



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**TECNICHE DI STERILIZZAZIONE E CONSERVAZIONE APPLICATE AI
TESSUTI TENDINEI E CONSEGUENTI EFFETTI SULLE PROPRIETÀ
BIOMECCANICHE**

Relatore: Prof.ssa C. G. Fontanella

Laureanda: Orietta Lazzaron

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 21/11/2023

INDICE

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUZIONE | 6 |
| CAPITOLO I: Caratterizzazione anatomica dei tessuti tendinei | 7 |
| I.1 Introduzione | 7 |
| I.2 Composizione e struttura | 8 |
| I.2.1 Macrostruttura..... | 8 |
| I.2.2 Microstruttura | 10 |
| I.3 Proprietà meccaniche dei tendini..... | 13 |
| I.4 Viscoelasticità..... | 16 |
| I.5 Modifica proprietà meccaniche | 17 |
| CAPITOLO II: Principali tecniche di sterilizzazione e conservazione | 19 |
| II.1 Introduzione..... | 19 |
| II.2 Metodi di sterilizzazione più comunemente utilizzati..... | 20 |
| II.2.1 Sterilizzazione chimica e processi proprietari..... | 21 |
| II.2.2 Sterilizzazione con raggi gamma e fascio di elettroni..... | 24 |
| II.3 Meccanismo delle radiazioni ionizzanti | 26 |
| II.4 Vantaggi della sterilizzazione con radiazioni..... | 27 |
| II.5 Effetto delle radiazioni e trattamenti radioprotettivi | 28 |
| II.6 Metodi di conservazione dei tessuti tendinei | 29 |

| | |
|--|---------------|
| CAPITOLO III: Valutazione degli effetti provocati dai metodi di sterilizzazione e conservazione sulle proprietà dei tessuti tendinei..... | 31 |
| III.1 Introduzione | 31 |
| III.2 Analisi effetti su Tibiale Anteriore e Peroneo Lungo. | 33 |
| III.2.1 Materiali e metodi | 33 |
| III.2.2 Risultati | 36 |
| III.2.3 Analisi dati | 39 |
| III.3 Analisi effetti su cinque tipologie di tendini | 42 |
| III.3.1 Materiali e metodi | 43 |
| III.3.2 Risultati | 44 |
| III.3.3 Analisi dati | 46 |
| III.4 Conclusioni | 47 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 50 |

ABSTRACT

L'utilizzo delle procedure di sterilizzazione e conservazione dei tessuti biologici serve ad evitare che si verifichino episodi di trasmissione di infezioni o sviluppo di malattie nei pazienti sottoposti ad un intervento di ricostruzione con tessuti sterilizzati. Il lavoro presentato in questo elaborato consiste nel descrivere le tecniche di sterilizzazione e conservazione applicate ai tessuti tendinei ed analizzare i conseguenti cambiamenti biomeccanici che si possono verificare.

Utilizzando articoli presenti in letteratura è stato possibile descrivere le procedure di sterilizzazione più diffuse come radiazione gamma e radiazione tramite fascio di elettroni, inoltre è stato possibile introdurre i metodi di conservazione applicati più frequentemente come ad esempio il congelamento a basse temperature. Considerando test meccanici su varie tipologie di tendine sono state raccolte informazioni riguardanti le variazioni delle proprietà biomeccaniche dei tessuti analizzati.

Questa ricerca permette di osservare come ogni tendine trattato reagisca in maniera differente ai test di prova, subendo variazioni nelle sue caratteristiche fisiche che risultano essere favorevoli ad un utilizzo clinico oppure variazioni dannose che escludono eventuali impieghi futuri poiché non garantiscono una funzione corretta del tendine.

INTRODUZIONE

L'obbiettivo di questa tesi consiste nell'approfondire lo studio relativo alle tecniche di sterilizzazione e conservazione applicate ai tessuti biologici, con particolare attenzione ai tessuti tendinei, e la loro influenza sulle proprietà biomeccaniche.

Il primo capitolo descrive la struttura, la composizione anatomica e le caratteristiche dei tendini; quindi, vengono introdotte le principali componenti che ne fanno parte e le proprietà meccaniche. L'unione di questi aspetti permette al tessuto di svolgere la sua funzione principale ovvero trasmettere la forza creata dal muscolo all'osso e quindi consentire i movimenti articolari.

Nel secondo capitolo vengono presentate e descritte alcune delle principali tecniche di sterilizzazione come l'irradiazione con raggi gamma e fascio di elettroni, ed i metodi di conservazione utilizzati più frequentemente ovvero congelamento, liofilizzazione e crioconservazione. Vengono descritte le caratteristiche principali dei processi sottolineando i vantaggi e le possibili problematiche che si possono verificare.

Nel terzo capitolo vengono analizzati gli effetti della sterilizzazione e della conservazione sulle proprietà biomeccaniche di alcune tipologie di tendini selezionati. Sono presentati test meccanici uni-assiali effettuati su campioni come il Peroneo lungo, il Tibiale anteriore, il tendine d'Achille e il quadricipite.

CAPITOLO I

CARATTERIZZAZIONE ANATOMICA DEI TESSUTI TENDINEI

I.1 Introduzione

In questo primo capitolo viene approfondita la struttura anatomica dei tendini dal punto di vista macroscopico; ovvero verranno descritti aspetti come: annessi tendinei, vascolarizzazione ed innervazione. Inoltre, dal punto di vista microscopico si parlerà della struttura gerarchica dei tendini (costituita da molecole di collagene, fibrille e fasci di fibre) e la componente cellulare. In seguito, vengono descritte le proprietà biomeccaniche dei tendini, aspetto che permetterà di introdurre alcune delle più frequenti tecniche di sterilizzazione e conservazione, in quanto è estremamente importante che queste ultime interferiscano il meno possibile sulle proprietà dei tessuti tendinei nel corso delle loro applicazioni.

I tendini (Fig.1) sono strutture portanti che trasmettono le forze dal muscolo all'osso collegandoli tra loro e quindi assicurando la continuità meccanica e il moto dell'articolazione. Questo è reso possibile dalla complessa struttura macroscopica e microscopica dei tendini e dalle fibre tendinee [1]. Tipicamente, ogni muscolo ha due tendini, prossimale e distale. Il punto di passaggio tra muscolo e tendine viene definito giunzione mio-tendinea e il punto in cui i tendini si ancorano saldamente all'osso viene definito giunzione osteo-tendinea [1]. L'attaccamento del tendine prossimale di un muscolo all'osso è chiamato origine muscolare, mentre quello del tendine distale è detto inserzione. In anatomia, i tendini vengono descritti come strutture di colore bianco con sezione circolare o ellittica e di consistenza fibro-elastica, sono resistenti alla trazione e al carico meccanico [1]. Possono sopportare carichi elevati adattando la loro struttura e composizione grazie all'azione delle cellule tendinee che si trovano al loro interno [2].

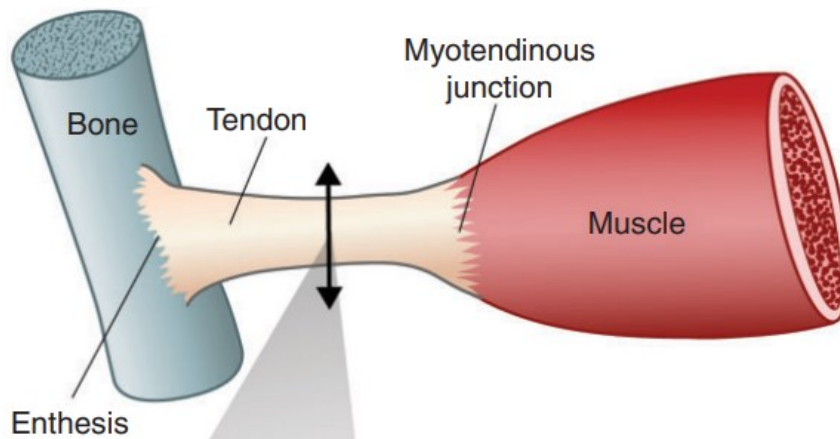


Fig.1- Tendine, giunzione mio-tendinea (myotendinous junction) e giunzione osteo-tendinea (enthesis). [3]

I.2 Composizione e struttura

I.2.1 Macrostruttura

I tendini possiedono strutture satelliti dette annessi tendinei, che hanno il compito di facilitare lo scorrimento del tessuto sulle strutture anatomiche circostanti e far sì che il tendine mantenga la sua linea d'azione durante la contrazione muscolare [1]. Gli annessi tendinei sono i seguenti: guaine fibrose, guaine sinoviali, foglietti peritendinei, pulegge di riflessione e borse tendinee. Le due guaine, fibrosa e sinoviale, hanno principalmente il compito di rivestire ed agevolare il tendine durante il suo scorrimento. In particolare, le guaine fibrose rappresentano i canali di scorrimento entro i quali i tendini sono avvolti da una guaina fibrocartilaginea [1]. La guaina sinoviale, essendo abbondantemente vascolarizzata, permette il regolare apporto di sostanze nutritive. Ad esempio, tendini che si piegano nettamente, come i tendini flessori delle dita, sono racchiusi da una guaina sinoviale che riduce le frizioni con le ossa o i legamenti adiacenti [1]. I foglietti peritendinei, presenti nella maggior parte dei tendini, hanno una funzione simile a quella delle guaine sinoviali, consentendo un maggiore movimento del tendine rispetto alle strutture circostanti, mentre le pulegge di riflessione hanno il compito di contenere il tendine all'interno del letto di scorrimento e sono situate nei punti in cui si presentano delle curvature [1]. Infine, le borse tendinee hanno la funzione di minimizzare l'attrito tra il tendine e le strutture ossee adiacenti ovvero evitare che una prominente ossea possa comprimere o danneggiare il tendine stesso [1].

Vascolarizzazione ed innervazione rappresentano un altro aspetto importante riguardante la struttura macroscopica dei tendini [2]. I tendini hanno un apporto vascolare ridotto rispetto ai muscoli ai quali

sono connessi, ma la presenza dei vasi è molto importante per la normale funzione dei tenociti e la capacità riparativa del tendine stesso [4]. La vascolarizzazione tendinea avviene attraverso tre sistemi principali: due localizzati alla giunzione osteotendinea e miotendinea ed uno attraverso il paratenonio o la guaina sinoviale (Fig.2). La rete circolatoria al loro interno ha una struttura variabile con arterie di diverso calibro che si ramificano in modo da irrorare la superficie del tendine e la struttura intratendinea. La vascolarizzazione dei tendini è compromessa nelle zone giunzionali e nei siti di torsione, frizione o compressione, inoltre si riduce con l'avanzare dell'età e con l'aumento del carico [4]. I tendini, in generale, mostrano uno scarso apporto di sangue, il che spiega in parte il lento adattamento a carico ripetitivo, guarigione prolungata e vulnerabilità alle lesioni [5]. L'innervazione dei tendini si origina dai muscoli vicini e dai rami sensitivi che si distribuiscono alla cute e ai connettivi profondi. I rami nervosi si diffondono parallelamente all'asse maggiore del tendine stesso ed a questi si collegano altri rami con direzione trasversale ed obliqua (Fig.2).

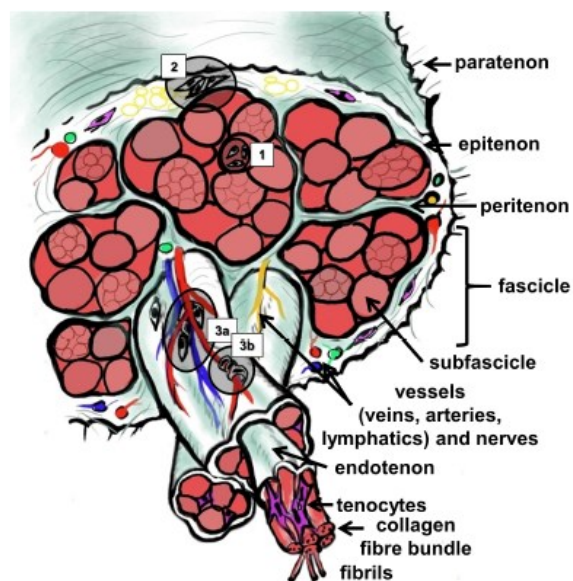


Fig.2- Schema dell'anatomia microscopica del tendine d'Achille. 1: Interno del tendine; 2: Paratenonio ed Epitenonio; 3a: nicchie perivascolari e 3b: nicchie all'interno della parete di piccoli vasi, contenenti periciti. [5]

I.2.2 Microstruttura

I tendini sono organizzati secondo uno schema gerarchico composto da molecole di collagene, fibrille, fibre e fasci di fibre che corrono lungo l'asse principale del tendine (Fig.3) [1,2].

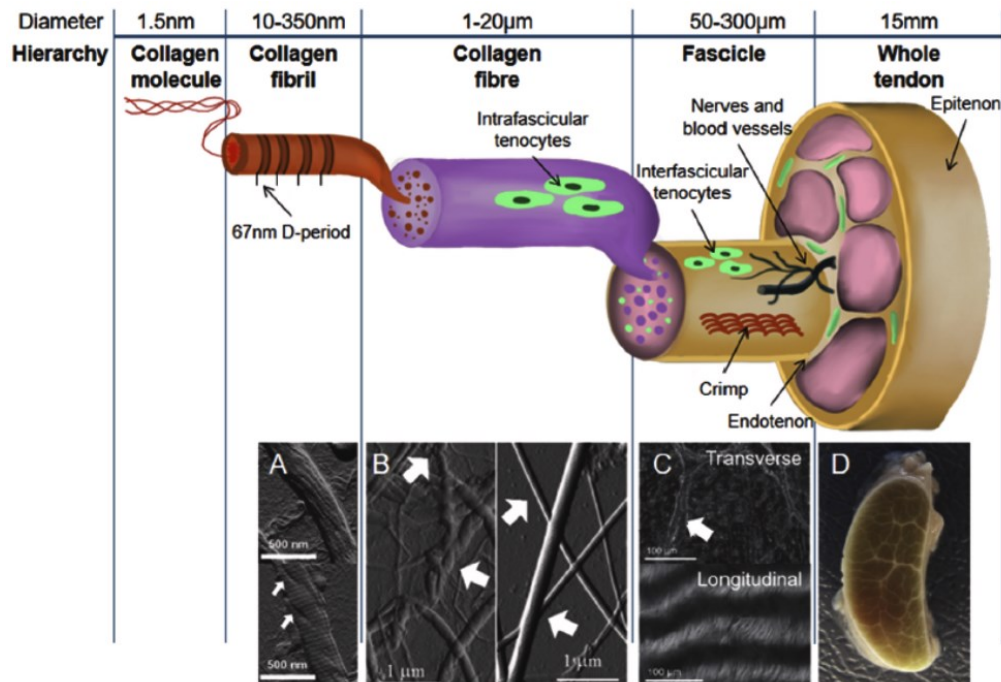


Fig.3- Diagramma schematico della struttura gerarchica del tendine che mostra l'organizzazione dei fasci di collagene. Sotto al diagramma sono presentate immagini corrispondenti ai differenti livelli di suddivisione. [6]

Molecole solubili di tropocollagene si dispongono secondo legami incrociati a formare molecole di collagene che a loro volta si aggregano progressivamente e danno origine alle fibrille di collagene [1]. Un gruppo di fibrille costituisce una fibra di collagene che è l'unità base del tendine. Il diametro delle fibre varia tra 1 e 20 μm (Fig.3). Successivamente, (Fig.4) un gruppo di fibre di collagene unendosi crea un fascio primario (sottofascicolo), un gruppo di fasci primari va a formare un fascio secondario (fascicolo) che a sua volta unendosi con altri fasci costituisce un fascio terziario. Infine, gruppi di fasci terziari, orientati nella direzione di applicazione della forza, ovvero lungo l'asse del tendine, costituiscono il tendine stesso [1]. Questi ultimi sono racchiusi da una sottile guaina di tessuto connettivo lasso chiamata Endotenonio che all'interno del tendine riveste e lega tra loro ogni fibra e consente ai fasci di scivolare l'uno sull'altro (Fig.4). L'Endotenonio, inoltre, trasporta vasi sanguigni, linfatici e nervi nelle parti più profonde della struttura tendinea [2]. La maggior parte dei tendini sono

circondati da una guaina di tessuto connettivo areolare lasso chiamata Paratenonio che ha la funzione di permettere il libero movimento del tendine contro i tessuti circostanti trovandosi nella zona più esterna. Sotto il Paratenonio si trova un'altra sottile guaina di tessuto connettivo detta Epitenonio, che con la sua superficie interna è contigua con l'Endotenonio (Fig.5). Paratenonio ed Epitenonio costituiscono il Peritenonio [2].

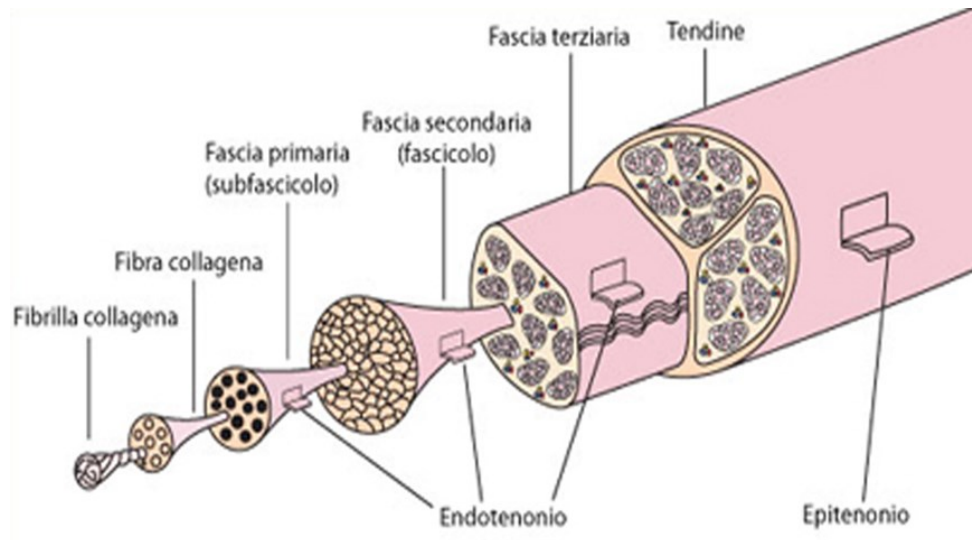


Fig.4- Organizzazione strutturale dei tendini (Epitenonio, Endotenonio, Fasci, Fibre). [7]

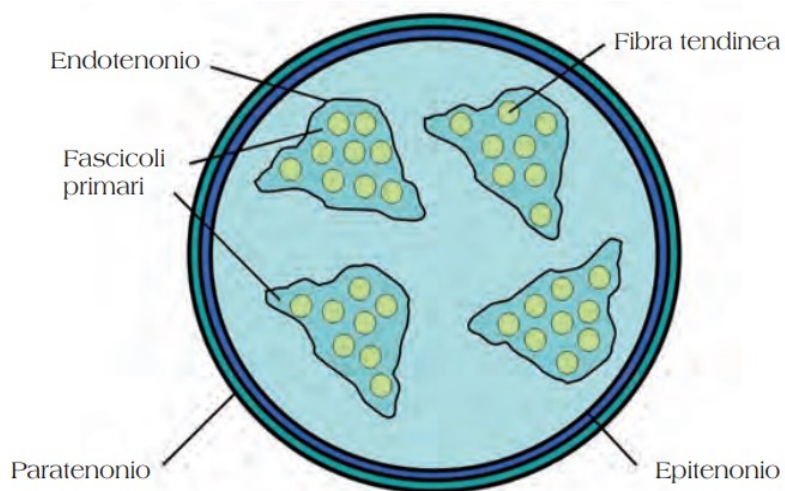


Fig.5- Sezione di un tendine, Epitenonio e Paratenonio. [4]

Le fibre e i fasci di fibre di collagene, se osservati al microscopio, mostrano un andamento ondulato, con periodici cambi di direzione, queste onde vengono chiamate crimps. Quando il tendine subisce un allungamento, i crimps tendono ad appiattirsi fino a quasi scomparire, successivamente al termine della sollecitazione ritornano nella loro posizione iniziale e il tendine riprende la sua lunghezza originale [1,2]. La complessa struttura dei tendini e delle fibre costituenti allineate lungo l'asse principale del tendine, descritta sopra, permette una maggiore protezione del tessuto e consente una buona trasmissione delle forze dovute alle contrazioni muscolari aumentando la resistenza alla trazione del tendine [1].

La matrice extracellulare dei tendini, fondamentale per il supporto meccanico e per le funzioni biomeccaniche, è costituita da fibre di collagene, fibre elastiche, sostanza fondamentale e componenti inorganiche [1]. Le fibre di collagene, il cui numero all'interno di ogni fascio primario può variare da tendine a tendine, contengono una concentrazione di collagene legata al diametro delle fibre stesse che a sua volta dipende dalla dimensione delle fibrille costituenti. All'interno di una fibra, le fibrille sono orientate non solo longitudinalmente, ma anche trasversalmente ed orizzontalmente. Le fibre longitudinali, inoltre, si incrociano tra loro a formare delle spirali [1]. Le fibre elastiche sono presenti in piccole quantità, contribuiscono al recupero della configurazione ondulata delle fibre di collagene dopo la contrazione muscolare e l'allungamento tendineo. La sostanza fondamentale, che circonda il collagene, è un gel idrofilo costituito da proteoglicani, glicosamminoglicani, proteine strutturali e altre piccole molecole [1]. La capacità di legare l'acqua di queste macromolecole è notevole; infatti, migliora le proprietà biomeccaniche del tendine qualora sottoposto a forze di taglio e compressione. Inoltre, sono importanti per la stabilizzazione dell'intero sistema di collagene del tessuto connettivo e per il mantenimento dell'omeostasi ionica e fibrillogenasi del collagene [1]. Infine, la componente inorganica è presente nel tendine per meno dello 0,2% della sua massa secca. Nel tendine sono presenti varie componenti inorganiche ad esempio: calcio, magnesio, manganese, cadmio, cobalto e altre. Solitamente la componente inorganica è coinvolta nella crescita, nello sviluppo e nel metabolismo delle strutture muscoloscheletriche [1].

Dal punto di vista microscopico i tendini presentano una componente cellulare che ha il compito di sintetizzare i componenti della matrice extracellulare ovvero: collagene, fibre elastiche, proteoglicani e glicoproteine strutturali [1]. (Fig.6) Questa componente è rappresentata principalmente da tenoblasti e tenociti, circa 90-95%. Il restante 5-10% comprende condrociti, cellule sinoviali, cellule vascolari e un piccolo numero di altre cellule come linfociti, macrofagi e mastociti [1]. I tenoblasti sono disposti in lunghe catene parallele e presentano forme e dimensioni differenti, con nuclei di forma ovale o allungata. Queste cellule sono inizialmente presenti nei soggetti giovani e successivamente maturano

e si trasformano in tenociti assumendo una forma più allungata. I tenociti, detti anche fibroblasti, sono organizzati in fasci longitudinali e in stretta vicinanza con le fibre di collagene. Presentano nuclei allungati che occupano quasi l'intera lunghezza della cellula. Nonostante siano più maturi dei tenoblasti sono metabolicamente attivi. L'attività di sintetizzazione è più elevata durante la crescita di un individuo e diminuisce con l'età [1].

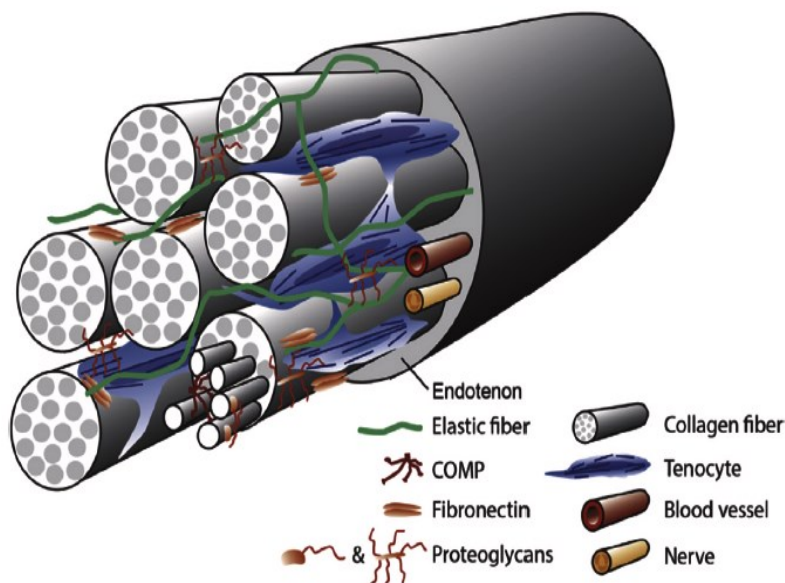


Fig.6- Rappresentazione schematica dell'architettura del tendine. Fibre di collagene, proteoglicani e glicoproteine. [6]

I.3 Proprietà meccaniche dei tendini

Durante le varie fasi del movimento, i tendini sono esposti non solo a forze longitudinali ma anche trasversali e rotazionali. Inoltre, devono essere adatti a resistere a contusioni e pressioni dirette [1]. I tendini devono essere in grado di trasmettere forze elevate, derivanti dalla contrazione muscolare, allo scheletro per il movimento e quindi adattarsi alle richieste funzionali dell'apparato locomotore, nel fare ciò sono in grado di cambiare il loro metabolismo e le loro proprietà meccaniche e strutturali [2]. I fibroblasti (tenoblasti e tenociti), componente cellulare dominante nei tendini, sono responsabili di questi cambiamenti alterando la produzione delle proteine nella matrice extracellulare. Il tendine è in grado di allungarsi fino a circa il 4% della sua lunghezza a riposo e accumula da solo il 70% dell'energia elastica totale [1]. Numerosi fattori influenzano le forze meccaniche sui tendini durante la normale locomozione. Per prima cosa, tendini diversi nel corpo sono soggetti a differenti livelli di

carico meccanico. Ad esempio, il tendine d'Achille resiste a forze di trazione superiori a quelle del tibiale anteriore. In secondo luogo, sia il livello di contrazione muscolare che le dimensioni relative del tendine influenzano le forze meccaniche applicate su di essi. Infatti, nel nostro corpo sono presenti tendini lunghi e sottili, adatti a compiere movimenti delicati e precisi, ad esempio, i flessori delle dita oppure tendini più corti e robusti deputati a svolgere azioni di potenza e resistenza, come i tendini del piede. I tendini lunghi, sebbene siano leggermente più deboli, possono assorbire più energia e subire una deformazione maggiore e quindi risultare più resistenti alla rottura rispetto ai tendini corti di uguale diametro, nonostante il carico richiesto per la rottura di questi ultimi sia maggiore. Inoltre, attività diverse inducono differenti livelli di forze, anche sullo stesso tendine [2].

Il comportamento meccanico del tendine viene rappresentato da: elasticità, plasticità e viscosità. L'elasticità è la capacità di un materiale a deformarsi in base ai carichi a cui è sottoposto e assumere le medesime condizioni iniziali una volta cessato il carico, la plasticità fa sì che il materiale non subisca alcuna deformazione finché la sollecitazione meccanica non raggiunge un determinato valore che costituisce il limite oltre il quale avviene la deformazione. Infine, la viscosità in un materiale esiste quando c'è proporzionalità tra la velocità di deformazione e la forza applicata, ovvero la deformazione è proporzionale non solo alla forza, ma anche al tempo in cui essa viene applicata [2].

I tendini sono soggetti a forze dinamiche, quindi hanno modelli di fibre e caratteristiche viscoelastiche che contribuiscono al comportamento meccanico unico del tendine [2]. Attraverso prove sperimentali, condotte con l'ausilio di apposite macchine di test, è stato possibile ricavare la curva tensione-deformazione (stress-strain) (Fig.7). Il diagramma stress-strain descrive il comportamento meccanico del tessuto tendineo soggetto a forze di diversa intensità e consente di valutare le rispettive proprietà, come la rigidità alla trazione e il carico di rottura [2].

Tendon stress/strain curve

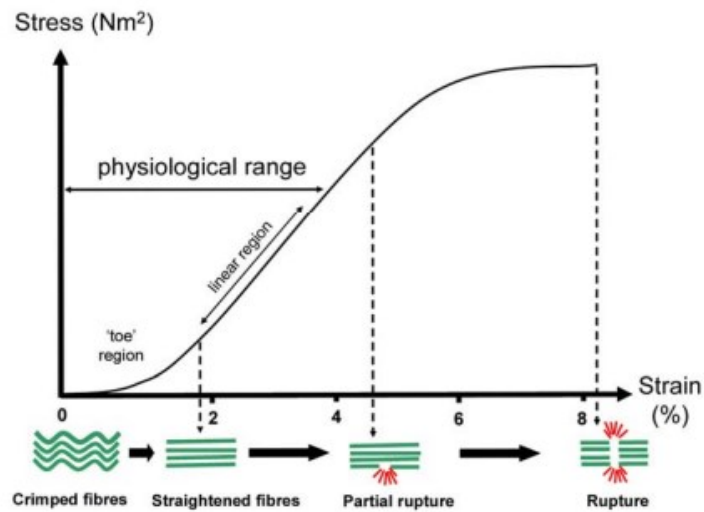


Fig.7- Curva stress-strain. [8]

Possiamo individuare quattro fasi principali che seguono l'andamento della curva (Fig.7), le prime due fasi riguardano allungamenti inferiori al 4% e rappresentano i carichi funzionali per un tendine; infatti, la curva presenta un comportamento elastico, in cui tensione e deformazione sono proporzionali [2]. In questa fase il tendine, sottoposto ad allungamento, si estende subendo piccole deformazioni longitudinali, senza danneggiamento del tessuto e le fibre di collagene perdono la loro caratteristica forma a crimp. La pendenza di questa regione definisce il modulo di Young, che esprime la rigidità del tessuto nella fase di allungamento o di accorciamento, e la deformazione delle fibre è di natura reversibile. Successivamente, entrando nella terza fase, allungamenti tra 4-8% determinano micro-lacerazioni tendinee. In questa fase il carico sottoposto al tendine cresce e la curva subisce un aumento della pendenza, la rigidità del tessuto aumenta in quanto le fibre sono ormai distese e non si possono allungare ulteriormente pertanto le fibrille e le singole molecole del tendine possono andare incontro ad una parziale rottura. Infine, per allungamenti oltre l'8% il tessuto raggiunge il suo punto di plasticizzazione e possono verificarsi delle vere e proprie rotture del tendine. Il carico di rottura varia a seconda dell'età, del livello di allenamento e altri fattori che dipendono da soggetto a soggetto [2].

I.4 Viscoelasticità

I tendini presentano un comportamento viscoelastico, probabilmente dato dall'interazione tra collagene, acqua e proteine [2]. Questo significa che hanno l'abilità di attenuare carichi ai quali vengono sottoposti quando deformati e hanno la capacità di limitare le deformazioni rapide che possono causare il loro danneggiamento. Quando i tendini sono soggetti a basse velocità di deformazione o di carico sono più deformabili, con velocità crescenti la regione lineare della curva tensione-deformazione diventa più ripida, indicando una maggiore rigidità del tessuto. Con velocità di carico ancora più elevate, i tendini immagazzinano più energia diventando meno deformabili e raggiungono un grado maggiore di rigidità [2].

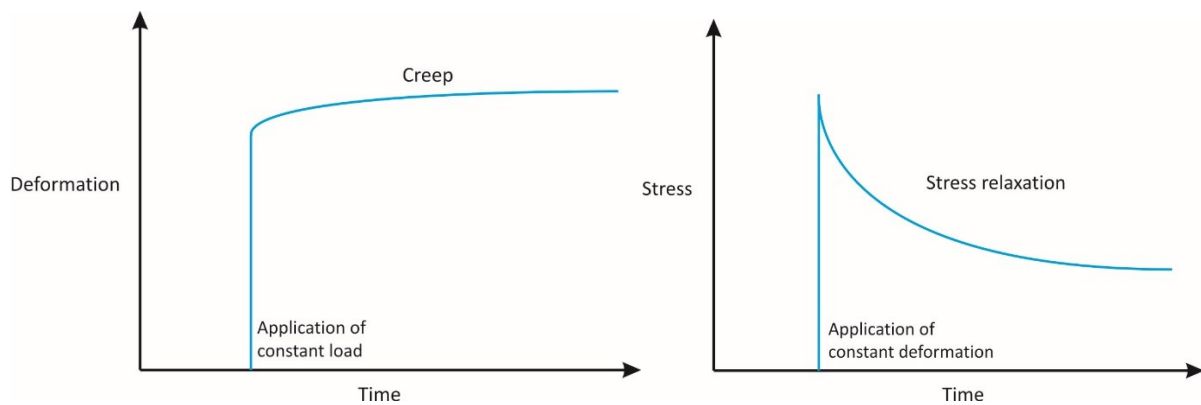


Fig.8- Fenomeni di deformazione del tendine ottenute applicando una tensione costante (curve di creep) e curve di rilassamento delle tensioni ottenute applicando una deformazione costante nei tendini. [9]

La viscoelasticità viene descritta dalle curve di creep, di rilassamento delle tensioni e dal ciclo di isteresi [2]. Le due immagini (Fig. 8) mostrano rispettivamente il fenomeno di creep e il fenomeno di rilassamento delle tensioni (stress relaxation). Nel primo caso, il carico viene arrestato al di sotto della regione lineare della curva tensione-deformazione e la tensione viene mantenuta costante nel tempo. La deformazione aumenta rapidamente nei primi istanti e poi subisce un rallentamento. Durante il fenomeno di rilassamento delle tensioni, si impone una deformazione costante nel tempo al materiale e si osserva inizialmente una rapida decrescita della tensione che successivamente si attenua. Il fenomeno di isteresi indica che la curva carico-deformazione (load-elongation) (Fig. 9) durante le fasi di carico e scarico è differente, il ciclo di isteresi rappresenta l'energia interna dissipata ad ogni ciclo. Durante la fase di allungamento, il tendine immagazzina energia elastica successivamente resa

nella fase di scarico. L'area compresa tra le due curve del ciclo di isteresi rappresenta l'energia persa come calore nel ciclo di allungamento-accorciamento del tendine.

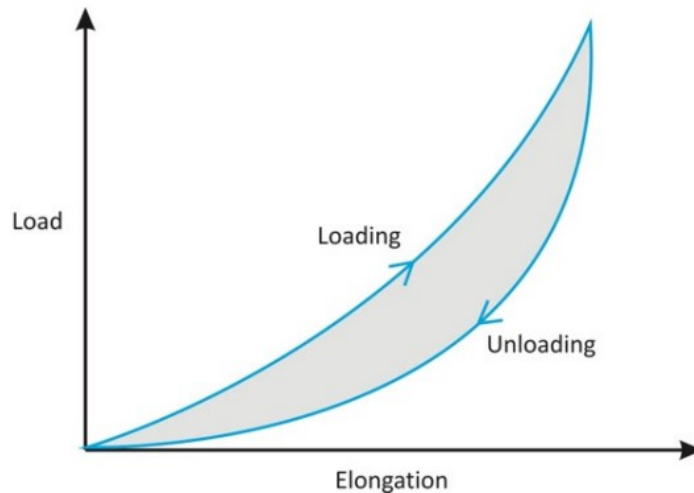


Fig.9- Ciclo di isteresi.[9]

I.5 Modifica proprietà meccaniche

Si può affermare che esistono numerosi fattori in grado di alterare le normali caratteristiche dei tessuti tendinei e la loro capacità di sopportare carichi applicati [2]. Questi sono: immobilizzazione, esercizio, invecchiamento e recupero dopo un evento traumatico. L'immobilizzazione provoca una profonda riduzione delle proprietà meccaniche dei tendini. La più evidente è la diminuzione della forza e del peso, inoltre si verifica anche un aumento del turnover di collagene, ovvero il ciclo tramite il quale il collagene viene sintetizzato e successivamente va incontro alla propria degradazione [2]. L'esercizio provoca un aumento della resistenza alla trazione e della rigidità, non si verificano sostanziali cambiamenti biochimici se non un aumento del turnover del collagene anche in questo caso. L'attività fisica, inoltre, provoca variazioni a livello strutturale nei tendini, ovvero un cambiamento nel diametro delle fibrille, nella loro densità e anche nell'allineamento per formare le fibre [2]. L'invecchiamento provoca una degradazione delle componenti della matrice extracellulare, questo comporta un cambiamento nella conformazione del collagene dovuta ad una variazione del diametro e della configurazione delle fibrille. Inoltre, si verifica una diminuzione del metabolismo del collagene compromettendo la capacità di auto-riparazione del tessuto [2]. A seguito di un trauma, la riparazione produce un tessuto con scarse proprietà meccaniche. Il processo di guarigione e il

recupero delle proprietà originarie è molto lento nei tendini. Questo perché le fibre di collagene sono disposte in fasci paralleli mentre il tessuto cicatriziale, ovvero il tessuto che si forma dopo la lesione, è composto da una rete senza una direzione precisa delle fibre [2]. Quindi è necessario rimodellare la rete in modo che le fibre si dispongano nella direzione originaria. Però, non tutti i tessuti riescono a raggiungere le proprietà meccaniche e biologiche originarie perché in alcuni casi il tessuto che si viene a riformare risulta più organizzato e talvolta con proprietà meccaniche superiori a quelle precedenti [2].

CAPITOLO II

PRINCIPALI TECNICHE DI STERILIZZAZIONE E CONSERVAZIONE

II.1 Introduzione

Alcuni gruppi di ricerca studiano l'effetto delle tecniche di conservazione e sterilizzazione analizzando gli eventuali cambiamenti che possono provocare sui tessuti tendinei. Lo scopo principale è capire se e quanto vengono influenzate le proprietà biomeccaniche dei tendini. I processi sono di varia tipologia ed alcuni verranno analizzati nel capitolo seguente sulla base di esperimenti effettuati su differenti tipologie di tessuto tendineo. L'obiettivo di questi studi è principalmente quello di ottenere la migliore condizione chimica e biomeccanica del tessuto biologico utilizzando metodi di conservazione e sterilizzazione ottimali ed efficaci. Questi possono essere utilizzati ad esempio dalle banche dati, che hanno il compito di conservare i tessuti biologici oppure nella preparazione dei tessuti che verranno successivamente utilizzati nei trapianti, come nel caso della tecnica Allograft. Questa tecnica, in particolare, consiste nel prelevare il tendine da un donatore, sottoporlo a specifiche procedure per garantire la sterilità e renderlo fisicamente adatto al successivo innesto nel paziente ricevente.

Dunque, nel capitolo seguente verranno introdotte le tecniche di sterilizzazione più comuni che comprendono la sterilizzazione per irradiazione, ovvero utilizzando raggi gamma oppure utilizzando fasci di elettroni (E-Beam), sterilizzazione chimica e tecniche di conservazione quali: crioconservazione, liofilizzazione e congelamento (deep-freezing).

II.2 Metodi di sterilizzazione più comunemente utilizzati

Esistono diversi metodi di sterilizzazione per i tessuti tendinei, alcuni sperimentati ed utilizzati già in passato ed altri, invece, attualmente in fase di studio. Il processo di sterilizzazione è di fondamentale importanza, ad esempio per quanto riguarda i tendini che vengono utilizzati nei trapianti in cui è necessario curare alcune tipologie di infortuni, dove avviene una sostituzione del tessuto tendineo per ripristinare le funzionalità motorie e la stabilità della parte lesa [10]. Utilizzando tessuti provenienti da donatore è presente il rischio di trasmissione di malattie infettive e di rigetto immunitario. Per eliminare questo problema è necessaria la sterilizzazione terminale, ovvero un processo che agisce direttamente sui prodotti nella loro confezione finale già sigillata e sterilizzata (Fig. 10). Fra i metodi di sterilizzazione più comunemente usati troviamo la radiazione ionizzante che comprende principalmente la sterilizzazione tramite raggi gamma e la sterilizzazione tramite fascio di elettroni (E-Beam). Inoltre, vengono applicate anche altre tecniche come trattamenti chimici e processi proprietari. Tuttavia, è presente la possibilità che le proprietà meccaniche, istologiche e strutturali delle componenti che costituiscono i tendini, vengano danneggiate a causa dell'applicazione di questi processi che, nel tentativo di uccidere gli agenti patogeni contenuti, risultano dannosi per i tessuti stessi.



Fig.10- Menischi mediali e laterali contenuti in sacchetti di plastica prima di essere sottoposti ad irradiazione gamma per la sterilizzazione terminale. [11]

Recentemente, nella medicina, gli allotrapianti sono diventati una valida alternativa agli autoinnesti poiché i tessuti utilizzati in queste procedure presentano molti vantaggi, come la riduzione del dolore e del trauma causati al paziente in seguito all'intervento necessario per prelevare tessuto autologo. Inoltre, riducono le degenze ospedaliere, i costi e la disponibilità di prodotti con le funzionalità, la forma e le dimensioni richieste è quasi illimitata [10]. I tessuti umani vengono conservati nelle apposite "banche di tessuti" tramite le quali vengono lavorati e distribuiti negli ospedali quando sono richiesti. Il compito di queste strutture è quello di garantire sicurezza ed efficacia nei prodotti. Tuttavia, l'uso di questi tessuti presenta il rischio che avvenga una trasmissione di malattie, potenzialmente pericolose, tra donatore e ricevente.

Dunque, per garantire che i prodotti raccolti siano privi di agenti patogeni viene effettuato uno screening di tutti i donatori coinvolti ed i processi di recupero e lavorazione avvengono in condizioni asettiche. Ovviamente, prima di procedere con il trapianto, ogni tessuto deve essere sottoposto ad una corretta sterilizzazione, che tuttavia non garantisce la totale eliminazione della carica microbica presente nel campione [10]. Per fronteggiare questo problema è necessario ridurre al minimo il rischio di trasmissione di malattie utilizzando le migliori tecniche di sterilizzazione attualmente conosciute.

II.2.1 Sterilizzazione chimica e processi proprietari

L'irradiazione gamma e la sterilizzazione tramite fascio di elettroni sono le tecniche più diffuse ed utilizzate oggi, ma ne esistono anche altre che includono trattamenti chimici come l'ossido di etilene, l'acido paracetico con etanolo, bagni antibiotici e alcune procedure, meglio note come processi proprietari [12], proposti da diverse aziende. I trattamenti chimici e i bagni antibiotici non sono molto utilizzati perché presentano alcune limitazioni come la mancanza di una completa penetrazione che permetterebbe di eliminare la carica batterica presente all'interno dei tessuti e non solo sulla superficie [10]. Tra i vari trattamenti chimici troviamo l'ossido di etilene che provoca effetti battericidi e virucidi, viene applicato allo stato gassoso e miscelato con diluenti inerti come la CO₂. Principalmente viene utilizzato su prodotti medici sensibili al calore e meno frequentemente sui tessuti umani poiché può produrre sostanze tossiche dannose per i campioni trattati. La sterilizzazione con acido paracetico ed etanolo, altro processo chimico, viene applicata negli innesti ossei poiché non ne danneggia le proprietà, al contrario, secondo alcuni studi, compromette la resistenza biomeccanica nei tessuti tendinei [10].

Alcune aziende propongono dei processi proprietari ovvero delle procedure di sterilizzazione che garantiscono un tessuto privo di microrganismi potenzialmente dannosi. La Cryolife, Inc. (Kennesaw, GA) esegue la crioconservazione dei tessuti tramite un processo di congelamento lento con dimetilsolfossido (DMSO) o glicerolo. I campioni vengono analizzati e trattati per un lungo periodo di tempo con una soluzione antimicrobica, in questo caso non vengono utilizzati ulteriori tipi di sterilizzazione [12]. La RTI Surgical Inc. (Alachua, FL) presenta il metodo chimico a bassa temperatura BioCleanse (Fig.11), capace di penetrare nel tessuto ed eliminare i microrganismi patogeni. Questo processo grazie all'azione di sterilizzanti liquidi, come il perossido di idrogeno, l'alcol isopropilico e le variazioni di pressione utili a far entrare ed uscire gli sterilizzanti dal campione, è in grado di arrivare alla matrice interna del tessuto. I tendini e altri tessuti molli vengono spesso trattati con questo metodo poiché, secondo alcuni studi, non vengono danneggiate le proprietà meccaniche [12]. Il metodo Allowash, presentato dall'azienda Lifenet, aumenta la solubilizzazione e rimuove i lipidi, il sangue e le cellule che possono funzionare da serbatoio per possibili agenti batterici e funghi. Agisce tramite ultrasuoni, centrifugazione e pressione negativa combinati a reagenti come detergenti biologici, alcoli e perossido di idrogeno. I tessuti vengono poi sterilizzati con radiazioni da 13 a 18 kGy [12]. Il processo Tutoplast (RTI, Alachua, FL) consiste nell'immergere i tessuti in bagni di acetone a ultrasuoni per rimuovere i lipidi e poi effettuare dei bagni iperosmotici alternati di soluzione salina e acqua deionizzata per eliminare i batteri. Successivamente, per eliminare le proteine solubili e distruggere gli eventuali virus e spore, viene effettuato un trattamento ossidativo con perossido di idrogeno. I tessuti poi subiscono un ultimo lavaggio con acetone per rimuovere eventuali prioni, garantire l'inattivazione dei virus e disidratare il campione. Infine, avviene l'estrazione sottovuoto che consente la conservazione a temperatura ambiente e la sterilizzazione terminale con raggi gamma a basse dosi [12]. La Clearant Inc. (Los Angeles, CA) ha presentato un processo che tratta i tessuti con alte dosi di radiazioni gamma, circa pari a 50 kGy che, sebbene superiori alla dose minima di 25 kGy, non risultano dannose poiché il campione viene congelato estraendo acqua e aggiungendo stabilizzatori e scavenger di radicali liberi. In seguito, vengono aggiunti DMSO e glicole propilenico che fungono da radioprotettori [12]. La tecnica di sterilizzazione di NovaSterilis (Lansing, NY) utilizza anidride carbonica supercritica a basse temperature e pressioni per provocare un'acidificazione transitoria che risulti letale per virus e batteri. Questo processo ha una buona penetrazione nei tessuti [12]. La Musculoskeletal Transplant Foundation (MTF, Edison, NJ), utilizza una serie di sostanze chimiche come detergenti non ionici o perossido di idrogeno e alcol per trattare prevalentemente tessuti ossei senza sterilizzazione terminale. Il processo sembra non danneggiarne le proprietà strutturali. Inoltre, nel caso dei tessuti tendinei, questo sistema viene

applicato con una serie di antibiotici che vengono rimossi alla fine della procedura per non lasciare residui potenzialmente dannosi nei campioni [12].



Fig.11- Il tessuto da sterilizzare, posizionato in un apposito contenitore, viene introdotto da un operatore all'interno di una camera per il trattamento BioCleanse. [13]



Fig.12- A sinistra, tendine rotuleo sterilizzato con metodo BioCleanse, senza uso di irradiazione e a destra tendine d'Achille sterilizzato con metodi proprietari e brevettati AllowashTecnologia XG® (RTI Surgical). [14]

II.2.2 Sterilizzazione con raggi gamma e fascio di elettroni

La sterilizzazione con radiazioni rappresenta attualmente una delle tecniche più diffuse e di successo nel campo medico e non solo, si basa sulla capacità delle radiazioni ionizzanti di uccidere i microrganismi e i primi studi risalgono alla fine del XIX secolo, con l'evolversi della tecnologia negli anni successivi ci sono state ulteriori scoperte [10]. Attualmente, le tecniche più sicure sono le radiazioni gamma e l'E-Beam.

Quest'ultima utilizza elettroni ad alta energia concentrati in un fascio sottile ed orientati contro il tessuto da sterilizzare, quando l'energia degli elettroni viene assorbita provoca l'alterazione dei legami chimici, danneggia il DNA e distrugge le capacità riproduttive dei microrganismi patogeni (Fig. 13). Rispetto ai raggi gamma, gli elettroni del fascio hanno una minore penetrabilità nel materiale ed una distribuzione della dose meno uniforme sul prodotto, ma il vantaggio di questo processo è la maggiore velocità di trattamento, si parla di pochi secondi rispetto alle ore necessarie per l'irradiazione gamma [12]. La tecnica del fascio di elettroni può essere considerata come una valida alternativa ai raggi gamma. Alcuni studi hanno dimostrato che le radiazioni a fascio elettronico in combinazione con misure di protezione dei tessuti come bassa temperatura e in presenza di anidride carbonica, non compromettono le proprietà meccaniche del tendine rotuleo (BPTB) [12].

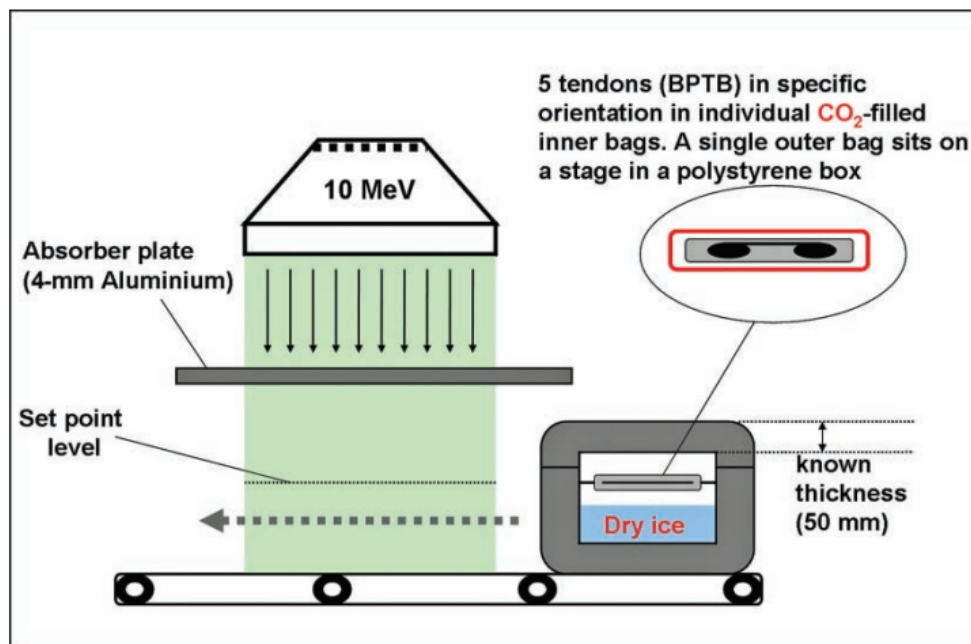


Fig.13- Schema processo di sterilizzazione con E-beam. 5 tendini di BPTB sono posizionati in una scatola di polistirene riempita di ghiaccio secco per mantenere la temperatura di -70° e successivamente irradiati con il fascio di elettroni. [15]

La radiazione tramite raggi gamma offre l'alternativa migliore per la sterilizzazione di tessuti umani; infatti, a sostegno di questa teoria esistono molti studi. Il processo prevede l'esposizione dei campioni ai raggi gamma degli isotopi radionuclidi di Cobalto-60 (^{60}Co) e Cesio-137 (^{137}Cs). Le radiazioni gamma hanno proprietà battericide e virucide [10]. Per garantire la sicurezza degli allotrapianti ed evitare contaminazioni la sterilizzazione viene effettuata in sacchetti di plastica resistenti alla dose applicata in modo che il polimero di confezionamento non reagisca con i componenti dei tessuti durante il processo. Affinché la sterilizzazione sia efficace i campioni vengono trattati allo stato liquido e mantenuti idratati [10].

Il kilogray (kGy) è l'unità di misura della dose di radiazioni gamma, un gray (Gy) viene identificato come l'assorbimento di un Joule di energia di radiazione da parte di un chilogrammo di materia (1 kGy = 1 Joule /grammo) [10]. L'applicazione di una determinata dose può variare, poiché valori troppo alti, superiori a 28 kGy, rischiano di provocare danni alle proprietà del tessuto e valori troppo bassi, compresi tra 18 e 21 kGy, potrebbero risultare inutili nel distruggere i microrganismi. Di conseguenza, l'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA) ha stabilito che una dose di radiazioni pari a 25 kGy venga considerata come dose minima di riferimento e garantisca la sterilità dei tessuti umani [10]. Tuttavia, prima di procedere con l'irradiazione conviene valutare le caratteristiche del tessuto trattato poiché diversi fattori possono influenzare l'efficacia del processo di sterilizzazione, uno tra questi è la carica biologica contenuta nel campione che varia da tessuto a tessuto. La carica biologica anche nota come "bioburden", è la popolazione di microrganismi vitali presenti sulla superficie o all'interno del tessuto prima che venga colpito dalle radiazioni [10]. Con una carica biologica bassa ci sono maggiori probabilità che la procedura sia efficace e dunque può essere scelta una dose di radiazioni minore. Alcuni gruppi di ricerca studiano il comportamento dei microrganismi dopo l'esposizione alle radiazioni ionizzanti per identificare la dose più efficace di raggi gamma. Il processo di sterilizzazione deve essere convalidato affinché risulti efficace nell'uccidere tutti i microrganismi presenti nel tessuto trattato e quindi raggiunga un livello di garanzia di sterilità (SAL) almeno pari a 10^{-6} , questo valore garantisce che meno di un milione di organismi dannosi sopravviva nel campione dopo la sterilizzazione [10].

II.3 Meccanismo delle radiazioni ionizzanti

Nello specifico, le radiazioni ionizzanti hanno un effetto letale poiché provocano un danno genetico e inibiscono la divisione cellulare dei microrganismi [10]. Possiamo identificare due meccanismi d'azione delle radiazioni, detti rispettivamente effetto diretto ed effetto indiretto. (Fig.14)

L'effetto diretto rappresenta il danno provocato direttamente dalle radiazioni ionizzanti che interagendo con molecole biologiche critiche portano all'eccitazione, alla lesione e alla scissione della struttura polimerica [10]. Inoltre, i fotoni ad alta energia o i radicali attivi prodotti dalla ionizzazione possono danneggiare il DNA e le fibre di collagene provocando rotture ai filamenti e reticolazioni intermolecolari con alterazione della struttura che ne inibiscono la sintesi e causano errori nelle proteine che portano alla morte cellulare.

L'effetto indiretto è dovuto alla formazione dei radicali idrossilici in seguito alla radiolisi dell'acqua nei microrganismi [10]. Questi fungono da intermediari nel trasferire l'energia delle radiazioni alle molecole biologiche, le radiazioni interagendo con l'acqua producono radicali perossidici e perossidi che danneggiano le molecole e bloccano il processo di riproduzione dei microrganismi portando alla rottura del collagene e dei filamenti di DNA. Inoltre, in presenza di ossigeno questo effetto risulta potenziato.

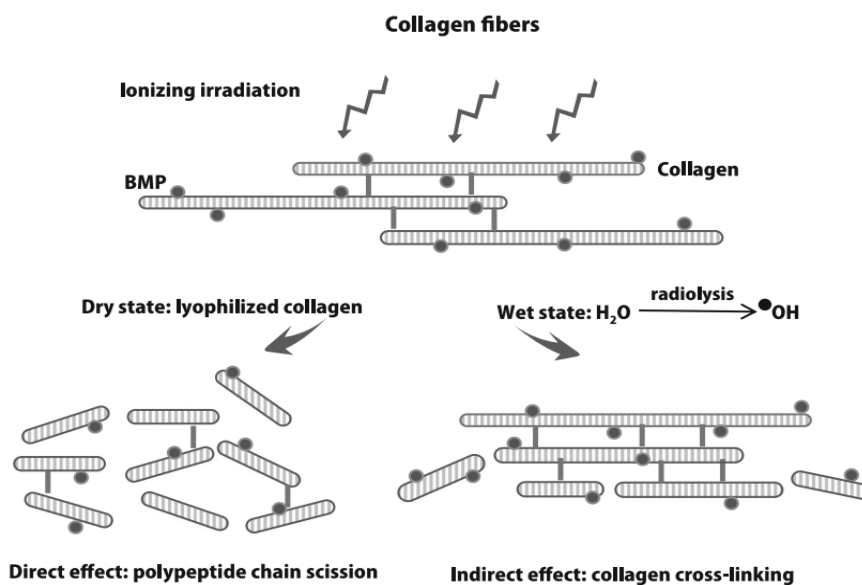


Fig.14- Effetto distruttivo della sterilizzazione per irradiazione gamma sulle fibre di collagene del tendine allo stato asciutto e umido. [16]

In alcune situazioni, i microrganismi come batteri, virus e funghi sono in grado di resistere alle radiazioni grazie anche ai meccanismi di riparazione del DNA. La resistenza alle radiazioni è misurata dalla dose di riduzione decimale (D_{10}), definita come la dose di radiazioni (kGy) necessaria per ridurre il numero del microrganismo di 10 volte o necessaria per uccidere il 90% del numero totale della specie [10]. Le condizioni ambientali in cui avviene la sterilizzazione possono influenzare la risposta dei microrganismi alle radiazioni. Infatti, alcuni sono più sensibili in soluzioni liquide invece che allo stato congelato. Questo è dovuto all'immobilizzazione dei radicali liberi che impedisce la loro diffusione quando il tessuto è congelato rendendo nullo l'effetto indiretto e favorendo la sterilizzazione. La presenza di ossigeno rende i microrganismi più sensibili alle radiazioni; infatti, i radicali liberi possono reagire con le molecole di ossigeno e produrre radicali perossidi di idrogeno e di importanti molecole organiche biologicamente dannose. Gli agenti patogeni sono più resistenti alle radiazioni in condizioni di poca attività idrica o di siccità [10].

II.4 Vantaggi della sterilizzazione con radiazioni

Inizialmente la sterilizzazione è stata introdotta per sterilizzare prodotti medici e successivamente è stata utilizzata anche per i tessuti umani come gli allotrapianti, poiché risulta un processo semplice sicuro ed efficace dal punto di vista energetico [10]. In particolare, i vantaggi della sterilizzazione mediante radiazioni gamma comprendono la capacità di distruggere i microrganismi senza che ci sia un aumento significativo della temperatura dei materiali colpiti preservandone le proprietà e le caratteristiche. L'elevata penetrabilità delle radiazioni gamma consente di sterilizzare i tessuti nella loro forma finale producendo un effetto istantaneo e simultaneo sull'intero prodotto. Questo metodo, noto anche come sterilizzazione terminale, consente di avere flessibilità nel confezionamento e consente di mantenere il prodotto in forma sterile fino a quando la confezione non viene aperta o danneggiata [10]. A temperatura ambiente o a temperature inferiori allo zero la sterilizzazione risulta comunque efficace ed è possibile avere un controllo preciso ed accurato del processo. È stato dimostrato che nei tessuti trattati con radiazioni gamma non sono presenti infezioni batteriche o virali.

II.5 Effetto delle radiazioni e trattamenti radioprotettivi

Le proprietà dei tessuti sono di fondamentale importanza per l'uso clinico che ne verrà fatto, variano da campione a campione e devono essere preservate durante le varie fasi di lavorazione e sterilizzazione. Ad esempio, per i tendini sono molto importanti le proprietà meccaniche che, secondo alcuni studi, non vengono danneggiate da radiazioni di 25 kGy, ma allo stesso tempo possono subire delle modifiche importanti se si utilizzano radiazioni di livello superiore come 50 kGy [10]. Solitamente questi studi vengono effettuati con diverse tecniche come la microscopia elettronica a scansione (SEM), la spettroscopia infrarossa e test di compressione o flessione.

Dunque, anche i metodi più efficaci come le radiazioni gamma possono provocare effetti indesiderati, alcuni studi hanno dimostrato che proprio le radiazioni gamma, se utilizzate ad alte, dosi alterano le caratteristiche biomeccaniche dei tessuti in modo dose-dependent [10]. All'aumentare della dose, le proprietà biomeccaniche e strutturali dei tendini diminuiscono gradualmente. (Fig.15)

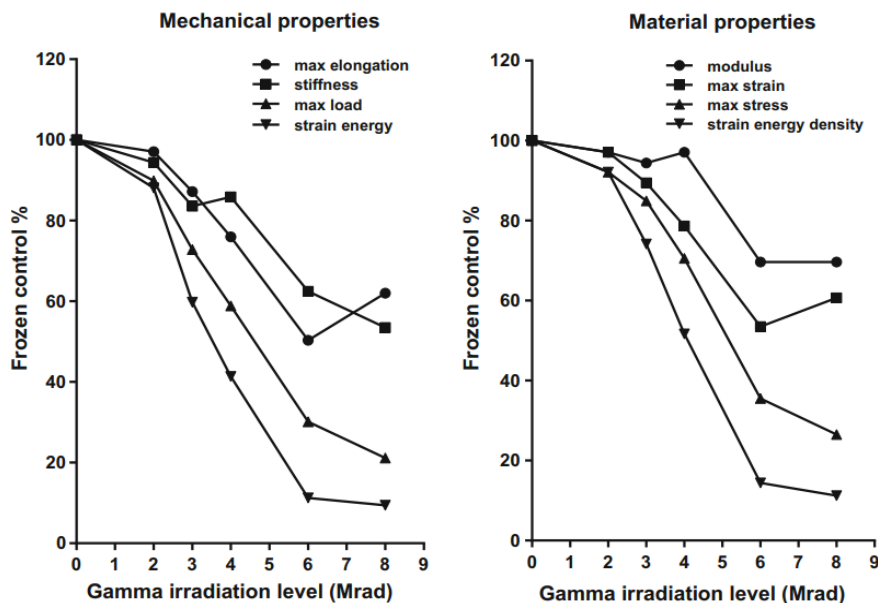


Fig.15- Relazione dose-dependent tra i risultati delle misurazioni delle caratteristiche meccaniche e materiali con l'irradiazione gamma. Proprietà biomeccaniche: allungamento massimo, rigidità, carico massimo ed energia di deformazione e proprietà strutturali: modulo di Young, deformazione massima, sollecitazione massima e densità di energia di deformazione. [16]

Le proprietà dei tessuti tendinei possono essere protette dalle radiazioni ionizzanti tramite il trattamento radioprotettivo basato sulla reticolazione e rimozione dei radicali liberi [10]. Alcuni studi hanno riferito che l'applicazione di dosi elevate di raggi gamma (50 kGy) dopo aver sottoposto i tessuti ad un trattamento con soluzioni radioprotettrici, non provocava alcun effetto dannoso alle proprietà dei campioni e consentiva una sterilizzazione molto efficace. Inoltre, la reticolazione combinata e lo scavenging dei radicali liberi migliora la resistenza e la stabilità dei tendini [10]. Sebbene l'uso di raggi gamma sia una procedura in grado di garantire l'inattivazione di batteri, spore e virus eliminando il pericolo di contrarre malattie dovute all'uso di tessuti contaminati, è tuttavia necessario effettuare uno screening iniziale dei donatori e adottare le pratiche asettiche necessarie durante la lavorazione. Inoltre, per garantire una maggiore sicurezza dei tessuti si applica la sterilizzazione terminale, così da poter fornire un prodotto sterile pronto all'utilizzo.

II.6 Metodi di conservazione dei tessuti tendinei

Una volta che il tessuto è stato trattato e lavorato, deve essere protetto e conservato fino al momento del suo utilizzo. La maggior parte dei tessuti viene conservata tramite congelamento a basse temperature (deep-freezing), liofilizzazione e crioconservazione.

Il congelamento a basse temperature è il metodo più semplice e solitamente più utilizzato, dopo il prelievo sterile, il tessuto viene messo in coltura e congelato mentre vengono eseguiti i test sierologici; successivamente viene immerso in una soluzione antibiotica, confezionato e congelato [12]. L'Associazione Americana delle banche dei tessuti (AATB) richiede che la conservazione avvenga ad una temperatura di almeno -40°C , ma la maggior parte delle banche di tessuti mantiene i campioni a -70°C o -80°C , questo consente la conservazione da 3 a 5 anni, inoltre i tessuti possono essere conservati fino a 10 anni se mantenuti ad una temperatura di -196°C [12]. La liofilizzazione distrugge tutte le cellule all'interno del tessuto e di conseguenza consente la conservazione sottovuoto a temperatura ambiente per 3-5 anni. Tuttavia, il processo può degradare le proprietà meccaniche del tendine alterando la composizione del collagene e risultando meno efficace del metodo deep-freezing. Inoltre, la liofilizzazione presenta lo svantaggio di dover reidratare il tessuto per almeno 30 minuti prima del suo utilizzo. Alcuni studi dimostrano che può esserci un legame tra il fallimento dei tendini liofilizzati utilizzati in medicina e la durata della loro conservazione, suggerendo quindi che il tempo di conservazione sia limitato [12]. Il metodo della crioconservazione prevede che il tessuto venga sottoposto a congelamento a velocità controllata fino a -135°C con estrazione di acqua cellulare mediante dimetilsolfossido (DMSO) e glicerolo. Il tessuto viene confezionato in una soluzione

crioprotettrice ed ha una durata di conservazione di 10 anni durante il quale l'80% delle sue cellule costituenti può rimanere vitale [12].

CAPITOLO III

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI PROVOCATI DAI METODI DI STERILIZZAZIONE E CONSERVAZIONE SULLE PROPRIETA' DEI TESSUTI TENDINEI

III.1 Introduzione

Il rischio di danneggiare le proprietà biomeccaniche dei tessuti tendinei è un fattore fondamentale da considerare quando vengono utilizzati i metodi di sterilizzazione e conservazione. Ad esempio, nella ricostruzione del legamento crociato anteriore viene sempre più frequentemente utilizzata la tecnica allograft in cui è richiesto che non vi siano possibilità di eventuali trasmissioni di malattie infettive nel paziente sottoposto all'intervento, inoltre le procedure di sterilizzazione applicate devono garantire l'integrità biomeccanica dei tessuti tendinei utilizzati. Dunque, nel capitolo seguente verranno analizzati gli effetti provocati dalle tecniche di conservazione e sterilizzazione più utilizzate come ad esempio l'irradiazione gamma ed E-Beam, applicate ad alcune tipologie di tendini come il tibiale anteriore (T), il peroneo lungo (P), il tendine rotuleo (BPTB) o il tendine d'Achille. (Fig. 16 e 17)

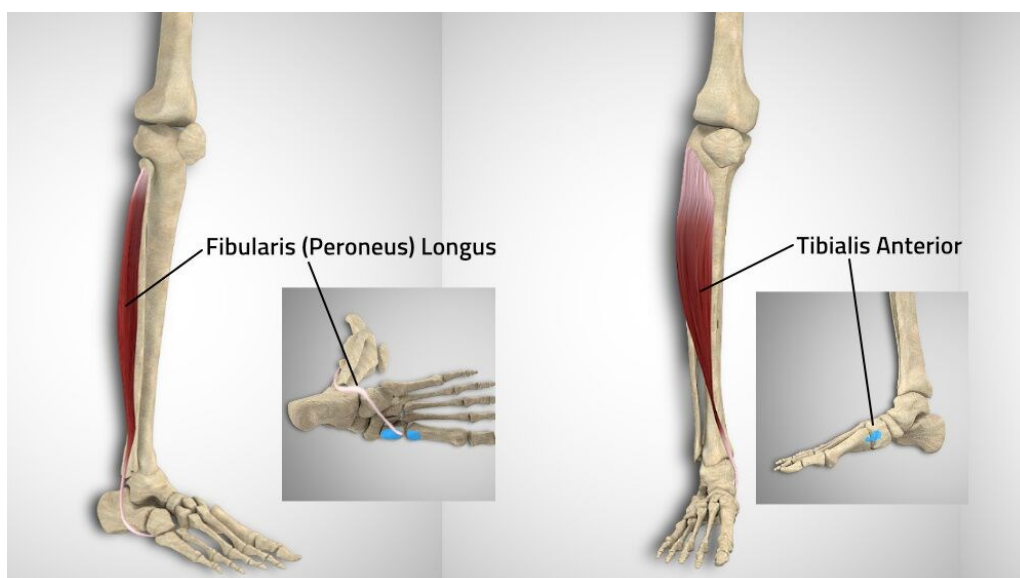


Fig.16- Peroneo Lungo e Tibiale Anteriore. [17]

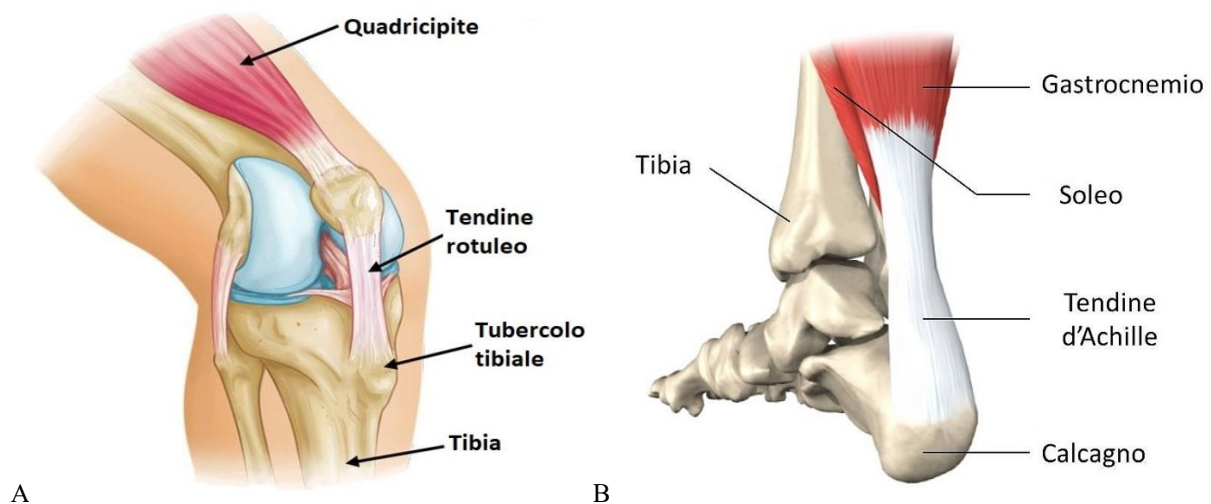


Fig.17- A: Articolazione del ginocchio dove si può osservare il tendine rotuleo (BPTB) ed il quadricipite. [18]
 B: Articolazione della caviglia con rappresentato il tendine d'Achille. [19]

La maggior parte degli studi presenti in letteratura afferma che è quasi impossibile sterilizzare un tessuto umano senza compromettere le sue proprietà biomeccaniche [12], i metodi utilizzati durante i processi sono numerosi e due delle sterilizzazioni più diffuse sono l'irradiazione gamma e l'irradiazione a fascio di elettroni, presentate nel capitolo precedente. La lavorazione dei tessuti al fine di evitare contaminazioni batteriche o virali è indispensabile, però comporta alcuni rischi per la loro integrità strutturale e funzionale; tuttavia, esistono numerose tecniche in grado di garantire un alto livello di sicurezza del tessuto come, ad esempio, la radioprotezione mediante reticolazione combinata e scavenging dei radicali liberi.

Il primo lavoro di ricerca presentato in seguito è stato realizzato da Gökler et al. (2021) [20] presso la Budapest University of Technology and Economics. Lo scopo di questo studio è quello di confrontare le proprietà biomeccaniche di due tipologie di tessuti tendinei sottoposti a sterilizzazione e conservazione, il peroneo lungo e il tibiale anteriore (Fig.16), solitamente utilizzati nella ricostruzione del legamento crociato anteriore. Le informazioni sono state ottenute sottoponendo i campioni ad un test di creep uni-assiale valutando i parametri di spostamento alla fine della fase di carico e di spostamento al termine del periodo di carico costante pari a 60 secondi.

Il secondo studio è stato condotto da Hangody et al. (2017) [21]. L'obiettivo della ricerca è quello di valutare le differenze biomeccaniche tra cinque tipologie di tendini e i possibili cambiamenti indotti dall'irradiazione gamma a due dosi, 21 kGy e 42 kGy. I tendini presi in considerazione sono: quadricipite, tendine d'Achille, semitendinoso più gracile (STG), tibiale anteriore (TA) e peroneo lungo (PL). Su questi campioni sono state condotte prove di carico ciclico seguite da prove di carico

a rottura, i parametri calcolati sono il modulo di elasticità (o modulo di Young), la forza massima, la deformazione dovuta all'applicazione ciclica di una forza compresa tra 50 N e 250 N e la deformazione a rottura.

III.2 Analisi effetti su Tibiale Anteriore e Peroneo Lungo

III.2.1 Materiali e metodi

I tendini utilizzati più comunemente per la sostituzione del legamento crociato anteriore sono la fascia lata, il tibiale anteriore o posteriore, i tendini femorali, il peroneo lungo, il tendine d'Achille e il tendine rotuleo. Tra questi il tibiale anteriore ed il peroneo lungo tendono a subire minori cambiamenti biomeccanici dopo l'irradiazione [20], di seguito verranno riportati i dati relativi a test effettuati su questa tipologia di campioni. Nella ricerca condotta da Gökler et al. [20] sono stati utilizzati 60 tendini di peroneo lungo e 60 tendini di tibiale anteriore provenienti da donatore umano deceduto e prelevati mediante protocolli chirurgici sterili. Prima di procedere con i test, tutti i campioni sono stati ripuliti ed esaminati mediante anamnesi e controlli medici per accertare che non vi fossero eventuali lesioni o malattie in nessuno dei donatori. Per proteggere le proprietà dei tendini e prevenire la diminuzione della resistenza meccanica a causa delle radiazioni ionizzanti è stato effettuato un trattamento radioprotettivo; dunque, i campioni sono stati immersi in una soluzione contenente il 16,7 % di 1,2-propandiolo, il 24,2% di dimetilsolfossido, il 3,8% di D-trealosio e il 2,7% di D-mannitolo ed infine ogni tendine è stato congelato a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20].

Si possono identificare tre gruppi creati in base al tempo di conservazione, al tipo di irradiazione e alla tipologia di tendine. Il metodo di conservazione utilizzato in questo studio è il congelamento a basse temperature (deep-freezing), attualmente viene considerato come il più sicuro, semplice ed economico inoltre il suo effetto è limitato sulle proprietà strutturali e meccaniche dei tessuti [20]. Per la ricerca i campioni sono stati conservati per 5 o 6 mesi. Le due sterilizzazioni applicate sono l'irradiazione gamma e l'E-Beam, entrambe con una dose di 21 kGy, definita come dose battericida. I tendini selezionati per operazioni chirurgiche di ricostruzione o sostituzione devono avere proprietà molto simili a quelle dei tessuti precedenti, per questo solitamente le caratteristiche studiate e analizzate nei campioni sono il modulo di Young, la forza massima che sono in grado di sostenere e la rigidità, poiché è importante che i tendini siano flessibili e consentano un movimento naturale come prima dell'operazione. Spesso tessuti tendinei con un elevato allungamento in risposta alle sollecitazioni meccaniche non sono considerati idonei e per questo non vengono utilizzati poiché

l'articolazione può perdere la sua stabilità e non garantire un'adeguata resistenza alle forze applicate [20], questo aspetto riguarda soprattutto i tendini usati per la ricostruzione del legamento crociato anteriore.

I tessuti tendinei si deformano in modo non lineare in risposta alle sollecitazioni causate dal carico applicato e hanno inoltre un comportamento viscoelastico, in quanto la deformazione si sviluppa in dipendenza dal tempo di applicazione del carico [20]. I test di creep vengono effettuati per verificare la risposta di un determinato campione ad un carico meccanico costante. Utilizzando dei dispositivi appositi i tessuti vengono sottoposti ad un carico costante per un certo periodo di tempo dopo una fase di carico rapido, durante queste operazioni vengono registrati in modo continuo i dati di forze e spostamenti. Nel corso di queste procedure il campione può subire delle deformazioni in base alle sue proprietà meccaniche e grazie ad una prova di creep di pochi minuti è possibile ricavare le informazioni previste per un periodo di tempo più lungo [20].

Nello studio che viene presentato, le misurazioni sono state effettuate con un telaio di carico servoidraulico Instron 8872 (Instron Ltd., High Wycombe, Regno Unito) dotato di una cella di carico Instron Dynacell con capacità di carico di 25 kN, di un'unità di controllo Instron Fasttrack 8800 e di una struttura a pinze da congelamento [20].

Per procedere con le misurazioni è necessario che i tessuti tendinei vengano scongelati a temperatura ambiente e portati a 37 °C per 20 minuti prima di iniziare il test. I campioni sono stati sottoposti alle prove di trazione a coppie, uniti tra loro, e fissati tramite le estremità libere ai morsetti del macchinario rappresentato nella figura 18. I morsetti sono stati congelati con ghiaccio secco al fine di garantire una presa resistente e stabile dei tendini ad essi ancorati, per evitare il ricongelamento totale dei campioni il processo è durato tre minuti. Nel test i tendini vengono pre-caricati a una velocità di 20 mm/min fino a 2 N, successivamente caricati a una velocità di 50 mm/min fino a 250 N ed infine mantenuti sotto carico per 60 s [20].



Fig. 18- Sistema di misurazione: Un'estremità del tendine stabilizzata da morsetti e ghiaccio secco, l'altra fissata tramite un albero metallico. [20]

Lo spostamento alla fine della fase di carico e lo spostamento di creep sono i due parametri utilizzati per confrontare le proprietà biomeccaniche dei campioni. Il primo parametro rappresenta lo spostamento che un oggetto subisce in seguito all'applicazione di carichi meccanici esterni e viene definito come la differenza tra le dimensioni dell'oggetto prima e dopo il carico, curva X1 nella figura 19. Durante questa fase, che varia da campione a campione, lo spostamento si può identificare con la componente di deformazione elastica istantanea [20]. È importante sottolineare che il tessuto per consentire il movimento naturale deve avere una componente elastica di deformazione, ma è bene ricordare che non è consigliabile utilizzare tendini per gli interventi di ricostruzione che abbiano un allungamento elevato in quanto l'articolazione coinvolta potrebbe perdere stabilità e resistenza alle forze applicate. Lo spostamento di creep è la differenza tra le lunghezze dei campioni misurate alla fine della fase di carico e dopo 60 s di carico statico [20] (denominato creep deformation nella figura 19). Idealmente un tessuto tendineo allotrapiantato non presenta variazioni nel tempo della lunghezza dovute alle sollecitazioni meccaniche, consentendo che l'articolazione svolga correttamente la sua funzione. Tuttavia, nella realtà a causa del fenomeno di creep ciò non avviene sempre, perciò è fondamentale trovare un tessuto tendineo con la minore deformazione possibile [20].

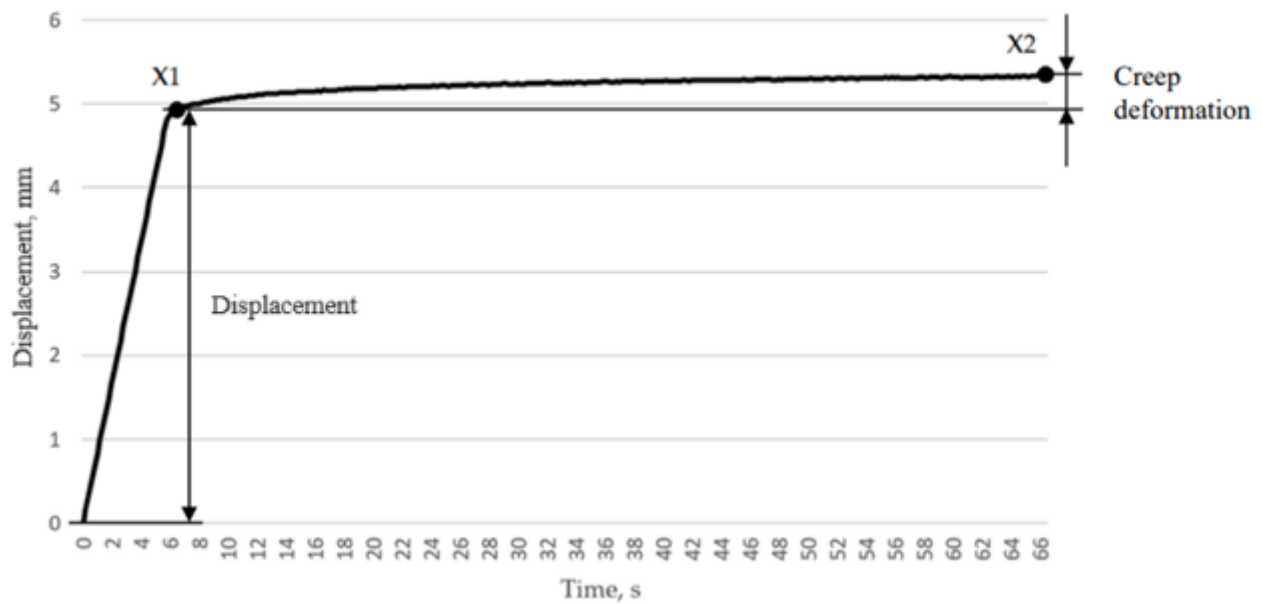


Fig.19- Spostamento alla fine della fase di carico rappresentato da X1, lo spostamento alla fine della fase di creep definita dalla differenza tra X2 e X1. [20]

III.2.2 Risultati

Nella figura 20 sono riportate le curve di creep in funzione del tempo relative a ciascun gruppo creato in base alla tipologia di tendine, al tipo di sterilizzazione ed al tempo di conservazione tramite deep-freezing.

I risultati ottenuti dallo studio sono stati rappresentati tramite i “diagrammi degli estremi e dei quartili” presenti nelle figure 21 e 22 che raffigurano i valori medi, massimi e minimi, inoltre i dati raccolti sono stati riassunti numericamente nelle tabelle 1 e 2. Il nome di ciascun gruppo è composto da tre caratteri, il primo indica il tipo di tendine (T – tibiale anteriore o P – peroneo lungo), il secondo la sterilizzazione utilizzata (G – irradiazione gamma o E – irradiazione a fascio di elettroni) ed infine il terzo carattere indica la durata della conservazione mediante deep-freezing (5 – cinque mesi o 6 – sei mesi).

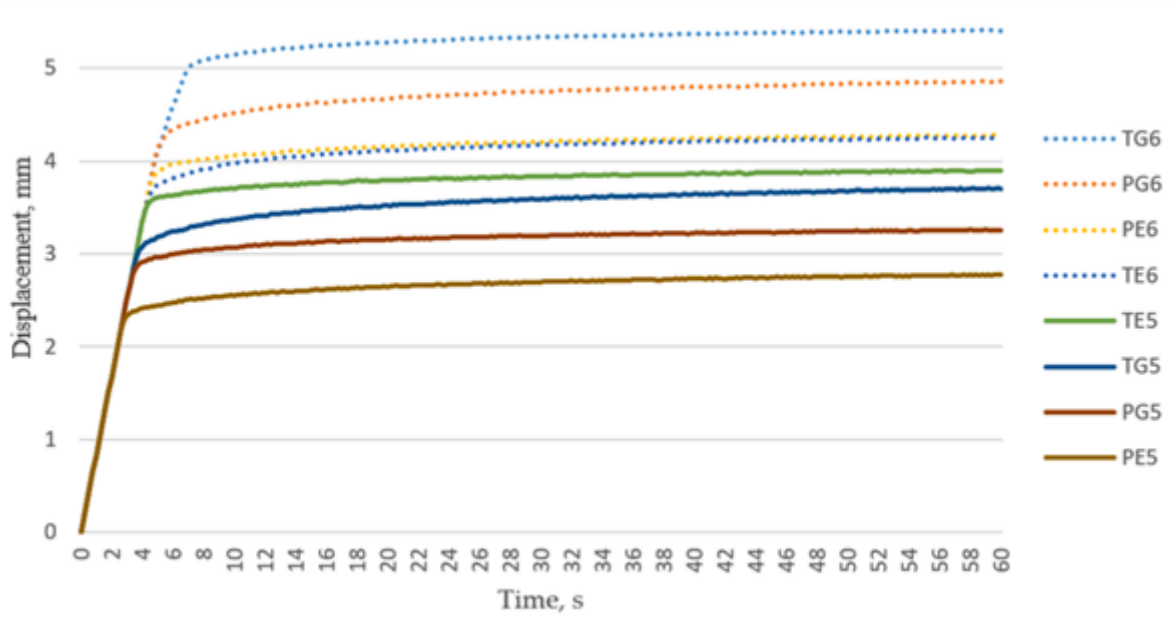


Fig.20- Curve di creep in funzione del tempo. T: Tibiale anteriore, P: Peroneo lungo, G: Radiazione gamma, E: Fascio di elettroni, 6: sei mesi di congelamento e 5: cinque mesi di congelamento. [20]

In base ai differenti tempi di conservazione, 5 mesi o 6 mesi, risulta significativo notare che lo spostamento alla fine della fase di carico dei gruppi TG5 e PG5 risulta inferiore rispetto ai gruppi TG6 e PG6, come mostrato nella figura 21. Per quanto riguarda lo spostamento di creep, il gruppo TE5 ha presentato un valore inferiore al gruppo TE6, rappresentato in figura 22.

I dati più rilevanti, relativi all'utilizzo di due tipologie di tendini (P e T), sono riferiti ai gruppi TE6 e PE6, poiché lo spostamento di creep del primo gruppo risulta significativamente maggiore rispetto al secondo (Fig. 22).

L'utilizzo di sterilizzazione tramite raggi gamma (G) o di elettroni (E) ha mostrato come il valore dello spostamento di creep del gruppo TE5 sia risultato inferiore a quello del gruppo TG5, come mostrato nella figura 22.

Nell'analisi dei dati sono stati indicati solo alcuni accoppiamenti tra gruppi di campioni, poiché in questi le differenze erano significative per comprendere gli effetti dei metodi applicati.

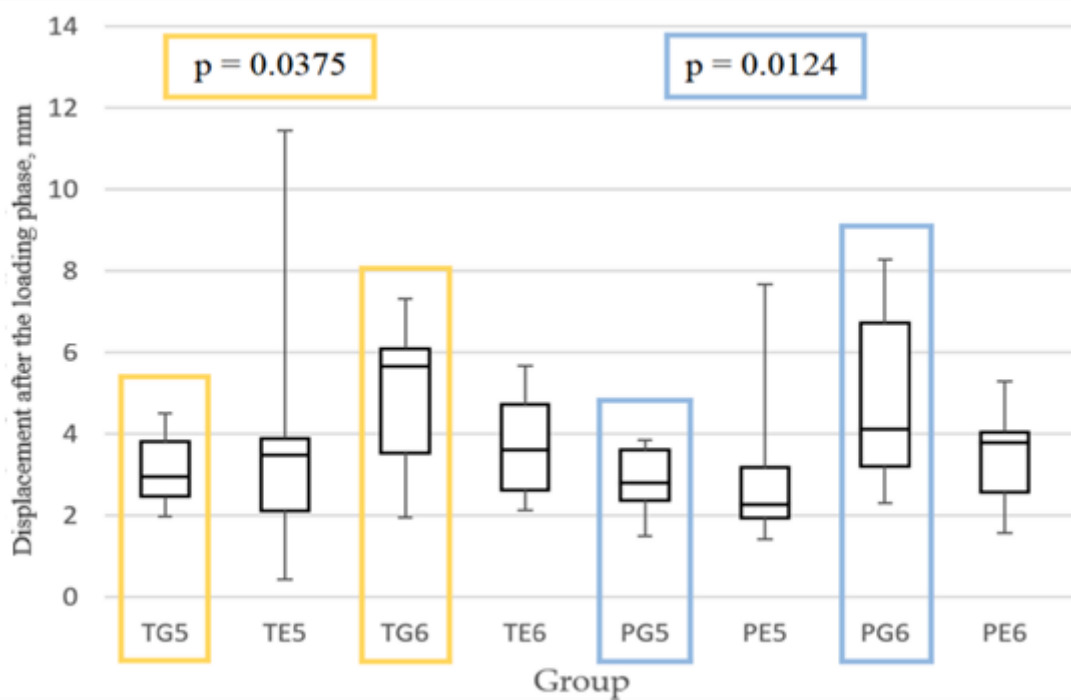


Fig.21- Valori dello spostamento al termine della fase di carico a 250 N. [20]

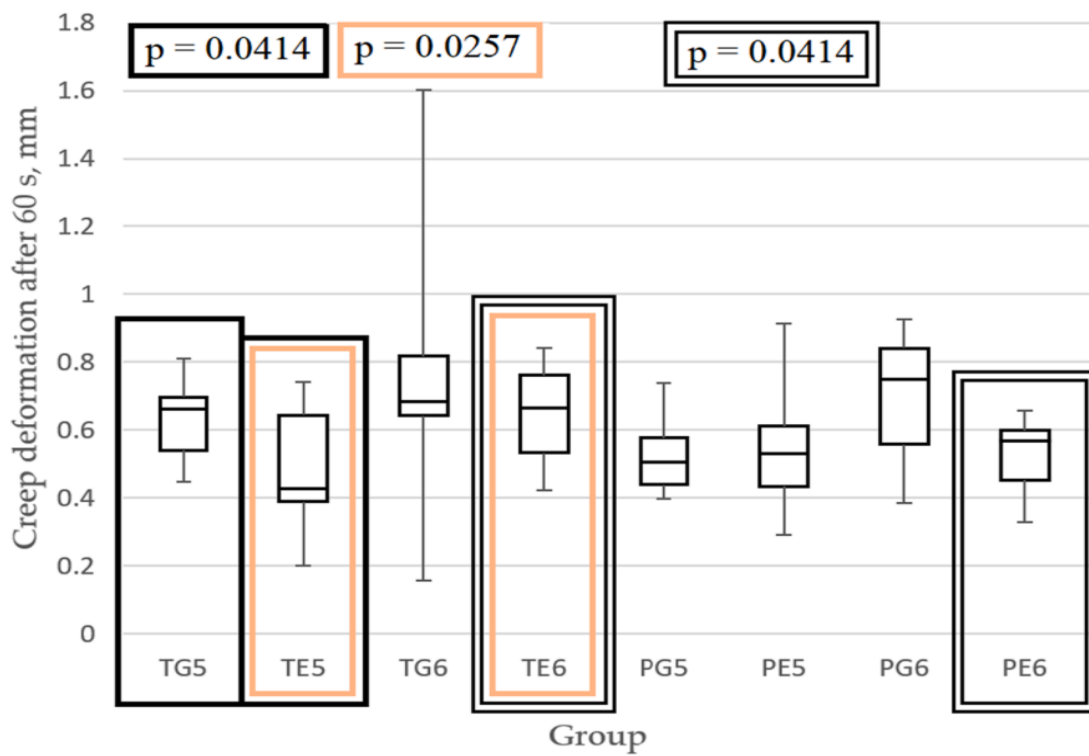


Fig.22- Valori dello spostamento di creep dopo 60 s di carico statico pari a 250 N. [20]

III.2.3 Analisi dati

L'obiettivo dello studio presentato è quello di valutare come il tipo di tendine, il metodo di sterilizzazione e la durata della conservazione possano influenzare le proprietà biomeccaniche dei tessuti tendinei, in particolare sono state valutate le differenze degli effetti sul comportamento di deformazione nei campioni.

Al termine di questo studio è emerso che il peroneo lungo risulta migliore rispetto al tibiale anteriore, la sterilizzazione tramite E-Beam viene consigliata rispetto all'irradiazione gamma e il congelamento a basse temperature per 5 mesi è più conveniente per i tessuti rispetto ai 6 mesi [20]. Questo poiché i gruppi, come ad esempio PE5, hanno subito una minore variazione durante l'aumento di carico e durante la fase di carico statico rendendo il tessuto più adatto alla chirurgia di ricostruzione. Nella figura 23 vengono rappresentati i rapporti tra spostamento alla fine della fase di carico (denominato Displacement) e spostamento di creep alla fine del periodo di carico costante (denominato Creep) nei vari gruppi. Si può osservare come un tempo maggiore di conservazione abbia un maggiore effetto sullo spostamento rispetto alla fase di creep.

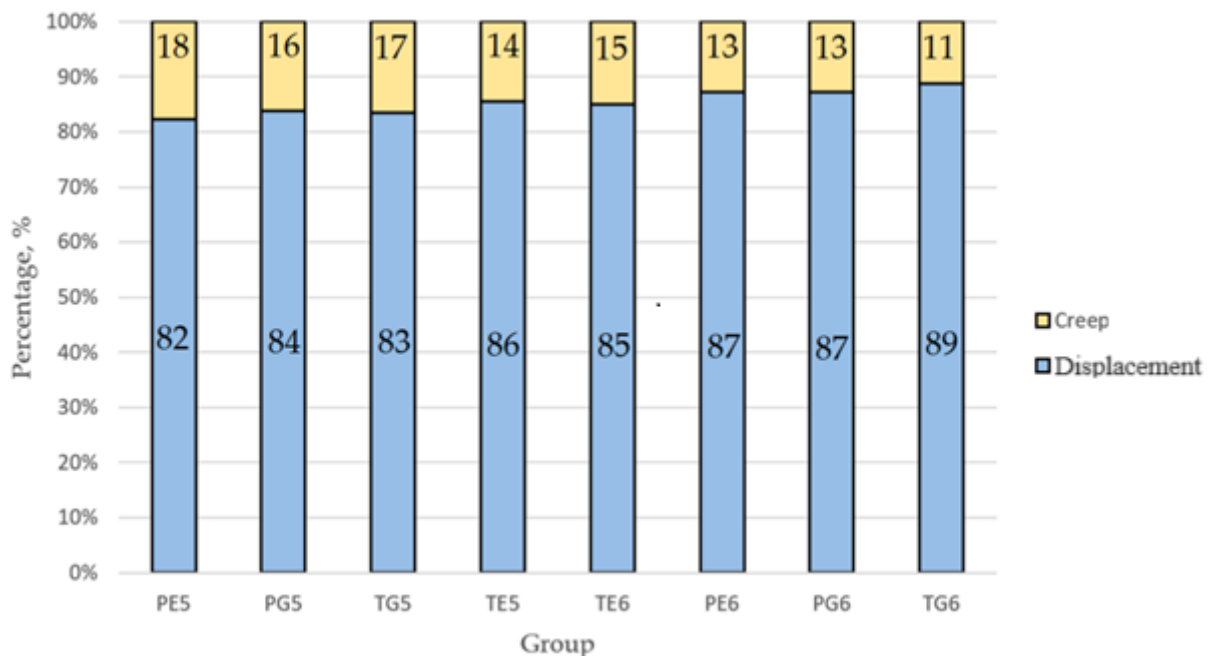


Fig.23- Percentuali di spostamento e di spostamento di creep alla fine della fase di carico. [20]

Nella prima parte dello studio vengono confrontati i campioni in base al tempo di conservazione, mentre il tipo di tessuto e il metodo di sterilizzazione sono gli stessi, inoltre la scelta del periodo di 5 o 6 mesi deriva dal fatto che nella chirurgia solitamente, per sicurezza, i tessuti non vengono conservati per tempi superiori a questi. I test effettuati dimostrano che la quantità di spostamento e di spostamento di creep alla fine della fase di carico aumentano con l'aumentare del tempo di conservazione, come si può osservare per le coppie di gruppi TG5 e TG6, PG5 e PG6 ed infine TE5 e TE6, rappresentati nelle figure 21 e 22, in cui i campioni conservati per 5 mesi hanno dimostrato deformazioni minori.

Successivamente i ricercatori hanno valutato le differenze tra le due tipologie di tendini selezionati, in modo tale che il tempo di conservazione e il metodo di irradiazione fossero gli stessi tra i gruppi. Secondo quanto osservato i tendini del peroneo lungo subiscono uno spostamento di creep minore rispetto ai tendini del tibiale anteriore. Ad esempio, il valore del gruppo TE6 è risultato maggiore di quello del gruppo PE6 (Tabella 2).

Infine, i campioni di tessuti sono stati confrontati in base al metodo di sterilizzazione utilizzato. È stato rilevato che le radiazioni gamma provocano uno spostamento di creep maggiore rispetto a quello creato dal fascio di elettroni. Questo si può notare nella figura 22 tra i gruppi TG5 e TE5 e confrontando i rispettivi valori della mediana, 0.6617 e 0.4283, rappresentati nella tabella 2.

Grazie a questo studio si può concludere che, basandosi sul comportamento di creep, il peroneo lungo sterilizzato con fascio di elettroni e conservato per cinque mesi tramite deep-freezing risulta la scelta migliore nel caso in cui sia necessario effettuare una ricostruzione del legamento crociato anteriore tramite allotrapianto. Questo garantisce una minore deformazione del tessuto sottoposto ai vari processi preoperatori ed in seguito una migliore funzionalità dell'articolazione coinvolta.

| Number of samples | TG5 | TE5 | TG6 | TE6 | PG5 | PE5 | PG6 | PE6 |
|-------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1. | 3.7977 | 3.4777 | 5.9573 | 4.9946 | 2.5989 | 7.6589 | 8.2713 | 5.28220 |
| 2. | 3.4763 | 2.2454 | 6.1372 | 2.6096 | 3.4864 | 2.8337 | 5.9577 | 4.1368 |
| 3. | 4.1488 | 0.4137 | 5.6630 | 3.6002 | 2.7599 | 2.2690 | 2.8093 | 2.4884 |
| 4. | 2.9426 | 3.6110 | 2.6566 | 3.8352 | 3.6326 | 1.7801 | 2.2911 | 3.8236 |
| 5. | 2.1258 | 1.9878 | 1.9320 | 2.1611 | 3.6387 | 2.2667 | 4.1209 | 1.5493 |
| 6. | 2.4436 | 3.6270 | 3.4435 | 2.1225 | 1.4850 | 1.4104 | 3.4358 | 2.6465 |
| 7. | 1.9541 | 4.1389 | 3.8178 | 2.6224 | 3.8288 | 3.6368 | 2.9643 | 3.9463 |
| 8. | 3.7917 | 5.2795 | 6.9435 | 2.9876 | 1.6306 | 3.2781 | 7.9920 | 3.1649 |
| 9. | 4.4981 | 2.6696 | 5.6491 | 4.6004 | 2.8081 | 1.9260 | 3.9989 | 4.1518 |
| 10. | 2.6637 | 11.4503 | 7.3061 | 4.8136 | 2.2844 | 1.9546 | 7.4714 | 2.2964 |
| 11. | 2.4699 | 0.6045 | - | 5.6626 | - | - | 5.1499 | 3.7846 |
| Median | 2.9426 | 3.4777 | 5.6561 | 3.6002 | 2.7840 | 2.2678 | 4.1209 | 3.7846 |
| Lower quartile | 2.4568 | 2.1166 | 3.5371 | 2.6160 | 2.3630 | 1.9332 | 3.2000 | 2.5675 |
| Upper quartile | 3.7947 | 3.8830 | 6.0922 | 4.7070 | 3.5961 | 3.1670 | 6.7145 | 4.0415 |

Tabella 1: Risultati numerici dello spostamento alla fine della fase di carico (differenza tra la lunghezza degli allotrapianti prima e dopo il carico), mm. [20]

| Number of samples | TG5 | TE5 | TG6 | TE6 | PG5 | PE5 | PG6 | PE6 |
|-------------------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|---------------|
| 1. | 0.6987 | 0.4283 | 0.6937 | 0.75941 | 0.3968 | 0.6204 | 0.8419 | 0.5923 |
| 2. | 0.4473 | 0.4690 | 0.8418 | 0.47283 | 0.7010 | 0.8463 | 0.9250 | 0.6037 |
| 3. | 0.6617 | 0.2047 | 0.5109 | 0.66446 | 0.4320 | 0.4934 | 0.3851 | 0.3376 |
| 4. | 0.7736 | 0.7423 | 0.7478 | 0.61761 | 0.7398 | 0.9136 | 0.4057 | 0.4715 |
| 5. | 0.6960 | 0.7162 | 0.1578 | 0.67928 | 0.5770 | 0.5199 | 0.7513 | 0.3293 |
| 6. | 0.5105 | 0.6148 | 0.6412 | 0.56245 | 0.5747 | 0.3557 | 0.7994 | 0.5957 |
| 7. | 0.5722 | 0.6731 | 0.8413 | 0.76406 | 0.4881 | 0.5830 | 0.8409 | 0.5692 |
| 8. | 0.6339 | 0.3868 | 0.6451 | 0.42367 | 0.4361 | 0.5395 | 0.8716 | 0.6124 |
| 9. | 0.6779 | 0.3931 | 1.6026 | 0.50561 | 0.5265 | 0.2908 | 0.5848 | 0.6590 |
| 10. | 0.8095 | 0.4150 | 0.6739 | 0.84315 | 0.4476 | 0.4163 | 0.5823 | 0.4365 |
| 11. | 0.4884 | 0.2016 | - | 0.78550 | - | - | 0.5334 | 0.4974 |
| Median | 0.6617 | 0.4283 | 0.6838 | <u>0.6645</u> | 0.5073 | 0.5297 | 0.7513 | <u>0.5692</u> |
| Lower quartile | 0.5413 | 0.3900 | 0.6421 | 0.5340 | 0.4389 | 0.4356 | 0.5578 | 0.4540 |
| Upper quartile | 0.6973 | 0.6440 | 0.8179 | 0.7617 | 0.5764 | 0.6110 | 0.8414 | 0.5997 |

Tabella 2: Risultati numerici dello spostamento di creep (differenza tra le lunghezze misurate alla fine della fase di carico e dopo 60 s di carico statico di 250 N), mm. [20]

Gli effetti delle radiazioni ionizzanti vengono valutati anche sulla base di altri parametri come: carico massimo, modulo di elasticità (o di Young), deformazione dovuta alla massima forza raggiunta e resistenza, oltre al creep e allo spostamento alla fine della fase di carico. Trattando anche altre tipologie di tendini. Infatti, secondo Kaminski et al. [22] l'applicazione di diverse dosi di irradiazione con elettroni non ha riportato rilevanti modifiche ai parametri del tendine rotuleo, al contrario, Seto et al. [23] dimostrano che le radiazioni gamma a basse ed alte dosi (25 kGy e 50 kGy) ed anche l'E-Beam, applicati a tendini di coniglio, provocano una diminuzione del carico massimo, del modulo di Young, della deformazione e della resistenza.

III.3 Analisi effetti su cinque tipologie di tendini

I principali parametri che verranno trattati nel corso del capitolo sono rappresentati nella figura seguente.

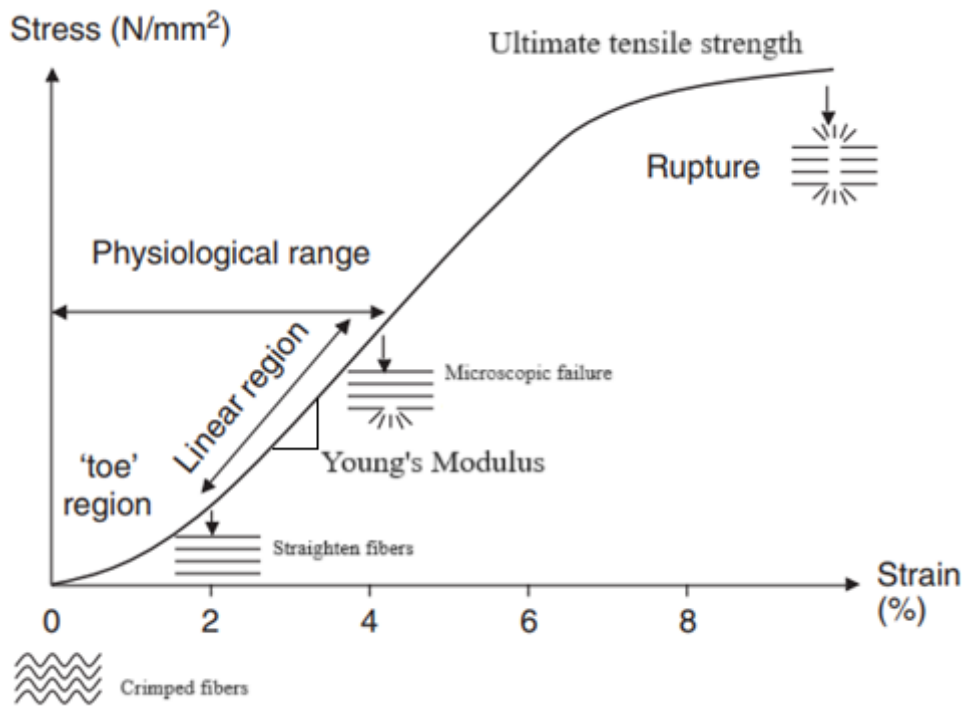


Fig.24- Rappresentazione grafica delle proprietà dei materiali. [2]

La curva stress-strain rappresentata nella figura 24 fornisce informazioni sulle proprietà meccaniche dei materiali e permette di rappresentarne il comportamento nel momento in cui vengono sottoposti a dei test di trazione [9]. La relazione Stress-Strain ha un andamento di tipo non lineare, caratterizzato da una prima fase a bassa rigidità e da una seconda fase di andamento lineare. La pendenza della curva in questa zona definisce il modulo di elasticità (o di Young) dato dal rapporto tra Stress e Strain [9], la sua unità di misura nel SI è il pascal (Pa), ma solitamente vengono utilizzati i MPa o i GPa. Lo Stress indica la sollecitazione uni-assiale e viene definita come rapporto tra forza e area della sezione trasversale del materiale, lo Strain indica la deformazione ed è rappresentato dal rapporto tra la variazione della lunghezza e la lunghezza originale del campione [9]. Quando viene superata la regione lineare (linear region), il campione perde la sua rigidità fino a raggiungere il punto massimo del carico di rottura (Ultimate tensile strength), dato dal rapporto tra la forza massima che porta alla rottura del campione (maximum load) e l'area della sezione trasversale originale del materiale. La deformazione nel punto di rottura quantifica l'allungamento totale del materiale.

III.3.1 Materiali e metodi

L'ipotesi iniziale dello studio di Hangody et al. [21], presentato in seguito, è che non ci siano differenze nelle proprietà biomeccaniche tra i tendini prima del processo di irradiazione e così anche dopo aver terminato la sterilizzazione.

L'irradiazione gamma viene considerata un metodo molto valido per la sterilizzazione dei tessuti grazie ai suoi vantaggi, l'elevata capacità di eliminare gli agenti patogeni dai tendini dipende in gran parte dalla dose applicata durante il processo; infatti, si possono distinguere due livelli di azione delle radiazioni gamma, dosi comprese tra 10 kGy e 15 kGy vengono identificate come dosi battericide, mentre dosi più elevate, comprese tra 30 kGy e 50 kGy, sono considerate dosi virucide, ovvero in grado di eliminare organismi dannosi come i virus. Tuttavia, valori di radiazioni molto elevati possono danneggiare con più facilità la struttura e le proprietà biomeccaniche dei tendini. La causa degli effetti dannosi dei raggi gamma sui tessuti è dovuta al fatto che questi scindono le catene polipeptidiche delle fibre di collagene in modo diretto e portano indirettamente alla radiolisi dell'acqua che rilascia radicali liberi in grado di danneggiare il collagene [21]. Per ridurre questo effetto vengono spesso utilizzate soluzioni radioprotettive capaci di eliminare i radicali liberi.

Lo studio include 30 cadaveri umani dai quali sono stati prelevati cinque tipi di tendini: Achille, quadricipite, semitendinoso più gracile (Figura 25), tibiale anteriore e peroneo lungo. Prima di procedere con i test, ogni tendine è stato esaminato, valutando anche la storia clinica del donatore, per verificare che non ci fossero alterazioni, segni di lesioni o malattie. Successivamente i campioni sono stati immersi in una soluzione radioprotettiva con il 16,7 % di 1,2-propandiolo, il 24 % di dimetilsolfossido, il 3,8 % di D-trealosio e il 2,7 % di D-mannitolo e congelati fino a - 80°C. I tendini sono stati divisi in tre gruppi, il gruppo A conteneva 50 campioni non irradiati, il gruppo B era costituito da 50 tendini irradiati con una dose pari a 21 kGy di radiazione gamma ed infine il gruppo C conteneva 50 campioni irradiati con una dose di raggi gamma di 42 kGy. Prima di avviare i test meccanici i tendini sono stati scongelati e portati a temperatura ambiente e per ogni tessuto è stata misurata l'area della sezione trasversale e la lunghezza tra i morsetti congelati a cui i tendini sono stati fissati; infatti, per le prove di resistenza è stato usato un telaio Inston 8872 con capacità di carico pari a 25 kN e dotato di pinze da congelamento, utilizzato anche da Gökler et al. nella loro ricerca. Prima di effettuare le prove di trazione, è stato applicato un carico di 50 N per 30 secondi, in seguito, durante le prove di carico ciclico, i tendini sono stati sottoposti a carichi compresi tra 50 N e 250 N per 1000 cicli ad una frequenza di 2 Hz e poi è stata eseguita una prova di carico fino alla rottura, i test sono stati effettuati con una velocità di prova pari a 20 mm/minuto [21].



Fig.25- Rappresentazione del tendine semitendinoso + gracile che si va ad inserire sul lato mediale della tibia (Pes anserinus). [24]

III.3.2 Risultati

Modulo di elasticità di Young, carico massimo, deformazione dovuta all'applicazione ciclica di una forza compresa tra 50 N e 250 N e deformazione a rottura sono i parametri misurati in questo studio per confrontare le proprietà biomeccaniche dei tendini.

Nel gruppo A, costituito da campioni “freschi” ovvero non sottoposti a sterilizzazione ed usati come riferimento, i risultati rappresentavano i valori dei parametri iniziali di ogni tendine e nello studio è stato evidenziato come il tendine d’Achille presenti un valore del modulo di Young inferiore a tutti gli altri campioni. Per quanto riguarda la deformazione dovuta alle prove cicliche e la deformazione a rottura, il valore riferito al tendine d’Achille era più alto rispetto a quello del PL, del TA, del STG e del quadricipite. Non sono state riscontrate differenze significative tra i valori del carico massimo dei tendini ad eccezione del STG che ha mostrato un valore inferiore rispetto agli altri. (Tabelle 3 e 4)

Il gruppo B, costituito da tendini sottoposti a sterilizzazione tramite raggi gamma con una dose di 21 kGy, presentava anche in questo caso, valori del modulo di Young inferiori principalmente per il tendine d’Achille. I valori del carico massimo sono risultati inferiori per il tendine STG rispetto agli

altri e il valore ottenuto delle prove cicliche del tendine d'Achille risultava essere superiore a tutti così come il valore della deformazione a rottura. (Tabelle 3 e 4)

Infine, il gruppo C, contenente tendini irradiati con raggi gamma ad una dose di 42 kGy, ha mostrato che il valore del modulo di Young del TA è risultato essere superiore rispetto agli altri, i valori del carico massimo dell'Achille, del quadricipite e del TA erano maggiori rispetto al PL e al STG. Infine, i valori della deformazione delle prove cicliche dell'Achille erano superiori rispetto agli altri e così valeva anche per la deformazione a rottura (Tabella 3 e 4), perciò questo significa minore resistenza del tendine all'applicazione di forze.

I dati numerici ottenuti dalle misurazioni sono raccolti nelle tabelle 3 e 4 come mediana con il corrispondente range interquartile (25-75% percentile).

| | Group A | | | Group B | | | Group C | | |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | Median | 25% | 75% | Median | 25% | 75% | Median | 25% | 75% |
| Achilles | | | | | | | | | |
| Young's modulus of elasticity (MPa) | 176.42 | 116.63 | 199.79 | 181.7 | 157.65 | 210.78 | 134.75 | 119.68 | 204.68 |
| Maximum load (N) | 2941.38 | 1726.28 | 4052.72 | 3572.54 | 3178.97 | 3857.89 | 3392.01 | 3211.1 | 3677.851 |
| Strain at tensile strength (mm/mm) | 0.2415 | 0.215 | 0.2621 | 0.2254 | 0.2002 | 0.2509 | 0.2561 | 0.227 | 0.3272 |
| Strain at break (mm/mm) | 0.3723 | 0.3272 | 0.5035 | 0.4467 | 0.3787 | 0.5221 | 0.498 | 0.4061 | 0.5328 |
| Quadriciceps | | | | | | | | | |
| Young's modulus of elasticity (MPa) | 200.49 | 155.87 | 498.03 | 302.96 | 257.25 | 411.29 | 192.28 | 140.4 | 246.92 |
| Maximum load (N) | 2454.75 | 1489.5 | 3828.28 | 3184.32 | 3082.7 | 4114.1 | 3464.35 | 3001.9 | 4738.1 |
| Strain at tensile strength (mm/mm) | 0.1335 | 0.1046 | 0.1349 | 0.1467 | 0.1274 | 0.1702 | 0.2404 | 0.1774 | 0.355 |
| Strain at break (mm/mm) | 0.2783 | 0.2067 | 0.3217 | 0.2618 | 0.2307 | 0.3153 | 0.5178 | 0.3492 | 0.5909 |
| Semitendinosus + gracilis | | | | | | | | | |
| Young's modulus of elasticity (MPa) | 213.11 | 160.54 | 285.344 | 248.93 | 234.5 | 291.34 | 213.88 | 193.6 | 272.63 |
| Maximum load (N) | 1604.24 | 1330.48 | 2525.45 | 2310.32 | 1749.12 | 2435.18 | 2271.96 | 1620.84 | 2587.49 |
| Strain at tensile strength (mm/mm) | 0.1237 | 0.1082 | 0.1669 | 0.1331 | 0.0985 | 0.1433 | 0.1479 | 0.1203 | 0.1744 |
| Strain at break (mm/mm) | 0.223 | 0.1704 | 0.275 | 0.1772 | 0.1558 | 0.1942 | 0.2308 | 0.2087 | 0.2647 |

Tabella 3: Risultati del test biomeccanico dei tendini di Achille, quadricipite e STG. [21]

| | Group A | | | Group B | | | Group C | | |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Median | 25% | 75% | Median | 25% | 75% | Median | 25% | 75% |
| Tibialis anterior | | | | | | | | | |
| Young's modulus of elasticity (MPa) | 313.82 | 290.75 | 413.76 | 327.93 | 283.62 | 346.84 | 375.15 | 307.31 | 428.82 |
| Maximum load (N) | 2954.42 | 2519.12 | 3376.27 | 3107.76 | 2501.35 | 3383.11 | 2678.96 | 2497.51 | 3155.68 |
| Strain at tensile strength (mm/mm) | 0.137 | 0.1106 | 0.1774 | 0.1542 | 0.1384 | 0.1784 | 0.1318 | 0.1225 | 0.157 |
| Strain at break (mm/mm) | 0.2393 | 0.1435 | 0.2996 | 0.1834 | 0.1473 | 0.212 | 0.161 | 0.1482 | 0.1922 |
| Peroneus longus | | | | | | | | | |
| Young's modulus of elasticity (MPa) | 243.71 | 217.81 | 277.43 | 284.84 | 268.81 | 316.07 | 333.11 | 254 | 403.67 |
| Maximum load (N) | 2522.83 | 2055.15 | 2896.55 | 2631.81 | 2333.87 | 3257.47 | 2291.71 | 1767.95 | 2599.15 |
| Strain at tensile strength (mm/mm) | 0.147 | 0.1284 | 0.1715 | 0.1569 | 0.138 | 0.169 | 0.1151 | 0.0957 | 0.1413 |
| Strain at break (mm/mm) | 0.2637 | 0.2456 | 0.2706 | 0.2067 | 0.157 | 0.219 | 0.1487 | 0.1181 | 0.1607 |

Tabella 4: Risultati del test biomeccanico dei tendini del tibiale anteriore e del peroneo lungo. [21]

III.3.3 Analisi dati

Lo studio di Hangody et al. [21] dimostra come tipologie diverse di tendine, in questo caso cinque, presentino proprietà biomeccaniche iniziali differenti e che questo poi si ripeta una volta applicati i metodi di sterilizzazione. Gli autori sostengono che il fattore più importante da considerare sia il modulo di Young, che descrive l'elasticità dei tendini al carico normale [21]; infatti, l'irradiazione gamma di 42 kGy ha ridotto notevolmente il valore di questo parametro nel caso del quadricipite e del tendine d'Achille, mentre per quanto riguarda il TA e il PL non ci sono state grosse differenze. Questo sostiene la teoria dello studio di Gökler et al. [20] secondo cui il tibiale anteriore e il peroneo lungo mantengono ottime proprietà biomeccaniche, tra cui il modulo di Young, il carico massimo, la deformazione dovuta all'applicazione di una determinata forza e la deformazione a rottura, rispetto alla maggior parte dei tessuti tendinei attualmente utilizzati.

I dati ottenuti per il carico massimo sono coerenti con quelli della letteratura [21]. I valori mediani sono circa superiori a 2200 N per tutti i tendini ad eccezione del semitendinoso (STG) non irradiato nel gruppo A che presenta un valore medio pari a circa 1600 N; tuttavia, i ricercatori fanno sapere che questi valori sono molto maggiori rispetto alle normali forze a cui, per esempio, viene sottoposto il legamento crociato durante la deambulazione (303-355 N) [21].

I valori della deformazione dovuta all'applicazione ciclica di forze comprese tra 50 N e 250 N e della deformazione a rottura, ottenuti dopo l'irradiazione a bassa dose (21 kGy) e ad alta dose (42 kGy), sono aumentati per il tendine d'Achille e per il quadricipite (Tabella 3). Questo per i ricercatori indica che con l'aumentare della dose utilizzata, diminuisce la capacità dei tendini di resistere alle forze di allungamento e viene meno anche la capacità di ristabilire la lunghezza originale provocando una

maggior lassità dell'articolazione interessata [21]. Invece, per quanto riguarda il TA e il PL questi parametri sono diminuiti con l'aumentare della dose di radiazione gamma. Nel complesso non sono state riscontrate differenze significative per il tendine tibiale anteriore che presentava valori simili tra tendini non irradiati e irradiati.

Al termine delle misurazioni, Hangody et al. [21] affermano che l'utilizzo di basse ed alte dosi di irradiazione gamma ha maggiore effetto sulle proprietà biomeccaniche del tendine d'Achille e del quadricipite che quindi risultano essere i più sensibili ai trattamenti. Per quanto riguarda il STG e il PL, l'effetto sui parametri è risultato essere lieve; invece, nel caso del TA le variazioni dei valori sono risultate minime, quasi assenti, in seguito ai processi di sterilizzazione. Inoltre, gli autori fanno sapere che l'ipotesi iniziale è stata smentita poiché diversi tipi di tendini reagiscono diversamente alle varie dosi di radiazioni gamma [21].

III.4 Conclusioni

Gli studi presentati in questa tesi sono stati svolti con lo scopo di valutare le proprietà biomeccaniche di alcune tipologie di tendini umani in seguito all'applicazione di tecniche di sterilizzazione e conservazione. In letteratura sono presenti numerosi articoli che riguardano i rischi associati all'uso di tessuti tendinei provenienti da donatori e la necessità di sottoporli a processi di sterilizzazione che garantiscano l'eliminazione di eventuali agenti batterici. Nella chirurgia questi interventi di ricostruzione o sostituzione, come nel caso del legamento crociato danneggiato, sono comuni soprattutto negli Stati Uniti dove si verificano circa 130.000 casi di ricostruzioni all'anno [21]. L'uso più frequente degli allotrapianti, dovuto ai numerosi vantaggi che ne derivano, è uno dei motivi per cui vengono effettuate queste ricerche approfondite sui tessuti.

Sulla base di quanto riportato da Gökler et al. [20] nel loro lavoro di ricerca, il tendine peroneo lungo sterilizzato con radiazioni a fascio elettronico e conservato con il metodo deep-freezing presenta ottimi parametri sul comportamento meccanico che quindi lo rendono adatto agli interventi di ricostruzione. Per arrivare a questi risultati sono stati effettuati test di creep (test a carico costante) su campioni di peroneo lungo e tibiale anteriore irradiati con raggi gamma ed E-Beam e conservati per 5 o 6 mesi.

Sebbene la procedura di irradiazione con fascio di elettroni abbia fornito risultati positivi e favorevoli al suo utilizzo, attualmente la procedura più frequentemente applicata è l'irradiazione gamma che presenta alcuni vantaggi rispetto alla tecnica precedente, come ad esempio una maggiore penetrazione nei tessuti, ma provoca effetti dipendenti dalla dose che possono essere svantaggiosi. Alcuni studi

effettuati sul tendine rotuleo umano (BPTB) irradiato con raggi gamma, sottolineano le alterazioni della struttura e delle proprietà biomeccaniche dovute alle diverse dosi utilizzate. Ad esempio, Fiderer et al. [25] riportano come la forza massima, l'energia di deformazione, il modulo e la sollecitazione massima nei tendini freschi e congelati vengano ridotte del 15% dopo l'irradiazione gamma con una dose di 2,0 Mrad. Mentre dopo una dose di 3,0 e 4,0 Mrad si verifica una diminuzione delle proprietà rispettivamente dal 10% al 24% e dal 19% al 46%. Inoltre, Curran et al. [26] nel loro studio sulle proprietà meccaniche cicliche e di rottura di tendini BPTB, hanno sottolineato che la minore resistenza dei tendini irradiati con 20 kGy rispetto a quelli non trattati, può contribuire al cedimento del legamento crociato anteriore e che l'aumento dell'allungamento dovuto ad un movimento ciclico può essere dannoso per la sua funzionalità. Lo studio riporta che il carico di rottura era in media di 1965 ± 512 N per gli innesti irradiati e di 2457 ± 647 N per quelli non irradiati. Infine, McGilvray et al. [27] hanno effettuato uno studio su BPTB ovini, focalizzandosi sugli effetti della dose di radiazioni gamma ^{60}Co sulle proprietà biomeccaniche strutturali iniziali. Dunque, è emerso che le radiazioni a bassa dose (15 kGy) non compromettono l'integrità meccanica del tessuto che invece viene danneggiata dalle radiazioni ad alta dose (25 kGy). Per garantire una migliore sterilizzazione è conveniente applicare dosi elevate di radiazioni (30-50 kGy) che tuttavia possono alterare la struttura dei tessuti. Questi effetti si possono ridurre utilizzando delle soluzioni radioprotettive in cui immergere i tessuti, applicate anche negli articoli di Gökler et al. [20] e di Hangody et al. [21], prima di procedere con i vari trattamenti, inoltre queste sostanze non alterano le proprietà dei tendini.

L'articolo di Hangody et al. [21] dimostra che tipologie diverse di tendini reagiscono in modo differente alle varie dosi di radiazioni gamma, sia basse (21 kGy) che alte (42 kGy). I campioni sono stati sottoposti a prove di carico ciclico seguite da prove di carico fino alla rottura, analizzando i valori del modulo di elasticità di Young, della forza massima e della deformazione. Alcuni campioni come il tendine d'Achille sono più sensibili alle radiazioni e quindi le proprietà biomeccaniche vengono alterate, altri tessuti tendinei come il peroneo lungo o il tibiale anteriore dimostrano un'elevata resistenza all'applicazione dei processi di sterilizzazione riportando basse variazioni delle caratteristiche biomeccaniche e strutturali, favorendone così il loro utilizzo.

In conclusione; gli studi riportati in questo elaborato hanno in comune l'obiettivo di approfondire l'efficacia delle tecniche di sterilizzazione e conservazione attuali e i loro effetti sui campioni analizzati, questo permette di fornire informazioni approfondite che possono influenzare la scelta di eventuali tessuti tendinei e rispettivi metodi di trattamento qualora sia necessaria una loro applicazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Kannus: *Structure of the tendon connective tissue*. Scand J Med Sci Sports (2000): 10: 312–320
- [2] James H.C. Wang: *Mechanobiology of tendon*. Journal of Biomechanics 39 (2006) 1563–1582
- [3] <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/ac857307-f99b-4eb2-a5be-aa3fedcd51e7/wdev201-fig-0001-m.jpg>
- [4] A. Frizziero, F. Olivia, N. Maffulli, “*Tendinopatie: stato dell’arte e prospettive*”. Pacini Editore SpA-Pisa 2011
- [5] G. G. Schulze-Tanzil, M. Delgado Cáceres, R. Stange, B. Wildemann, D. Docheva: *Tendon healing: a concise review on cellular and molecular mechanisms with a particular focus on the Achilles tendon*. Bone Joint Res 2022;11(8):561–574.
- [6] S. Zhang, W. Ju, X. Chen, Y. Zhao, L. Feng, Zi Yin, Xiao Chen: *Hierarchical ultrastructure: An overview of what is known about tendons and future perspective for tendon engineering*. Bioactive Materials 8 (2022) 124-139.
- [7] <https://www.fisiokine.com/wp-content/uploads/2018/05/TENDINE.jpg>
- [8] <https://www.researchgate.net/profile/GrahamRiley2/publication/236168496/figure/fig3/AS:340614974590990@1458220346395/13-The-theoretical-basis-of-tendon-overuse-injury-The-tendon-stress-strain-curve-is.png>
- [9] M. Hanczar, M. Moazen, R. Day: *The significance of biomechanics and scaffold structure for bladder tissue engineering*. International Journal of Molecular Sciences. 2021
- [10] R. Singh, D. Singh, A. Singh: *Radiation sterilization of tissue allografts: A review*. World Journal of Radiology (2016)
- [11] P. Mickiewicz, M. Binkowski, H. Bursig, Z. Wróbel: *Preservation and sterilization methods of the meniscal allografts: literature review*. Cell Tissue Bank (2014) 15:307–317
- [12] Frederick M. Azar: *Tissue Processing: Role of Secondary Sterilization Techniques*. Clin Sports Med 28 (2009) 191–201

- [13] *Why Choose RTI Surgical Tendons?* Distributed by: RTI Surgical, Inc.pdf 28
- [14] https://img.medicaexpo.it/images_me/photo-g/103597-11742910.webp
- [15] A. T. Hoburg, S. Keshlaf, T. Schmidt, M. Smith, U. Gohs, C. Perka, A. Pruss, S. Scheffler: *Effect of Electron Beam Irradiation on Biomechanical Properties of Patellar Tendon Allografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. The American Journal of Sports Medicine, Vol. 38, No. 6. 2010
- [16] X. Yang, J. Feng, F. Wang, Y. Hu: *Irradiation sterilization used for allogenic tendon: a literature review of current concept*. Cell Tissue Bank. 2019 Jun.
- [17] <https://cdn-degmb.nitrocdn.com/assets/images/optimized/rev-d26f84f/3dmusclelab.com/wp-content/uploads/2022/08/anatomical-stirrup.jpg>
- [18] <https://www.carlodamioli.com/wp-content/uploads/2020/02/legamento2.jpg>
- [19] https://medicinaonline.co/ezoimgfmt/la_medicinaestetica.files.wordpress.com/medicina-online-dott-emilio-alessio-loiacono-tendine-achille.jpg
- [20] D. J. Gökler, D. Faragó, G. Szebényi, R. Kiss, K. Pap: *The effect of sterilization and storage on the viscoelastic properties of human tendon allografts*. Journal of Biomechanics 127 (2021) 110697
- [21] G. Hangody, G. Szebényi, B. Abonyi, R. Kiss e L. Hangody: *Does a different dose of gamma irradiation have the same effect on five different types of tendon allografts ? - a biomechanical study*. International Orthopaedics (SICOT) (2017) 41:357–365
- [22] A. Kaminski, G. Gut, J. Marowska, M. Łada-Kozłowska, W. Biwejnjs, M. Zasacka: *Mechanical properties of radiation-sterilised human Bone-Tendon-Bone grafts preserved by different methods*. Cell Tissue Bank (2009) 10:215–219
- [23] A. Seto, C. J. Gatt, M. G. Dunn: *Radioprotection of Tendon Tissue via Crosslinking and Free Radical Scavenging*. Clin Orthop Relat Res (2008) 466:1788–1795
- [24] <https://www.giovannichetta.it/img/zampadoca.jpg>
- [25] B. M. Fideler, C. T. Vangsness, B. Lu, C. Orlando, T. Moore: *Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts*. Am J Sports Med 1995; 23: 643-646

[26] A. R. Curran, D. J. Adams, J. L. Gill, M. E. Steiner, A. D. Scheller: *The biomechanical effects of low-dose irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts*. Am J Sports Med 2004; 32: 1131-1135

[27] K. C. McGilvray, B. G. Santoni, A. S. Turner, S. Bogdansky, D. L. Wheeler, C. M. Puttlitz: *Effects of (60)Co gamma radiation dose on initial structural biomechanical properties of ovine bone-patellar tendon-bone allografts*. Cell Tissue Bank 2011; 12: 89-98