

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO:

**Caratterizzazione di bundles bioriassorbibili
elettrofilati e reticolati per la ricostruzione
del tessuto tendineo**

Elaborato in

Comportamento Meccanico dei Materiali LT

Relatore:

Chiar.mo Prof. Ing. Luca Cristofolini

Presentato da:

Chiara Dazzi

Co-relatori:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Letizia Focarete

Chiar.ma Prof.ssa Chiara Gualandi

Ing. Alberto Sensini

Sessione II

Anno accademico 2015/2016

INDICE

1	ABSTRACT	5
2	INTRODUZIONE	7
2.1	TESSUTO TENDINEO	7
2.1.1	STRUTTURA MULTI-SCALA	7
2.1.2	COMPOSIZIONE MATRICE EXTRACELLULARE	9
2.1.3	COMPONENTE CELLULARE	12
2.1.4	CARATTERISTICHE MECCANICHE	13
2.2	FASCICOLO DI TENDINE D'ACHILLE UMANO	18
2.2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA	18
2.2.2	BIOMECCANICA E PROPRIETA' MECCANICHE	19
2.3	SCAFFOLD IN INGEGNERIA TESSUTALE	21
2.3.1	DEFINIZIONE E PROPRIETA'	21
2.3.2	RICOSTRUZIONE DEL TESSUTO TENDINEO	23
2.3.3	ACIDO POLILATTICO	24
2.3.4	COLLAGENE	25
2.4	ELECTROSPINNING	26
2.4.1	PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO	26
2.4.2	SCAFFOLD IN NANOFIBRE ELETTROFILATE	27
3	SCOPO DELLA TESI	30
4	PARTE SPERIMENTALE	31
4.1	MATERIALI	31
4.2	PRODUZIONE DI BUNDLES 3D	32

4.3	PROCESSO DI RETICOLAZIONE	35
4.4	PROCESSO DI INVECCHIAMENTO IN PBS DI BUNDLES RETICOLATI	36
4.5	METODI DI CARATTERIZZAZIONE	38
4.5.1	MICROSCOPIA OTTICA	38
4.5.2	MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE	38
4.5.3	PROVE MECCANICHE A TRAZIONE	39
4.5.4	ELABORAZIONE DATI	41
5	RISULTATI E DISCUSSIONE	43
5.1	OTTIMIZZAZIONE METODOLOGIA DI PRODUZIONE DEI BUNDLES E MORFOLOGIA	43
5.2	PROVE DI INVECCHIAMENTO IN PBS DI BUNDLES RETICOLATI	47
5.3	PROPRIETA' MECCANICHE	48
6	CONCLUSIONI	53
7	RINGRAZIAMENTI	56
8	BIBLIOGRAFIA	58
9	SITOGRAFIA	62

1 - ABSTRACT

Nonostante i recenti progressi dell'Ingegneria tissutale, per la ricostruzione del tessuto tendineo non è stata ancora trovata una soluzione ottimale: sia per la sua complessa struttura multi-scala difficilmente riproducibile, sia per le proprietà meccaniche particolari che possiede in virtù del suo ruolo di raccordo tra ossa e muscoli. In questo lavoro di tesi, si descrive la produzione, reticolazione e caratterizzazione di supporti tridimensionali elettrofilati (bundles) in PLLA e Collagene per la rigenerazione del tessuto tendineo. Si è scelta l'elettrofilatura poiché è una tecnica particolarmente adatta per realizzare uno scaffold che rispetti la complessa struttura gerarchica e le proprietà meccaniche del tendine, in quanto consente di ottenere nanofibre morfologicamente paragonabili alle fibrille di collagene tendineo ed orientabili nel senso preferenziale dei carichi di interesse. Per quanto riguarda i materiali, si sono utilizzati PLLA e Collagene per unire le buone proprietà meccaniche del primo con l'alta bioattività del collagene, in grado di favorire attecchimento e proliferazione cellulare. I bundles sono stati prodotti in due composizioni diverse (PLLA/Coll 75/25 e PLLA/Coll 50/50) e si è ottimizzato il processo di produzione in modo tale che questi scaffolds avessero una struttura porosa (fondamentale per la penetrazione e proliferazione cellulare) più simile possibile a quella dei fascicoli del tendine d'Achille. Il collagene elettrofilato risulta però solubile in ambiente fisiologico poiché non presenta la classica struttura a tripla elica: si è resa per questo necessaria la reticolazione chimica tramite N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC) e l'N-idrossisuccinimide (NHS). La reticolazione non ha portato grossi cambiamenti nella morfologia delle fibre e lo scaffold ha mantenuto la struttura porosa di partenza. Per valutare l'efficacia della reticolazione sono state effettuate delle prove gravimetriche sia dopo la reticolazione, sia dopo 7 e 14 giorni in PBS in condizioni fisiologiche: le perdite di peso si sono esaurite quasi completamente dopo il processo di reticolazione, restando comunque decisamente inferiori ai valori riportati in studi precedenti circa le perdite di peso di scaffolds nelle medesime composizioni, ma non reticolati [3]. Infine, tutte le tipologie di bundles sono state caratterizzate dal punto di vista meccanico tramite prove a trazione, grazie all'utilizzo di capstan-grips che limitassero le concentrazioni di tensione nei punti di afferraggio del campione. La reticolazione ha portato a un incremento delle proprietà meccaniche per entrambe le miscele, raggiungendo

valori fisiologici per tenacità, tensione di rottura e deformazioni. Dopo 7 e 14 giorni in condizioni fisiologiche, i bundles perdono parte delle loro proprietà meccaniche che rimangono comunque superiori (o nel range) ai valori dei bundles non reticolati. Gli scaffolds sono stati poi inviati all'Università di Sheffield per effettuare prove di compatibilità cellulare *in vitro*.

2 - INTRODUZIONE

2.1 TESSUTO TENDINEO

2.1.1 STRUTTURA MULTI-SCALA

Il tendine è una robusta struttura di tessuto connettivo fibroso che funge da collegamento tra i muscoli e le ossa o altre strutture di inserzione, come la pelle. La principale funzione dei tendini è quella di trasmettere la forza esercitata dai muscoli durante la contrazione alle strutture alle quali sono connessi, consentendo così il movimento delle articolazioni nonché il controllo della loro stabilità. Svolgono anche un importante ruolo di protezione da traumi, agendo come tessuti di smorzamento per assorbire gli urti e limitare potenziali danni al muscolo, in virtù della loro grande capacità di assorbire energia e di rilasciarla uniformemente durante il movimento. La forma dei tendini è molto variabile e ha una stretta dipendenza dalla funzione che questi devono svolgere in relazione all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono; in generale muscoli deputati a compiere movimenti precisi e delicati e sottoposti a piccole sollecitazioni come i flessori delle dita possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che esercitano sollecitazioni maggiori come il quadricipite hanno tendini più brevi e spessi [1]. L'elemento costitutivo fondamentale dei tendini è il collagene, principalmente di tipo I, presente in tutti i sotto-componenti del tendine ma con diversi gradi di aggregazione, a formare sottostrutture di diametro sempre maggiore, disposte parallelamente all'asse longitudinale del tendine (ossia nella direzione dei carichi applicati). Il tendine è, infatti, rappresentabile come una struttura multi-scala con diversi livelli di organizzazione, come mostrato in **Fig.1**.

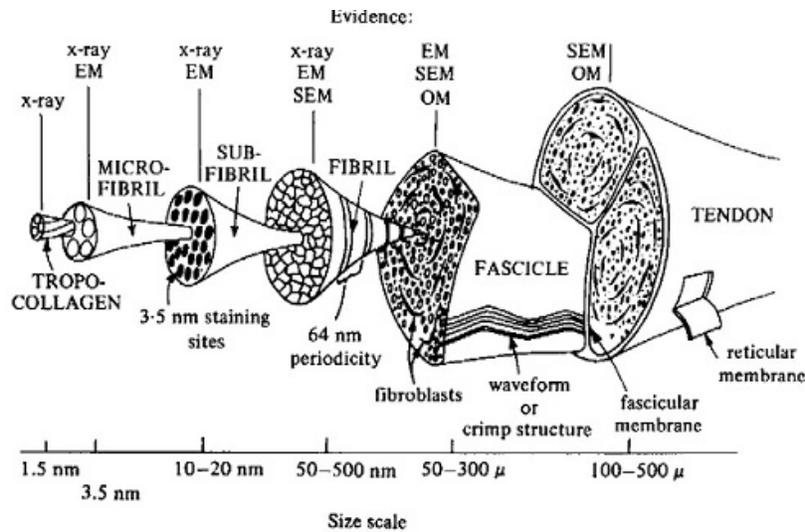


Figura 1. Struttura multi-scala del tendine [2].

Il livello di organizzazione più basso è costituito dal tropo-collagene, composto da tre catene polipeptidiche unite insieme a formare un'elica destrorsa (diametro di circa 1,5 nm). Tali macromolecole si uniscono a formare le micro-fibrille di circa 3.5-10 nm di diametro, grazie a legami di tipo cross-link. Le micro-fibrille a loro volta si uniscono a formare le sub-fibrille, dal diametro molto variabile che nell'uomo può raggiungere i 500 nm. La fibrilla si ottiene dall'unione di più fibre, fino a raggiungere un diametro di 50-400 μm. Dall'aggregazione di 4-5 fibrille, ma si può arrivare anche a 10-12, si ottiene il fascicolo, con diametri variabili tra i 150-1000 μm [2-4]. Questi ultimi unendosi tra loro formano il livello superiore di organizzazione che è il tendine vero e proprio, circondato dall'epitenon, una guaina sottile di fibre random di collagene. Dalle sub-fibrille in poi, tra un livello e l'altro, è presente uno strato di endotenon, sottile rete di tessuto connettivo formata da fibre di collagene incrociate che diventa contigua con la superficie interna dell'epitenon. L'endotenon ha il compito di permettere la penetrazione di strutture vascolari e nervose all'interno del tendine, aumentare l'adesione tra le fibre e permettere lo scorrimento tra i fasci, grazie alla presenza di proteoglicani altamente idrofili e quindi idrati tra l'endotenon e la superficie dei fasci [1]. Sulla sua superficie esterna invece l'epitenon è contiguo con il paratenon, il quale fa parte di quelle strutture satelliti che si riscontrano nella maggior parte dei tendini e che hanno la funzione principale di facilitare lo scorrimento del tendine sulle strutture anatomiche circostanti, riducendo l'attrito, per evitare anche che il tendine stesso esca di sede durante la contrazione muscolare. Esse sono, oltre al paratenon: guaine

fibrose o retinacoli, guaine sinoviali, pulegge di riflessione, borse tendinee. Il punto nel quale avviene l'adesione tra tendine e muscolo è la giunzione miotendinea, nella quale le fibre di collagene si inseriscono nel tessuto muscolare, aumentando la superficie di ancoraggio e riducendo in modo significativo i fenomeni di concentrazione delle tensioni. Il legame con l'osso si verifica invece nella giunzione osteotendinea, dove il collagene sfuma nel periosteo (superficie dell'osso) con un progressivo gradiente di mineralizzazione che aumenta la rigidità della giunzione e diminuisce anche qui i fenomeni di concentrazione delle tensioni [3]. Per quanto riguarda la composizione del tendine, come tutti i tessuti connettivi, è formato da cellule disperse all'interno di abbondante matrice extracellulare (ECM). Tali componenti sono analizzati nei prossimi paragrafi.

2.1.2 COMPOSIZIONE MATRICE EXTRACELLULARE

I costituenti fondamentali della matrice extracellulare del tendine sono le fibre di collagene ed elastina incorporate all'interno di una matrice di proteoglicani ed acqua, con il collagene che rappresenta il 65-80% della massa secca del tendine, mentre l'elastina solo l'1-2% [1].

Sono stati identificati ad oggi 27 diversi tipi di collagene, non tutti con struttura fibrillare, ma quello più presente nei tendini è ampiamente quello di tipo I [3]. L'unità strutturale di base del collagene è il tropo-collagene che, come già descritto, si compone di tre catene polipeptidiche legate insieme a formare una molecola a tripla elica destrorsa. Ogni polipeptide presenta un motivo di tipo Gly-X-Y, nel quale la sigla Gly rappresenta l'amminoacido glicina; X e Y possono riferirsi a qualsiasi residuo ma solitamente corrispondono rispettivamente al residuo prolina (Pro) e 4-Idrossiprolina (Hyp). Queste catene sono affiancate alle estremità da domini terminali globulari chiamati N- e C-propeptidi che non presentano il motivo Gly-X-Y. La fibrillogenosi è il processo che cerca di spiegare la formazione delle fibrille di collagene a partire dal procollagene, precursore del collagene, e in particolare riguarda i meccanismi di nucleazione del collagene in fibrille, la loro crescita laterale ed assiale e il loro rimodellamento [11]. Le fibrille sono sintetizzate e secrete dai fibroblasti, le cellule più abbondanti del tessuto connettivo, disposte lungo i fasci di fibre. I passaggi principali della fibrillogenosi sono riassumibili nelle seguenti tappe:

1. Sintesi delle catene di procollagene nel reticolo endoplasmatico (ER) dove vengono

- piegate a formare trimeri a tripla elica.
2. Produzione di molecole di tropo-collagene a seguito della riduzione dei trimeri di procollagene tramite la rimozione dei propeptidi globulari N- e C- da parte delle N- e C-proteinasi.
 3. Secrezione e trasporto del tropo-collagene attraverso l'apparato di Golgi verso la membrana plasmatica.
 4. Assemblaggio delle molecole di tropo-collagene a formare fibrille, costituite da legami cross-link tra le catene a tripla elica di collagene [5].

I vari passaggi sono schematizzati in **Fig.2**.

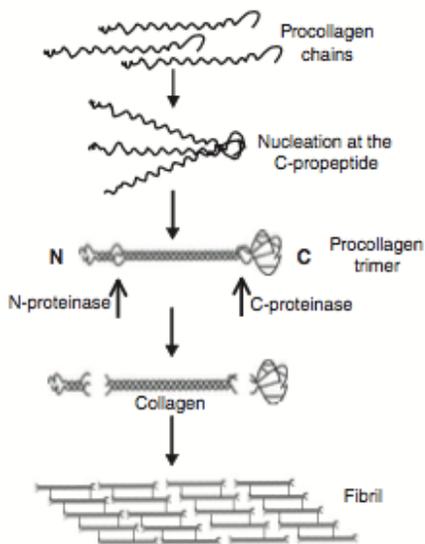


Figura 2. Panoramica sulla fibrillogenesi.

L'altra struttura fibrosa presente all'interno della matrice extracellulare del tendine, è l'elastina.

L'elastina è la proteina deputata a conferire elasticità alle strutture con le quali si coordina ed è ricca in prolina e glicina come il collagene ma, a differenza di quest'ultimo, è povera in idrossiprolina. Le fibre di elastina hanno un diametro di 0.3-2.0 μm e in genere non si aggregano in fasci ma decorrono isolate formando una fine rete irregolare attraverso il tessuto. L'elastina viene sintetizzata dai fibroblasti sotto forma di un precursore, la tropo-elastina, che polimerizza nei tessuti extracellulari. La funzione delle fibre elastiche non è del tutto chiara, ma sembra contribuiscano al recupero della configurazione ondulata delle fibre di collagene, a seguito di un

allungamento del tendine dovuto alla contrazione muscolare [1].

Alla base della ECM tendinea vi è un'ultima componente importante: i proteoglicani (PGs). Questi sono macromolecole composte da un nucleo proteico centrale al quale si legano in maniera covalente più catene di glicosamminoglicani (GAGs), formando quella sostanza gelatinosa che viene comunemente denominata gel idrofilico o sostanza fondamentale. I GAGs sono costituiti da lunghe catene polisaccaridiche ciascuna delle quali è composta dalla ripetizione di unità disaccaridiche; una delle unità del disaccaride è generalmente un acido uronico, mentre l'altra un amminosaccaride (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina). All'interno del tendine si trovano essenzialmente due famiglie di proteoglicani: i piccoli proteoglicani ricchi in leucina (small leucine-rich PGs o SLRPs) e i grandi proteoglicani chiamati anche modulari o ialectani (large PGs or modular/lecticans PGs). I primi sono caratterizzati dalla presenza di sequenze ripetute ricche di leucina (leucine-rich repeats o LRRs), che sono formate da 20-30 amminoacidi lungo le quali i residui di leucina occupano posizioni conservate. Questi PGs hanno un nucleo proteico di piccole dimensioni al quale sono attaccate una o due catene di GAGs che hanno la funzione principale di regolare lo spazio interfibrillare: coindrotinsolfato o dermatansolfato (CS o DS) oppure diverse catene di cheratansolfato (KS). I SLRPs principali nel tendine sono la decorina, i biglicani, la fibromodulina e i lumincani. Hanno la capacità di legarsi alle fibrille di collagene garantendone l'adesione e giocano un ruolo fondamentale nella fibrillogenosi e nell'organizzazione della matrice extracellulare. I modular PGs, come l'aggrecano e il versicano, sono ricchi invece di catene CS e KS. Il nucleo proteico centrale di questi PGs ha domini multipli. Si tratta di molecole idrofile cariche negativamente che hanno la capacità di trattenere una quantità d'acqua pari a 50 volte il loro peso. Si trovano per lo più intrappolati tra le fibrille e le fibre di collagene. In virtù della elevata densità di cariche fisse e delle forze di repulsione elettrostatica, questi PGs sono tesi rigidamente fornendo così alle fibrille di collagene un'alta resistenza alle sollecitazioni di trazione e compressione. La composizione e il contenuto di PGs varia nelle diverse zone del tendine in base alle differenti richieste funzionali: nelle regioni sottoposte a tensione, il contenuto di proteoglicani è costituito da un 90% di SLRPs e un 10% large PG; nelle zone sottoposte a compressione, la quantità assoluta di proteoglicani è maggiore e le quantità relative delle due tipologie si equiparano [3-6].

2.1.3 COMPONENTE CELLULARE

Le cellule tendinee, tenoblasti e tenociti, costituiscono circa il 90-95% degli elementi cellulari del tendine, mentre il restante 5-10% comprende condrociti, presenti nei siti di inserzione e nelle zone sottoposte a compressione, i sinoviociti delle guaine sinoviali, le cellule endoteliali dei capillari e le cellule muscolari lisce delle arteriole nell'endotenon e nell'epitenon. Le cellule tendinee provvedono alla sintesi di tutti i componenti della matrice extracellulare, quindi del collagene, dell'elastina, dei proteoglicani e delle proteine strutturali. Il rapporto cellule/matrice non è in generale molto elevato anche se tende a essere maggiore nel tendine giovane per poi diminuire con l'età. Le cellule del tendine giovane (tenoblasti) sono disposte in lunghe filiere parallele e appaiono di forma e dimensioni variabili: alcune sono allungate, altre arrotondate e altre ancora poligonali. La lunghezza dei tenoblasti varia da 20 μm fino a 70 μm e lo spessore da 8 μm a 20 μm . Caratteristica comune a tutti i tenoblasti è la presenza di numerosi prolungamenti citoplasmatici che si estendono nella matrice in tutte le direzioni, per stabilire i contatti intercellulari. Man mano che il rapporto cellula/matrice diminuisce, anche altri cambiamenti avvengono all'interno delle cellule tendinee. I tenoblasti vengono ora chiamati tenociti e assumono una forma estremamente allungata raggiungendo anche i 300 μm di lunghezza. Aumenta il rapporto nucleo/citoplasma e i processi cellulari diventano più lunghi e sottili estendendosi lontano dal corpo cellulare. L'aumento della lunghezza di questi processi è necessaria per garantire uno stretto contatto tra le cellule e la matrice extracellulare compensando così la riduzione del rapporto cellula/matrice. I tenociti sono comunque cellule metabolicamente attive che conservano la capacità di sintetizzare tutti i componenti della matrice extracellulare, ma la loro attività è inferiore a quella dei tenoblasti. Gli studi circa il metabolismo della matrice extracellulare si sono concentrati quasi esclusivamente sul turnover del collagene e molto poco sugli altri componenti della ECM. Le conclusioni principali di questi studi hanno evidenziato come nei tendini giovani la sintesi di collagene sia relativamente rapida ma come si riduca drasticamente con l'età e, in secondo luogo, come il turnover del collagene di un tendine adulto, quindi comprensivo sia della sintesi che del catabolismo di quest'ultimo, avvenga con una velocità molto minore rispetto ai legamenti. Il basso tasso metabolico del tendine gli permette di svolgere al meglio il suo compito: in questo modo, il tendine può rimanere in tensione per un certo periodo di tempo, tollerando scarso apporto di ossigeno, senza andare in contro al rischio di

ischemia o necrosi. L'aspetto negativo di questo tipo di metabolismo risulta nei lunghi tempi di guarigione a seguito di infortuni. Si hanno invece meno informazioni riguardo i meccanismi del catabolismo della matrice extracellulare, ma in base a studi condotti su matrici extracellulari di altri tessuti connettivi, due meccanismi di degradazione appaiono plausibili: 1) i tenociti producono enzimi lisosomiali o altri enzimi citosolici che vengono riversati nello spazio extracellulare dove quindi svolgono la loro attività catabolica; 2) i processi catabolici hanno luogo in sede intracellulare a seguito di fenomeni di fagocitosi e/o pinocitosi, così come avviene nel tessuto osseo ad opera degli osteoclasti [1].

2.1.4 CARATTERISTICHE MECCANICHE

Per poter comprendere le proprietà meccaniche del tendine, è utile prima conoscere le caratteristiche meccaniche dei singoli componenti che lo costituiscono. La funzione principale dei tendini è quella di resistere a sollecitazioni di trazione e tutte le sue sottostrutture e sotto-componenti sono ottimizzate per resistere a questa tipologia di carichi. La caratterizzazione meccanica della sostanza fondamentale risulta piuttosto complessa poiché sotto carico questa risponde rilasciando liquidi e modificando le sue caratteristiche. È un auto-lubrificante ideale, ma allo stesso tempo riduce notevolmente il modulo elastico e il carico di rottura del tendine [3]. L'elastina è un tessuto elastico, cioè in grado di subire grandi deformazioni per carichi relativamente piccoli. In **Fig.3** è mostrato il comportamento meccanico dell'elastina sottoposta a trazione. Il modulo di elasticità è molto basso e le deformazioni raggiungono il 200%. In una ristretta regione finale, la rigidità aumenta fino a rottura. Non si manifestano deformazioni plastiche prima della rottura. Il percorso di carico e scarico non mostra un'isteresi significativa e l'energia dissipata per viscosità interna è molto modesta [1s-7].

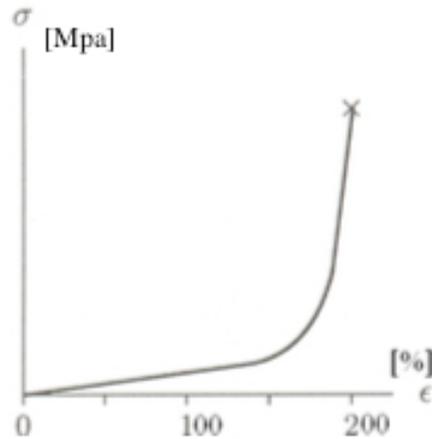


Figura 3. Comportamento meccanico a trazione dell'elastina.

Il collagene ha un comportamento meccanico che è strettamente legato alla sua struttura particolare a tripla elica. Com'è mostrato in **Fig.4**, la curva tensione-deformazione ha un andamento non lineare. Nella prima parte dell'allungamento a trazione, le fibre di collagene hanno una modesta capacità di sopportare i carichi; in questa prima fase le fibre ruotano e si flettono modificando la loro geometria spaziale dalla forma elicoidale a quella lineare. Una volta che le catene sono distese, le proprietà meccaniche aumentano e diventano dipendenti esclusivamente dai legami intra e intermolecolari. Un'importante caratteristica del collagene riguarda la sua viscoelasticità: il modulo di elasticità aumenterà quindi con la velocità di deformazione [7].

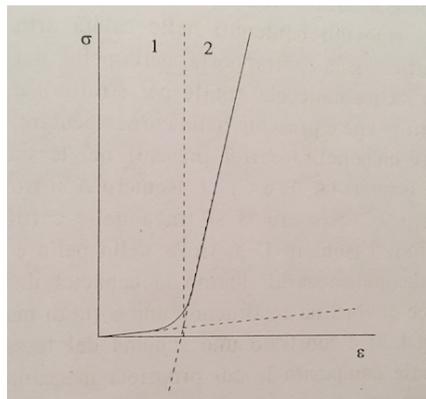


Figura 4. Comportamento meccanico a trazione del collagene: *la regione 1) è caratterizzata da un comportamento elastico con basso valore del modulo elastico (svolgimento catene), mentre la*

regione 2) è caratterizzata da un comportamento elastico con alto valore del modulo elastico.

I valori delle proprietà meccaniche di collagene ed elastina sono riassumibili nella tabella sottostante (**Tab.1**).

Tabella 1. Proprietà meccaniche del collagene e dell'elastina. Da: *JB Park e RS Lakes 'Biomaterials: an Introduction. Second Edition', Plenum Press, New York, 1992.*

	Modulo di elasticità [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Allungamento a rottura [%]	Limite elastico [%]
collagene	1000	50+100	10	1+2
elastina	0.6	1	100	60

L'andamento della curva tensione-deformazione per il tendine completo, è molto simile a quella del collagene come mostrato in **Fig.5**.

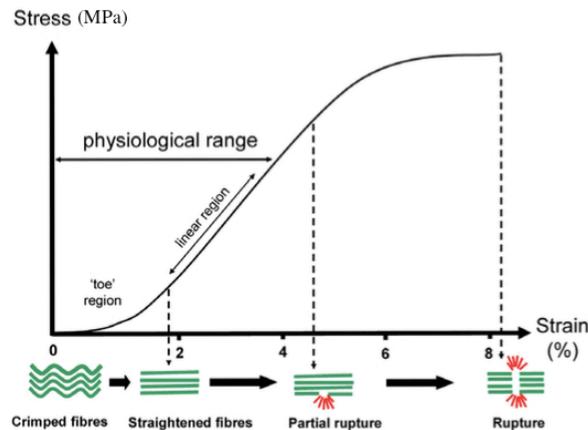


Figura 5. Tipica curva sforzo-deformazione a trazione di un tendine.

Così come per il collagene, la curva presenta una forte non-linearità. Può essere suddivisa in tre

regioni: la prima parte della curva, a basso modulo elastico, rappresenta la distensione e l'allineamento delle fibre di collagene nella direzione del carico di applicazione; vi è poi una zona abbastanza lineare in cui si ha il massimo valore della pendenza della curva, nella quale la maggior parte delle fibre viene deformata lungo il proprio asse; infine, l'ultimo tratto della curva, presenta una progressiva riduzione di pendenza poiché è caratterizzato dalla rottura delle singole fibre fino al cedimento del tendine [7]. L'ultima zona è raggiungibile solo in caso di trauma ed è caratterizzata da comportamento plastico. Le deformazioni in quest'ultima zona possono raggiungere il 9.5-17% (in condizioni fisiologiche le tensioni applicate non eccedono mai 1/3-1/4 del valore di rottura) [3]. I tendini sono tessuti viscoelastici; a causa della loro viscosità, presentano fenomeni di rilassamento, creep e isteresi. Il rilassamento consiste nel fatto che la forza richiesta per un determinato allungamento decresce nel tempo. La diminuzione della forza segue un andamento curvilineo prevedibile fino al raggiungimento di un valore di regime (**Fig.6A**). Il creep è un fenomeno che riguarda l'aumento di deformazione nel tempo se il tendine è sottoposto ad una forza costante (**Fig.6B**). Anche in questo caso l'andamento della deformazione è curvilineo finché non si raggiunge un valore di regime. Sia nel rilassamento che nel creep, la zona curvilinea riflette la componente viscosa del tendine (il collagene), mentre il valore di regime riflette la componente elastica (elastina). Il tendine presenta isteresi meccanica e ciò è riscontrabile durante un ciclo di carico e scarico del campione (**Fig.6C**). Durante la fase di scarico, il tendine raggiunge deformazioni maggiori e, l'area contenuta all'interno del ciclo, rappresenta l'energia persa nel rinculo dovuto alla componente viscosa; è generalmente espressa in termini % sul lavoro totale eseguito sul tendine durante l'allungamento [8].

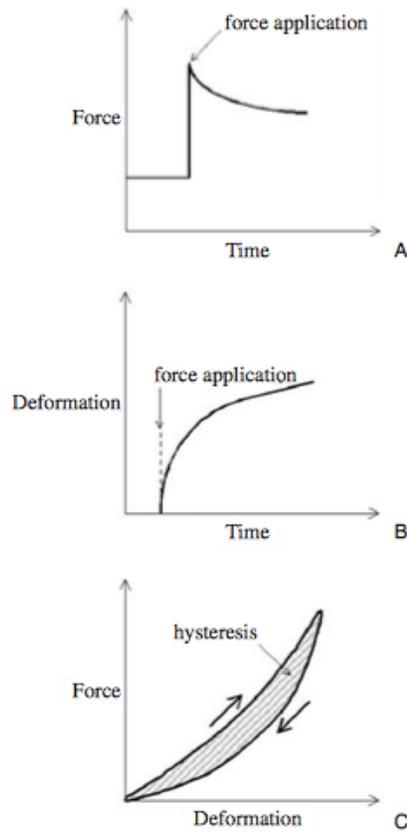


Figura 6. **A).** Tipica curva di rilassamento nel tendine. **B).** Tipica curva di creep nel tendine. **C).** Tipico andamento dell'isteresi meccanica nel tendine.

Tabella 2. Proprietà meccaniche del tendine.

MATERIALE	MODULO ELASTICO [GPa]	TENSIONE DI ROTTURA [MPa]	DEFORMAZIONE DI ROTTURA [%]	LIMITE ELASTICO [%]
Tendine	1	50±120	9.5±17	5

2.2 FASCICOLI DI TENDINE D'ACHILLE UMANO

2.2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA

Il tendine d'Achille, o tendine calcaneare, è il più spesso e robusto dei tendini del corpo umano. E' lungo circa 15 cm e funge da allaccio tra il tricipite surale (formato dal soleo e le due teste di gastrocnemio) e il calcagno. Le teste mediale e laterale del gastrocnemio originano dai condili femorali e la loro estremità inferiore prosegue nel tendine d'Achille formando un'ampia aponeurosi. Il soleo nasce interamente sotto il ginocchio, principalmente da tibia e perone, e il suo contributo al tendine d'Achille è più spesso ma più corto rispetto al gastrocnemio. L'incorporamento totale di soleo e gastrocnemio nel tendine d'Achille è solitamente evidente 8-10 cm sopra il sito d'attacco al calcagno [9]. Il tendine d'Achille si inserisce infine nella parte centrale della superficie posteriore del calcagno, diventando gradualmente più compatto verso il basso: infatti le fibre tendinee derivanti dal gastrocnemio tendono a convergere restringendo il diametro del tendine.



Figura 7. Sito anatomico del tendine d'Achille.

Come abbiamo già visto, il tendine ha una struttura multi-scala, e ciò è chiaramente valido anche per il tendine d'Achille. I fascicoli o fibre del tendine d'Achille, hanno una disposizione molto caratteristica: prossimalmente corrono parallele per poi ruotare distalmente. Ciò significa che i fascicoli del tendine d'Achille non scendono in maniera rettilinea ma creano una struttura a

spirale come rappresentato in **Fig.8**. Più precisamente, i fascicoli provenienti dai tre capi del tricipite surale, si intrecciano in modo che le fibre della testa mediale del gastrocnemio siano situate posteriormente (superficialmente) e le fibre della testa laterale si trovino anteriormente (profondamente). Le fibre originate dal soleo sono localizzate invece nella parte centrale e mediale del tendine [10].



Figura 8. Arrangiamento a spirale dei fascicoli di tendine.

2.2.2 BIOMECCANICA E PROPRIETA' MECCANICHE

Tramite il tendine d'Achille, il muscolo gastrocnemio e soleo sono i principali flessori plantari dell'articolazione della caviglia. Il soleo ha inoltre anche un ruolo posturale, impedendo al corpo di cadere in avanti durante la stazione eretta. In piedi, così come nella corsa e nelle attività che prevedono salti, questa unità muscolotendinea fornisce la forza propulsiva primaria per la locomozione. La contrazione di questa unità muscolotendinea contribuisce anche alla flessione del ginocchio e alla supinazione dell'articolazione sottoastragalica. La conformazione a spirale dei fascicoli del tendine d'Achille fino a un grado di torsione di 90°, sembra spieghi alcune delle qualità elastiche apparenti del tendine. Nell'atterraggio da un salto infatti il corpo rimane in posizione verticale mentre il piede assume una posizione di flessione a causa dell'attività del tricipite surale: nelle fasi di atterraggio la deformazione è assorbita dal tendine d'Achille che

produce un effetto di rinculo. Alcuni studi hanno dimostrato che la forza che deve sopportare il tendine d'Achille durante la corsa raggiunge valori pari a 6/8 volte il peso corporeo del soggetto, una forza non lontana dal carico di rottura del tendine (5098 ± 1199 N) [12]. La tensione di rottura per il tendine d'Achille raggiunge valori pari a 79 ± 22 MPa, mentre il modulo di elasticità vale 819 ± 208 MPa [13]. Per quanto riguarda i fascicoli del tendine calcaneare, i valori sono riportati in **Tab.3** [14].

Tabella 3. Proprietà meccaniche fascicoli tendine d'Achille.

	Stress (Mpa)	Strain (%)	Young's Modulus (Mpa)	Absorbed Energy (mj/mm ²)
AA (n=12)	21.9 ± 9.9	16.3 ± 3.5	222.8 ± 84.6	25.0 ± 13.1
CC (n=12)	28.1 ± 9.8	13.8 ± 4.4	316.8 ± 110.0	25.1 ± 8.9

Nella tabella riportata sopra è stato fatto un confronto tra le proprietà meccaniche di fascicoli di tendine d'Achille appartenenti a uomini di origine afro-americana (AA) e caucasica (CC). E' evidente come i risultati per le due tipologie di fascicoli siano simili. In **Fig.9** è presentata la relazione tensione-deformazione per tali fascicoli: la curva formata da tondi pieni appartiene ai campioni di origine afro-americana, quella formata da tondi vuoti appartiene invece a campioni caucasici [14].

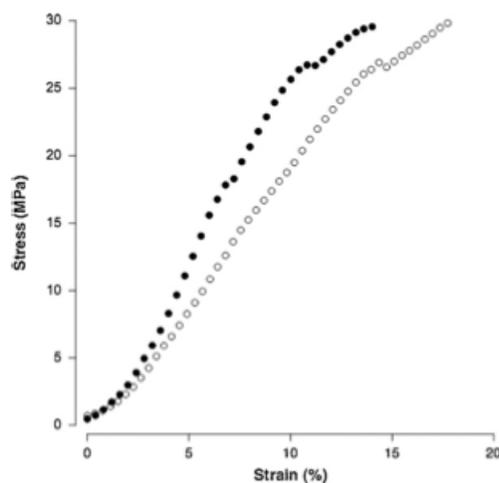


Figura 9. Curva tensione-deformazione fascicoli tendine d'Achille.

2.3 SCAFFOLD IN INGEGNERIA TESSUTALE

2.3.1 DEFINIZIONE E PROPRIETA'

Gli scaffolds svolgono un ruolo unico nella riparazione e rigenerazione dei tessuti. Nel corso degli ultimi due decenni, sono stati fatti numerosi studi per sviluppare materiali per scaffolds potenzialmente applicabili nell'ingegneria tissutale. Uno scaffold è definito come un supporto tridimensionale poroso realizzato con biomateriali e progettato per eseguire alcune o tutte le seguenti funzioni: (I) promuovere interazioni cellula-biomateriale, l'adesione cellulare e la proliferazione cellulare, (II) consentire il trasporto di gas, nutrienti e fattori di regolamentazione per consentire la sopravvivenza cellulare, la proliferazione e la differenziazione, (III) biodegradare ad una velocità controllabile che approssimi il tasso di rigenerazione tissutale sotto le condizioni di coltura di interesse, e (IV) provocare un grado minimo di infiammazione o di tossicità in vivo [15]. Com'è facilmente intuibile dalla definizione di scaffold, questo deve mimare, almeno parzialmente, le funzioni della matrice extracellulare nativa. Eccetto che per le cellule del sangue, tutte le altre cellule dei tessuti umani sono ancoraggio dipendenti e si fissano su una matrice solida che è la matrice extracellulare (ECM). Ci sono numerose tipologie di matrice extracellulare nei tessuti umani, ognuna con diversi componenti, una specifica composizione e funzioni multiple. Tutto ciò, unito alla natura dinamica della ECM, rende difficile mimarne le funzioni esattamente [16]. Nonostante questo, è possibile ottenere scaffolds con caratteristiche ottimali in termini di resistenza, velocità di degradazione, porosità e microstruttura, nonché forma e dimensione, servendosi di materiali polimerici, il cui utilizzo facilita la riproducibilità dello scaffold [17]. I biomateriali polimerici possono essere naturali o sintetici. Tra i naturali sono annoverati alcuni polimeri proteici (seta, collagene, fibrinogeno, elastina, cheratina, actina, miosina), alcuni polisaccaridi (cellulosa, amido, glicosamminoglicani) e i polinucleotidi (DNA, RNA). A causa delle loro proprietà bioattive hanno migliori interazioni con le cellule permettendo a queste di migliorare le loro prestazioni all'interno del sistema biologico. PLA, PGA e PLGA (copolimero) fanno parte dei polimeri sintetici principalmente utilizzati in ingegneria tissutale. Questi sono spesso meno costosi dei polimeri di origine biologica e le loro proprietà possono essere controllate in fase produttiva [15]. In linea generale,

indipendentemente dal tessuto che si vuole rigenerare o riparare, ci sono una serie di considerazioni chiave da fare nel progettare e determinare l'idoneità di uno scaffold per uso in ingegneria tessutale:

- *Biocompatibilità*: è il primo criterio da soddisfare per qualsiasi scaffold utilizzato in ingegneria tessutale. Le cellule devono aderire, funzionare regolarmente, migrare sulle superficie ed eventualmente attraverso lo scaffold e cominciare a proliferare. Dopo l'impianto, inoltre, lo scaffold deve provocare una reazione immunitaria trascurabile per evitare l'insorgere di una grave risposta immunitaria che potrebbe allungare i tempi di guarigione o causare rigetto.
- *Biodegradazione*: l'obiettivo dell'ingegneria dei tessuti è quello di consentire nel corso del tempo alle cellule del corpo di rimpiazzare lo scaffold. Tale struttura deve essere perciò biodegradabile in modo da consentire alle cellule di produrre la propria matrice extracellulare. I prodotti di questa degradazione dovrebbero essere non tossici e in grado di uscire dal corpo senza interferire con altri organi.
- *Proprietà meccaniche*: idealmente, lo scaffold deve avere proprietà meccaniche coerenti con il sito anatomico nel quale deve essere impiantato e, da un punto di vista pratico, deve essere sufficientemente resistente da consentirne la manipolazione chirurgica durante l'impianto. Le proprietà meccaniche si devono mantenere dal momento dell'impianto fino al completamento del processo di rimodellamento. Nel progettare scaffolds con elevate proprietà meccaniche, è importante non trascurare la porosità superficiale fondamentale per permettere l'infiltrazione cellulare e la vascolarizzazione.
- *Architettura dello scaffold*: come già accennato nel punto precedente, l'architettura degli scaffolds è di importanza critica. Gli scaffolds dovrebbero avere una struttura ad elevata porosità di pori interconnessi tale da assicurare la penetrazione cellulare e un'adeguata diffusione di nutrienti alle cellule. Inoltre, una struttura di questo tipo è necessaria per consentire il passaggio dei prodotti di degradazione e di scarto in modo tale che escano dal corpo senza interferenze con i tessuti circostanti. E' importante anche la dimensione media dei pori: le cellule interagiscono infatti con lo scaffold tramite gruppi chimici (leganti) sulla superficie del materiale che nel caso di materiali naturali (per esempio il collagene) sono posseduti naturalmente, nel caso di materiali sintetici vengono incorporati tramite adsorbimento di proteine. I pori devono quindi essere abbastanza

grandi da permettere alle cellule di migrare nella struttura, ma abbastanza piccoli per avere una superficie specifica (cioè la superficie disponibile dentro un poro nella quale le cellule possono aderire) sufficientemente alta da portare a una densità di ligando minima per ottenere un numero critico di cellule nello scaffold. Pertanto, per ogni tipologia di impalcatura, esiste un intervallo critico per le dimensioni dei pori che può variare a seconda del tipo di cellula e tessuto in questione.

- Tecnologia produttiva: affinché uno scaffold possa diventare commercialmente e clinicamente valido, deve essere conveniente dal punto di vista economico e producibile in lotti [18].

2.3.2 RICOSTRUZIONE DEL TESSUTO TENDINEO

L'ingegneria tessutale è progredita notevolmente negli ultimi anni, offrendo la possibilità di riparare e rigenerare molti tessuti e organi del corpo umano mediante la realizzazione di uno scaffold opportuno, che supporti la crescita cellulare. La ricostruzione del tessuto tendineo resta però ancora oggi una sfida per l'ingegneria tissutale: innanzitutto per la sua complessa organizzazione multi-scala, difficilmente riproducibile; in secondo luogo, per le caratteristiche meccaniche che il tendine deve possedere in virtù del suo ruolo di raccordo tra ossa e muscoli, cioè elevata resistenza a carichi di trazione, anche per lungo tempo, e alle concentrazioni di tensione che si verificano nei punti di inserzione, unite a una buona rigidità. Riuscire a progettare e realizzare uno scaffold opportuno per questa tipologia di tessuto rappresenterebbe però una svolta importante nel campo dei traumi tendinei. Il processo di rigenerazione naturale dei tendini è, infatti, un processo molto lento e, al contempo, inefficiente in quanto non è in grado di ripristinarne efficacemente le proprietà morfo-biologiche e biomeccaniche a causa dell'insorgere di tessuto cicatriziale non direzionale, meccanicamente meno efficiente rispetto al tessuto anisotropo originario. Inoltre, anche gli approcci esistenti fino ad ora per la riparazione tendinea comportano effetti collaterali da non sottovalutare: gli innesti biologici comportano il rischio sia di trasmissione di malattie che di rigetto tissutale; le protesi artificiali necessitano di materiali compatibili duraturi e che a contatto con i fluidi biologici non subiscano alterazioni di alcun genere, onde evitare il rilascio di sostanze che possano innescare vari meccanismi di difesa da parte dell'organismo, compromettendone la sua funzionalità nel tempo.

2.3.3 ACIDO POLILATTICO (PLA)

L'acido polilattico o polilattide (PLA) è un poliestere alifatico biodegradabile e termoplastico che si ottiene al 100% da fonti rinnovabili. In **Fig.10** è rappresentata la formula strutturale dell'acido polilattico. Il PLA ha ampie applicazioni in campo biomedico tra cui suture, strutture per fissaggio osseo, microsfere per la somministrazione di farmaci e nell'ingegneria dei tessuti [19]. Questo polimero può essere ottenuto con metodi produttivi differenti, ma in ambito biomedico viene prodotto essenzialmente per policondensazione diretta di monomeri di acido lattico e per polimerizzazione attraverso formazione di lattide, ovvero polimerizzazione tramite apertura dell'anello. In particolare, la polimerizzazione ad apertura di anello del lattide, necessita di alte temperatura (tra i 140° e i 180°) e di un catalizzatore (per esempio ossido di stagno), ma permette di ottenere acido polilattico con peso molecolare controllato [19-20]. Il lattide stesso si ottiene dalla fermentazione di fonti rinnovabili come amido di mais, o altre sostanze ricche di carboidrati quali granturco, zucchero e grano [20-2s].

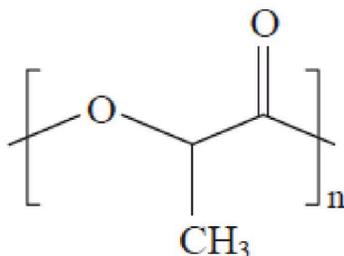


Figura 10. Formula strutturale acido polilattico.

Dal punto di vista strutturale è un materiale semicristallino o amorfo, con una temperatura di transizione vetrosa di circa 55° e una temperatura di fusione di 180°. In ambiente biologico il PLA è inizialmente degradato mediante idrolisi e gli oligomeri solubili sono poi metabolizzati dalle cellule [21]. I tempi di degradazione, in particolare, sono molto lunghi (il polimero resiste in ambiente fisiologico per molti mesi) e lo rendono adatto ad applicazioni dove il materiale biorassorbibile deve mantenere le sue caratteristiche per tempi lunghi. Ciò che rende attraente questo poliestere è proprio il fatto che il suo prodotto di degradazione, ovvero l'acido lattico, è un metabolita naturale presente normalmente nel corpo umano. Inoltre, la sua lavorabilità eccezionale ne aumenta ulteriormente il fascino.

Poiché l'acido lattico è una molecola chirale, il PLA ha stereoisomeri, come il poli-L-lattide

(PLLA), il poli-D-lattide (PDLA), e il poli-DL-lattide (PDLLA). L'isomero del PLLA costituisce la frazione principale del PLA e, grazie alle sue buone proprietà meccaniche e alla sua alta biocompatibilità, è quello maggiormente usato in ambito biomedico [19].

Sono stati effettuati degli studi cellulari su scaffolds in acido poli-L-lattico, che hanno dimostrato come la morfologia delle cellule attaccate assomigliasse a quella di tendini e legamenti; inoltre scaffolds in PLLA con superficie modificata hanno registrato il miglior tasso di proliferazione cellulare rispetto a tutti gli altri poliesteri testati.

Nonostante ciò, restano comunque alcuni limiti per l'acido poli-L-lattico. In primo luogo, a causa della sua natura idrofoba non supporta un alto livello di adesione cellulare; questa limitazione può però essere superata mediante modifica della superficie con agenti adesivi quali fibronectina. In secondo luogo, anche se i prodotti della degradazione del PLLA sono metaboliti naturali, sono anche acidi. La presenza di questi metaboliti in grandi concentrazioni può dar luogo a reazioni locali o sistemiche significative. Pertanto, in generale, il PLLA è più adatto per la produzione di piccoli scaffolds [22].

2.3.4 COLLAGENE

Recentemente si è sviluppato un interesse crescente nell'uso del collagene e dei suoi derivati per la fabbricazione di dispositivi medicali [7]. La matrice extracellulare di tessuti molli come tendini e legamenti è per lo più costituita da collagene di tipo I, quindi gli scaffolds basati su derivati del collagene sono altamente biocompatibili con questi tipi di tessuti. Questi inoltre esibiscono una particolare biofunzionalità grazie alla quale supportano meglio l'adesione e la proliferazione cellulare rispetto ad altri materiali come i poliesteri. Nonostante la superiore biofunzionalità e biocompatibilità del collagene, esso non è esente da alcuni limiti importanti. In primo luogo, la sua processabilità è limitata, quindi una fine elaborazione e caratterizzazione della struttura dello scaffold risulta complicata. In secondo luogo, la riproduzione precisa degli scaffold prodotti con derivati del collagene risulta difficile da effettuare. Inoltre, la resistenza meccanica degli scaffold di derivati del collagene è molto inferiore degli altri materiali, come ad esempio i poliesteri. Questo comporta una difficoltà nel resistere alle tensioni meccaniche nel corso del tempo quando sono impiantati in vivo. Una soluzione a questo problema può essere la reticolazione con agenti che ne aumentino i legami cross-link e di conseguenza la resistenza

meccanica, anche se in modo moderato. Infine, poiché il collagene è un polimero naturale, è incline a indurre reazioni antigeniche e immunogeniche, anche se con bassa probabilità [22]. Nell'utilizzo di questo tipo di materiali in ambito biomedico, occorre prevedere dei trattamenti chimici atti a devitalizzarli e a garantirne la stabilità chimico-fisica nel tempo. La stabilità nel tempo è necessaria in virtù del fatto che con la devitalizzazione, la distruzione della parte cellulare rende impossibili i processi di autoriparazione del tessuto che nel tempo può andare in contro a fenomeni di disgregazione [7].

2.4 ELECTROSPINNING

2.4.1 PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO

L'electrospinning è una tecnica originariamente brevettata nel 1930, ma che ha conosciuto un rinnovato interesse per applicazioni in ingegneria tessutale negli ultimi anni, grazie anche ai recenti progressi nel campo delle nanotecnologie e al crescente riconoscimento del potenziale dei nanomateriali come scaffolds biocompatibili e biomimetici per le cellule [23-24]. L'apparato per electrospinning è formato da tre componenti principali: un generatore ad alta tensione, un serbatoio contenente la soluzione polimerica (per esempio una siringa con un ago di piccolo diametro) con o senza pompa di controllo del flusso, ed uno schermo metallico di raccolta messo a terra (collettore) [25]. Il collettore può essere di diverse tipologie ma generalmente si tratta o di una piastra stazionaria (**Fig.11**), per produrre fibre random, o di una piattaforma rotante (**Fig.12**) per la produzione di fibre sia random che allineate, a seconda della velocità di rotazione. L'intero apparato si trova solitamente all'interno di una teca chiusa, con possibilità di controllare temperatura e umidità. Operativamente, viene applicata una differenza di potenziale tra l'ago della siringa (polo positivo) ed il collettore metallico (polo negativo o terra) posto ad una certa distanza; quando la soluzione viene estrusa a portata controllata dalla siringa, sulla punta dell'ago si forma una goccia semisferica di soluzione polimerica; con l'aumento di tensione, sulla superficie della goccia si accumula una carica superficiale la quale, quando supera in valore la tensione superficiale della soluzione polimerica stessa, deforma la goccia originando una forma conica nota come il cono di Taylor, dal quale si origina un filamento nanometrico. Tale nanofibra con andamento elicoidale, raggiunge il collettore e vi si deposita. Il solvente evapora

durante la corsa al collettore metallico, aumentando la carica superficiale del getto polimerico. Questo incremento di carica superficiale induce instabilità nel getto che attraversa il campo elettrico. Per compensare tale instabilità, il getto di polimero si divide geometricamente prima in due getti, e poi in molti altri col ripetersi di questa procedura [24].

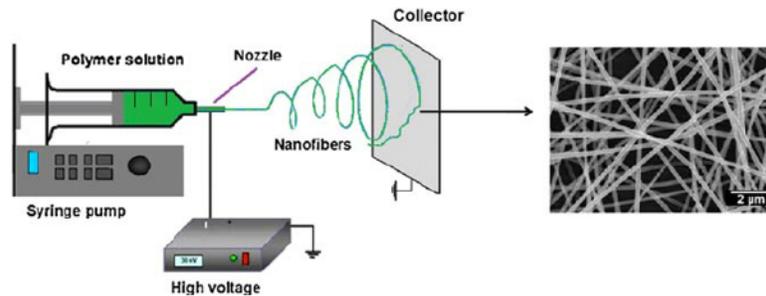


Figura 11. Schema dell'apparato da elettrofilatura con collettore a piastra [26].

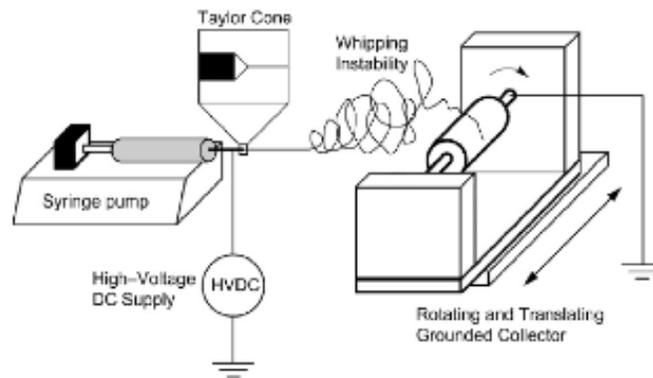


Figura 12. Schema dell'apparato da elettrofilatura con collettore rotante.

2.4.2 SCAFFOLD IN NANOFIBRE ELETTROFILATE

L'elettrospinning ha importanti applicazioni nell'ingegneria dei tessuti, in quanto permette la fabbricazione di scaffolds, con fibre nanometriche dai diametri variabili, che ricordano la natura fibrosa della matrice extracellulare (ECM), grazie alla loro elevata porosità e area superficiale. L'ECM è composta, infatti, da fibre, pori e altre caratteristiche superficiali con dimensioni

inferiori al micron. Si pensa che tali caratteristiche, in scala nanometrica, abbiano un impatto diretto sulle interazioni tra cellule e materiali dello scaffold, come la migrazione e l'orientamento cellulare [23]. E' noto come alcuni parametri estrinseci ed intrinseci influenzino la morfologia strutturale delle nanofibre [27], anche se l'esatta influenza di ciascuno di essi dipende dal particolare sistema polimero/solvente. In particolare, per produrre nanofibre uniformi, devono essere ottimizzati i parametri estrinseci, quali umidità ambientale e temperatura, e i parametri intrinseci come tensione applicata, distanza di lavoro, conducibilità, viscosità, e volatilità della soluzione polimerica [24], come mostrato in **Tab.4** [29].

Tabella 4. Effetti dei parametri intrinseci sulla morfologia delle fibre.

PARAMETRI	EFFETTO SULLA MORFOLOGIA DELLE FIBRE
Tensione applicata.	Aumentando la tensione, il diametro delle fibre diminuisce in un primo momento, poi torna ad aumentare.
Velocità di flusso (portata).	All'aumentare della velocità di flusso, aumenta il diametro delle fibre. Per velocità elevate si ha un aumento dei difetti dovuto al fatto che le fibre non si asciugano completamente prima di raggiungere il collettore.
Distanza ago-collettore.	All'aumentare della distanza, il diametro delle fibre diminuisce. Se la distanza è troppo piccola si formano dei difetti.
Concentrazione del polimero.	La concentrazione del polimero influenza sia la viscosità che la tensione superficiale della soluzione. Se la soluzione è troppo diluita la fibra polimerica si rompe prima di raggiungere il collettore per effetto della tensione superficiale, mentre se la soluzione è troppo concentrata la fibra non riesce a formarsi a causa dell'elevata viscosità. All'interno del range ottimale di concentrazioni, un aumento della concentrazione comporta un aumento del diametro della fibra.
Conducibilità della soluzione.	All'aumentare della conducibilità il diametro diminuisce. Soluzioni con elevata conducibilità sono altamente instabili in presenza di campi elettrici elevati e le fibre che ne derivano hanno un diametro variabile in un ampio range.
Volatilità del solvente.	All'aumentare della volatilità del solvente, aumenta la densità dei pori e delle microtessiture.

Gli scaffolds ottenibili con l'electrospinning possono essere tappeti (mats) di fibre random o

scaffold 2D/3D di fibre orientate. I primi, hanno applicazioni limitate nel campo dell'ingegneria dei tessuti a causa della loro bassa resistenza meccanica e isotropia [30]. Molti tessuti muscolo-scheletrici, infatti, presentano proprietà meccaniche significativamente anisotrope, riflettenti una matrice extracellulare altamente orientata. Per esempio, nei tendini e legamenti le proprietà tensili sono 200-500 volte superiori lungo la direzione delle fibre rispetto alla perpendicolare [24]. Per questo motivo, in molti settori dell'ingegneria tessutale, vengono principalmente realizzati scaffolds 3D di nanofibre allineate, sottoforma di bundles (le nanofibre sono disposte parallelamente tra loro, **Fig.12A**) o yarns (le nanofibre sono attorcigliate tra loro, **Fig.12B**).

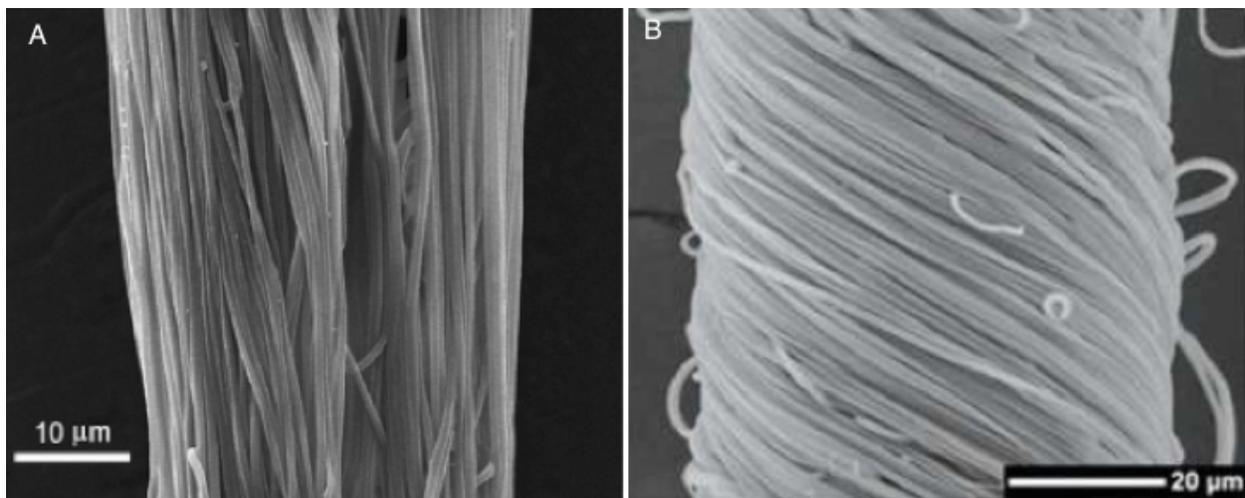


Figura 12. A). Morfologia fibre bundle; **12B).** Morfologia fibre yarns [30].

A tal proposito, sono stati effettuati degli studi su scaffolds 3D composti da fibre allineate tramite un apparato di electrospinning con collettore rotante, che mettesse in relazione la loro anisotropia meccanica con i parametri di produzione. Tali studi hanno evidenziato che l'organizzazione delle nanofibre è dipendente dalla velocità di rotazione del bersaglio; su un collettore fisso sono state prodotte fibre allineate solo per un 33%, mentre su un collettore rotante la percentuale di allineamento delle fibre raggiunge il 94%. Inoltre, gli scaffolds con fibre allineate hanno dimostrato avere proprietà meccaniche superiori; il modulo di elasticità è decisamente superiore per queste strutture nella direzione delle fibre, e tale anisotropia è più pronunciata a velocità di rotazione maggiori. Anche negli studi in coltura cellulare, l'allineamento delle cellule è stato dettato dall'orientamento prevalente delle fibre [24].

3 - SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto già avviato [3], che tenta di realizzare una nuova tipologia di scaffold in grado di riprodurre un'architettura simile al tessuto tendineo, cercando di individuare il livello gerarchico più adatto per poter ottenere un'unità costitutiva che sia in grado di approssimarne al meglio le caratteristiche meccaniche, consentendo allo stesso tempo la proliferazione cellulare e la formazione di nuova matrice extracellulare. L'unità costitutiva dello scaffold è stata individuata in bundles elettrofilati [32], costrutti tridimensionali porosi costituiti da miscele a diversa composizione di PLLA e Collagene, che mimano le proprietà meccaniche e la morfologia dei fascicoli tendinei. Il collagene presente nelle fibre realizzate con la tecnica dell'electrospinning, non è però organizzato a tripla elica, per cui tende a solubilizzare velocemente in ambiente fisiologico. In un precedente lavoro di tesi [31] è stato messo a punto un processo di reticolazione del collagene su scaffold bidimensionali, utilizzando EDC e NHS. Partendo da questi presupposti, lo scopo che questa tesi si è posto, è stato innanzitutto quello di ottimizzare la procedura di produzione dei bundles, in modo tale da ottenere fibre con una morfologia più simile possibile a quella dei fascicoli tendinei; in secondo luogo, si è cercato di confermare l'efficacia della reticolazione del collagene anche sui bundles tridimensionali, in termini di diminuzione del rilascio di questo in ambiente fisiologico; infine, si è valutato come la reticolazione possa far variare le proprietà meccaniche dei bundles appena reticolati e dopo l'invecchiamento in ambiente fisiologico per 7 e 14 giorni.

4 - PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI

I polimeri utilizzati per la produzione di bundles elettrofilati sono:

- 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);
- Collagene di Tipo I (Coll), estratto dalla pelle di bovino, fornito da Kensey Nash Corporation (Exton, USA).

I solventi utilizzati sono tutti di Sigma Aldrich:

- 1,1,1,3,3,3-Esafluoro-2-propanolo (HFIP);
- 2,2,2-Trifluoroetano (TFE);
- Etanolo (EtOH);
- Acetone;
- Acqua distillata;

Per l'agente reticolante sono stati utilizzati inoltre:

- N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide (EDC);
- N-idrossisuccinimide, (NHS).

Per il tampone fosfato:

- HK_2PO_4 ;
- Sodio Azide.

Nelle prove meccaniche è stata usata soluzione salina al 0.9%, 0.9% NaCl solution, S.A.L.F. S.p.A. Laboratorio Farmacologico, Cenate Sotto (BG).

Le soluzioni polimeriche che sono state preparate sono le seguenti:

- 15% (w/v) PLLA/Coll 75/25 in TFE/HFIP 50/50;
- 15% (w/v) PLLA/Coll 50/50 in TFE/HFIP 50/50.

Il primo termine percentuale peso/volume esprime la concentrazione del polimero; il contenuto relativo di PLLA e Collagene è espresso in rapporto peso/peso; infine il contenuto dei solventi nelle soluzioni è espresso come rapporto volume/volume.

4.2 PRODUZIONE DI BUNDLES 3D

Per la produzione dei bundles è stato utilizzato un apparato per electrospinning (**Fig.13**) composto dalle seguenti parti:

- Macchina da elettrofilatura (Spinbow Lab Unit, Spinbow S.r.l., Italy) [35];
- Pompa a siringa (KDSscientific 200 series) [35];
- 2 siringhe di vetro da 5 ml contenenti la soluzione polimerica;
- 2 Aghi da 0.51 mm in acciaio inossidabile (Hamilton);
- Collettore in alluminio a rullo (diametro 150 mm) posto a terra.

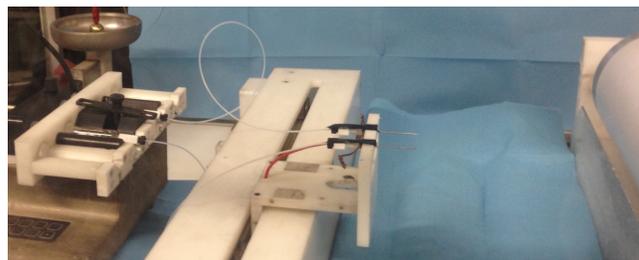


Figura 13. Apparato da elettrofilatura e setup macchina.

Per entrambe le soluzioni preparate si sono utilizzate le seguenti condizioni:

- Distanza collettore-ago 200 mm;
- Velocità di rotazione del collettore 2900 giri/min;
- Diametro ago 0.51 mm;
- Velocità di flusso della soluzione 0.5 ml/h;
- Voltaggio 22 kV;
- Temperatura e umidità ambientali.

Una volta terminata l'elettrofilatura, dopo circa 2 ore, il rullo è ricoperto da un tappetino costituito da fibre orientate tutte parallelamente al senso di rotazione del rullo. Lo scaffold viene quindi arrotolato trasversalmente alla lunghezza del rullo, ricoperto in precedenza di carta da forno per evitare un'adesione troppo forte tra fibre e collettore, fino ad ottenere il bundle finale di fibre allineate (**Fig.14**). Dall'intera larghezza del tappeto cilindrico ricoprente il rullo, sono stati ottenuti 8 bundles, suddividendo tale tappeto lungo l'asse principale in cilindri con stessa area di base e altezza di 50 mm. I bundles vengono poi separati dal collettore praticando un'incisione con il cutter, infine catalogati annotando:

- Data di produzione;
- Condizioni di filatura;
- Diametro della sezione appena elettrofilato;
- Lunghezza bundle appena elettrofilato;
- Peso bundle appena elettrofilato.



Figura 14. Bundle in fase di produzione sul collettore.



Figura 15. Bundle completo appena elettrofilato.

4.3 PROCESSO DI RETICOLAZIONE

I campioni sottoposti al processo di reticolazione sono 5 bundles PLLA/Coll 50/50 e 5 bundles PLLA/Coll 75/25 con una lunghezza compresa tra i 455-465 mm e un peso medio di 38.90 ± 5.78 mg per i campioni PLLA/Coll 50/50 e di 37.46 ± 6.01 mg per i campioni PLLA/Coll 75/25.

Il processo di reticolazione è stato ottimizzato in studi precedenti [31] e i campioni sono stati immersi nell'agente reticolante per 24 ore a temperatura ambiente (**Fig.16**). L'agente reticolante è una soluzione di EDC e NHS 0.02 M in miscela di etanolo/acqua distillata al 95/5 v/v.



Figura 16. Bundles immersi nell'agente reticolante.

Dopo 24 ore, i campioni sono stati prelevati dalla soluzione reticolante e hanno subito una serie di lavaggi prima in tampone fosfato (PBS) e poi in acqua distillata tramite la seguente procedura:

1. 30 minuti in tampone fosfato (PBS);
2. 2 ore in acqua distillata (cambiata ogni 15 minuti).

Lo scopo di tali lavaggi è quello di eliminare il reticolante in eccesso e stabilizzare il collagene reticolato: il passaggio in PBS è stato effettuato proprio perché è stato dimostrato in studi precedenti il suo effetto stabilizzante [33].

Infine i campioni sono stati lasciati asciugare per 48 ore (**Fig.17**) e quindi catalogati annotando:

- Diametro della sezione dopo reticolazione;
- Lunghezza dopo reticolazione;
- Peso dopo reticolazione.

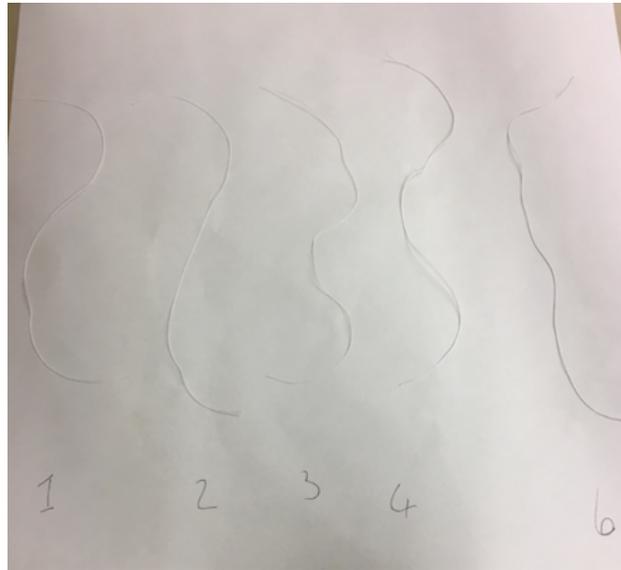


Figura 17. Bundles asciugati dopo la reticolazione.

4.4 PROCESSO DI INVECCHIAMENTO IN PBS DI BUNDLES RETICOLATI

Le prove di invecchiamento in condizioni fisiologiche sono state eseguite su quattro campioni reticolati per ciascuna delle due tipologie di bundles. Prima della prova sono state effettuate le misure gravimetriche per poterle poi confrontare con i dati al termine dell'indagine. Ogni campione è stato immerso in 50 ml di tampone fosfato (PBS: 0,1 M, pH = 7,4) con l'aggiunta di sodio azide per inibire la crescita di batteri (**Fig.18**).



Figura 18. Campioni immersi in PBS e sodio azide.

Sono stati poi incubati in un bagno ad acqua mantenuto a 37°C con agitazione (SW22 Julabo, 80 rpm, **Fig.19**). I campioni sono stati prelevati dal bagno in tempi differenti: due campioni per tipologia dopo 7 giorni, gli altri due dopo 14 giorni. Hanno subito lavaggi in acqua distillata, cambiata ogni 15 minuti per un tempo totale di 2 ore, al fine di eliminare i residui del tampone salino. Infine sono stati lasciati asciugare per 48 ore e pesati.



Figura 19. Agitatore SW22 Julabo [3s].

I campioni che verranno sottoposti alle prove meccaniche a trazione, ottenuti come descritto nei precedenti paragrafi, sono quindi di 8 tipologie:

1. PLLA/Coll 75/25 non reticolato;
2. PLLA/Coll 75/25 reticolato;
3. PLLA/Coll 75/25 reticolato e invecchiato per 7 giorni in PBS;
4. PLLA/Coll 75/25 reticolato e invecchiato per 14 giorni in PBS;

5. PLLA/Coll 50/50 non reticolato;
6. PLLA/Coll 50/50 reticolato;
7. PLLA/Coll 50/50 reticolato e invecchiato per 7 giorni in PBS;
8. PLLA/Coll 50/50 reticolato e invecchiato per 14 giorni in PBS.

4.5 METODI DI CARATTERIZZAZIONE

4.5.1 MICROSCOPIA OTTICA

L'analisi di microscopia ottica è stata realizzata con un microscopio ottico in luce polarizzata Axioskop Zeiss (ingrandimento dell'oculare x10, ingrandimento dell'obbiettivo x5, x20, x32). Il sistema è provvisto di una fotocamera (AxioCam MRc Zeiss) collegata ad un computer che permette l'acquisizione digitale delle immagini, elaborate poi con il software Axio Vision (**Fig.20**). Tale indagine è stata utilizzata per misurare i diametri dei bundles.



Figura 20. Microscopio ottico Axioskop Zeiss e computer.

4.5.2 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

I campioni sono stati fissati con del nastro biadesivo su dei porta-campioni in alluminio chiamati stub, che prima dell'analisi vengono rivestiti con un sottile strato d'oro per rendere conduttiva la superficie. Con la microscopia elettronica a scansione abbiamo analizzato la morfologia delle fibre sia longitudinalmente che lungo una sezione trasversale. Per ottenere le sezioni da analizzare, i bundles sono stati tagliati in azoto liquido dopo essere stati in immersione per 20

minuti insieme alle forbici utilizzate per il taglio. Poi sono stati fissati per un'estremità allo stub mentre l'altra estremità, tagliata in azoto liquido, è stata posta perpendicolarmente alla superficie dello stub con l'ausilio di un supporto su cui farla poggiare. Per l'analisi longitudinale, i bundles sono stati tagliati e fissati orizzontalmente sullo stub. Le osservazioni SEM sono state effettuate utilizzando un microscopio Philips 515 (**Fig.21**) ad una tensione di accelerazione di 15 kV. Le immagini sono state acquisite ed elaborate con il software EDAX Genesis.



Figura 21. Microscopio elettronico a scansione (SEM).

4.5.3 PROVE MECCANICHE A TRAZIONE

Le prove meccaniche a trazione sono state eseguite con una macchina di prova (Instron) sulla quale è stata montata una cella di carico da 1 kN, nelle seguenti condizioni:

- Tratto utile del provino 16 mm;
- Velocità traversa 16 mm/s;
- Frequenza di campionamento 1000 Hz;
- Velocità di deformazione 1 sec^{-1} ;
- Rampa di carico fino a rottura del provino;
- Temperatura ed umidità ambientali.

Per minimizzare la concentrazione di tensioni all'interfaccia tra tratto utile del provino e

afferraggi della macchina, con conseguente sottostima della tensione di rottura, e per ridurre le dimensioni dei campioni testati, sono state disegnate e prodotte delle apposite capstan-grips. Tale sistema di montaggio, che deriva da normative per prove meccaniche su funi, è realizzato in alluminio e permette di utilizzare campioni con tratto utile di soli 16 mm. Le grips presentano a ciascuna estremità un perno forato (di diametro 3 mm), attorno al quale viene fatto ruotare il bundle. Il campione viene poi fatto passare attraverso il foro posto nella parte anteriore del perno e bloccato con una guarnizione in gomma.

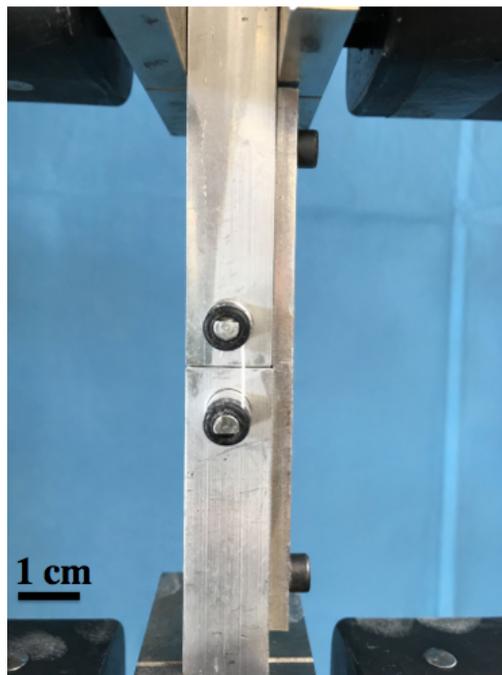


Figura 22. Grips con bundle montato.

Durante il montaggio del bundle, il sistema resta allineato grazie ad una traversa imbullonata che viene mantenuta anche durante l'inserimento del sistema di montaggio tra i morsetti della macchina di prova. Tramite una squadra si allineano le grips prima di serrare gli afferraggi della macchina di prova (**Fig.23**). Viene infine tolta la traversa laterale per dare inizio al test.

Per ognuna delle tipologie di campione abbiamo testato 5 provini da 70 mm l'uno, al fine di rispettare i vincoli imposti dal sistema di montaggio.

Prima del montaggio sulle grips, ogni campione è stato immerso in soluzione salina 0.9% per due minuti.

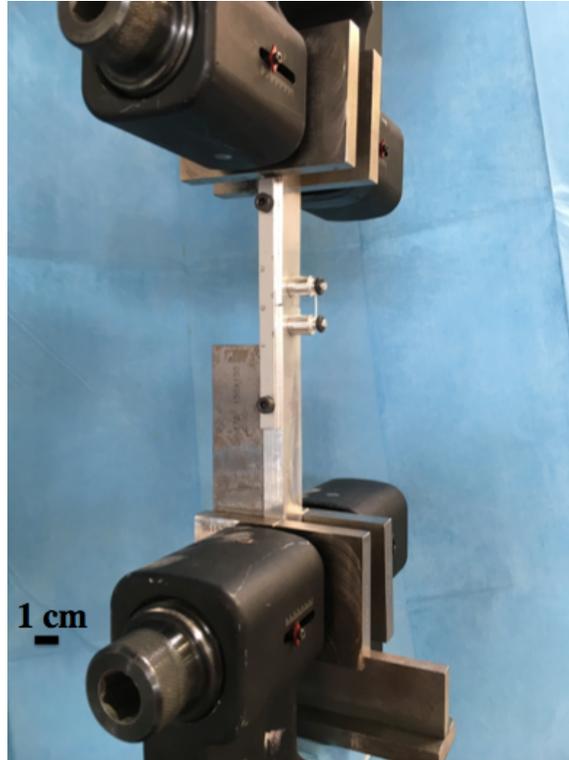


Figura 23. Allineamento grips nella macchina di prova.

4.5.4 ELABORAZIONE DATI

I dati ottenuti dalle prove meccaniche sono poi stati filtrati con un filtro mediano a 81 campioni, per ridurre il rumore. In seguito tali dati sono stati elaborati e condizionati partendo dai grafici tensione-deformazione in questo modo:

1. Esclusione dei dati al di sotto del 5% della tensione di rottura;
2. Individuazione ad occhio della tensione di snervamento preliminare;
3. Regressione lineare al 50% dell'intervallo tra la tensione di snervamento preliminare e il 20% della tensione di rottura;
4. Traslazione dell'1% verso destra della regressione lineare per individuare il limite di proporzionalità come intersezione tra la regressione e la curva tensione-deformazione;
5. Calcolo del modulo elastico come coefficiente angolare della regressione lineare dei punti del grafico compresi tra il 20% della tensione massima e il limite di

proporzionalità;

6. Calcolo del lavoro a snervamento (resilienza) e a rottura (tenacità) come integrale della curva tensione-deformazione, cioè come l'area sottesa dai grafici tramite il metodo dei trapezi.

5 - RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 OTTIMIZZAZIONE METODOLOGIA DI PRODUZIONE BUNDLES E MORFOLOGIA

I bundles sono stati ottenuti con la procedura descritta nel capitolo dei metodi 4.2. Una delle problematiche che abbiamo dovuto affrontare durante la produzione dei bundles, ha riguardato il calcolo della larghezza delle sezioni in cui dividere il tappetino elettrofilato sul rullo, in modo tale che arrotolando ciascuna sezione trasversalmente alla lunghezza della circonferenza, si ottenessero il maggior numero di bundles con diametro confrontabile con i fascicoli di tendine d'Achille. A tal proposito, come riferimento, ci si è basati sulle misure riportate in letteratura dal lavoro di P. Hanson et al. [13], in cui si riportano valori medi di diametri dei fascicoli del tendine d'Achille di 0.7 mm.

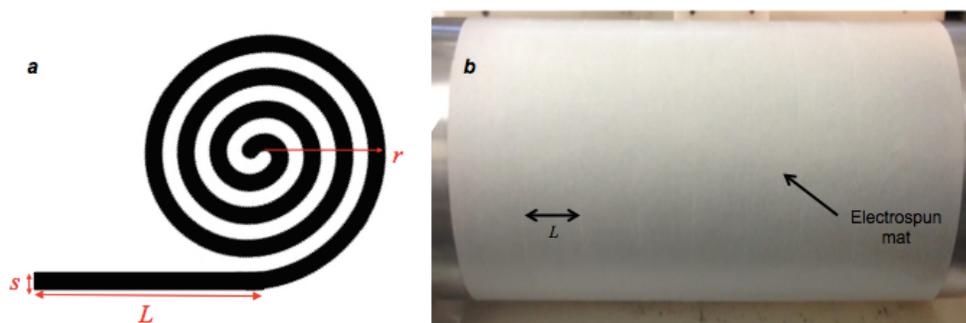


Figura 24. Approssimazione della relazione tra lo spessore del tappetino, la larghezza della sezione da arrotolare e il diametro del bundle.

In **Fig.24a** è rappresentata la sezione del bundle durante il processo di arrotolamento, approssimabile come una spira con luce nulla tra gli avvolgimenti. Per il calcolo abbiamo considerato il raggio del bundle completo (r), lo spessore del tappetino (s) e la lunghezza del tratto di tappetino da arrotolare per ottenere il bundle (L). In **Fig.24b** è mostrato il tappetino elettrofilato ed una sezione di larghezza L . E' possibile dunque uguagliare l'area della sezione

del tappetino (rettangolo di base L ed altezza s), e l'area della sezione del bundle (approssimabile quindi per quanto detto con l'area di un cerchio), come espresso dalla seguente equazione:

$$L \times s = \pi \times r^2 \quad \text{[Equazione 1]}$$

Per ottenere sezioni con diametro pari a circa 0.7 mm, siccome dopo due ore di filatura si ha uno spessore del tappeto che varia tra 0.005 mm (nelle estremità del rullo) e 0.01 mm (nella parte centrale del rullo), si ha che, applicando la **Eq.1**, L deve valere circa 50 mm.

Per quanto riguarda la morfologia, di seguito sono mostrate le immagini SEM delle sezioni dei bundles, tagliate in azoto liquido, per ogni tipologia di campione appena elettrofilato (**Fig.25**) e le corrispondenti immagini della superficie esterna dove è possibile osservare che le fibre sono allineate lungo l'asse del bundle (**Fig.26**).

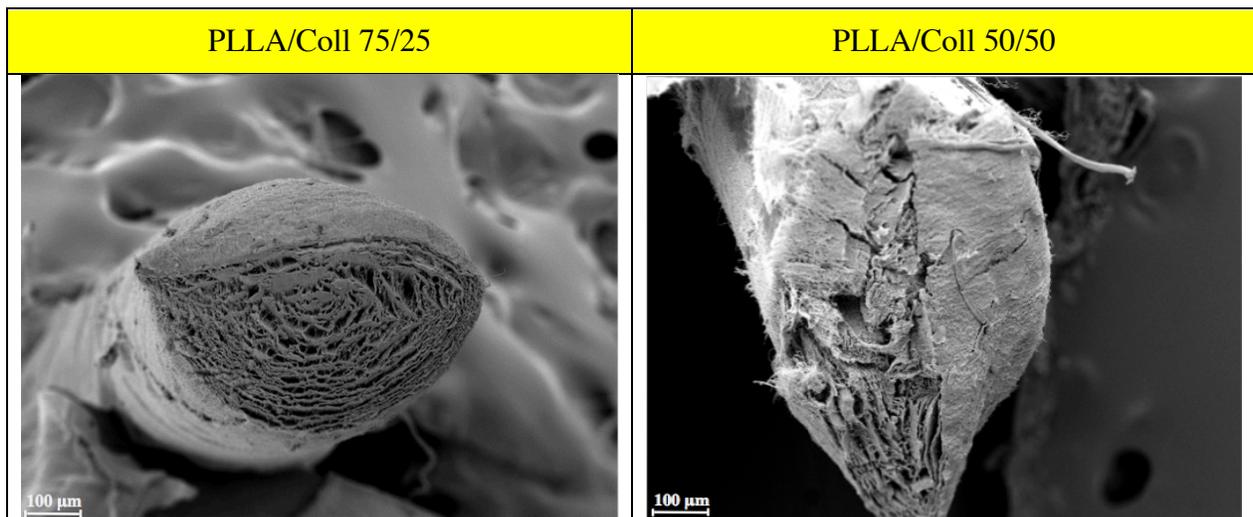


Figura 25. Immagini SEM delle sezioni dei bundles.

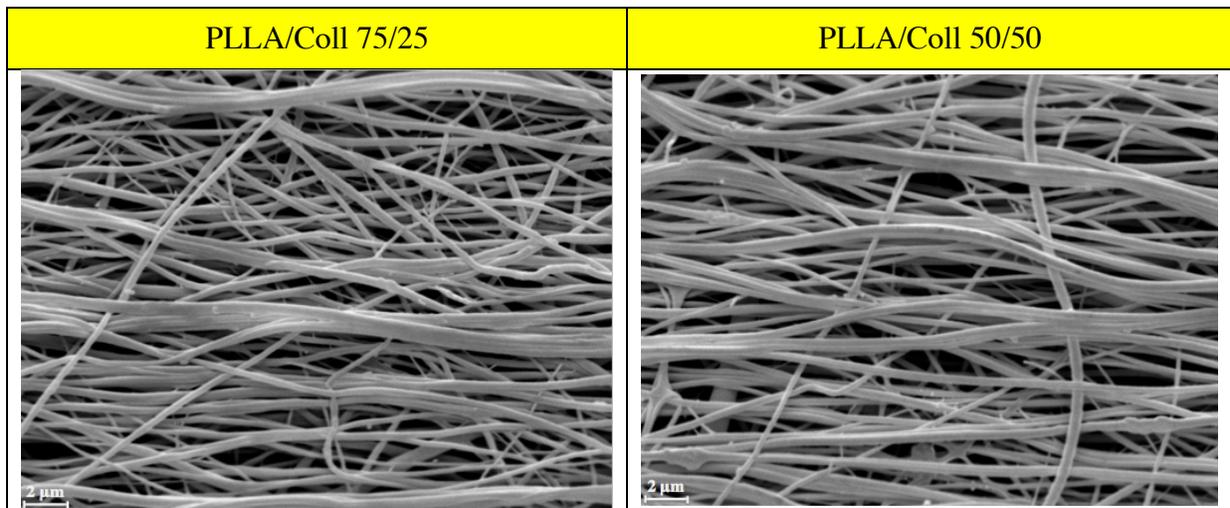


Figura 26. Immagini SEM della superficie esterna dei bundles.

La morfologia delle fibre è quella desiderata: sono presenti i pori utili alla proliferazione cellulare; le fibre risultano omogenee e continue; non sono presenti “beads”, cioè piccoli agglomerati sferici di polimero che si formano quando le condizioni di processo non sono ottimizzate.

Il diametro delle singole nanofibre è poco variabile; tali valori, che sono stati misurati con il microscopio ottico in luce polarizzata in 200 punti diversi lungo le fibre stesse, sono riportati in **Tab.5** per entrambe le composizioni. In **Tab.6** sono invece riportati i valori dei diametri dei bundles; anch’essi mostrano una debole variabilità, confermando che la procedura di elettrofilatura è ben ottimizzata.

Tabella 5. Diametri fibre.

CAMPIONE	DIAMETRO (μm)
75/25	0.325 \pm 0.08
50/50	0.385 \pm 0.13

Tabella 6. Diametri bundles.

CAMPIONE	DIAMETRO (μm)
75/25	662.9 ± 72.6
50/50	656.8 ± 51.2

Sono state catturate al SEM anche le immagini dei bundles appena reticolati, nelle due composizioni, sia superficialmente che in una sezione (**Fig.27**, **Fig.28**).

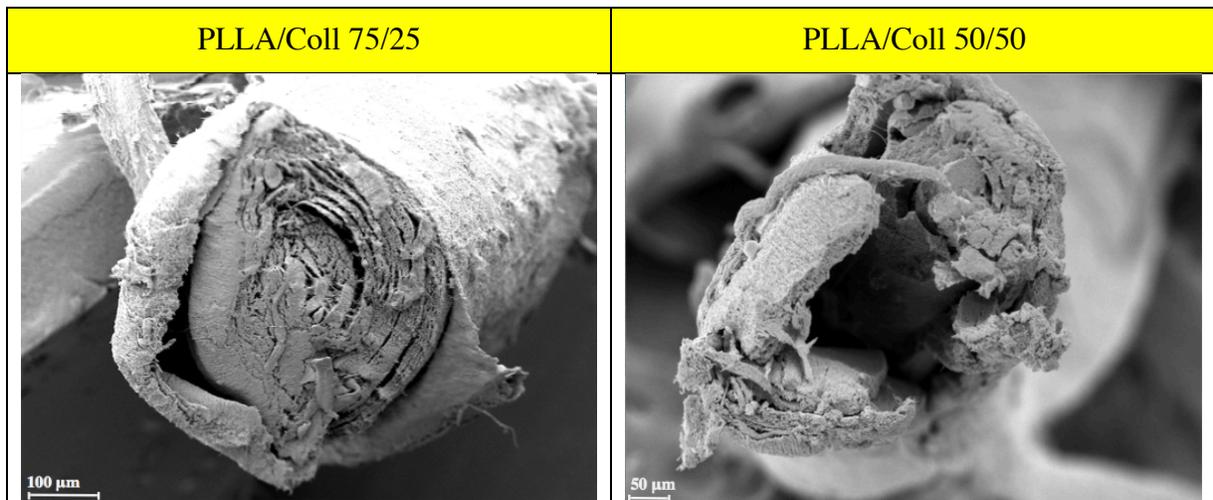


Figura 27. Immagini SEM delle sezioni dei bundles reticolati.

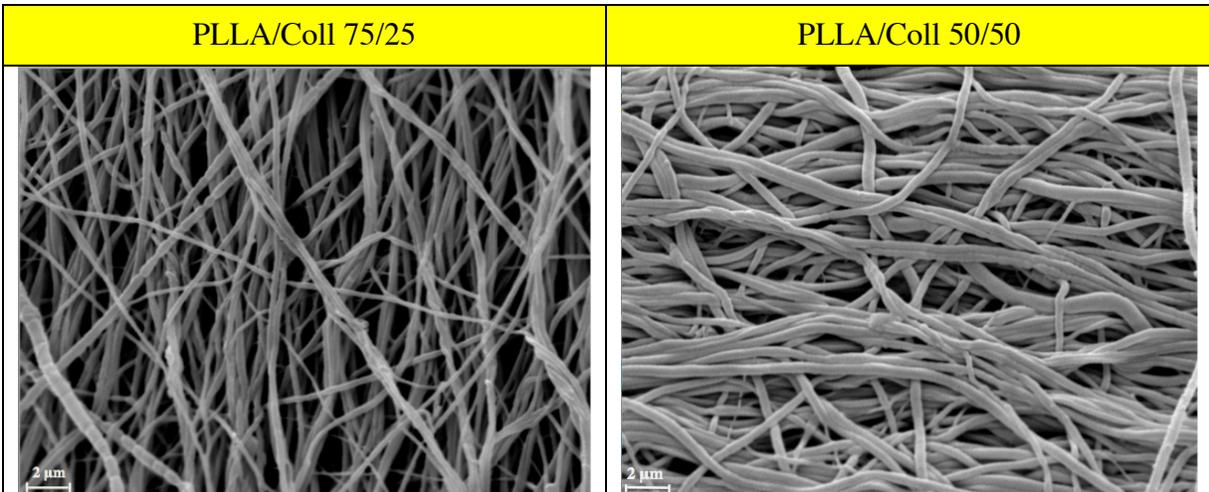


Figura 28. Immagini SEM della superficie esterna di bundles reticolati.

La morfologia fibrosa è stata conservata anche nei campioni reticolati per entrambe le miscele. In particolare, la struttura porosa si mantiene anche dopo la reazione di reticolazione. Questo è un dato di fondamentale importanza poiché è necessaria la presenza di pori interconnessi affinché possa avvenire la proliferazione cellulare.

5.2 PROVE DI INVECCHIAMENTO IN PBS DI BUNDLES RETICOLATI

Le prove di invecchiamento, avvenute come descritto nel paragrafo 4.4, sono servite per valutare l'efficacia della reticolazione del collagene. In particolare, è stato misurato il peso del campione subito dopo la sua produzione come riferimento, dopo la reticolazione e i lavaggi in acqua distillata (1), dopo 7 giorni (2) e 14 giorni (3) in PBS e sodio azide: un abbassamento del peso del bundle è da attribuire essenzialmente alla dissoluzione del collagene, dal momento che il PLLA degrada in tempi molto più lunghi (tipicamente dai 6 agli 8 mesi), come dimostrato da studi precedenti [31]. La **Tab.7** riporta le perdite di peso percentuali registrate nei tre momenti elencati sopra.

Tabella 7. Perdita peso per le due composizioni a 7 e 14 giorni in PBS e Sodio azide.

CAMPIONE	PERDITA DI PESO (%)		
	Post-lavaggi	7 giorni	14 giorni
PLLA/Coll 75/25	7.3±0.9	0.1±0.3	0*
PLLA/Coll 50/50	8.4±0.1	2.6±0.4	4.7±0.1*

* La perdita di peso a 14 giorni in PBS è calcolata rispetto ai valori post-lavaggi immediatamente successivi al processo di reticolazione.

I bundles PLLA/Coll 75/25 appena reticolati, hanno una perdita di peso inferiore al 10% subito dopo i lavaggi, che diventa pressoché nulla a 7 e 14 giorni. La perdita di peso è leggermente superiore per i 50/50, poiché hanno un quantitativo di collagene maggiore. Dalla tabella quindi risulta che dopo 14 giorni in PBS i bundles reticolati di PLLA/Coll 75/25 hanno perso poco più del 7% in peso in totale mentre quelli di PLLA/Coll 50/50 circa il 13%. Anche se una parziale solubilizzazione avviene comunque, è un ottimo risultato: bundles delle medesime composizioni con collagene non reticolato, perdevano fino al 40% del loro peso nella composizione PLLA/Coll 50/50 già dopo 48 ore in PBS [2]. Ciò conferma che la reticolazione è avvenuta con successo.

5.3 PROPRIETA' MECCANICHE

Per l'analisi delle proprietà meccaniche delle quattro tipologie di bundles (as spun, reticolati, invecchiati in PBS a 7 giorni e a 14 giorni) nelle due composizioni (PLLA/Coll 75/25 e PLLA/Coll 50/50), si è eseguita una prova a trazione secondo le modalità e le condizioni presentate nei capitoli 4.5.3. e 4.5.4. L'andamento delle curve tensione-deformazione per i diversi campioni analizzati con composizione PLLA/Coll 75/25 è presentato in **Fig.29**; per i bundles PLLA/Coll 50/50 in **Fig.30**.. Dall'osservazione di tali grafici è stato possibile notare che:

- Tutte le tipologie di bundles mostravano un comportamento non lineare al piede della curva simile ai fascicoli di collagene tendineo.
- Tutte le tipologie di bundles presentavano un comportamento duttile caratterizzato da un ampio tratto plastico.

- I bundles PLLA/Coll 75/25 erano caratterizzati da una maggiore rigidità e resistenza rispetto ai bundles con composizione PLLA/Coll 50/50.
- I bundles reticolati, per entrambe le composizioni, raggiungevano valori di tensione di rottura e snervamento, rigidità, deformazione e tenacità superiori ai non reticolati.
- A 7 e 14 giorni in PBS e sodio azide, i bundles perdevano parte delle loro proprietà meccaniche, che restavano comunque superiori, o nel range, dei valori dei bundles non reticolati appena elettrofilati.

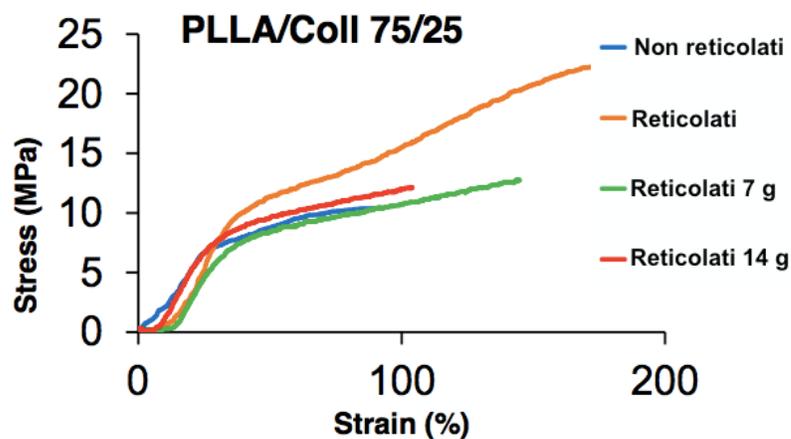


Figura 29. Grafico tensione-deformazione per le quattro tipologie di bundles PLLA/Coll 75/25.

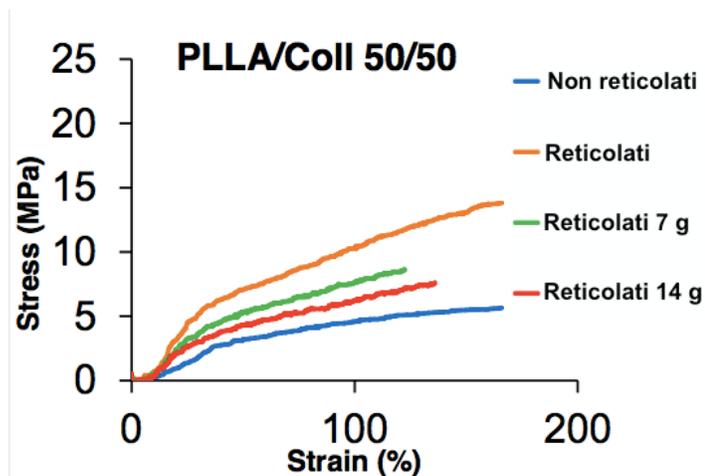


Figura 30. Grafico tensione-deformazione per le quattro tipologie di bundles PLLA/Coll 50/50.

In **Tab.8-11** sono riportati tutti i dati ottenuti dall'analisi delle curve con media e deviazione standard su cinque provini per campione, secondo le modalità descritte nel capitolo 4.5.4.

Tabella 8. Tensioni e deformazioni di snervamento e rottura dei bundles PLLA/Coll 75/25.

CAMPIONE	TENSIONE DI SNERVAMENTO (MPa)	TENSIONE DI ROTTURA (MPa)	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO (%)	DEFORMAZIONE DI ROTTURA (%)
Non reticolati	7.7±0.6	11.5±0.6	28.2±6.6	84.8±10.3
Appena reticolati	8.1±0.8	19.5±1.4	34.7±3.1	168.3±15.6
Invecchiati 7 gg in PBS	6.4±0.7	12.0±0.8	30.4±4.7	125.9±14.0
Invecchiati 14 gg in PBS	5.8±0.7	10.4±1.1	29.6±7.6	100.7±21.0

Tabella 9. Moduli elastici e tenacità dei bundles PLLA/Coll 75/25.

CAMPIONE	MODULO ELASTICO (MPa)	LAVORO A SNERVAMENTO (MPa)	LAVORO A ROTTURA (MPa)
Non reticolati	32.8±4.2	104.7±30.0	668.1±92.3
Appena reticolati	34.3±1.3	94.9±22.8	1989.1±293.6
Invecchiati 7 gg in PBS	31.4±3.2	68.3±17.8	997.0±149.0
Invecchiati 14 gg in PBS	33.0±4.0	53.0±11.4	677.4±194.3

Tabella 10. Tensioni e deformazioni di snervamento e rottura dei bundles PLLA/Coll 50/50.

CAMPIONE	TENSIONE DI SNERVAMENTO (MPa)	TENSIONE DI ROTTURA (MPa)	DEFORMAZIONE DI SNERVAMENTO (%)	DEFORMAZIONE DI ROTTURA (%)
Non reticolati	2.9±0.3	6.1±0.3	31.1±6.9	156.5±12.6
Appena reticolati	4.8±0.9	14.4±0.9	24.0±8.0	185.6±30.2
Invecchiati 7 gg in PBS	5.9±0.9	7.8±0.8	24.6±10.1	133.3±13.2
Invecchiati 14 gg in PBS	2.5±0.4	6.7±1.0	18.0±5.8	92.2±38.8

Tabella 11. Moduli elastici e tenacità dei bundles PLLA/Coll 50/50.

CAMPIONE	MODULO ELASTICO (MPa)	LAVORO A SNERVAMENTO (MPa)	LAVORO A ROTTURA (MPa)
Non reticolati	12.6±4.3	45.0±16.8	653.8±64.1
Appena reticolati	29.1±8.9	49.0±26.6	1698.8±290.0
Invecchiati 7 gg in PBS	15.9±2.4	30.8±24.6	641.3±68.4
Invecchiati 14 gg in PBS	15.5±5.0	17.1±7.5	389.1±212.3

Confrontando l'andamento dei grafici tensione-deformazione per i diversi bundles, e i valori ottenuti da tali grafici con i dati presenti in letteratura per i fascicoli di tendine d'Achille umano, si possono effettuare alcune considerazioni:

- La reticolazione contribuisce ad aumentare le proprietà meccaniche dei bundles per entrambe le composizioni, raggiungendo valori fisiologici per la tensione di rottura soprattutto nel caso dei PLLA/Coll 75/25. Questo fatto è da imputare all'aumento dei legami cross-link tra le macromolecole di collagene.
- Il modulo elastico, e quindi la rigidità dei bundles, non rientra invece nei valori fisiologici; inoltre, rispetto a studi precedenti su bundles non reticolati nelle due composizioni [2-32], i valori del modulo elastico risultano inferiori. Questo è dovuto al fatto che nei test meccanici i campioni sono stati idratati, ed essendo il collagene idrofilico, l'assorbimento di acqua ha contribuito ad una magnificazione del suo comportamento duttile. Ciò è particolarmente evidente nella miscela con collagene al 50% che non idratata aveva mostrato un comportamento fragile [2-32], mentre ora presenta un ampio tratto plastico.
- Per entrambe le composizioni, le proprietà meccaniche tendono a diminuire a 7 e 14 giorni in PBS e sodio azide, poiché nonostante la reticolazione, una piccola percentuale di collagene solubilizza comunque in acqua.

E' necessario fare ora alcune riflessioni. Innanzitutto, possiamo ritenere i valori ottenuti attendibili poiché con il sistema di afferraggio realizzato, i bundles si sono rotti nel tratto utile dei provini (**Fig.31**), permettendo quindi una stima corretta delle tensioni di rottura.

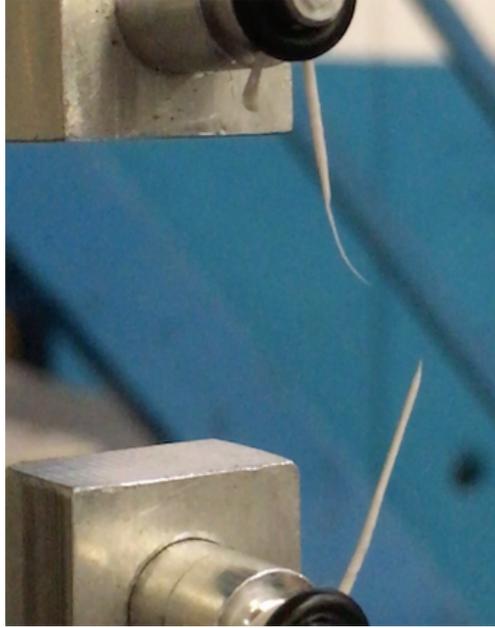


Figura 31. Rottura del bundle nel tratto utile.

In secondo luogo, nell'analisi dei risultati ottenuti, bisogna tenere presente che queste miscele di PLLA/Coll sono pensate per scaffolds biorassorbibili, ossia per svolgere una funzione di supporto temporanea per il tessuto tendineo danneggiato, in modo tale da permettere la penetrazione e proliferazione cellulare e la conseguente produzione di matrice extracellulare che dovrà sostituirsi alle nanofibre elettrofilate e prendersi carico delle tensioni reali a cui è sottoposto il tendine. Per questo motivo, la perdita di proprietà meccaniche a 7 e 14 giorni non deve destare preoccupazione, in quanto il tessuto tendineo avrà già ricominciato a rigenerarsi e ad assorbire i carichi di lavoro. Perciò è già un ottimo risultato che i bundles appena reticolati rientrino all'interno del range dei valori fisiologici. Inoltre, le tensioni che deve sopportare il tendine in fase di convalescenza sono sicuramente inferiori rispetto a quelle a cui è sottoposto tale tessuto in soggetti sani. Il comportamento duttile dei bundles è, infine, una caratteristica necessaria per questi scaffolds, poiché permette di avere un fattore di sicurezza che consente di evitare una rottura improvvisa dei bundles in modo fragile in caso di picchi improvvisi di tensione e ridurre il rischio di un precoce fallimento dell'impianto.

6 - CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati prodotti, reticolati e caratterizzati scaffolds 3D porosi, costituiti nanofibre allineate di acido poli-L-lattico e da collagene in due composizioni diverse (PLLA/Coll 75/25 e PLLA/Coll 50/50), che potessero mimare la struttura gerarchica e le proprietà meccaniche dei fascicoli di collagene del tendine d'Achille umano, da utilizzare nel campo dell'ingegneria del tessuto tendineo.

Lo scopo di questo lavoro di tesi era quello di ottimizzare la produzione di bundles elettrofilati, di verificare l'efficacia della reticolazione del collagene sui bundles per limitare la sua dissoluzione in ambiente acquoso, di mettere a punto un set-up per prove meccaniche e di valutare l'influenza della reticolazione sulle proprietà meccaniche dello scaffold, analizzando anche bundles reticolati ed invecchiati in PBS, per mimare quindi le condizioni in cui si troverebbero tali strutture una volta inserite all'interno del corpo umano. Per la realizzazione dei bundles è stata utilizzata la tecnica dell'elettrofilatura, con collettore a rullo rotante, per produrre nanofibre polimeriche parallele, che mimassero la struttura delle fibre di collagene del tendine umano. Il PLLA è stato scelto per le sue buone proprietà meccaniche e la sua biodegradabilità; il collagene per la sua bioattività che favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare. È stato ottimizzato il processo di produzione dei bundles, grazie ad una relazione semplificativa tra diametro del bundle e spessore del tappeto elettrofilato sul rullo, in modo tale da ottenere diametri paragonabili a quelli dei fascicoli del tendine d'Achille. Prima di procedere con la reticolazione, è stata effettuata un'indagine al SEM delle strutture ottenute, che ha mostrato che i bundles sono costituiti da fibre continue di diametro piuttosto costante, che formano una struttura altamente porosa, quindi ottimale per la penetrazione e proliferazione delle cellule. La procedura di reticolazione del collagene è stata realizzata sfruttando le conoscenze sulla reticolazione di collagene elettrofilato già precedentemente ottimizzato [31] : i bundles nelle due composizioni, sono stati mantenuti in una soluzione di EDC/NHS in etanolo al 95% per 24 h. Dopo i lavaggi in PBS e acqua distillata per stabilizzare l'agente reticolante ed eliminarne la quantità in eccesso, i campioni sono stati sottoposti nuovamente all'analisi SEM per valutare i cambiamenti morfologici. La reticolazione non ha portato grossi cambiamenti nella morfologia delle fibre e lo scaffold ha mantenuto la struttura porosa di partenza, fondamentale, come già detto, per la

proliferazione cellulare. Per valutare l'efficacia della reticolazione sono state effettuate delle prove gravimetriche sia dopo i lavaggi immediatamente successivi alla procedura di reticolazione, sia dopo 7 e 14 giorni di immersione in PBS in condizioni fisiologiche a pH (7.4) e temperatura (37°). Le perdite di peso si sono esaurite quasi completamente dopo i lavaggi, restando comunque decisamente inferiori ai valori riportati in studi precedenti circa le perdite di peso di scaffolds nelle medesime composizioni ma non reticolati [3] : la reticolazione è avvenuta con successo. Per valutare le proprietà meccaniche dei bundles sono state effettuate delle prove a trazione, in seguito alla messa a punto di un sistema di afferraggio idoneo, che limitasse le concentrazioni di tensione nei punti di afferraggio del campione in modo da evitare di falsare la misura. Le prove sono state effettuate su bundles idratati, di entrambe le composizioni, per ciascuna delle quattro tipologie (appena elettrofilati, reticolati, invecchiati 7 giorni in PBS, invecchiati 14 giorni in PBS). Da tali test è emerso che la reticolazione ha portato ad un incremento delle proprietà meccaniche per entrambe le miscele, raggiungendo valori fisiologici per tenacità, tensione di rottura e deformazioni; il modulo elastico, invece, resta piuttosto basso. L'idratazione ha, inoltre, incrementato il comportamento plastico dei campioni. Dopo 7 e 14 giorni in condizioni fisiologiche, i bundles perdono parte delle loro proprietà meccaniche che rimangono comunque superiori (o nel range) dei valori dei bundles non reticolati appena elettrofilati. Infine tutti i bundles presentano un andamento della curva tensione-deformazione qualitativamente simile a quello dei fascicoli di tendine umani, con un piede della curva non lineare.

Resta ancora tuttavia da incrementare il modulo elastico. La soluzione potrebbe essere quella di utilizzare un polimero sintetico biorassorbibile con proprietà meccaniche differenti dal PLLA, sempre in combinazione con il Collagene per garantire la bioattività dello scaffold.

Per quanto riguarda i possibili sviluppi futuri di questo studio, sarebbe interessante la realizzazione di uno scaffold multi-scala costituito dall'unione di bundles con composizione combinata di PLLA e Collagene, per valutare le proprietà meccaniche dello scaffold completo. Sarà da valutare, inoltre, il comportamento dei bundles sottoposti a carichi ciclici in condizioni fisiologiche, imponendo un numero di cicli paragonabile a quelli realmente subiti dai fascicoli di tendine umani nel periodo di convalescenza. Un altro aspetto fondamentale da valutare, riguarda i test di vitalità e proliferazione cellulare *in vitro*, che hanno già fornito risultati positivi per scaffolds non reticolati in queste composizioni [32]. Per realizzare questi studi, sono stati inviati

dei campioni di bundles reticolati all'Università di Sheffield. Infine, lo scaffold potrebbe essere utilizzato in combinazione con un bioreattore, per promuovere la proliferazione cellulare *in vitro*, da innestare poi sul paziente al bisogno.

7 - RINGRAZIAMENTI

Terminata questa prima tappa del mio percorso di studi, sento di dover ritagliare uno spazio per ringraziare le persone che lo hanno reso possibile.

Ringrazio il mio relatore, il Prof. Ing. Luca Cristofolini, poiché mi ha permesso di partecipare a un lavoro di tesi così interessante e stimolante che, oltre ad avermi arricchita dal punto di vista scientifico, mi ha permesso di avvicinarmi e di cominciare a comprendere il mondo della ricerca. Ringrazio la Dott.ssa Chiara Gualandi e la Prof.ssa Maria Letizia Focarete del gruppo di Macromolecole del Dipartimento di Chimica Giacomo Ciamician, per i suggerimenti che mi hanno elargito in questi mesi, in una disciplina che non conoscevo approfonditamente. Sento di dovere un ringraziamento particolare all'Ing. Alberto Sensini, per avermi seguita passo dopo passo in questo lavoro di tesi, nonostante i numerosi impegni, con professionalità e dedizione, supportandomi e fornendomi gli strumenti giusti per poter svolgere al meglio il mio lavoro.

Tutto ciò non sarebbe stato possibile senza il sostegno economico, ma soprattutto morale, della mia famiglia, alla quale va un ringraziamento speciale, per avermi supportata (e sopportata) nel corso degli ultimi tre anni, senza che mai venisse meno la fiducia di cui avevo bisogno.

Ringrazio Tommaso per essere stato sempre il primo a credere in me, anche quando non lo facevo io; perché mi ha saputo comprendere ed ha sempre trovato le parole giuste in ogni occasione, che mi permettessero di affrontare ogni sfida con maggiore serenità.

Ringrazio le mie amiche di sempre, per essermi state vicine in ogni momento di questi tre anni così come in ogni momento da quando ci conosciamo: Greta, per la tua sincerità e la tua capacità di parlare senza mezzi termini, spesso l'unico aiuto di cui avevo bisogno; Bonni, per la tua riflessività e dolcezza, che "purtroppo" traspare anche quando non vuoi farti abbracciare; Sara, per la tua capacità di ascoltare, perché ti conosco da sempre e dopo tutti questi anni siamo ancora qui; Marti, per la carica e la forza che trasmetti; sei un serbatoio di energia, necessario alle volte.

Infine, un ringraziamento va ai miei compagni di facoltà, con i quali ho condiviso ogni vittoria e sconfitta di questo percorso universitario, con molti dei quali ho stretto amicizie che penso e spero dureranno anche una volta che le nostre strade si saranno separate: Ale, Mario, Guido, Frenk, Lori, Ire etc. Un grazie speciale va ad Elisa, con la quale ho affrontato ogni singola sfida, dal primo giorno e, con la quale, ho condiviso molto più che gioie e dolori della vita universitaria, rivelandosi una persona fondamentale per me.

8 - BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Kannus, *Structure of the tendon connective tissue*. Scand J Med Sci Sports, 2000: 10:312–320.
- [2] Kastelic J, Galeski A, Baer E., The multicomposite structure of tendon. Connect Tissue Res. 1978;6(1):11-23.
- [3] Tesi di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica: *Sviluppo e caratterizzazione di scaffold elettrofilati per la ricostruzione del tessuto tendineo*. Laureando: Alberto Sensini, Relatore: Luca Cristofolini, Correlatori: Maria Letizia Focarete, Chiara Gualandi.
- [4] Marco Franchi, Alessandra Trirè, Marilisa Quaranta, Ester Orsini, Victoria Ottani, *Collagen structure of tendon relates to function*. TheScientificWorldJOURNAL, (2007) 7, 404–420.
- [5] Elizabeth G. Canty, Karl E. Kadler, *Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis*. Journal of Cell Science 2005 118: 1341-1353.
- [6] J.H. Yoon and J. Halper, *Tendon proteoglycans: biochemistry and function*. J Musculoskeletal Neuronal Interact 2005; 5(1):22-34.
- [7] Riccardo Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*. Pàtron editore (1996).
- [8] Constantinos N. Maganaris and Marco V. Narici, *Mechanical Properties of Tendons*.
- [9] Nicola Maffulli, Louis C. Almekinders, *The Achilles Tendon*, Springer (2007).
- [10] Szaro P, Witkowski G, Smigielski R, Krajewski P, Cizek B, *Fascicles of the adult human Achilles tendon – An anatomical study*. Ann Anat. 2009 Dec;191(6):586-93.
- [11] 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.

- [12] Schepsis AA, Jones H, Haas AL., *Achilles tendon disorders in athletes*. Am J Sports Med. 2002 Mar-Apr;30(2):287-305.
- [13] Wren TA1, Yerby SA, Beaupré GS, Carter DR, *Mechanical properties of the human achilles tendon*. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2001 Mar;16(3):245-51.
- [14] 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.
- [15] Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, and D. Sakthi Kumar, *Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review*. International Journal of Polymer Science Volume 2011, Article ID 290602, 19 pages.
- [16] B. P. Chan Æ K. W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. Eur Spine J (2008) 17 (Suppl 4):S467–S479.
- [17] J. R. Fuchs, B. A. Nasser, and J. P. Vacanti, *Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction*. Annals of Thoracic Surgery, vol. 72, no. 2, pp. 577–591, 2001.
- [18] Fergal J. O’Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materialstoday, March 2011, vol. 14, number 3.
- [19] Milena S. Lopes, André L. Jardini and Rubens M. Filho, *Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications*. Chemical Engineering Transactions, vol. 38, 2014.
- [20] Sneha Mohan, Oluwatobi S. Oluwafemi, Nandakumar Kalarikkal, Sabu Thomas and Sandile P. Songca, *Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology*. Book: ‘Recent Advances in Biopolymers’, Chapter 3, edited by Farzana Khan Parveen, ISBN 978-953-51-2255-5, Published: March 9, 2016.
- [21] K. Hamad, M. Kaseem, H.W. Yang, F. Deri, Y. G. Ko, *Properties and medical applications of polylactic acid: A review*. eXPRESS Polymer Letters Vol.9, No.5 (2015) 435–455.

- [22] Liu Y. et. al., *Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies*. Trends in Biotechnology, 26 (4), 201-209, 2006.
- [23] John J. Stankus, Jianjun Guan, Kazuro Fujimoto, and William R. Wagner, *Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix*. Biomaterials. 2006 February ; 27(5): 735–744.
- [24] Wan-Ju Li and Rocky S. Tuan, *Fabrication and Application of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering*. Curr Protoc Cell Biol. 2009 March ; CHAPTER: Unit–25.2.
- [25] Zheng-Ming Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna, *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology 63 (2003) 2223–2253.
- [26] Younes Pilehvar-Soltanahmadi, Abolfazl Akbarzadeh, Nasim Moazzez-Lalaklo, Nosratollah Zarghami, *An update on clinical applications of electrospun nanofibers for skin bioengineering*. Artificial Cells 44(6):1-15 · May 2015.
- [27] Jayesh Doshi and Darrell H. Reneker, *Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers*. Journal of Electrostatics 35 (1995) 151-160.
- [28] Rayleigh JWG. Lond. Edinburgh Dublin Phil. Mag. 1882, 14, 184.
- [29] Travis J. Sill, Horst A. von Recum, *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials 29 (2008) 1989-2006.
- [30] Usman Ali, Yaqiong Zhou, Xungai Wang and Tong Lin (2011), *Electrospinning of Continuous Nanofiber Bundles and Twisted Nanofiber Yarns*, Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications, Dr. Tong Lin (Ed.), ISBN: 978-953-307-420-7, InTech.
- [31] Tesi di laurea in Chimica e Chimica dei Materiali: *Reticolazione di scaffold elettrofilati per la ricostruzione del tessuto tendineo*. Laureando: Michele Segala, Relatore: Chiara Gualandi, Correlatore: Alberto Sensini.

- [32] A. Sensini, C. Gualandi, L. Cristofolini, G. Tozzi, M. Di carlo, 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.
- [33] E. Khor. Elsevier, *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses*. (Biomaterials), 1997, Vol. 18, 95-105.
- [34] A. Sensini, M. L. Focarete, C. Gualandi, G. Tozzi, L. Cristofolini, *Biomechanical Suitability Of Scaffolds Made Of Electrospun Bundles For Tendon Repair*. Bone Joint J, 99-B(SUPP 1), 42. Accessed January 31, 2017.
- [35] Davide Fabiani, Marco Zaccaria, Juri Belcari, Oliviero Bocchi, Andrea Zucchelli. *Electrospun nanofibers with piezoelectric properties*. 2015 Electrical Insulation Conference (EIC), Seattle, Washington, USA, 7-10 June 2015.

9 - SITOGRAFIA

[1s] http://dma.ing.uniroma1.it/users/scicostr_c1/RdBM_Cap_4.pdf

[2s] http://campus.unibo.it/195573/19/BIOMATERIALI%20%20%20Polimerici_F.pdf

[3s] www.julabo.com