatti, è affidata un'importante funzione meccanica: essa permette la trasmissione delle forze dal muscolo all'osso per garantire il movimento del corpo. Eventuali lesioni tendinee comportano gravi problematiche motorie, accentuate dal fatto che tale tessuto non ha la capacità di rigenerazione spontanea; per questo l'ingegneria tissutale ha ricercato alternative alla sua ricostruzione.

Partendo dalla descrizione delle caratteristiche morfologiche e funzionali del tendine e della tecnica di elettrofilatura, l'obiettivo primario prefissato in questa tesi riguarda la realizzazione di uno scaffold multiscala che riproduca strutturalmente le proprietà del tendine. In seconda analisi sono state eseguite prove a trazione per valutare le proprietà meccaniche dello scaffold artificiale e confrontarle con i valori di riferimento associati alla struttura fisiologica.

Per mimare l'architettura del tendine è stata utilizzata la tecnica di elettrofilatura che permette di produrre nanofibre polimeriche; gli scaffold multiscala sono stati realizzati partendo da una soluzione polimerica di acido poli-(L)-lattico.

Le proprietà meccaniche sia dei bundles sia degli scaffold si avvicinano molto ai valori attesi. Per quanto riguarda i bundles singoli, la rottura dei provini è avvenuta nel tratto utile come previsto e il valore di tensione a rottura raggiunto è di poco inferiore a quello dei fascicoli di collagene. Per le prove effettuate su scaffold completi, si sono ottenuti valori inferiori rispetto a quelli riferiti al tendine umano, ma questo è sicuramente dovuto anche agli afferraggi, che comportano un'inevitabile concentrazione di tensioni: questo è stato dimostrato dal fatto che buona parte dei provini si è rotta in punti molto vicini alle estremità. Gli afferraggi per il costruito multiscala completo vanno perciò ottimizzati in modo da garantire una rottura del campione testato nel tratto utile. Oltre alla caratterizzazione meccanica, è stato eseguito uno studio morfologico: si è riscontrato un buon allineamento delle fibre nei bundles, caratteristica fondamentale per garantire una buona resistenza dello scaffold multiscala alla trazione.

In futuro sarà innanzitutto necessario eseguire dei test di compatibilità cellulare, in modo da verificare che la struttura artificiale realizzata permetta la proliferazione ed il differenziamento delle cellule, caratteristica peculiare di un qualunque scaffold di

bioingegneria. Ponendo l'attenzione sulle caratterizzazioni meccaniche, invece, si può avviare un progetto di ottimizzazione dei materiali polimerici utilizzati, che garantiscano proprietà ancora più conformi a quelle fisiologiche del tendine umano. Infine, si potrà avviare il setup delle prove meccaniche a carico ciclico, in quanto la resistenza a fatica è una caratteristica fondamentale per il tendine, che risulta continuamente sottoposto a carichi ripetuti.

2 INTRODUZIONE

2.1 STRUTTURA TENDINEA

2.1.1 Organizzazione multiscala

I tendini sono formazioni anatomiche costituite per la maggior parte da fibre collagene e rappresentano componenti pressoché inestensibili, molto resistenti alla trazione e piuttosto flessibili; quest'ultima proprietà permette loro di piegarsi attorno a superfici ossee in modo da mutare la direzione di trazione definitiva. Inoltre, essi sono in grado di sopportare carichi elevati con deformazioni minime e questo comporta, a parità di carico sottoposto, una diminuzione della lunghezza della fibra muscolare che a sua volta causa un decremento del consumo energetico dovuto allo stiramento tendineo.

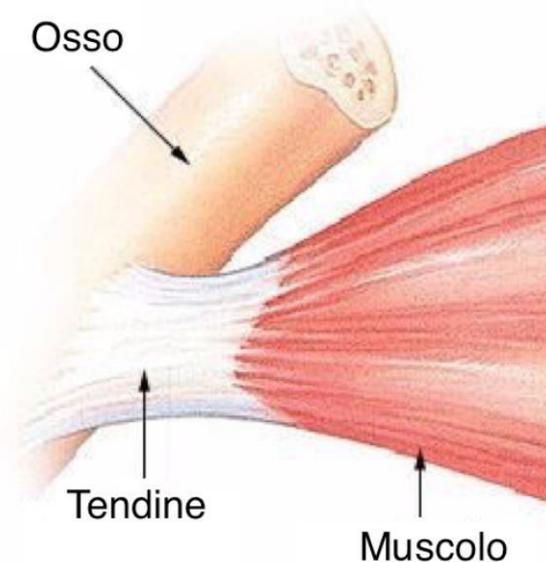


Figura 1 – Rappresentazione anatomica del tendine.

La loro principale funzione è il collegamento ed il trasferimento di sollecitazioni meccaniche tra muscoli scheletrici ed ossa: il passaggio della forza prodotta dalla contrazione muscolare alle ossa scheletriche è permesso proprio da tali strutture e ciò consente sia il movimento del corpo, sia il mantenimento della postura. I tendini appaiono bianchi in quanto la loro rete

vascolare si presenta molto diradata; la forma somiglia a funi e la sezione trasversale è circolare, ovale o appiattita, mentre i fasci di collagene sono per lo più disposti parallelamente all'asse maggiore, ma in parte anche intrecciati [1].

L'anatomia prevede una zona di inserzione del tendine al muscolo, la giunzione muscolo-tendinea, all'interno della quale è presente l'organo tendineo del Golgi, un propriocettore muscolare che risponde alla tensione sviluppata dal muscolo scheletrico durante una contrazione isometrica (cioè senza accorciamento muscolare), causando un riflesso inverso da stiramento, quindi il rilasciamento del muscolo stesso. L'organo del Golgi è costituito da una capsula di tessuto connettivo contenente fasci di fibre di collagene avvolte da una fibra nervosa afferente, che viene schiacciata al momento della contrazione muscolare e conseguentemente eccita interneuroni inibitori, comportando una diminuzione di tale contrazione [2]. La giunzione osteotendinea, zona di unione tra tendine ed osso, implica una graduale transizione dalla struttura tendinea all'osso lamellare, che prevede la presenza di tessuto fibrocartilagineo nel mezzo. Più precisamente, si contano quattro zone anatomiche: tessuto fibroso puro, tessuto fibrocartilagineo non mineralizzato, tessuto fibrocartilagineo mineralizzato e tessuto osseo [3].

Le guaine fibrose, le guaine sinoviali, i foglietti peritendinei, le borse tendinee e le pulegge di riflessione rappresentano gli annessi tendinei. Le prime, dette anche retinacoli, sono canali di scorrimento che permettono un buon scivolamento dei tendini, altrimenti ostacolato dall'attrito prodotto tra scanalature e tessuto fibrocartilagineo delle pareti ossee. Le guaine sinoviali sono strutture formate da due strati concentrici, i cosiddetti foglietti sierosi: il foglietto viscerale, il più interno, aderisce al tendine mediante tessuto connettivo lasso, lo strato parietale ricopre le pareti della guaina fibrosa. Alle estremità appaiono in continuità tra loro e i due foglietti sono separati da un sottile strato di liquido peritendineo, la cui composizione è molto simile a quella del liquido sinoviale. La loro funzione principale si esplica nel facilitare lo scorrimento del tendine sulle superfici ossee o su altre strutture anatomiche. I foglietti peritendinei, invece, rappresentano strati di tessuto connettivo lasso che vanno a circondare il tendine e funzionalmente sono paragonabili alle guaine sinoviali, sebbene vi sia una sostanziale differenza a livello istologico. Nel complesso tale struttura rappresenta il paratenon ed è costituita da fibrille di collagene e da sottili fibre elastiche. Le borse tendinee sono piccole vescicole sierose situate in zone in cui si evidenziano prominente ossee che potrebbero comprimere e logorare il tendine e, come alcuni degli altri annessi tendinei, hanno lo scopo di minimizzare le tensioni di attrito tra il tendine e le strutture anatomiche adiacenti. Le pulegge di riflessione, infine, sono rinforzi formati da

tessuto fibrillare denso; il loro compito consiste nel mantenere il tendine all'interno della zona di scorrimento, in particolare nei punti di curvatura [4].

Se si esamina la sezione trasversale di un tendine, si nota che la struttura più esterna è il paratenon, una guaina elastica in tessuto fibrillare lasso che permette lo scorrimento del tendine rispetto ai tessuti circostanti. Nella parte più interna, adiacente al paratenon, è presente l'epitenon, un'ulteriore guaina sottile di tessuto connettivo formata da una rete di fibre di collagene con orientamento casuale. Proseguendo verso l'interno, la struttura a contatto con l'epitenon è l'endotenon, una membrana di tessuto connettivo lasso che, oltre a rivestire le singole fibre tendinee, le raggruppa in fasci di diverse dimensioni. Quest'ultima struttura è importante anche per garantire la distribuzione capillare, linfatica e nervosa all'interno del tendine. Lo scorrimento reciproco tra i fascicoli tendinei e l'endotenon è garantito dalla presenza di proteoglicani, particolari macromolecole altamente idrofile.

La struttura tendinea è il risultato di un assemblaggio di sottocomponenti strutturali che variano in funzione del diametro medio della sezione trasversale, ma la composizione chimica resta la stessa, costituita in gran parte dal collagene di tipo I. In Figura 2 si propone una rappresentazione di questa struttura multiscala a sei elementi.

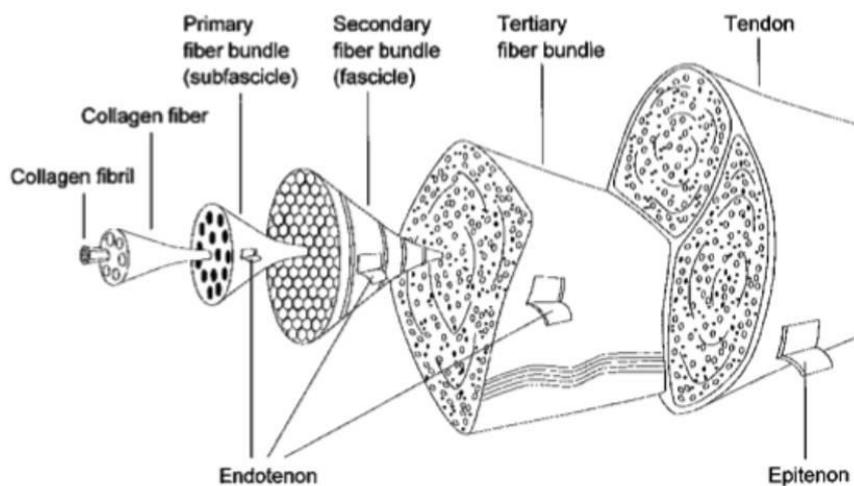


Figura 2 – Rappresentazione multiscala della struttura tendinea [4].

La fibrilla di collagene o tropocollagene (di diametro pari a 20-150 nm) rappresenta il componente fondamentale di tale organizzazione multiscala. L'unione di più fibrille porta alla formazione di fibre dal diametro estremamente variabile, fino ad una misura di 300 µm,

che a loro volta si riuniscono in fasci di fibre primarie (o subfascicoli) dal diametro di 15-400 μm . Le fibre sono rivestite da uno strato di endotenon che permette una migliore adesione tra esse. I fasci di fibre secondari (o fascicoli) derivano dall'aggregazione di un numero variabile di subfascicoli e presentano un diametro variabile tra i 150 μm e 1 mm. L'ultima struttura gerarchica, prima del tendine completo, è rappresentata dai bundles terziari (di diametro pari a 1-3 mm), generati dall'unione di più fascicoli [4].

2.1.2 Elementi cellulari e loro proprietà biochimiche

La natura connettivale fibrosa dei tendini permette di classificarli all'interno dei tessuti molli non contrattili. La principale componente dei tessuti connettivi è la matrice extracellulare; nel caso dei tendini essa risulta costituita da fibre di collagene e di elastina immerse in una sostanza amorfa idrofila formata da proteoglicani, glicosamminoglicani e glicoproteine.

Il collagene è una proteina la cui unità strutturale fondamentale, il tropocollagene, è formato da tre catene α polipeptidiche intrecciate tra loro in modo da formare una molecola a tripla elica. La biosintesi del collagene avviene all'interno del fibroblasto, una particolare cellula del tessuto connettivo. Completata la formazione della tripla elica delle unità strutturali, tali molecole vengono trasferite nella matrice extracellulare, dove avviene l'assemblaggio di fibre di collagene insolubili, che svolgono la loro funzione di sostegno del tessuto connettivo. Nell'organismo sono presenti 27 diverse tipologie di collagene, che sono state suddivise per tipologia e numerate: nel tessuto tendineo prevale il collagene di Tipo I, ma è presente anche il Tipo III, sebbene in proporzioni inferiori, che costituisce l'epitenon e l'endotenon [5].

L'elastina è una proteina idrofila formata da molecole di tropoelastina legate covalentemente ed aventi una struttura ad α -elica. La principale funzione di questa componente è rappresentata dalla capacità di riportare la struttura tendinea alla sua forma originaria dopo essere stata sottoposta a forze di stiramento o di contrazione. Nel tessuto tendineo è presente in quantità inferiore rispetto al collagene.

I proteoglicani (PGs) rappresentano la sostanza fondamentale, chiamata anche gel idrofilico, caratterizzata da una consistenza gelatinosa; sono macromolecole composte da un asse proteico a cui vengono uniti covalentemente i glicosamminoglicani (GAGs), lunghe catene non ramificate formate dalla ripetizione di diverse unità disaccaridiche. Le due principali categorie dei GAGs sono i solforati ed i non solforati, dei quali fa parte l'acido ialuronico (HA). Nei tendini e nel tessuto connettivo il proteoglicano più presente è la decorina,

costituita da una parte centrale proteica legata a una o due catene di GAG (il dermatan solfato, DS). La parte proteica crea un legame non covalente con le fibrille collagene, le catene di DS invece si estendono nella direzione di una fibrilla adiacente, con lo scopo di formare dei ponti interfibrillari che conferiscono un ordinato allineamento parallelo di tali fibrille. Il ruolo della decorina risulta fondamentale nell'assemblaggio della matrice: le fibrille effettuano legami testa-coda e così la fusione laterale viene ostacolata, ottenendo quindi una regolazione ottimale del diametro e della lunghezza in risposta al carico sottoposto al tendine [6].

Le glicoproteine sono macromolecole formate da una componente proteica (la maggiore) ed una glucidica. La loro principale funzione si esplica nella regolazione dello spessore delle fibre collagene (agisce comportando una diminuzione del loro diametro), andando ad interagire con le molecole di tropocollagene, ritardando la loro aggregazione.

La componente cellulare è rappresentata per il 90-95% da tenoblasti e tenociti: i primi, caratterizzati dalla presenza di numerosi prolungamenti citoplasmatici che si estendono nella matrice in tutte le direzioni, sono i responsabili dello sviluppo del tessuto tendineo e sono disposti in lunghe catene parallele. Gli organuli cellulari maggiormente sviluppati sono il reticolo endoplasmatico rugoso, coinvolto nella sintesi proteica, e l'apparato del Golgi, responsabile della componente glucidica, mentre i mitocondri sono presenti in minima parte [7]. Durante la fase di sviluppo tendineo i tenoblasti presentano un elevato rapporto cellula/matrice, in accordo con l'elevata attività biosintetica cellulare, che nel tempo si riduce lentamente, o effettua un drastico cambiamento nel caso si presentino delle condizioni patologiche. In presenza di un tendine sviluppato completamente si assiste ad una mutazione morfologica delle cellule che lo compongono: il rapporto cellula/matrice si riduce drasticamente e i tenoblasti si trasformano in tenociti, strutture fusiformi estremamente allungate in cui si ha un ulteriore sviluppo dei prolungamenti citoplasmatici, che formano una vera e propria rete immersa nella sostanza fondamentale. Tale struttura risulta indispensabile per garantire gli scambi metabolici tra cellula e matrice in aree lontane dai corpi cellulari e per compensare l'elevata perdita di cellule che vengono sostituite dalla matrice stessa, fenomeno dovuto all'aumento dell'età [4].

In generale le funzioni delle cellule tendinee si riassumono in produzione di energia e sintesi delle componenti della matrice extracellulare, quali fibre di collagene ed elastina, proteoglicani e glicoproteine strutturali. Inoltre, un'importante proprietà sta nello scarso consumo metabolico, che permette di trasportare carichi e di rimanere in tensione per molto tempo evitando ischemia o necrosi del tessuto tendineo.

I meccanismi di catabolismo della sostanza fondamentale tendinea non sono ancora sufficientemente conosciuti: si ipotizza che i tenociti siano i responsabili della secrezione di enzimi lisosomiali coinvolti nella degradazione dei componenti della matrice, oppure che tale degradazione avvenga attraverso fagocitosi [7].

2.1.3 Proprietà biomeccaniche

Fisiologicamente, i tendini sono strutture adibite alla resistenza a sollecitazioni di trazione ed alla trasmissione di impulsi meccanici provenienti dalla contrazione muscolare alla struttura scheletrica. Deve quindi essere sviluppata una resistenza alla tensione tale da tollerare la forza sviluppata dal muscolo mentre si contrae; in altri termini, l'unità muscolo-tendinea deve adattarsi alle diverse richieste funzionali dell'apparato locomotore.

Le caratteristiche biomeccaniche dei tendini dipendono da vari fattori, dalla loro forma all'entità della sollecitazione a cui devono resistere: i flessori delle dita, ad esempio, sono dotati di tendini lunghi e sottili, in quanto i movimenti richiesti sono delicati e di precisione; il tendine del quadricipite femorale, invece, sarà più corto e spesso poiché la sua funzione è maggiormente legata ad azioni di potenza e resistenza. Se, a parità di diametro, i tendini corti riescono a sviluppare una maggior resistenza a carichi di trazione, i tendini più lunghi hanno il vantaggio di produrre una deformazione più elevata prima di arrivare a rottura; ne consegue che una lunghezza maggiore comporta un miglior assorbimento di energia e complessivamente i tendini più lunghi risulteranno più resistenti ai corti. Si può considerare che il diametro e la disposizione delle fibrille collagene sono due fattori fondamentali per determinare il livello di carico che ogni tendine può sopportare.

Si può eseguire un'analisi funzionale anche per le sottostrutture del tendine: i glicosamminoglicani, ad esempio, lavorano in parallelo al collagene e all'elastina, mantenendo l'allineamento delle fibre che altrimenti risulterebbero piuttosto attorcigliate ed hanno la funzione di smorzare il carico applicato. L'elastina, grazie alle sue elevate caratteristiche di estensibilità reversibile, è fondamentale per il recupero di tutta l'energia spesa durante la deformazione. La curva tensione-deformazione mostra una scarsa rigidità fino a deformazioni del 200%, poi aumenta istantaneamente fino al punto di rottura.

Tabella 1 – Proprietà meccaniche dell’elastina.

MATERIALE	MODULO DI YOUNG (E) [Mpa]	TENSIONE DI ROTTURA (σ) [Mpa]	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO (ϵ) [%]	LIMITE ELASTICO [%]
Elastina	0.6	1	100	60

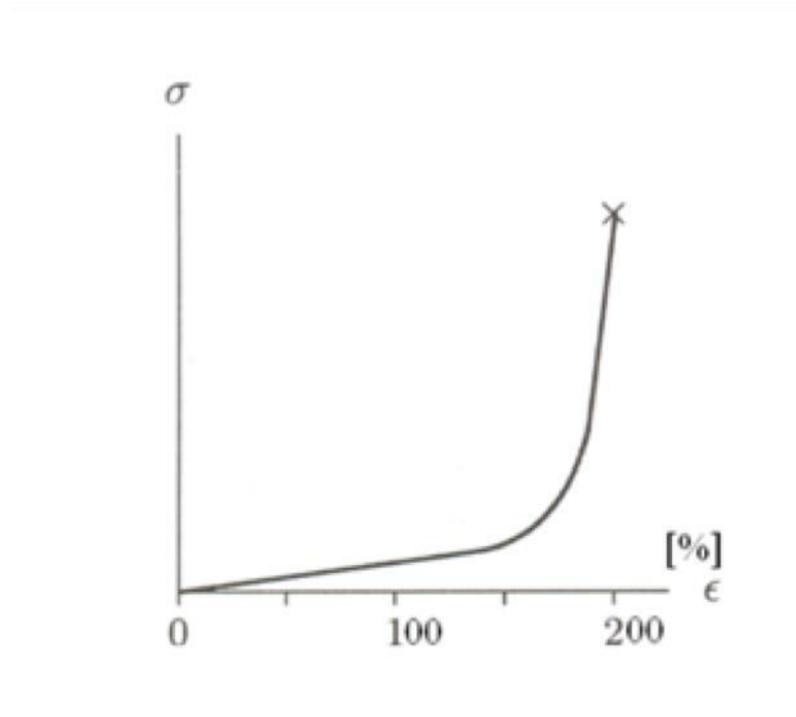


Figura 3 – Diagramma tensione-deformazione dell’elastina.

Il collagene è il componente funzionale più importante per il tendine: grazie alla sua struttura a tripla elica ed ai legami trasversali che si formano per ogni livello di aggregazione, esso offre un’ottima resistenza a trazione e rigidezza delle fibre. Le fibre, però, risultano molto sensibili a sforzi di taglio e poco resistenti a carichi di compressione. La curva tensione-deformazione, in questo caso, presenta un andamento non lineare: inizialmente si osserva un basso modulo di Young ed un comportamento elastico, in quanto a livello microscopico si sta verificando lo stiramento delle eliche e l’allineamento delle fibre nella direzione del carico. Questa zona rappresenta la regione di base. La seconda regione è caratterizzata da un modulo elastico maggiore ed una relazione lineare tra tensione applicata e deformazione prodotta. Le

proprietà migliorano notevolmente grazie al comportamento delle catene proteiche già distese che fungono da molle. L'ultima parte del grafico, la regione di rottura, non prevede alcuna fase di snervamento [7].

Tabella 2 – Proprietà meccaniche del collagene.

MATERIALE	MODULO DI YOUNG (E) [Mpa]	TENSIONE DI ROTTURA (σ) [Mpa]	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO (ϵ) [%]	LIMITE ELASTICO [%]
Collagene	1000	50 – 100	10	1 - 2

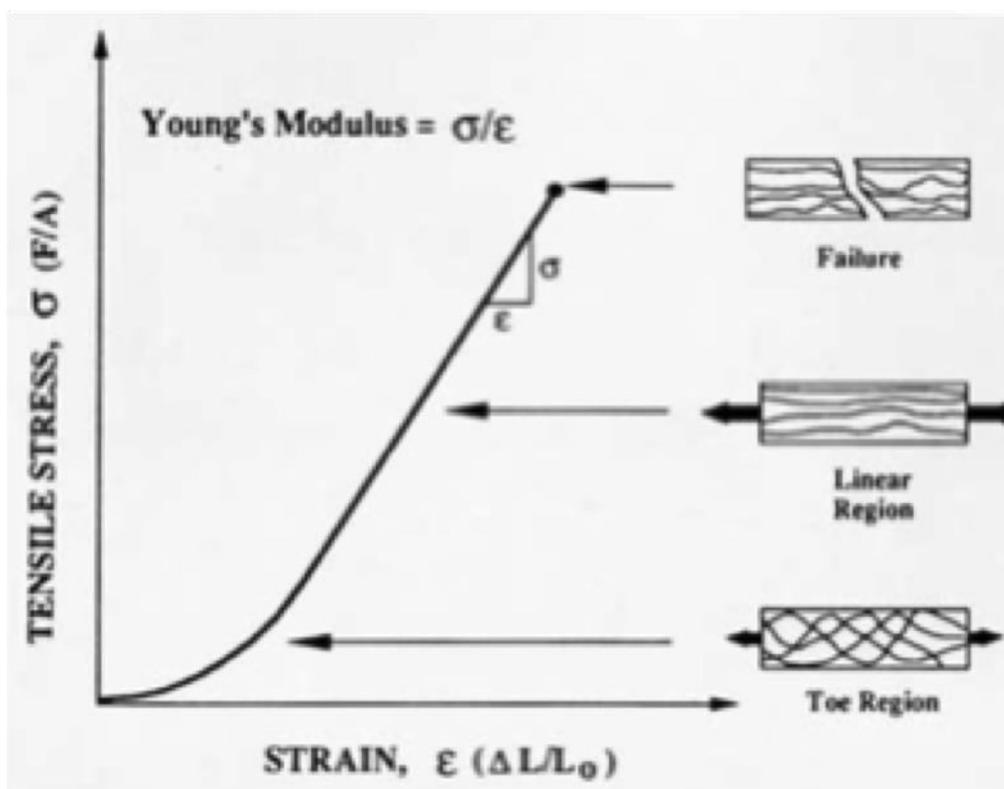


Figura 4 – Diagramma tensione-deformazione del collagene.

Il tendine completo ha un comportamento meccanico molto simile a quello del collagene, ma i valori di rigidità e le tensioni in gioco sono nettamente superiori. Solitamente le proprietà

meccaniche dei tendini vengono studiate sfruttando metodi che prevedono l'allungamento di campioni tendinei isolati fino alla rottura, in cui durante le prove vengono registrate la variazione di lunghezza dei campioni e la forza applicata [8]. Nei risultati di tali test si possono identificare quattro diverse regioni nella curva forza-allungamento del tendine:

- I regione: si riferisce al piede della curva, è associata a forze che non danneggiano la struttura e che riducono il grado di rilassamento delle fibre collagene, ma senza causare un loro allungamento vero e proprio. Risulta quindi sufficiente il tono muscolare per mantenere i tendini al limite di questa regione.
- II regione: è la regione lineare, in cui il carico produce una variazione di lunghezza delle fibre già allineate. Nella parte finale di questa zona alcune fibre iniziano a cedere. Per carichi più elevati si possono verificare minime cadute di carico causate dal danneggiamento di alcune fibre. Tale zona descrive la stimolazione fisiologica del tendine.
- III regione: un ulteriore allungamento comporta la rottura di altre fibre, che avviene in maniera inaspettata. Questo tratto rappresenta il cedimento della struttura, che comporta un danneggiamento permanente delle fibre che compongono il tendine. Si nota un minimo comportamento plastico che però comporta molto presto un trauma tendineo.
- IV regione: avviene la completa rottura del tendine [8].

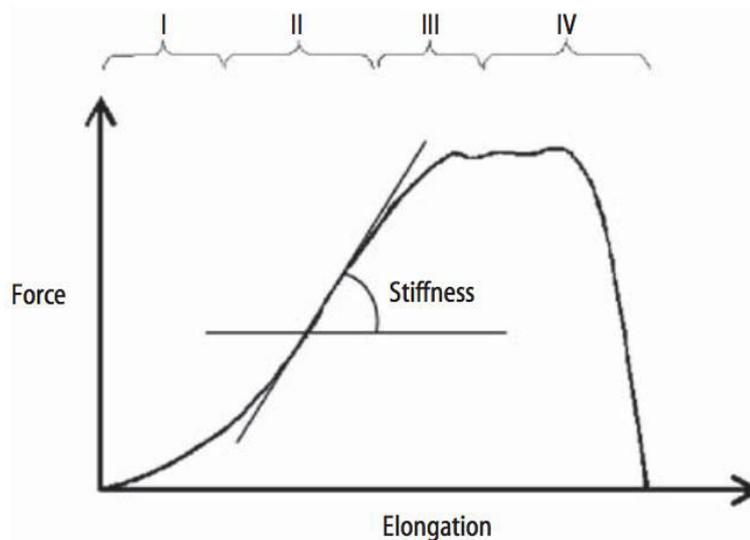


Figura 5 – Tipica curva forza-allungamento registrata durante una prova a trazione eseguita sul tendine.

Se si considerano prove a trazione effettuate a diverse velocità, si può notare un aumento del modulo elastico che caratterizza la regione lineare concorde con l'aumento della velocità di deformazione; questo avviene perché a velocità più elevate i tendini immagazzinano maggiore energia, sopportando carichi più elevati. Si verifica quindi il fenomeno di viscoelasticità, in particolare nelle forme di creep e rilassamento. Più precisamente, una prova di creep prevede un carico applicato e mantenuto costante per un lungo periodo, per testare l'andamento della deformazione, che inizialmente aumenta rapidamente e poi si assesta su un preciso valore. Nella prova di rilassamento, al contrario, si mantiene costante la deformazione per testare l'andamento del carico nel tempo, che dapprima decresce rapidamente, per poi raggiungere un valore che mantiene costante. Il comportamento meccanico del tendine per prove cicliche presenta il fenomeno del condizionamento, per cui la curva tensione-deformazione si stabilisce su un preciso andamento dopo una serie di cicli di carico e scarico. Infine, è necessario notare che le proprietà meccaniche si modificano col progredire dell'età: nel corso del tempo le dimensioni delle fibre collagene aumentano, insieme a rigidità e carico di rottura; in età più avanzata si riscontra una riduzione della rigidità e della resistenza in generale del tessuto tendineo [7].

Tabella 3 – Proprietà meccaniche del tendine.

STRUTTURA	MODULO DI YOUNG (E) [GPa]	TENSIONE DI ROTTURA (σ) [MPa]	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO (ϵ) [%]	LIMITE ELASTICO [%]
Tendine	1	50 – 120	9.5 – 17	5

2.2 TENDINE D'ACHILLE UMANO

2.2.1 Anatomia e fisiologia

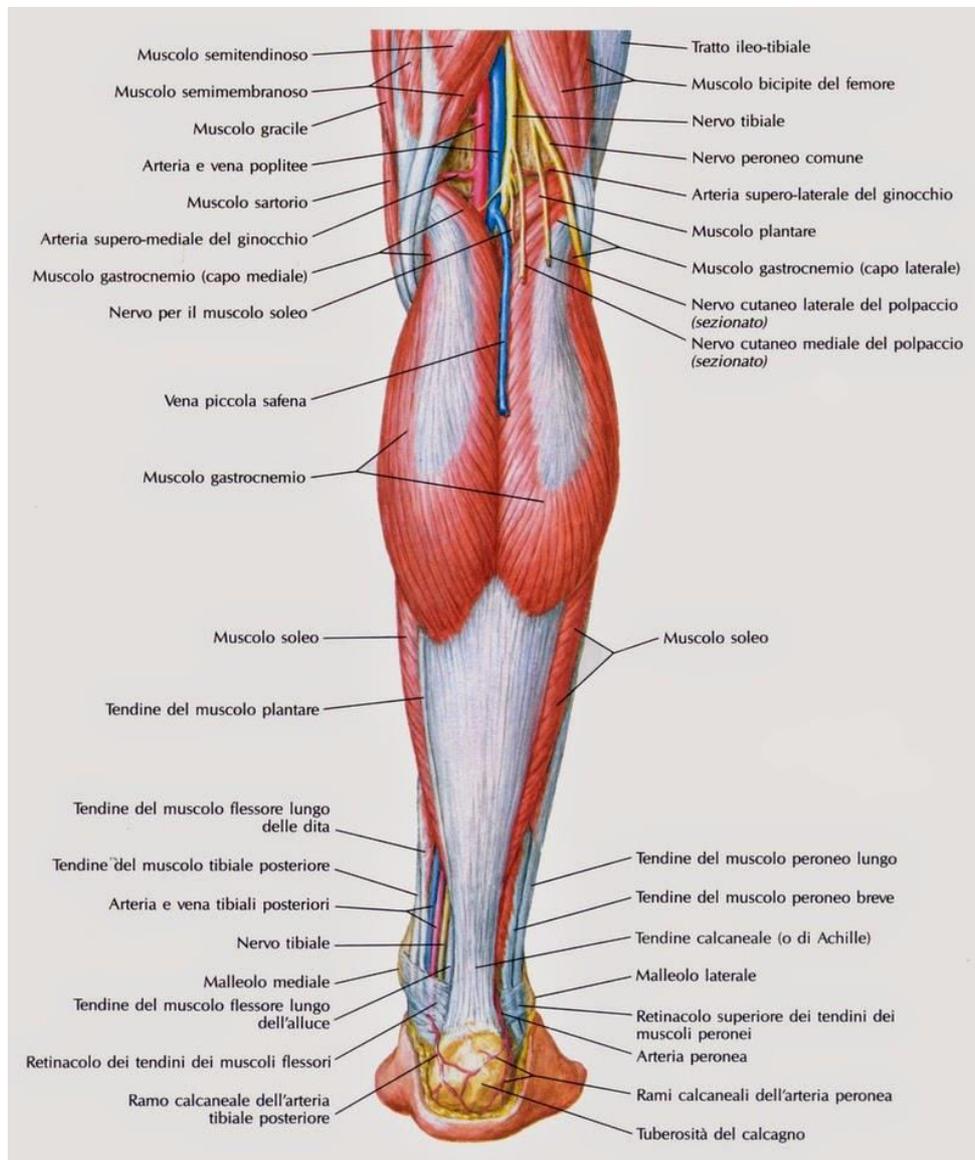


Figura 6 – Anatomia del tendine d'Achille.

Il tendine d'Achille è il più forte e spesso del corpo e ha una funzione di collegamento tra il tricipite della sura (formato dal soleo e dai due capi del gastrocnemio) ed il calcagno. E' lungo circa 15 cm ed origina approssimativamente a metà della gamba. Esso rappresenta una peculiarità dell'anatomia umana e una struttura fondamentale a livello evolutivo. La progressiva affermazione della specie umana è fortemente collegata alla sua abilità nella

corsa ed alla combinazione tra una moderata velocità ed una considerevole resistenza [8-9].

Su tale struttura sono concentrate diverse caratteristiche funzionali che lo rendono evidentemente vulnerabile:

- la postura eretta propria dell'uomo impone che i piedi assumano una posizione perpendicolare rispetto alla gamba e che il tendine di Achille si avvicini al retro del piede seguendo la direzione della gamba, generando così un elevato momento;
- i muscoli che contribuiscono alla formazione del tendine hanno funzioni e proprietà fisiologiche differenti. Il muscolo soleo permette la flessione dell'articolazione della caviglia ed è costituito da moltissime fibre collagene di tipo I, che facilitano il suo ruolo di muscolo posturale, prevenendo lo sbilanciamento in avanti del corpo in postura eretta [8-10]. Il muscolo gastrocnemio ha la funzione di flettere l'articolazione del ginocchio e conta un elevato numero di fibre di tipo IIB, adibite al vigoroso movimento impulsivo caratteristico nella corsa e nel salto;
- dal momento che il tendine di Achille è attaccato al calcagno, agisce sull'articolazione sottoastragolica, come anche su quella del ginocchio e della caviglia. Siccome l'asse dell'articolazione sottoastragolica è diretto verso l'alto e medialmente rispetto all'angolo posterolaterale del calcagno [8-11], il tricipite della sura agisce nella distensione del piede [8-12]. Quindi le concentrazioni di tensione tra la parte mediale e laterale della giunzione osteotendinea del tendine possono avere una forte variabilità;
- la rotazione dell'arto che si verifica durante lo sviluppo implica che in età adulta il tendine d'Achille si attorciglia su se stesso, per questo le fibre che provengono dal muscolo gastrocnemio sono attaccate alla regione laterale dell'inserzione calcaneare, mentre le fibre che si generano dal soleo hanno un'inserzione mediale [8-13-14]. Perciò, quando sul tendine agisce un certo carico, esso risulta sottoposto ad un'azione torcente. Dato che il gastrocnemio abbraccia l'articolazione del ginocchio ed il ginocchio flesso può effettuare una rotazione, la parte di tendine che si inserisce nel gastrocnemio può risultare attorcigliata in relazione alla parte tendinea del muscolo soleo. Questa complessa azione rotatoria viene ulteriormente complicata dalla forma dell'astragalo. Tale forma spiega il fatto che si verifica una lieve variazione nella posizione dell'asse dell'articolazione della caviglia rispetto al tendine d'Achille durante la flessione dorsoplantare; avvengono quindi leggere rotazioni passive [8-15];
- durante la corsa il tendine d'Achille trasmette dei valori di forza mediamente pari a

sette volte il peso del corpo e questo rappresenta un enorme incremento della forza che agisce in posizione statica (pari a circa la metà del peso corporeo) [8-16].

Le inserzioni mediali e laterali del gastrocnemio sorgono dai condili femorali ed il loro contributo al tendine d'Achille comincia come un'ampia aponeurosi alle estremità inferiori di tali prominenze muscolari. Può essere presente anche una terza testa del muscolo gastrocnemio, più comunemente collegata con la testa mediale e questo si verifica con un'incidenza del 2.9-5.5% sulla popolazione. Occasionalmente il muscolo plantare può formare un terzo capo; questo avviene quando il gastrocnemio si inserisce nel punto di convergenza delle teste mediale e laterale e quest'ultima a volte può essere ridotta ad una semplice corda fibrosa [8-1s]. Il soleo sorge completamente sotto al ginocchio, principalmente dalla tibia e dalla fibula, ed il tendine d'Achille in questa sede risulta più sottile e più corto [14]. Ci sono casi in cui la testa tibiale del soleo può essere assente, oppure è presente un muscolo soleo accessorio tra il tendine del soleo ed il flessore lungo dell'alluce [1s]. Il soleo accessorio può contribuire alla formazione del tendine d'Achille e si attacca in maniera indipendente sul calcagno, o si unisce con il legamento collaterale mediale dell'articolazione della caviglia. Solitamente un ampio strato di tessuto connettivo sorge sulla parte posteriore del ventre del muscolo soleo, in una posizione più prossimale rispetto alla parte iniziale dell'aponeurosi gastrocnemica. Ne consegue che, nel punto in cui il soleo ed il gastrocnemio sono in contatto tra loro (dove, cioè, entrambi i muscoli sono soggetti ad una mutua pressione), i due ventri muscolari sono separati da uno strato di tessuto connettivo denso fibroso posizionato sulla superficie dei muscoli e da una sottile copertura di tessuto connettivo lasso posta tra le due parti. Lo strato di tessuto connettivo sulla superficie posteriore del soleo è unito all'aponeurosi del gastrocnemio da una fascia in un punto variabile posto in prossimità della parte centrale del polpaccio. L'aponeurosi prosegue distalmente sulla superficie posteriore del soleo e riceve ulteriori contributi tendinei dal muscolo mentre prosegue verso la caviglia. In più, vi è un piccolo tendine intramuscolare all'interno del soleo che si unisce alla parte distale del tendine principale [8-17]. Tipicamente il completo assorbimento delle strutture tendinee del soleo e del gastrocnemio nel tendine d'Achille avviene ad una distanza di 8-10 cm dal sito di inserzione del calcagno, ma ci sono casi in cui il tendine del soleo resta separato da quello del gastrocnemio fino all'inserzione stessa [8-18]. Talvolta i due capi del gastrocnemio rimangono separati ed i rispettivi tendini che sorgono da essi si attaccano direttamente al calcagno, senza prima unirsi tra loro [16]. Tutte queste variazioni anatomiche possono contribuire a dare una falsa impressione di un tendine d'Achille patologicamente inspessito. Se visto posteriormente, un tipico ventre del

muscolo soleo è coperto prossimalmente dal gastrocnemio, ma distalmente si protende dalla parte opposta del tendine del gastrocnemio, formando un sito conveniente per un'eventuale biopsia o per l'elettromiografia [17]. Le fibre tendinee che originano dal gastrocnemio discendente convergono in modo da restringere il tendine d'Achille. Esse ruotano anche attorno al soleo, quindi risultano unite al calcagno lateralmente, mentre quelle del soleo (sempre attorcigliate) si attaccano più medialmente. Il grado di rotazione risulta variabile, quindi oltre al normale contributo laterale, il tendine gastrocnemico può, in alcuni individui, inserirsi anche posteriormente o anteriormente rispetto al sito di inserzione calcaneare [13]. Tale rotazione si accentua nella parte terminale del tendine. Dove la parte attorcigliata del tendine è marcata, risulta più semplice capire i contributi dei tendini del soleo e del gastrocnemio al tendine d'Achille nel punto in cui la rotazione risulta più sottile. La spirale formata dai fascicoli tendinei comporta un cedimento di meno fibre nei momenti in cui il tendine è sottoposto a certe tensioni: questo riduce sia la distorsione delle fibre, sia l'attrito che si crea tra le fibre stesse [8-19].

La generica forma del tendine d'Achille varia considerevolmente dalla zona prossimale a quella distale. Come accade per molti tendini presenti in altre parti del corpo, le fibre del tendine di Achille si allargano mentre si avvicinano al sito di inserzione ossea. Questo contribuisce al marcato appiattimento antero-posteriore e alla lieve concavità anteriore del tendine, evidente a livello della sua giunzione osteotendinea. Caratteristica propria del tendine di Achille è la mancanza di una vera guaina tendinea sinoviale, sostituita da uno strato di paratenon che permette lo scorrimento reciproco delle strutture adiacenti.

2.2.2 Caratteristiche meccaniche

I tendini agiscono come forze contrattili di trasmissione che permettono i movimenti dello scheletro. Nell'adempire tale compito, tuttavia, i tendini non si comportano come collegamenti rigidi tra i muscoli e le ossa, ma esibiscono un comportamento viscoelastico [8]. Il tendine d'Achille è uno dei tendini del corpo umano maggiormente soggetti a rottura, in quanto, insieme al patellare, rappresenta uno dei due tendini più sovraccaricati. Gli infortuni più frequenti al tendine calcaneare avvengono in soggetti coinvolti in uno sforzo fisico eccessivo, che normalmente conducono una vita sedentaria, oppure sono dovuti ad un improvviso incremento della durata o dell'intensità dello sforzo. Si è verificato che il tendine d'Achille umano è sottoposto a valori di tensione più elevati rispetto a qualunque altro

tendine. Mentre mediamente i tendini sopportano tensioni fino a 30 Mpa, il tendine d’Achille può arrivare anche fino a 67 Mpa [20]. Mediamente nel cammino di registrano tensioni di 59 Mpa, mentre durante la corsa di raggiungono anche picchi di 111 Mpa. Per una migliore descrizione delle proprietà meccaniche del tendine calcaneare, è stata eseguita una misura del modulo di Young, del carico a rottura, della tensione a rottura e della deformazione a rottura a due diverse velocità ($1\%s^{-1}$ e $10\%s^{-1}$), delle quali la minore rappresenta una situazione quasistatica, mentre la maggiore dà un’idea del carico fisiologico associato al tendine durante la camminata. Per ogni velocità di carico sono stati testati 9 campioni.

Tabella 4 – Media (deviazione standard) delle proprietà meccaniche del tendine di Achille [21].

PROPRIETA’ MECCANICHE	VELOCITA’ DI DEFORMAZIONE	
	$1\%s^{-1}$	$10\%s^{-1}$
MODULO ELASTICO (MPa)	816 (218)	822 (211)
CARICO DI ROTTURA (N)	4617 (1107)	5579 (1143)
TENSIONE DI ROTTURA (MPa)	71 (17)	86 (24)
DEFORMAZIONE DI ROTTURA (%) (complesso osso-tendine)	12.8 (1.7)	16.1 (3.6)
DEFORMAZIONE DI ROTTURA (%) (struttura tendinea)	7.5 (1.1)	9.9 (1.9)

Mentre il modulo elastico non ha riportato variazioni, la tensione e la deformazione a rottura presentano un incremento del 15% circa nella prova eseguita a velocità maggiore [20].

Sono stati eseguiti studi anche sul comportamento meccanico in risposta a prove cicliche e di creep. Per i test di creep si sono scelti valori di tensione costanti da 35 a 75 MPa e non si sono verificate particolari relazioni tra l’applicazione del carico e il tempo impiegato per raggiungere la rottura, ma il tempo di rottura decresce esponenzialmente se si aumenta la deformazione iniziale, ottenendo quindi una diminuzione della deformazione a rottura. Per le

prove cicliche la frequenza è stata impostata a 1 Hz ed il carico applicato varia da un minimo di 10 MPa ad un massimo di 30-80 MPa. In queste prove il tempo ed i cicli a rottura subiscono una decrescita esponenziale a fronte di un incremento della tensione applicata, oppure un incremento della deformazione iniziale, o una diminuzione della deformazione di rottura. Sia per i test di creep sia per quelli ciclici, la deformazione iniziale è il dato che fornisce una buona predizione del tempo o dei cicli impiegati per raggiungere la rottura, partendo dall'ipotesi che la deformazione è il principale parametro meccanico da cui dipende l'incremento del danno tendineo, che lo porterà alla rottura [21].

2.3 SCAFFOLD DEL TENDINE IN BIOINGEGNERIA

L'ingegneria tissutale si pone come obiettivo quello di rigenerare o sostituire tessuti e organi danneggiati o compromessi da patologie, malattie o traumi. Attualmente è stata focalizzata l'attenzione sullo sviluppo di scaffold tridimensionali, strutture adibite al sostegno dell'architettura cellulare che permettono una miglior adesione, crescita e diffusione cellulare. Per il tessuto tendineo la vera sfida è riuscire a riprodurre la struttura multiscala che lo contraddistingue e allo stesso tempo costruire uno scaffold che sia in grado di resistere a valori di carichi e tensioni che solitamente agiscono sul tendine. In particolare il tendine d'Achille è il responsabile di molti movimenti che avvengono a livello del piede e della gamba, ma che interessano tutto il corpo, richiedendo quindi un'elevata resistenza meccanica. La rottura del tendine di Achille è molto frequente, soprattutto nei soggetti che praticano sport saltuariamente, privi di un'adeguata preparazione fisica. Il trattamento attuale per questa lesione è l'intervento chirurgico di ricostruzione del tendine (tenoraffia), che viene ricucito nel punto di rottura. Uno studio condotto su una particolare tecnica di ricostruzione del tendine d'Achille [22] riporta che le suture con ampia esposizione aumentano le possibili complicanze legate alla sofferenza della cute e alle infezioni possibili; in più con queste tecniche tradizionali non si ripristina mai completamente la fisiologica lunghezza del tendine e questo comporta una riduzione dei carichi che il tendine suturato riesce a sopportare. Per tutte queste problematiche l'ingegneria tissutale ha rivolto l'attenzione alla possibilità di realizzare un tendine artificiale che vada innanzitutto a rinforzare la sutura e a ridurre l'esposizione e le possibili complicanze locali, e in secondo luogo che abbia un'adeguata resistenza meccanica alla trazione. Bisogna tenere conto che, trattandosi di uno scaffold realizzato con materiale biorisorbibile, la struttura artificiale è temporanea, perciò dopo un

certo periodo di tempo (che varia in base al materiale scelto) essa verrà completamente sostituita da tessuto naturale rigenerato.

2.3.1 Caratterizzazione e proprietà

Lo scaffold svolge un ruolo unico nella riparazione e rigenerazione dei tessuti biologici, in quanto semplici cellule isolate sono difficilmente in grado di organizzarsi spontaneamente per formare tessuti complessi, in assenza di strutture tridimensionali che fungano da guida e ne stimolino l'attività [23]. Esso viene definito come supporto solido tridimensionale poroso, progettato al fine di eseguire alcune o tutte le seguenti funzioni:

- promuovere l'interazione cellula-biomateriale, l'adesione cellulare e il deposito di matrice extracellulare;
- permettere un sufficiente trasporto di gas e nutrienti ed avere un ruolo di regolazione sui fattori fondamentali per la sopravvivenza, la proliferazione ed il differenziamento cellulare;
- controllare l'andamento nel tempo della biodegradabilità, in quanto tale velocità deve essere approssimata a quella di rigenerazione tissutale sotto le condizioni di coltura di interesse;
- provocare un minimo grado di infiammazione o di tossicità in vivo.

La sintesi del primo scaffold risale al 1974 e dal 1980 i ricercatori hanno messo a punto molte tecniche nuove per trasformare semplici polimeri in complesse strutture tridimensionali che esibissero determinate proprietà per specifiche applicazioni in ambito tissutale. Gli scaffold polimerici conferiscono resistenza meccanica, porosità, variabilità chimica superficiale ed una particolare geometria che guida la rigenerazione tissutale [23-24].

Per ottenere scaffold ottimali è necessario focalizzare i requisiti fondamentali da soddisfare:

1) Biocompatibilità: riguarda tutti gli aspetti di natura chimica e biologica che possono indurre alterazioni dannose e si riferisce alla necessità di migliorare e/o ripristinare una determinata funzione biologica, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo. In sintesi il materiale utilizzato per lo scaffold non deve determinare alcun tipo di alterazione nei tessuti con cui viene a contatto [25].

2) Porosità: questa caratteristica è fondamentale per permettere la proliferazione e la riorganizzazione cellulare. La porosità ed il grado di interconnessione dei pori influisce direttamente sulla diffusione delle sostanze nutritive e dei gas e sulla rimozione dei rifiuti

metabolici [26]. Un ulteriore parametro da considerare è la dimensione dei pori, che presenta un elevato grado di variabilità in base al tipo di tessuto che si vuole rigenerare. Per la pelle, ad esempio, la dimensione porosa richiesta è compresa tra 20 e 125 μm , mentre per il tessuto del fegato 45-150 μm [26].

3) Proprietà superficiali: un elevato rapporto superficie/volume è fondamentale per consentire la proliferazione di un elevato numero di cellule finalizzate alla rigenerazione del tessuto o dell'organo. Il tipo di correlazione tra la dimensione porosa e l'area superficiale va stabilita in base all'applicazione dello scaffold; massimizzando la superficie, la morfologia e le proprietà del materiale utilizzato saranno importanti fattori che vanno ad influenzare l'attaccamento e la migrazione cellulare [26].

4) Geometria: le caratteristiche geometriche dello scaffold sono fattori fondamentali da considerare nella fase di applicazione per la ricostruzione tissutale. Proprietà fisiche ottimali, infatti, consentono allo scaffold di sostituire opportunamente la matrice extracellulare naturale, che gioca un ruolo chiave nella struttura tissutale, fornendo supporto e resistenza alle tensioni [23]. Sono state ottimizzate tecniche per la modifica superficiale, al fine di riprodurre specifiche interazioni chimiche e biologiche: alterando la funzionalità superficiale o depositando una sottile pellicola sullo scaffold si viene a creare una superficie ottimale, con le proprietà fisiche e chimiche ricercate, ideali per la valutazione biologica che ne consegue [27].

5) Proprietà meccaniche compatibili con il tessuto da rigenerare: gli scaffold devono avere una sufficiente resistenza meccanica per mantenere gli spazi richiesti per la crescita cellulare e la produzione della matrice. Inoltre, per consentire la rapida mobilitazione della zona trattata, nel caso di rigenerazione del tessuto osseo, lo scaffold degradabile dovrebbe conservare sufficiente resistenza meccanica in modo da tollerare qualsiasi stress e carichi fisiologici imposti sulla struttura ingegnerizzata in vivo. La degradazione degli scaffold deve essere regolata opportunamente in modo che conservi un'integrità strutturale affinché il tessuto da poco sviluppatosi possa sostituire la funzione portante che aveva lo scaffold [26].

2.3.2 Acido Polilattico

L'acido polilattico è un poliesteri termoplastico, alifatico, che può essere ottenuto attraverso una reazione di policondensazione dell'acido lattico. Si tratta di un polimero biodegradabile,

prodotto da risorse rinnovabili, fattore molto importante che riduce l'impatto ambientale causato dalla produzione e dall'utilizzo di polimeri petrolchimici.

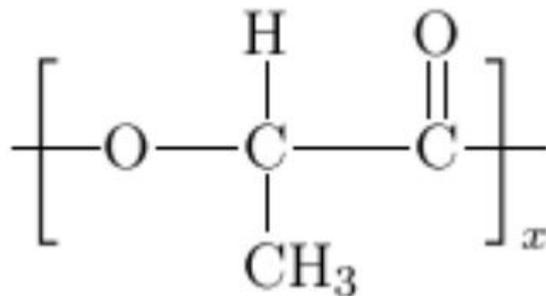


Figura 7 – Unità ripetitiva della struttura dell'acido polilattico.

Strutturalmente il monomero è il più semplice idrossiacido esistente e presenta un atomo di carbonio centrale asimmetrico (carbonio α), a cui è legato un gruppo metile. Questo tipo di conformazione determina la chiralità del carbonio α del PLA, che comporta l'esistenza di due forme enantiomeriche (L-D). Solo l'isomero otticamente attivo (L) permette la formazione del polimero attraverso la fermentazione lattica. Il PLA presenta una temperatura di transizione vetrosa compresa tra 50°C e 60°C; sotto tale temperatura il polimero ha un comportamento rigido e fragile, con un modulo elastico di circa 3 GPa, ed una scarsa capacità di deformazione plastica. La temperatura di fusione è 175°C e per essere lavorato richiede temperature operative che devono superare i 185-190°C. A queste temperature si verificano reazioni di idrolisi che favoriscono la perdita di peso molecolare e la degradazione termica, meccanismi che limitano notevolmente la finestra di processo di tale materiale. La cristallinità, se si sviluppa, aumenta leggermente il modulo di Young e contemporaneamente diminuisce la modellabilità della struttura [28]. Le proprietà fisiche dipendono da caratteristiche molecolari come grado di cristallinità, morfologia ed orientamento delle catene. Il limite superiore di temperatura di un polimero amorfo è determinato dalla temperatura di fusione, mentre per un solido semicristallino si considera la temperatura di fusione. Così, l'effettivo comportamento plastico della fase amorfa dei polimeri semicristallini potrebbe ampliare notevolmente i potenziali campi d'impiego di questo materiale. Le proprietà meccaniche, invece, possono variare da quelle di un polimero amorfo a quelle di un polimero semicristallino [28]. Sono state studiate a fondo anche le proprietà di permeabilità: il PLA risulta quasi totalmente idrofobo ed è anche impermeabile a gas quali O₂ e CO₂. Aumentando il grado di cristallinità, inoltre, si ottiene una diminuzione della permeabilità dell'ossigeno, che però non risulta lineare con la diminuzione del volume della

parte amorfa della struttura [29]. Di seguito vengono riportate le proprietà chimiche e fisiche del polimero appena descritto.

Tabella 5 – Principali proprietà chimico-fisiche del PLA.

Proprietà	Valore
Densità	1.21-1.43 g/cm ³
Temperatura di transizione vetrosa	50-80°C
Temperatura di fusione	130-180°C
Modulo elastico	350-2800 Mpa
Resistenza a trazione	10-60 Mpa
Assorbimento di acqua	0.5-5%

2.4 ELECTROSPINNING

2.4.1 Principi di funzionamento

L'elettrospinning è una tecnica che permette la produzione di fibre di dimensioni nanometriche a partire da una soluzione polimerica.

Nella più semplice delle configurazioni, un'apparato da elettrospinning è costituito da cinque elementi fondamentali:

- una siringa in vetro, che conterrà la soluzione polimerica.
- un ago metallico con diametro interno noto, al quale verrà applicato, attraverso un connettore, il campo ad alta tensione generato
- una pompa per infusione in grado di regolare il flusso di erogazione della soluzione polimerica;

- un generatore di alta tensione;
- un collettore metallico, generalmente posto a terra, che rappresenta l'elemento di raccolta delle nanofibre prodotte (la forma più semplice per questo elemento è una lastra metallica piana; talvolta si usa un rullo metallico che, posto in rotazione ad alta velocità, permette una raccolta di fibre allineate).

Il principio di funzionamento di questa tecnologia consiste nell'applicazione di una differenza di potenziale alla soluzione polimerica; questa, interagendo con il campo elettrostatico, si carica. Le macromolecole polimeriche, una volta raggiunto un livello di carica tale da rompere la tensione superficiale della goccia che arriva all'apice dell'ago metallico, si organizzano deformando tale goccia e costituendo un filamento elettricamente carico. Come detto, esso si sviluppa da una geometria conica (il cono di Taylor) e, attraversando il campo elettrico imposto, riceve un'accelerazione; inoltre si assottiglia fino a raggiungere le dimensioni nanometriche. Nel tempo di volo si ha anche l'evaporazione del solvente [30].

La semplicità operativa della strumentazione per l'elettrofilatura si scontra con la complessa messa a punto delle variabili sperimentali: tale processo, infatti, è influenzato da numerosi parametri strettamente correlati tra loro.

La morfologia delle nanofibre dipende quindi dai parametri di sistema e dai parametri di processo. I primi comprendono: la viscosità, che incide sull'estensione del getto nonché sul diametro delle fibre, la tensione superficiale, che contribuisce alla formazione di "beads" (grumi che rappresentano difetti indesiderati) sulla fibra e la conducibilità, il parametro più importante in quanto l'electrospinning permette lo stiramento del fluido polimerico proprio grazie alla mutua repulsione delle cariche sulla superficie. I parametri di processo, invece, comprendono il potenziale elettrico, valore che fornisce alla soluzione le cariche necessarie affinché la forza elettrostatica superi la tensione superficiale (quando si raggiunge questa soglia il processo di elettrofilatura ha inizio), la distanza ago-collettore che, se incrementata, comporta una produzione di nanofibre con diametri minori in quanto se la distanza è maggiore il getto di soluzione ha più tempo per stirare; la temperatura e l'umidità a cui avviene il processo e il diametro dell'ago [3s].

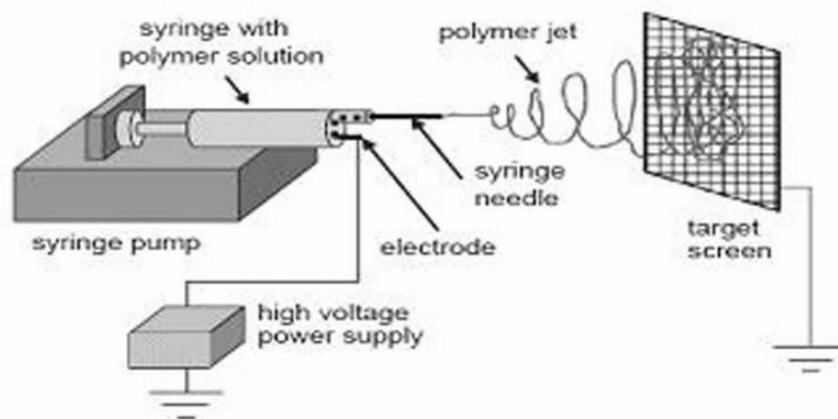


Figura 8 – Setup del processo di electrospinning su collettore piano.

2.4.2 Scaffold elettrofilati

I due processi che simultaneamente governano la formazione delle nanofibre ed influenzano la struttura finale dello scaffold prodotto sono: l'evaporazione del solvente e l'estremo allungamento delle fibre in fase di solidificazione.

Una porzione di soluzione (goccia) che fuoriesce dall'ago passa dall'apice dello stesso al collettore, dove si depositano le fibre solide, in un brevissimo intervallo di tempo pari a circa 0.1 secondi [31]. Le dimensioni delle fibre di questi scaffold sono nell'ordine delle centinaia di nanometri e la struttura complessiva è controllabile e modulabile per riprodurre il tessuto da ricostruire. Caratteristica fondamentale di queste strutture nanometriche fibrose è la porosità superficiale: i pori interconnessi di varie dimensioni sono principalmente dovuti alla tessitura random dell'elettrofilatura, causata dal caotico percorso del getto conferito alla soluzione (wipping). L'elevata porosità determina una buona permeabilità, parametro fondamentale per il controllo della diffusione cellulare nello scaffold. Le buone proprietà meccaniche e l'elevata flessibilità degli scaffold elettrofilati consentono una grande versatilità in termini di applicazioni di ingegneria tissutale. Oltre alla produzione di tappetini random, è stata messa a punto una particolare tecnologia che permette la realizzazione di nanofibre morfologicamente allineate, che riproducono fedelmente molti tessuti naturali, come i tessuti tendinei e legamentosi.

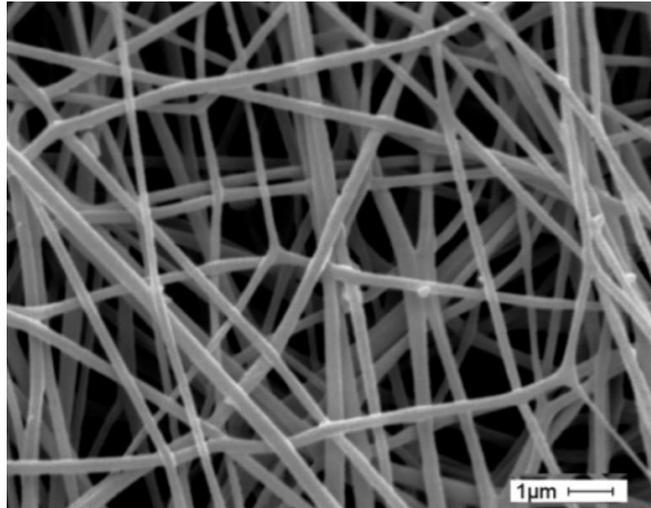


Figura 9 – Immagine SEM di fibre porose elettrofilate [7].

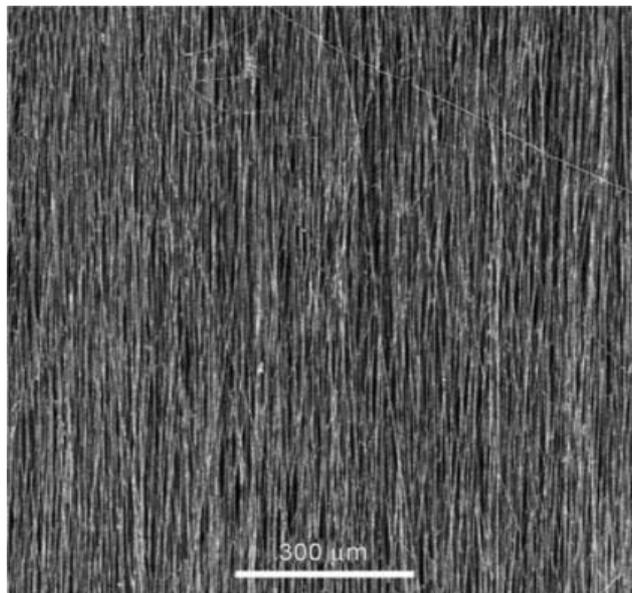


Figura 10 – Immagine SEM di fibre elettrofilate allineate [31].

Il valore aggiunto dell'allineamento delle fibre si esplica considerando le proprietà tensili, che aumentano notevolmente lungo la direzione delle fibre, piuttosto che nella direzione perpendicolare [32]. Per il controllo dell'allineamento delle fibre sono stati progettati diversi collettori: quello utilizzato in questo studio è un rullo. Un altro fattore da cui dipende l'allineamento è la velocità a cui viene fatto ruotare il collettore: maggiore è la velocità, migliore risulterà l'allineamento delle nanofibre, fino al raggiungimento di un valore ottimale.

3 SCOPO DELLA TESI

Questa tesi ha come scopo esplicativo l'ottimizzazione di una nuova tecnologia per produrre scaffold multiscala elettrofilati che riproducano fedelmente la morfologia e le proprietà meccaniche di un tendine completo. Per questo progetto è stato considerato come riferimento il tendine di Achille, il più spesso e robusto del corpo umano.

Per la realizzazione del costrutto multiscala è stato utilizzato l'acido poli-(L)-lattico (PLLA), un polimero sintetico biorassorbibile in tempi piuttosto lunghi, idrolizzabile in ambiente acquoso ed estremamente duttile, caratteristica che risulta funzionale per avere un certo margine di sicurezza nei momenti di applicazione di carichi. Partendo quindi da una tecnica di elettrofilatura di bundles ottimizzata in studi precedenti [7-34-35], è stata messa a punto una procedura di allineamento dei bundles per creare lo scaffold tendineo completo; successivamente è stata realizzata la camicia di fibre di PLLA randomiche, sfruttando ancora la tecnica dell'elettrofilatura, per compattare il più possibile i bundles che costituiscono lo scaffold. In secondo luogo è stata eseguita una caratterizzazione meccanica sia dei singoli bundles, sia dello scaffold completo.

4 PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI

Per la preparazione dei bundles elettrofilati e della camicia esterna dello scaffold multiscala è stato utilizzato il materiale polimerico: Acido Poli-L-lattico, PLLA (Lacea H.100-E, $M_w = 8.4 \times 10^4$ g/mol, PDI = 1.7) fornito da Mitsui Fine Chemicals (Dusseldorf, Germany).

I solventi utilizzati per la preparazione della soluzione sono:

- Diclorometano (DCM), formula lineare: CH_2Cl_2 ;
- Dimetilformamide (DMF), formula lineare: $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$;
- Cloroformio (CLF);
- Acetone;
- Etanolo (EtOH)
- Acrylic cement Restray®, Salmoiraghi Produzione Dentaria s.r.l., Mulazzano (MI);
- 0.9% NaCl solution, S.A.L.F. S.p.A. Laboratorio Farmacologico, Cenate Sotto (BG).

La soluzione utilizzata per la filatura del PLLA è:

- 13% (w/v) PLLA in DCM/DMF 65/35.

La stessa soluzione è stata utilizzata sia per la filatura dei bundles, sia per la filatura della camicia sullo scaffold multiscala completo. La concentrazione di PLLA è espressa in percentuale peso/volume (w/v), il contenuto dei solventi in soluzione come rapporto volume/volume (v/v).

Per le prove a trazione effettuate sui singoli bundles 3D di PLLA e sugli scaffold completi è stata utilizzata la soluzione salina (NaCl 0.9%), in cui sono stati immersi i campioni di bundles per due minuti prima della prova.

Per la realizzazione degli afferraggi da applicare allo scaffold multiscala per effettuare le prove meccaniche a trazione è stato utilizzato il cemento acrilico.

4.2 METODI

4.2.1 Produzione dei bundles elettrofilati

Per la produzione dei bundles è stato utilizzato il seguente apparato per elettrofilatura, composta da [33]:

- Macchina da elettrofilatura progettata dall'Università di Bologna;
- Pompa a siringa (KDSscientific 200 series);
- 2 siringhe di vetro da 5 ml contenenti la soluzione polimerica;
- 2 aghi aventi diametro interno $d_{in} = 0.84$ mm in acciaio inossidabile (Hamilton);
- Collettore in alluminio a rullo (diametro 150 mm) posto a terra.



Figura 11 – Apparato per elettrofilatura.

Il collettore viene posto in rotazione ad alta velocità, al fine di allineare le nanofibre polimeriche prodotte durante il processo trasversalmente rispetto all'asse del rullo.

Le condizioni di filatura della soluzione 13% (w/v) PLLA in DCM/DMF 65/35 sono:

- Distanza ago-collettore = 200 mm;
- Diametro interno ago = 0.84 mm;

- Flusso della soluzione = 1.2 ml/h;
- Voltaggio = 18 kVolt;
- Velocità del collettore = 2900 giri/min
- Temperatura ed umidità ambientali.

Prima di avviare il processo di elettrofilatura si ricopre il rullo con un foglio di carta che permette una facile raccolta ed un prelievo delle fibre prodotte.

Il tempo di filatura della soluzione di PLLA è settato a un'ora; al termine del processo il collettore risulta ricoperto da uno spessore di nanofibre allineate di circa 5 μm (lo spessore è variabile, massimo al centro e minimo agli estremi). Da questo tappetino sono stati ricavati manualmente i bundles, tagliando con il cutter un tratto di 40 mm di larghezza e avvolgendoli trasversalmente alla lunghezza del collettore. I bundles ottenuti sono poi stati catalogati e posizionati in fogli di carta.

Da un singolo processo di elettrofilatura si ricavano 9 bundles, di cui i due ricavati dai tratti più esterni risultano visibilmente più sottili. Per la fase successiva di assemblaggio del tendine, quindi, si è deciso di escluderli, al fine di mantenere diametri dei bundles entro il range stabilito.

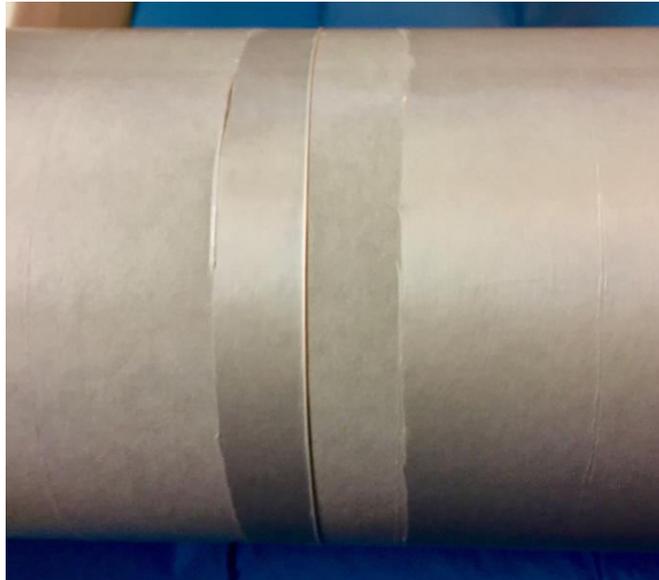


Figura 12 – Fase di avvolgimento del bundle.

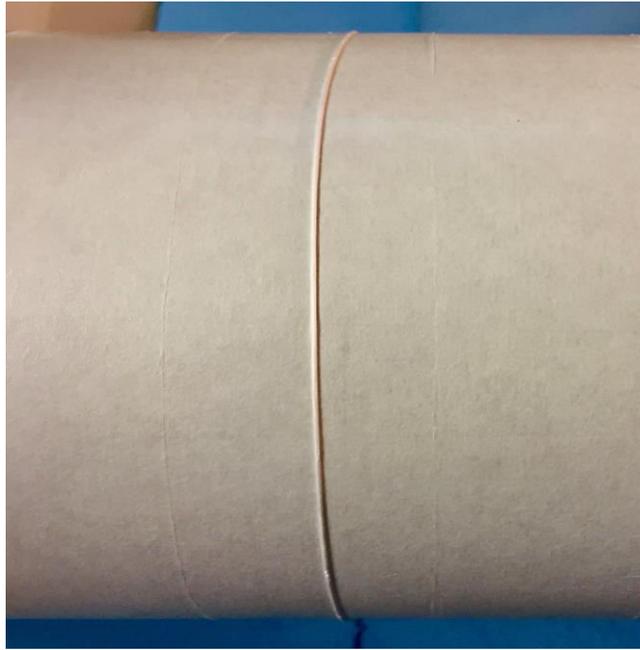


Figura 13 – Bundle su rullo.

4.2.2 Assemblaggio scaffold tendine completo

I bundles ottenuti dalla filatura hanno una lunghezza di circa 470 mm. Con l'aiuto di un bisturi sono stati tagliati tratti di 100 mm. Una volta ottenuti 100 bundles di tale lunghezza, si è avviata la procedura di assemblaggio del tendine completo, al fine di raggiungere un diametro finale del costruito multiscala compreso tra 5-6.50 mm.

I bundles così ottenuti sono stati poi allineati secondo una procedura che permette di raggiungere un'elevato livello di allineamento tra di loro. Una volta ottenuto il fascio dei bundles allineati, sono state fissate le estremità con tape e nastro-carta in modo da procedere con la successiva fase di elettrofilatura della camicia esterna.

4.2.3 Elettrofilatura della camicia

L'apparato utilizzato è costituito dai seguenti componenti [34]:

- alimentatore ad alta tensione (Spellman, SL 50 P 10/CE/230)
- pompa a siringa (KDScientific 200 series);
- collettore a piastra di alluminio messa a terra (60x200 mm);
- elettrodo positivo collegato all'ago della siringa;

- dispositivo per la rotazione continua dello scaffold progettato dall'Università di Bologna .

Le condizioni di filatura della soluzione 13% (w/v) PLLA in DCM/DMF 65/35 sono:

- distanza ago-piastra = 200 mm;
- distanza scaffold-piastra = 5 mm;
- diametro interno ago = 0.84 mm;
- flusso della soluzione = 1.2 ml/h;
- voltaggio = 18 kVolt;
- velocità rotazione funnel = 15 giri/min;
- periodo di rotazione = 4 min;
- periodo di stop = 2 min;
- altezza ago = 220 mm;
- temperatura e umidità ambientali.

Il tendine viene posizionato verticalmente sul supporto rotante, fissandolo con altre due strisce di nastro carta. La piastra target è stata ricoperta posteriormente con teflon, poi avvicinata allo scaffold multiscala. Una volta avviato il processo, il tendine assemblato inizierà ad essere rivestito da uno strato di fibre random elettrofilate, a simulare l'epitenon del tendine naturale. Come tempo di filatura è stato stabilito 3 ore.

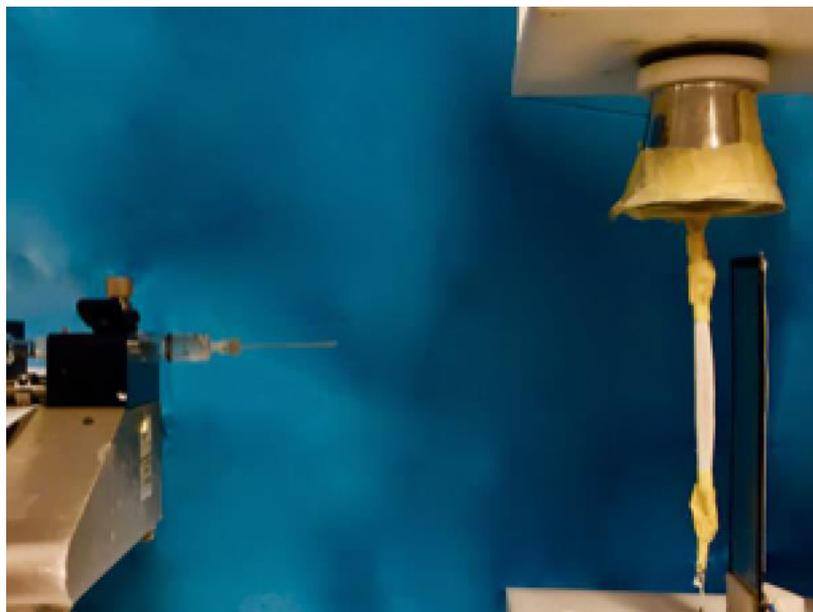


Figura 14 – Apparato per elettrofilatura della camicia.

4.2.4 Elaborazione dati

Per la preparazione dei campioni singoli di PLLA, sono stati presi dei bundles ottenuti dal processo di elettrofilatura e con un bisturi sono stati ricavati dai provini di lunghezza pari a 100 mm. Sono stati testati in totale 10 provini.

Per lo scaffold multiscala, invece, sono stati uniti 100 bundles di lunghezza pari a 100 mm, con il processo di electrospinning è stata realizzata la camicia ed infine sono stati aggiunti gli afferraggi in cemento. I campioni testati sono stati 5.

L'elaborazione dei dati è stata eseguita servendosi di un prefiltraggio dei dati (in quanto, utilizzando una cella di carico da 1 kN, gli esigui valori di forza registrati dai singoli bundles, sono risultati eccessivamente sporcati da rumore) attraverso un filtro mediano a 81 campioni programmato su MatLab ed il grafico stress-strain è stato riportato in Excel.

Il condizionamento dati avviene sul grafico stress-strain:

- Si escludono valori di forza al di sotto del 5% della forza massima registrata;
- Si effettua una prima valutazione soggettiva della tensione di snervamento;
- Si calcola il 50% del tratto compreso tra il 20% del massimo valore di tensione ed il punto di snervamento di prima approssimazione, e vi si traccia una regressione lineare;
- Si trasla questa retta verso destra dell'1%; l'intersezione con il grafico rappresenta il limite elastico della curva;
- Un'ulteriore regressione compresa tra il 20% della tensione massima ed il limite elastico permette di calcolare il modulo di Young del campione analizzato, come coefficiente angolare della regressione;

Si calcola il lavoro fino allo snervamento e la tenacità sfruttando il metodo dei trapezi (partendo dal 5% della tensione massima).

4.3 METODI DI CARATTERIZZAZIONE

4.3.1 Microscopia ottica

Questa tecnologia è stata utilizzata per effettuare le misure dei diametri dei singoli bundles e degli scaffold completi. Lo strumento usato è un microscopio ottico in luce polarizzata Axioskop Zeiss con una fotocamera (AxioCam Mrc Zeiss) collegata ad un calcolatore. Tale

microscopio è dotato di un ingrandimento dell'oculare x10 e tre lenti dell'obiettivo con diversi ingrandimenti (x5, x20, x32). L'elaborazione dei dati dell'immagine viene effettuata attraverso un software apposito (Axio Vision).



Figura 15 – Axioscop Zeiss [2s].

4.3.2. Microscopio elettronico a scansione

Questo strumento serve per effettuare un'analisi morfologica dei bundles. Inizialmente i campioni vengono immersi in azoto liquido per 20 minuti insieme alle forbici, in modo che al momento del taglio trasversale la sezione rimanga circolare. Il bundle tagliato viene fissato sullo stub con del nastro biadesivo, poi il tutto viene rivestito in oro per rendere la superficie conduttiva. Con l'aiuto di un supporto, la sezione trasversale tagliata viene posizionata perpendicolarmente alla superficie del porta campione. E' stato utilizzato un microscopio Philips 515 ad una tensione di accelerazione di 15 kV. L'elaborazione delle immagini è stata effettuata con il software EDAX Genesis.



Figura 16 – Microscopio elettronico a scansione.

4.3.3 Prove meccaniche a trazione

Sono state eseguite prove a trazione su 10 bundles di PLLA singoli e 5 scaffold multiscala completi, ciascuno formato da 100 bundles. E' stata utilizzata una macchina di prova Instron su cui è stata montata una cella di carico da 1 kN.

Le condizioni di prova dei bundles singoli sono:

- tratto utile = 16 mm;
- velocità deformazione = 1/s;
- frequenza di acquisizione = 1000 Hz;
- rampa di carico fino a rottura provino;
- temperatura ed umidità ambientali.

Prima di montare i provini su appositi afferraggi, detti capstan grips, si immergono per 2 minuti in soluzione salina, per meglio riprodurre le condizioni fisiologiche. La dimensione dei diametri dei bundles non permette di utilizzare i tradizionali morsetti con configurazione a pinza per il fissaggio dei campioni agli afferraggi della macchina; in questo modo, infatti, si verificherebbe un'inevitabile concentrazione di tensioni sulle estremità, tanto maggiore quanto minore è il tratto utile. Si è scelto quindi di mettere a punto un sistema di afferraggio ad hoc che limita la concentrazione delle tensioni, realizzato in acciaio inossidabile, basandosi su normative per prove eseguite su funi. Si tratta di due blocchetti rettangolari (uniti da un'apposita traversa tramite un sistema di bulloni, rimossa prima dell'inizio della prova) su cui sono stati montati dei perni con dei fori passanti in cui vengono inserite le due

entrambe le estremità del bundle; dopo aver arrotolato il bundle su entrambi i perni, si aggiungono delle guarnizioni in gomma per bloccare il campione.

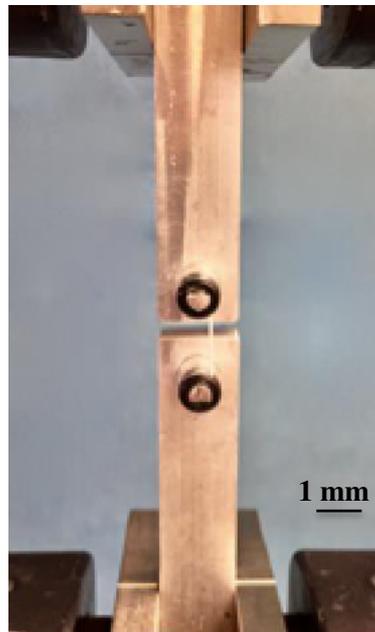


Figura 17 – Fissaggio campione per prove a trazione su bundles singoli.

Per le prove sugli scaffold completi sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- tratto utile = 53 mm (circa);
- velocità trasversale = 1/s;
- frequenza di acquisizione = 1000 Hz;
- rampa di carico fino a rottura provino;
- temperatura ed umidità ambientali.

Gli afferraggi per le estremità del costrutto artificiale completo sono stati realizzati in cemento chirurgico. Servendosi di uno stampo in delrin su cui è stata riprodotta una conicità di 30°, per ridurre le concentrazioni di tensione in prossimità delle estremità dei campioni, si posiziona la prima estremità e si esegue una colata di cemento chirurgico (metacrilato di metilene). Dopo circa 40 minuti il cemento chirurgico è completamente solidificato, perciò si stacca lo stampo in delrin dal provino e si può procedere allo stesso modo con la seconda estremità.

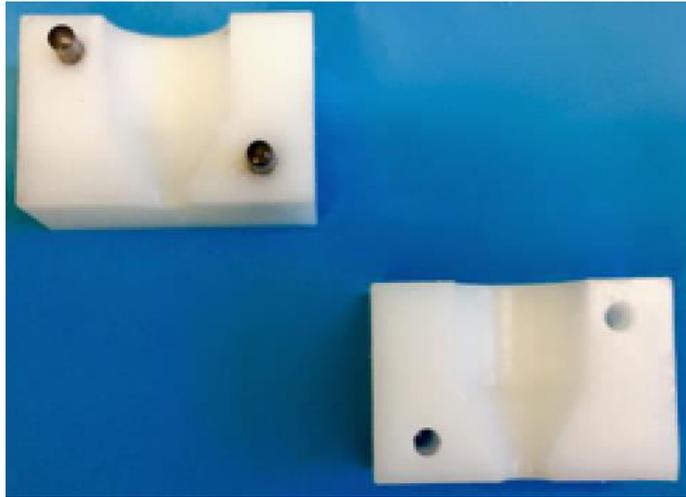


Figura 18 – Stampo in delrin.



Figura 19 – Fase di cementazione delle estremità del campione.

Infine sono stati realizzati degli appositi afferraggi in acciaio inossidabile per posizionare il campione sulla macchina di prova.



Figura 20 – Fissaggio campione per prove a trazione su scaffold completo.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 OTTIMIZZAZIONE DELLA MORFOLOGIA DEI BUNDLES

Il processo di elettrofilatura dei bundles è stato già ottimizzato in studi precedenti [7-35]: la soluzione di acido poli-(L)-lattico viene fatta filare per un'ora, con una velocità di infusione pari a 1.2 ml/h. Per modellare la sezione dei bundles, ci siamo basati sui diametri dei fascicoli di collagene di tendine d'Achille umano, con valori medi di circa 700 μm , ottenuti da P. Hansen et al. [37]. A tal proposito sono stati fatti degli studi sulle dimensioni del tappetino bidimensionale, in modo che, dopo averlo avvolto manualmente, si ottenga un bundle con il diametro richiesto. E' stata messa a punto la seguente equazione:

$$L \cdot s = \pi \cdot r^2 \qquad \text{Equazione 1}$$

Essa lega l'area del rettangolo che ha come altezza lo spessore del tappetino (s) e come base la lunghezza del tratto considerato per produrre i bundles (L), e l'area del cerchio, di raggio (r), che approssima l'area della sezione del bundle (che in realtà sarebbe una spira con luce nulla tra gli avvolgimenti). Anche se si tratta di un modello semplificato, questa relazione risulta utile per calcolare approssimativamente la larghezza del tappetino che permette di ricavare un bundle con il diametro richiesto. $L \cdot s = \pi R^2$.

Partendo quindi dal dato del raggio, con lo spessimetro è stato misurato lo spessore del tappetino ottenuto dopo un'ora di elettrofilatura, che è risultato mediamente di 750-800 μm . A questo punto è stata ricavata la larghezza del tappetino da arrotolare, pari a circa 450-480 mm. Questo dato serve per stabilire il punto preciso in cui andare a tagliare lo scaffold, in modo da ottenere un certo numero di bundles dal diametro richiesto.

Per avere una caratterizzazione morfologica dello scaffold bidimensionale e delle sezioni trasversali dei bundles ottenuti con l'elettrofilatura, è stata fatta un'analisi al SEM, che ha mostrato una buona morfologia delle nanofibre senza la presenza di imperfezioni (beads) e con una misura dei diametri pari a $529 \pm 0.14 \mu\text{m}$.

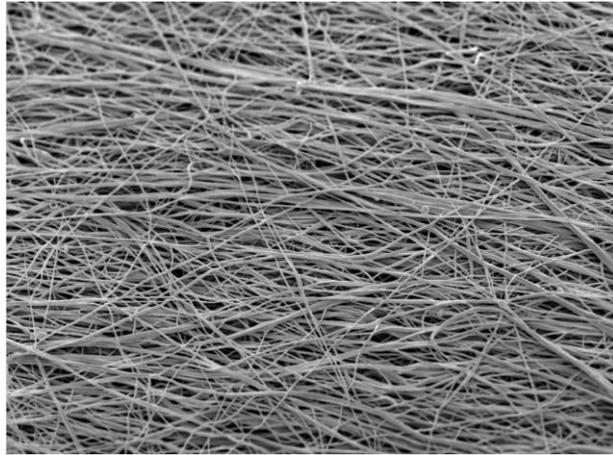


Figura 22 – Immagini SEM delle fibre allineate nei bundles.

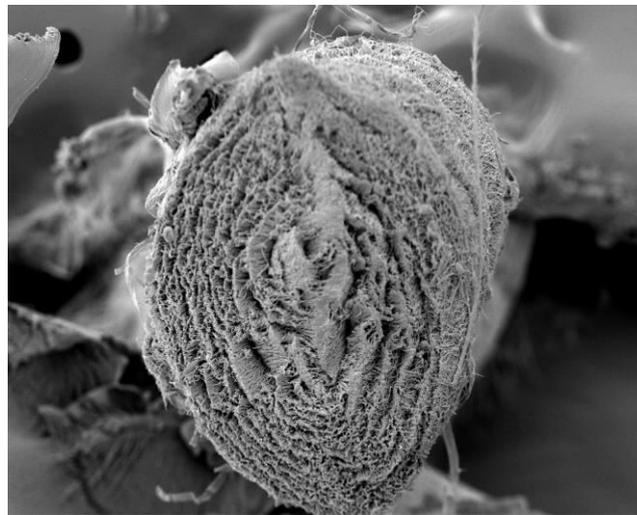


Figura 23 – Immagine SEM della sezione tagliata del bundle di PLLA.

5.2 OTTIMIZZAZIONE DELLA FILATURA DELLA CAMICIA

La tecnica di assemblaggio dei bundles per produrre uno scaffold che simuli la struttura multiscala tendinea è stata messa a punto in studi precedenti [7], considerando però 5 bundles di PLLA lunghi 150 mm. In questa tesi è stato portato avanti il progetto, unendo 100 bundles di lunghezza pari a 100 mm ciascuno. E' stato ottimizzato il procedimento di allineamento e di unione dei bundles per ottenere lo scaffold, come descritto nella parte sperimentale. A questo punto si è avviato il processo di elettrofilatura della camicia, posizionando lo scaffold in un dispositivo progettato per permettere la sua rotazione continua. La soluzione utilizzata

per la filatura è sempre composta da PLLA miscelato a DCM e DMF e la velocità di infusione è stata impostata a 1.2 ml/h.



Figura 24 – Risultato dello scaffold dopo elettrofilatura della camicia.

Dopo 3 ore di filatura si è osservato che la struttura dei bundles è stata ben compattata dalla camicia, che a sua volta risulta avere fibre omogenee ed essere adeguatamente porosa, simulando fedelmente l'epitenon del tendine.

Terminata la filatura della camicia, sono stati analizzati i diametri della sezione trasversale degli scaffold. La media dei valori ottenuti e la relativa deviazione standard sono riportate nella seguente tabella, in cui è stata inserita anche la media della misura dei singoli bundles.

Tabella 6 – Diametri dei singoli bundles e degli scaffold completi.

CAMPIONE	DIAMETRO (mm)
BUNDLE	0.59 ± 0.1
COSTRUTTO MULTISCALE	6.48 ± 0.8

5.3 PROPRIETA' MECCANICHE SINGOLI BUNDLES E SCAFFOLD MULTISCALE

I dati registrati durante le prove a trazione sono stati elaborati seguendo il procedimento precedentemente descritto.

Dalle prove meccaniche sui bundles singoli e sugli scaffolds multiscale sono risultati i seguenti andamenti medi delle curve carico-spostamento e tensione-deformazione.

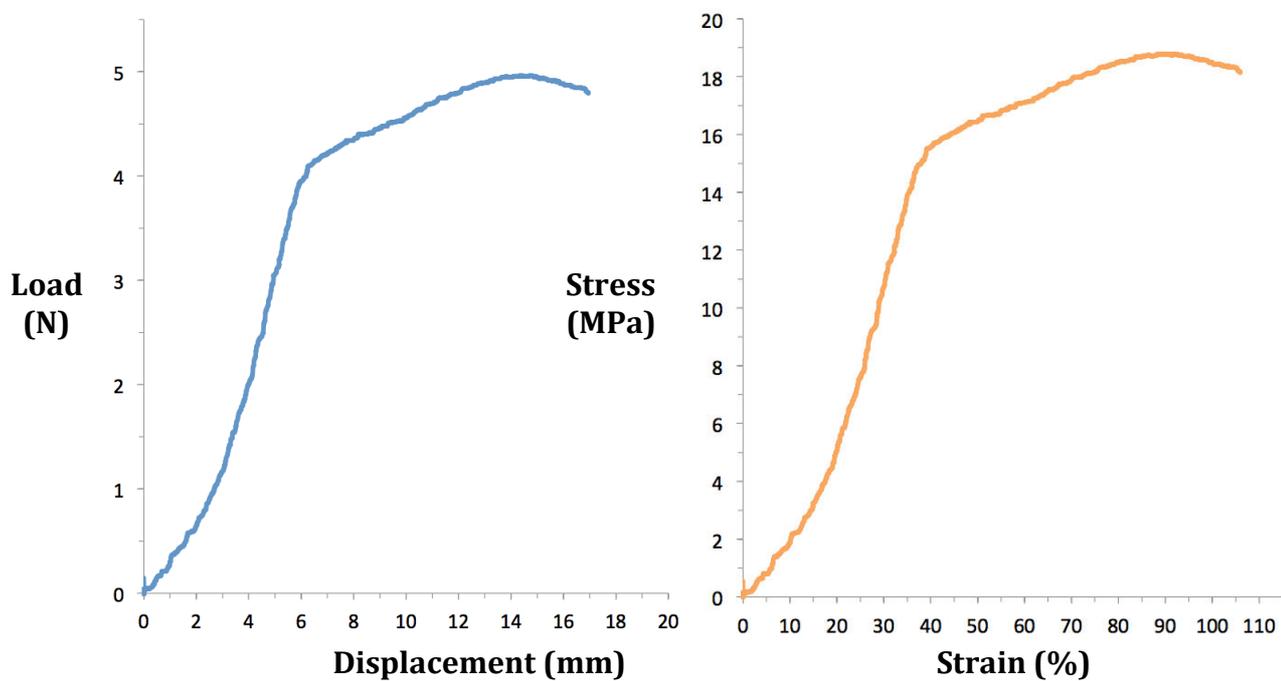


Figura 25 – Grafici carico-spostamento e tensione-deformazione dei singoli bundles.

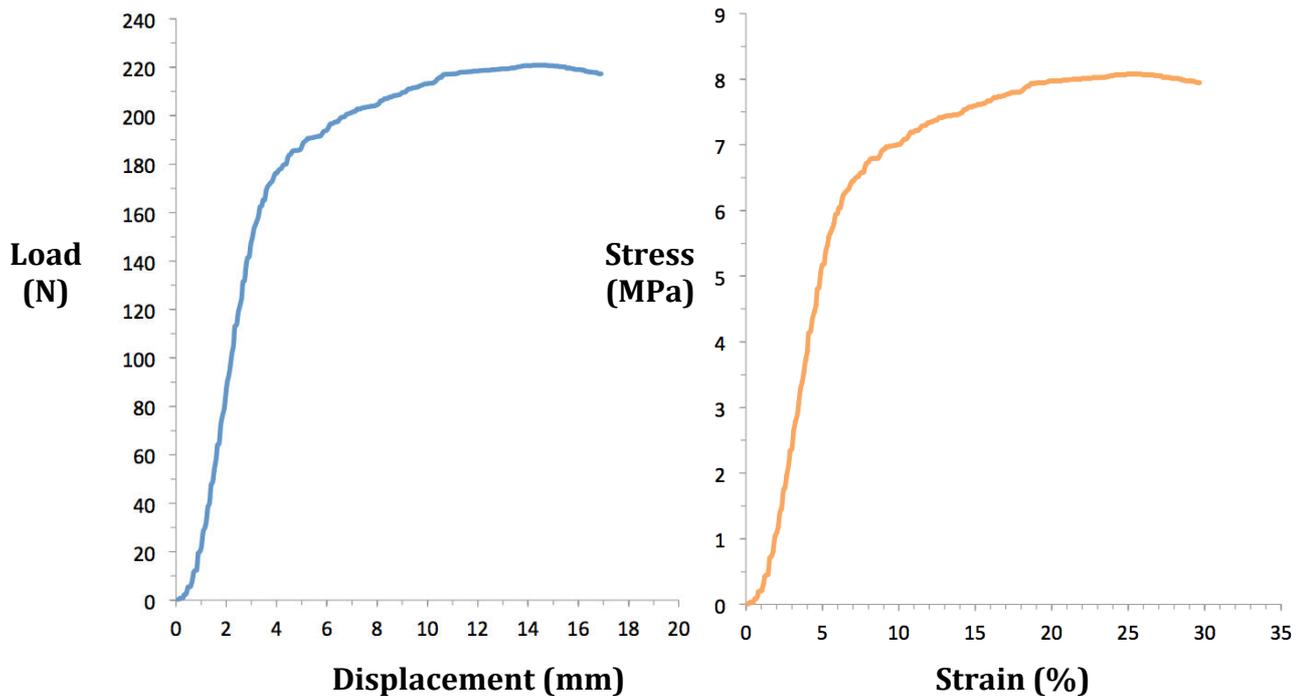


Figura 26 – Grafici carico-spostamento e tensione-deformazione degli scaffold completi.

Osservando tali curve si può notare che:

- sia i singoli bundles, sia gli scaffold completi presentano un andamento non lineare del piede della curva tipico dei fascicoli di collagene e dei tendini umani;
- sia i singoli bundles, sia gli scaffold completi presentano un elevato comportamento duttile, visibile dall'esteso tratto plastico;
- i valori del carico a rottura raggiunti dagli scaffold sono molto maggiori rispetto a quelli dei singoli bundles;
- le tensioni di rottura dei bundles sono maggiori delle tensioni di rottura degli scaffold;
- la rigidità dello scaffold completo supera ampiamente quella dei singoli bundles;
- lo scaffold completo presenta valori di deformazione a rottura molto minori rispetto ai singoli bundles

Di seguito si riportano i dati elaborati dalle prove meccaniche; per ciascun valore è stata calcolata la media e la deviazione standard. Per i bundles di PLLA sono stati testati 10 campioni, per gli scaffold sono stati considerati 5 provini.

Tabella 7 – Carichi, tensioni e deformazioni di rottura dei bundles e degli scaffold.

CAMPIONE	CARICO DI ROTTURA [N]	TENSIONE DI ROTTURA [MPa]	DEFORMAZIONE DI ROTTURA [%]
BUNDLE	4.88 ± 0.35	18.5 ± 3.3	90.7 ± 5.0
COSTRUTTO MULTISCALA	248 ± 56	7.59 ± 1.4	21.9 ± 5.4

Tabella 8 – Tensioni, deformazioni e moduli elastici di snervamento dei bundles e degli scaffold.

CAMPIONI	TENSIONE DI SNERVAMENTO [MPa]	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO [%]	MODULO ELASTICO [MPa]
BUNDLE	15.5 ± 2.7	40.7 ± 3.7	53.9 ± 13
COSTRUTTO MULTISCALA	6.09 ± 0.85	8.10 ± 2.4	111 ± 19

Tabella 9 – Tenacità dei bundles e degli scaffold.

CAMPIONI	LAVORO A SNERVAMENTO [MPa]	LAVORO A ROTTURA [MPa]
BUNDLE	283 ± 62	1154 ± 261
COSTRUTTO MULTISCALA	19.5 ± 2.5	124 ± 64

E' necessario considerare che, durante le prove, i provini di bundles singoli hanno raggiunto la rottura nel tratto utile, ciò comporta una stima accurata dei valori di carichi e tensioni a rottura. Gli scaffold multiscala invece hanno raggiunto la rottura all'interfaccia tra afferraggi e tratto utile a causa della concentrazione di tensioni in quella zona del provino, comportando una sottostima degli effettivi carichi e tensioni di rottura.

Alla luce di queste considerazioni i valori ottenuti risultano estremamente soddisfacenti: i bundles presentano una tensione a rottura di poco inferiore a quella riportata in letteratura per i fascicoli di collagene, mentre per gli scaffold è stato riscontrato un notevole incremento del modulo elastico rispetto ai bundles singoli, pur non riuscendo a raggiungere, come atteso, i valori di riferimento del tendine di Achille. Il carico medio a rottura degli scaffold multiscala risulta 248 N mentre per i singoli bundles si raggiungono valori di 4.88 N, ovvero poco più della metà del valore che ci si aspetterebbe se fosse rispettata la sovrapposizione degli effetti sui valori di carico dei singoli bundles.

Tenendo conto della concentrazione delle tensioni riscontrata sugli afferraggi degli scaffold multiscala, si può dedurre chiaramente che gli effettivi valori a rottura siano stati sottostimati. Ciò comporta che migliorando il sistema di afferraggio, tali valori potrebbero incrementare, avvicinandosi a quelli attesi dalla sovrapposizione degli effetti. Anche le tensioni a rottura degli scaffold multiscala dunque, sono stati viziati dalla sottostima dell'effettivo carico a rottura. Da notare inoltre che il PLLA puro è stato un polimero funzionale solamente all'ottimizzazione della struttura multiscala dello scaffold: infatti essendo a basso costo, ben si presta ad operazioni di ottimizzazione morfologica e a riflessioni di massima sulle stime degli andamenti delle proprietà meccaniche a diversi gradi di assemblaggio (saranno utilizzati altre tipologie di polimeri e miscele per incrementare le proprietà meccaniche dello scaffold). Da notare infine che il comportamento duttile della struttura multiscala riprodotta (bundles e scaffold) è auspicabile per prevedere un fattore di sicurezza rispetto al fallimento immediato della struttura qualora il soggetto che la ospita superi inavvertitamente i carichi a snervamento della stessa.

6 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato progettato e realizzato uno scaffold multiscala che simulasse la complessa struttura gerarchica del tendine di Achille. L'obiettivo principale era riuscire a riprodurre la complessa struttura gerarchica del tendine, risultato che è stato ampiamente raggiunto. L'acido poli-(L)-lattico si è rivelato un materiale molto utile per queste prime prove di assemblaggio di un vero e proprio scaffold multiscala, in quanto poco costoso e quindi utilizzabile per prove di ottimizzazione del processo. Il passo successivo sarà realizzare una camicia con una soluzione che contenga anche collagene, per garantire una miglior compatibilità fisiologica e cellulare.

Servendosi della tecnica di elettrofilatura, da una soluzione di acido poli-(L)-lattico sono stati prodotti i bundles che mimano i fascicoli di collagene della struttura tendinea e, successivamente, sempre tramite questa tecnica, attorno ad uno scaffold formato da 100 bundles è stata realizzata la camicia, che rappresenterebbe l'epitenon del tendine.

I parametri di filatura dei bundles erano già stati ottimizzati in studi precedenti [7-35]. E' stata invece messa a punto la tecnica di elettrofilatura della camicia, scegliendo come soluzione la stessa che è stata utilizzata per i bundles, per evitare costi eccessivi.

Il passo successivo è stato eseguire la caratterizzazione morfologica sia dei singoli bundles, sia degli scaffold incamiciati: per i bundles le fibre risultano allineate come richiesto ed i diametri ottenuti hanno i valori previsti.

E' stata eseguita anche una caratterizzazione meccanica delle strutture analizzate. Le prove meccaniche hanno rivelato proprietà soddisfacenti, ed hanno permesso di trarre interessanti conclusioni sulla scalabilità delle proprietà dai singoli bundles agli scaffold multiscala indipendentemente dal polimero utilizzato. E' emerso inoltre che la riproducibilità morfologica della struttura multiscala è effettivamente realizzabile sfruttando la tecnica dell'elettrofilatura e che è sicuramente possibile raggiungere anche proprietà meccaniche molto simili a quelle della struttura tendinea.

In futuro sarà necessario eseguire test di compatibilità cellulare sullo scaffold realizzato, per valutare l'effettiva permeabilità della camicia simil epitenon al flusso di cellule, per far sì che queste riescano a raggiungere i bundles all'interno dello scaffold e vi aderiscano proliferando e producendo matrice extracellulare, che andrà a sostituire completamente la struttura artificiale dopo la sua biodegradazione.

Le caratteristiche meccaniche dello scaffold multiscala possono sicuramente essere migliorate testando nuove soluzioni polimeriche oltre che ottimizzando il setup sperimentale per i test di resistenza meccanica a trazione (afferraggi). Inoltre sarebbe interessante investigare il comportamento dello scaffold a fatica attraverso prove meccaniche cicliche.

Riuscire a realizzare uno scaffold multiscala che simuli la struttura tendinea sarebbe certamente per l'ingegneria tissutale un traguardo molto importante, che permetterebbe un miglioramento del trattamento della rottura del tendine di Achille.

7 RINGRAZIAMENTI

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questa tesi.

Innanzitutto ringrazio il Professor Luca Cristofolini che, proponendomi questo argomento di tesi, mi ha permesso di intraprendere un percorso molto importante per la mia crescita accademica e culturale. La seconda persona che desidero ringraziare sentitamente è il mio correlatore Alberto Sensini, che con estrema professionalità mi ha seguito in ogni parte del progetto e senza il quale questa esperienza formativa non sarebbe stata possibile. Ringrazio anche il secondo correlatore Juri Belcari, che, nonostante i numerosi impegni lavorativi, ha pazientemente contribuito in questo lavoro. Vorrei poi rivolgere un sentito ringraziamento a tutti i Dottorandi ed i Ricercatori del Professor Cristofolini, che si sono mostrati disponibili a fornire consigli e suggerimenti in qualunque momento, sebbene molto impegnati nei loro progetti.

Ringrazio i miei amici della facoltà, Sara, Francesca, Enrico, Lorenzo, Guido, Alessio e tutti gli altri che mi sono stati vicini in questi ultimi impegnativi mesi, grazie per avermi supportata e sopportata! Ringrazio anche le mie amiche Giovanna, Sara, Lorenza e Sonia, per le intense chiacchierate e per essere state sempre presenti, anche nei momenti più difficili. Un enorme grazie va a Irene, per la sua infinita pazienza e per avermi permesso di condividere con lei così tante cose che mi sembra di conoscerla da una vita intera. Un ringraziamento immenso è riservato a Chiara, l'amica con cui ho condiviso l'intero percorso universitario, dagli scogli più difficili alle soddisfazioni più grandi, grazie per avermi sempre ascoltata e soprattutto per avermi capita, senza mai giudicarmi.

Ma il ringraziamento più grande va a loro, i miei genitori, che mi sono stati accanto in qualunque momento, senza mai smettere di credere in me; non avrei mai avuto la forza di portare a termine questo difficile percorso senza il loro aiuto ed il loro sostegno. Grazie a mio fratello Davide, per essere stato presente ogni giorno, anche quando ero "davvero insopportabile".

A tutti i miei familiari e conoscenti, grazie!

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Warwick R., Williams PL, *Anatomia del Gray*, versione italiana della 35^a edizione inglese
- [2] Prof. Marco Pirini, *Organi e tessuti per il movimento umano*, Bioingegneria della Riabilitazione BS AA 2005-2006
- [3] Benjamin M., Evans EJ, Cope L., *The histology of tendon attachment to bone in man*, J Anat., 1986, 149:89–100.
- [4] P. Kannus, *Structure of the tendon connective tissue*, Scand J Med Sci Sports, 2000, 10: 312-230.
- [5] Kheng Lim Goh, Anne Listrat and Daniel Béchet, *Hierarchical Mechanics of Connective Tissues: Integrating Insights from Nano to Macroscopic Studies*, Journal of Biomedical Nanotechnology, Vol. 10, 2464-2507, 2014.
- [6] Scott JE, Parry AD, *Control of collagen fibril diameters in tissues*, Int J Biol Macromol 1992; 14: 292-293.
- [7] A. Sensini, *Sviluppo e caratterizzazione di scaffold elettrofilati per la ricostruzione del tessuto tendineo*, Tesi di laurea magistrale, 2015
- [8] Maffulli N., Almekinders Luis C., *The Achilles tendon*, Springer Verlag London Limited 2007
- [9] Bramble D.M., Lieberman D.E., *Endurance running and the evolution of Homo*, Nature 2004; 432:345-352
- [10] Schepsis A.A., Jones H., Haas A.L., *Achilles tendon disorders in athletes: Current concepts*, Am J Sports Med 2002; 30:287-305
- [11] Manter J.T., *Movements of the subtalar and transverse tarsal joints*, Anat Rec 1941; 80:397–410.
- [12] Barfred T., *Achilles tendon rupture*, Acta Orthop Scand 1973; Suppl 152:7–126
- [13] White J.W., *Torsion of the Achilles tendon: Its surgical significance*, Arch

Surg 1943; 46:784–787

[14] Cummins E.J., Anson B.J., Carr B.W., Wright R.R., Hauser E.D.W., *The structure of the calcaneal tendon (of Achilles) in relation to orthopedic surgery*, Surg Gynecol Obstet 1946; 83:107–116

[15] Hicks J.H., *The mechanics of the foot*, J Anat 1953; 87:345–357

[16] Ker R.F., Bennett M.B., Bibby S.R., Kester R.C., Alexander R.M., *The spring in the arch of the human foot*, Nature 1987; 325:147–149

[17] Williams P.L., Warwick R., Dyson M., Bannister L.H., *Gray's Anatomy*, 37th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989

[18] Mellado J., Rosenberg Z.S., Beltran J., *Low incorporation of soleus tendon: A potential diagnostic pitfall on MR imaging*, Skeletal Radiol 1998; 27: 222–224

[19] Ahmed I.M., Lagopoulos M., McConnell P., Soames R.W., Sefton G.K., *Blood supply of the Achilles tendon*, J. Orthop Res 1998; 16:591–596

[20] Tishya A.L. Wren, Scott A. Yerby, Gary S. Beaupré, Dennis R. Carter, *Mechanical properties of the human achilles tendon*, Clinical Biomechanics 16 (2001) 245-251

[21] Tishya A. L. Wren, Derek P. Lindsey, Gary S. Beaupré, Dennis R. Carter, *Effects of Creep and Cyclic Loading on the Mechanical Properties and Failure of Human Achilles Tendons*, Annals of Biomedical Engineering; 31:710–717, 2003

[22] Perrone V., Mega W., Esposito D., *Riparazione della lesione del tendine d'Achille con artificiale (Poly-Tape)*, G.I.O.T. 2009;35:129-137

[23] Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D. S., *Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review*, International Journal of Polymer Science Volume 2011, Article ID 290602, 19 pages

[24] R. Langer and D. A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*, Nature, vol. 428, no. 6982, pp. 487–492, 2004

[25] Pietrabissa R., *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, Patron Editore,

1996

- [26] Leong K. F., Cheah C. M., Chua C. K., *Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs*, *Biomaterials* 2003; 24: 2363-2378
- [27] R. N. S. Sodhi, *Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research*, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 81, no. 3, pp. 269–284, 1996
- [28] Kulinski Z., Piorkowska E., *Crystallization, structure and properties of plasticized poly(L-lactide)*, *Polymer* 46 (2005) 10290–1030
- [29] Drieskens M., Peeters R., Mullens J., Franco D., Lemstra P. J., Hristova-Bogaerds D. G., *Structure Versus Properties Relationship of Poly(lactic acid). I. Effect of Crystallinity on Barrier Properties*, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*
- [30] Jayesh Doshi, Darrell H. Reneker, *Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers*, *Journal of Electrostatics* 35 (1995) 151-160
- [31] Greiner A., Wendorff J. H., *Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5670 – 5703
- [32] Lee J.H., Jung H.W., Kang I.K., Lee H.B., *Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups*, *Biomaterials* 1994, 15, 705–711
- [33] Fabiani D., Zaccaria M., Belcari J., Bocchi O., Zucchelli A., *Electrospun Nanofibers with Piezoelectric Properties*, *Electrical Insulation Conference (EIC)*, Seattle, Washington, USA, 7 -10 June 2015
- [34] Palazzetti R., Zucchelli A., Gualandi C., Focarete M.L., Donati L., Minak G., Ramakrishna S., *Influence of electrospun Nylon 6,6 nanofibrous mats on the interlaminar properties of Gr-epoxy composite laminates*, *Composite Structures* 94 (2012) 571–579
- [35] A. Sensini, C. Gualandi, L. Cristofolini, G. Tozzi, M. Dicarlo, G. Teti, M. Mattioli-Belmonte, M. L. Focarete, *Biofabrication of bundles of poly(lactic acid)-collagen blends mimicking the fascicles of the human Achille tendon*,

accepted for publication at Biofabrication 22 Febbraio 2017

[36] Tesi di laurea in Chimica e Chimica dei Materiali: *Reticolazione di scaffold elettrofilati per la ricostruzione del tessuto tendineo*, M. Segala

[37] P. Hanson, P. Aagaard, S.P. Magnusson, *Biomechanical properties of isolated fascicles of the Iliopsoas and Achilles tendons in African American and Caucasian men*, *Annals of Anatomy* 194 (2012) 457–460

8 SITOGRAFIA

[1s] www.uh.org/Providers/Textbooks/AnatomicVariants/AnatomyHP.html2002

[2s] <http://www.medwow.com/>

[3s] <http://www.tecnotex.it/>