



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria  
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

## **Applicazione di diverse tipologie di scaffold per il trattamento di problematiche localizzate nella cuffia dei rotatori.**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Federico Masetti

Data:  
A.A. 2022/2023

Firma laureando

Firma relatore

## **Indice**

Abstract	pagina 3
Introduzione	pagina 4
Capitolo 1: Cuffia dei rotatori	pagina 5
1.1 Anatomia	pagina 5
1.2 Patofisiologia	pagina 6
Capitolo 2: Scaffold	pagina 14
2.1 Ingegneria tissutale e caratteristiche funzionali desiderate	pagina 14
2.2 Tipologie di scaffold	pagina 16
2.2.1 Scaffold biologici: innesti xenogenici e innesti allogenici	pagina 17
2.2.2 Scaffold sintetici: degradabili e non degradabili	pagina 20
Capitolo 3: Valutazione di scaffold commerciali	pagina 24
Conclusioni	pagina 34
Bibliografia	pagina 35

## **Abstract**

La cuffia dei rotatori, costituita dai muscoli sovraspinato, infraspinato, sottoscapolare e piccolo rotondo, è potenzialmente sede di traumi in corrispondenza dell'entesi, dando origine ai cosiddetti Rotator Cuff Tears (RCT). Essi possono essere causati dallo stress o da degenerazione, e vengono classificati in base alla dimensione, alla forma e al numero di tendini che hanno subito lacerazioni.

Le principali patologie degenerative che colpiscono i tendini lacerati sono assottigliamento e disallineamento delle fibre collagene, degenerazione mixoide; degenerazione ialina, metaplasia condroide, calcificazione, proliferazione vascolare e filtrazione grassa. Per quanto concerne il processo riparativo, si osserva che esso viene facilitato in generale nelle lacerazioni di dimensioni minori; con un maggior numero di fibroblasti, mastociti, leucociti e vasi sanguigni. Per migliorare i processi riparativi della cuffia dei rotatori, l'ingegneria tissutale, attraverso l'utilizzo combinato di cellule, scaffold e fattori di crescita, sembra molto promettente.

La presente tesi, in particolare, intende concentrare l'attenzione sugli scaffold, ovvero sui biomateriali che, in forma di "impalcatura" in grado di favorire la rigenerazione tessutale, devono possedere specifiche caratteristiche funzionali.

La differenza principale tra i numerosi scaffold presenti sul mercato è legata alla loro origine, che può essere biologica o sintetica. Inoltre, tra quelli sintetici si possono distinguere scaffold degradabili e non degradabili, mentre tra quelli biologici vi sono scaffold xenogenici e alloigenici.

Tra le possibili analisi comparative con un tendine sano, in questa tesina ci si sofferma su valutazioni di natura meccanica, su scala macroscopica e microscopica, e istologica.

Confrontando il comportamento di due scaffold biologici e due scaffold sintetici, è stato riscontrato come la proliferazione dei tenociti e l'espressione genica di collagene di tipo I e tipo III, sia favorita su scaffold biologici. D'altra parte, l'adesione cellulare, inizialmente maggiore su scaffold sintetici, tende ad essere favorita su scaffold biologici col passare del tempo. Per quanto riguarda le proprietà micro e macromeccaniche, si verifica che gli scaffold biologici hanno caratteristiche simili al tendine sano a livello microscopico; quelli sintetici, a livello macroscopico.

Ulteriori studi saranno in futuro necessari per identificare il sostituto migliore per la cura delle lesioni alla cuffia dei rotatori.

## **Introduzione**

Nell'ultimo decennio si è registrata una tendenza crescente all'intervento chirurgico per il trattamento degli strappi della cuffia dei rotatori. Con l'invecchiamento della popolazione, è probabile che questo intervento sia destinato a diventare uno dei più comuni eseguiti sui tessuti molli.

Per migliorare gli attuali risultati chirurgici, è indispensabile che le nuove tecniche chirurgiche siano valutate con studi di follow-up a lungo termine, in modo da poter valutare il reale recupero funzionale dell'articolazione.

A tale proposito, l'ingegneria tissutale è in prima linea per studiare le applicazioni di scaffold di diversa natura che soddisfino precise caratteristiche funzionali. Sebbene ci sia ancora molto lavoro da fare prima che i nuovi scaffold vengano introdotti nella pratica clinica di routine, sembrano esserci buone possibilità per il loro utilizzo come innesto interposizionale per le lacerazioni della cuffia dei rotatori grandi e massicce. La presente tesina ha l'obiettivo di mettere a fuoco questa particolare applicazione. Il primo capitolo tratta l'anatomia e le problematiche patofisiologiche ricorrenti della cuffia dei rotatori, identificando una classificazione sia per le lacerazioni sia per i meccanismi degenerativi che ne conseguono.

Il secondo capitolo introduce gli scaffold: viene posta particolare attenzione alle loro funzionalità, alle caratteristiche chimiche e alla loro origine, includendo vari esempi di strutture di supporto che sono attualmente utilizzate per la riparazione dei tendini della cuffia dei rotatori.

Infine, il terzo e ultimo capitolo analizza due studi pubblicati recentemente, allo scopo di confrontare fra loro quattro differenti scaffold rispetto al tendine sano.

# Capitolo 1: Cuffia dei rotatori

## 1.1 Anatomia

Per aiutare a comprendere le proprietà ideali dei biomateriali per la rigenerazione della cuffia dei rotatori, si introducono alcuni cenni di anatomia. La cuffia dei rotatori agisce per stabilizzare l'articolazione della spalla ed è composta dai seguenti quattro muscoli (Figura 1.1). Questi muscoli originano dalla scapola e i loro tendini convergono in un foglio continuo che forma la cuffia dei rotatori prima di inserirsi nei tubercoli omerali maggiori e minori. Come gruppo, questo insieme di muscoli agisce per ruotare internamente (sottoscapolare), ruotare esternamente (infraspinato, piccolo rotondo) e abduarre (sovraspinato) la testa omerale.

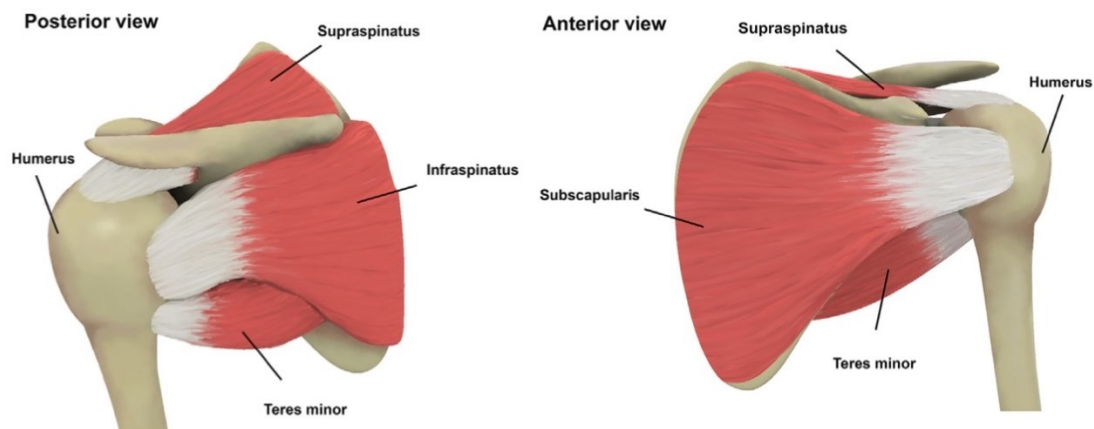


Figura 1.1. Rappresentazione tridimensionale dei muscoli della cuffia dei rotatori.

I muscoli della cuffia forniscono all'omero le capacità di rotazione per mantenere la sua posizione rispetto alla testa omerale contro la cavità glenoidea. Poiché le inserzioni sono vicine all'asse di movimento, quest'area è spesso soggetta ad ampie variazioni angolari, con conseguenti danni cumulativi che portano alla RCT (Rotator Cuff Tear).

La cuffia dei rotatori spesso si rompe in corrispondenza della sua entesi, che è un tessuto connettivo tra il tendine e l'osso. L'entesi è un'area molto complessa ed eterogenea in cui il tessuto molle è ancorato all'osso. Quattro zone di transizione uniche costituiscono l'area: tendine, fibrocartilagine, fibrocartilagine mineralizzata e osso. Dal tendine all'osso, l'entesi è caratterizzata da un graduale aumento del contenuto minerale e da una diminuzione dell'organizzazione delle fibre di collagene, con il risultato di una zona di transizione unica con variazioni graduali delle proprietà meccaniche. Inoltre, la presenza di una zona di transizione, dai tessuti molli (tendini) ai tessuti duri (ossa), supporta le interazioni cellulari eterotipiche

necessarie per il mantenimento dell'omeostasi e della funzione. È importante notare che il contenuto di collagene di queste zone di transizione varia a seconda del tipo di tessuto. Le zone tendinosa, fibrocartilaginea e mineralizzata sono composte da diversi tipi di collagene e ciò è alla base dei diversi moduli elastici di queste zone, che aumentano la complessità e la difficoltà di ricreare tali strutture.

A causa delle proprietà individuali variabili all'interno della struttura dei tessuti e della complessità della struttura dell'interfaccia tendine-osso nativa, è difficile sviluppare biomateriali che riflettano le proprietà dei tessuti nativi o del complesso sito di inserzione tendine-osso.

## **1.2 Patofisiologia**

Poiché la lesione della cuffia dei rotatori è causata da un trauma acuto, da un uso eccessivo cronico (stress ripetitivo) o da un invecchiamento graduale (degenerazione) di uno o più tessuti osseo-tendineo-muscolari, la comprensione della patofisiologia della cuffia dei rotatori è fondamentale per identificare nuovi bersagli clinici per lo sviluppo terapeutico.

Poiché la cuffia dei rotatori consiste in un complesso multi-tessuto integrato, le lesioni non sono solo limitate alla sede dello strappo, ma anche a più componenti dell'unità tessutale muscolo-scheletrica, tra cui tendine, muscolo scheletrico e osso.

In genere, le lacerazioni si verificano principalmente all'interfaccia osso-tendine o all'entesi. Questo perché c'è un forte disallineamento meccanico tra i tessuti duri e molli, come l'osso e il tendine/legamento. Dopo la lesione si osserva una robusta risposta di guarigione, ma la struttura del tessuto dell'entesi è alterata e non viene ripristinata allo stato nativo. Al contrario, si forma tipicamente un tessuto cicatriziale fibrovascolare, invece di una transizione osso-tendine rigenerata e graduata.

Gli RCT sono classificati in base alla forma, alle dimensioni e al numero di tendini lacerati. Possono esserci strappi parziali o incompleti, che coinvolgono solo una parte dello spessore del tendine, o strappi a tutto spessore, che coinvolgono l'intero spessore di uno o più tendini. Questi ultimi sono classificati in base al numero di tendini coinvolti nella lacerazione, la quale deve superare i 5 cm di diametro per avere la caratteristica di grave entità.

Come viene riportato nella Figura 1.2, vi sono cinque classificazioni: tipo A, strappi del sottoscapolare superiore e del sovraspinato; tipo B, strappi del sottoscapolare intero e del sovraspinato; tipo C, strappi del sottoscapolare superiore, dell'infraspinato e del sovraspinato; tipo D, strappi dell'infraspinato e del sovraspinato; tipo E, strappi dell'infraspinato, del sovraspinato e del piccolo rotondo.

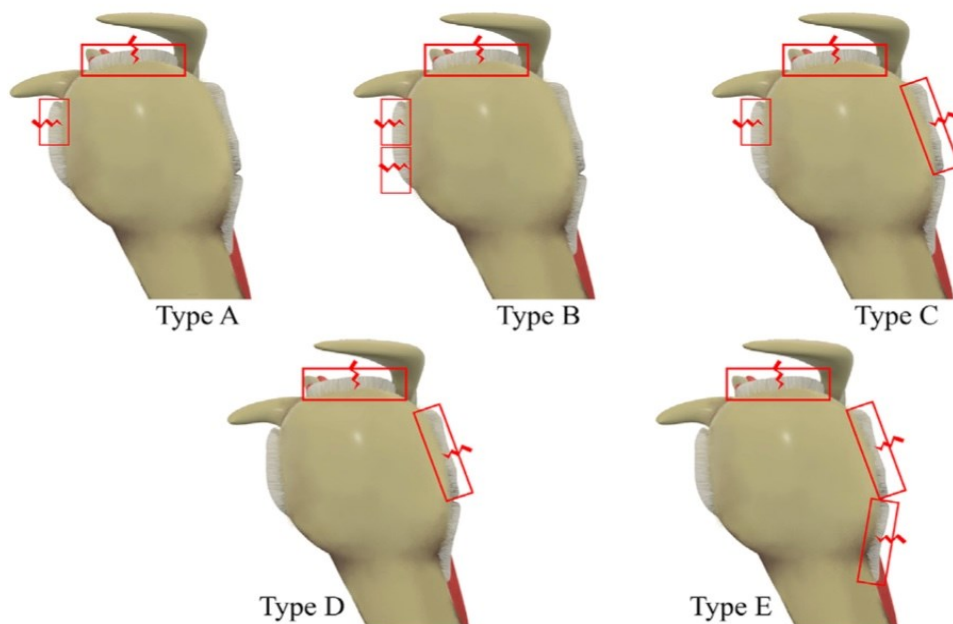


Figura 1.2. Tipi di lacerazioni

Nelle lacerazioni a tutto spessore, il tendine lacerato si ritrae e le sue proprietà compositive e biomeccaniche in genere non vengono riportate ai livelli precedenti alla lesione. Il rapporto tra i tipi di collagene all'interno del tendine è alterato, in modo tale che il collagene di tipo III aumenta e diventa predominante rispetto al collagene di tipo I. Nei tendini degenerativi sono stati riportati l'assottigliamento e disallineamento delle fibre collagene, la degenerazione mixoide e ialina, la metaplasia condroide, la calcificazione, la degenerazione grassa e la proliferazione vascolare. La presenza di proliferazione vascolare e di degenerazione grassa interrompe la continuità delle fibre di collagene e può ridurre le proprietà di resistenza a trazione. Per chiarire la patogenesi dello strappo della cuffia dei rotatori, si prende in considerazione lo studio del Dipartimento di Chirurgia Ortopedica, Ospedale Nobuhara e Istituto di Biomeccanica, Hyogo, Giappone; e del Dipartimento di Patologia Chirurgica, Università di Salute Occupazionale e Ambientale, Scuola di Medicina Fukuoka, Giappone [1]. In questo studio, il professore Takashi Hashimoto ha investigato e analizzato il patomeccanismo dello strappo della cuffia dei rotatori analizzando la distribuzione delle lesioni patologiche nei tendini strappati dal punto di vista istochimico e morfometrico. Ottanta campioni mediali di tendini lacerati della cuffia dei rotatori sono stati ottenuti da 80 pazienti sottoposti a riparazione chirurgica dello strappo presso l'istituto tra il 1999 e il 2001. I pazienti erano 62 uomini e 18 donne con un'età media di 59,6 anni (range, 34-74 anni). Le lacerazioni sono state classificate in base alle dimensioni e alla profondità. Le lacerazioni di dimensioni

inferiori a 1 cm sono state considerate piccole; le lacerazioni di dimensioni comprese tra 1 e 3 cm sono state considerate medie, quelle da 3 a 5 cm grandi e quelle superiori a 5 cm massicce. Erano presenti 50 lacerazioni a tutto spessore e 30 a spessore parziale. La durata dei sintomi nei pazienti con lacerazioni a tutto spessore era maggiore rispetto ai pazienti con lacerazioni a spessore parziale, ma la differenza non era significativa (Tabella 1.1).

Type of Tear	Number of Patients	Age at Repair *(years)	Gender (M/F)	Dominant	Duration of Symptoms *(months)	History of Trauma	History of Night Pain
Full-thickness	50	61.1 ± 7.8	39 / 11	34 / 50 (68%)	9.1 ± 9.6	18 / 50 (36%)	40 / 50 (80%)
Massive	13	61.3 ± 6.1	11 / 2	8 / 13 (62%)	14.9 ± 9.6	3 / 13 (23%)	10 / 13 (77%)
Large	27	61.8 ± 8.3	22 / 5	18 / 27 (67%)	6.3 ± 8.5	13 / 27 (48%)	21 / 27 (78%)
Medium	10	59.1 ± 8.9	6 / 4	8 / 10 (80%)	9.1 ± 10.0	2 / 10 (20%)	9 / 10 (90%)
Partial-thickness	30	57.0 ± 9.4	23 / 7	16 / 30 (53%)	7.2 ± 7.7	15 / 30 (50%)	26 / 30 (87%)
Bursal surface	4	56.0 ± 11.8	4 / 0	2 / 4 (50%)	5.5 ± 3.4	3 / 4 (75%)	3 / 4 (75%)
Articular surface	26	57.2 ± 9.3	19 / 7	14 / 26 (54%)	7.5 ± 8.2	12 / 26 (46%)	23 / 26 (89%)
Total	80	59.6 ± 8.6	62 / 18	50 / 80 (63%)	8.4 ± 9.0	33 / 80 (41%)	66 / 80 (83%)

\*The values are given as the mean and the standard deviation. M = male; F = female

Tabella 1.1. Tipi di dolore e dati correlati nello studio [Hashimoto et al].

Per compiere una analisi istochimica e delle immagini è stata preparata una sezione di lunghezza 10 mm del tendine lungo il bordo lacerato di ciascun moncone. Nei casi di lacerazione ampia e massiva, le lacerazioni si estendevano ai tendini infraspinato o piccolo rotondo. I monconi dei tendini della cuffia sono stati appuntati su tavole di sughero, prestando molta attenzione all'orientamento delle fibre tendinee. In questo modo, è stato possibile controllare in modo affidabile la direzione e la posizione dei tendini della cuffia. I monconi dei tendini della cuffia sono stati fissati in una soluzione di formalina tamponata al 15% (soluzione acquosa al 35-40% di formaldeide, usata come disinfettante e conservante di materiale biologico) e tagliati in cinque strisce di tessuto su un piano parallelo all'asse longitudinale del tendine. Ognuno dei cinque blocchi di tessuto è stato disidratato, incorporato in paraffina e sezionato a 3 µm di spessore. Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina, tricromia di Masson e alcian blu. L'intensità del disallineamento delle fibre dei tendini negli strati superficiali e profondi è stata valutata mediante morfometria microscopica con l'ausilio di un sistema computerizzato di analisi delle immagini. L'analisi statistica è stata eseguita con il pacchetto software statistico Stat-View (SAS Institute Inc, Cary, NC). Le differenze tra i gruppi in termini di età e durata dei sintomi sono state analizzate con il test di Mann-Whitney (test non parametrico) per due campioni indipendenti. Le differenze nella distribuzione delle alterazioni degenerative sono state analizzate con il test di Scheffe (metodo statistico). Le differenze nell'intensità dell'orientamento delle fibre tra gli strati superficiali e profondi sono state testate con il Wilcoxon signed-rank test (non parametrico) per due campioni dipendenti.



L'esame istopatologico ha rivelato le caratteristiche del moncone dei tendini lacerati, classificate come:

- assottigliamento e disallineamento delle fibre collagene;
- degenerazione mixoide;
- degenerazione ialina;
- metaplasia condroide;
- calcificazione;
- proliferazione vascolare;
- filtrazione grassa.

Nei tessuti tendinei lacerati, le fibre di collagene si sono divise longitudinalmente, con conseguente assottigliamento e disallineamento (Figura 1.3.A). Questo cambiamento era distribuito quasi uniformemente nelle strisce anteriori e posteriori di ciascun tendine lacerato. La degenerazione mixoide è stata osservata come tessuto colorato con alcian blu (Figura 1.3.B), nel quale lo strato di collagene si assottiglia e si verifica l'accumulo di materiale mucoide (mixomatoso).

La degenerazione ialina è una degenerazione tissutale, principalmente dei tessuti connettivi, in cui gli elementi strutturali delle cellule colpite sono sostituiti da materiale omogeneo e traslucido che si colora intensamente con i coloranti acidi (Figura 1.3.C).

Quando il tessuto cartilagineo si forma in una sede estranea allo scheletro, viene diagnosticato come metaplasia condroide. Intorno alle aree di metaplasia condroide sono state riscontrate gravi alterazioni ialine (Figura 1.3.D).

I depositi calcificati sono stati osservati al microscopio sotto forma di microcalcoli liberi e sparsi tra i fibroblasti a forma di fuso e le fibre di collagene nel tessuto tendineo, senza distinte alterazioni metaplastiche condroidi (Figura 1.4.E).

La proliferazione vascolare è stata osservata pronunciata in tutti gli strati dei monconi tendinei (Figura 1.4.F), differentemente a una situazione fisiologica, la quale è caratterizzata da una scarsa vascolarizzazione. L'infiltrazione grassa è stata osservata tra le fibre del collagene, interrompendone la continuità (Figura 1.4.G).

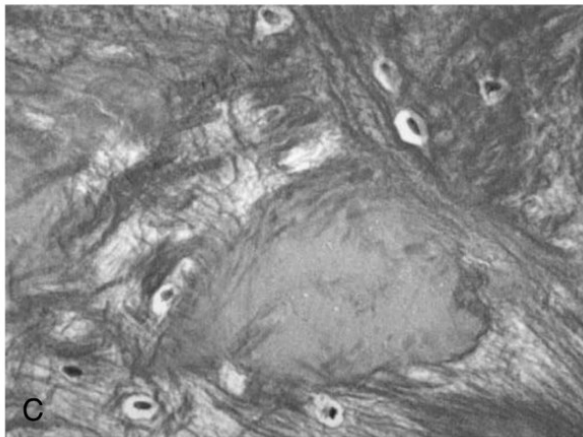
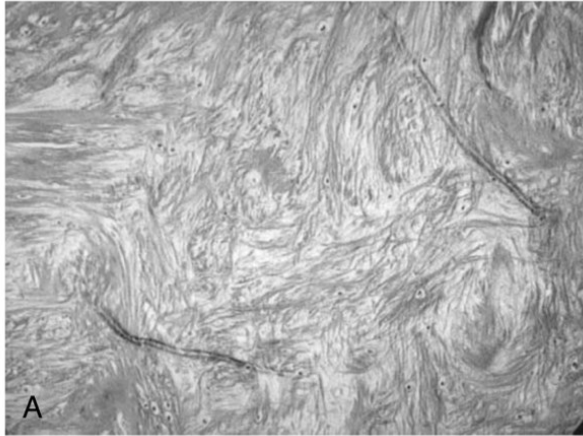


Figura 1.3.A. Assottigliamento e disallineamento delle fibre di collagene. Figura 1.3.B. Degenerazione mixoide, Figura 1.3.C. Degenerazione ialina. Figura 1.3.D. Metaplasia condroide.

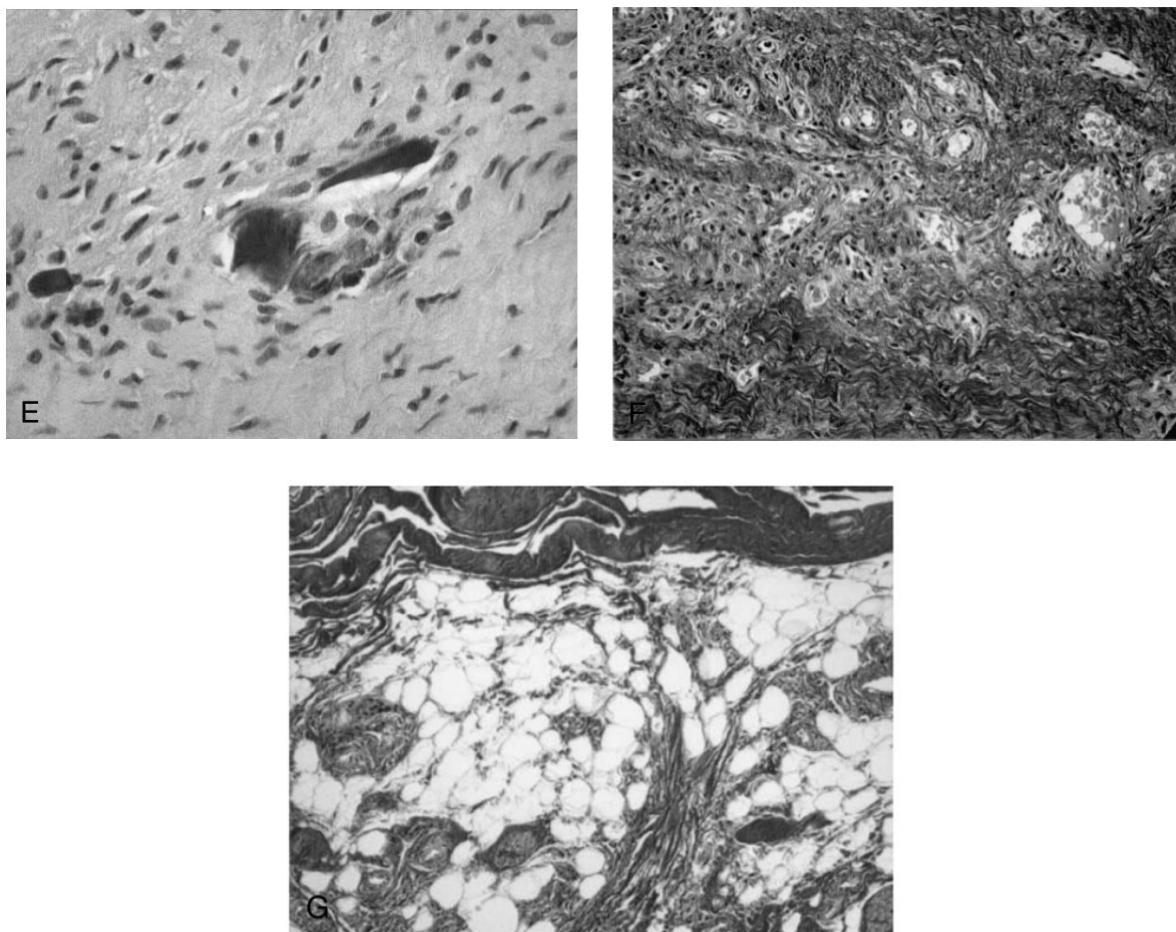


Figura 1.4.E. Calcificazione. Figura 1.4.F. Proliferazione vascolare. Figura 1.4.G. Infiltrazione grassa.

Per quanto riguarda la distribuzione negli strati superficiali, mediali e profondi si riscontrano eterogeneità e analogie (Figura 1.5). L'assottigliamento e disallineamento delle fibre di collagene, sono osservati soprattutto nello strato profondo del tendine, come avviene anche per la degenerazione mixoide, calcificazione e metaplasia condroide. Tutti i cambiamenti, ad eccezione della proliferazione vascolare e dell'infiltrazione di agenti patogeni, sono più pronunciati negli strati medi e profondi dei tendini rispetto allo strato superficiale. L'assottigliamento e il disallineamento delle fibre collagene, la degenerazione mixoide e la degenerazione ialina sono diffusi in tutti i casi.

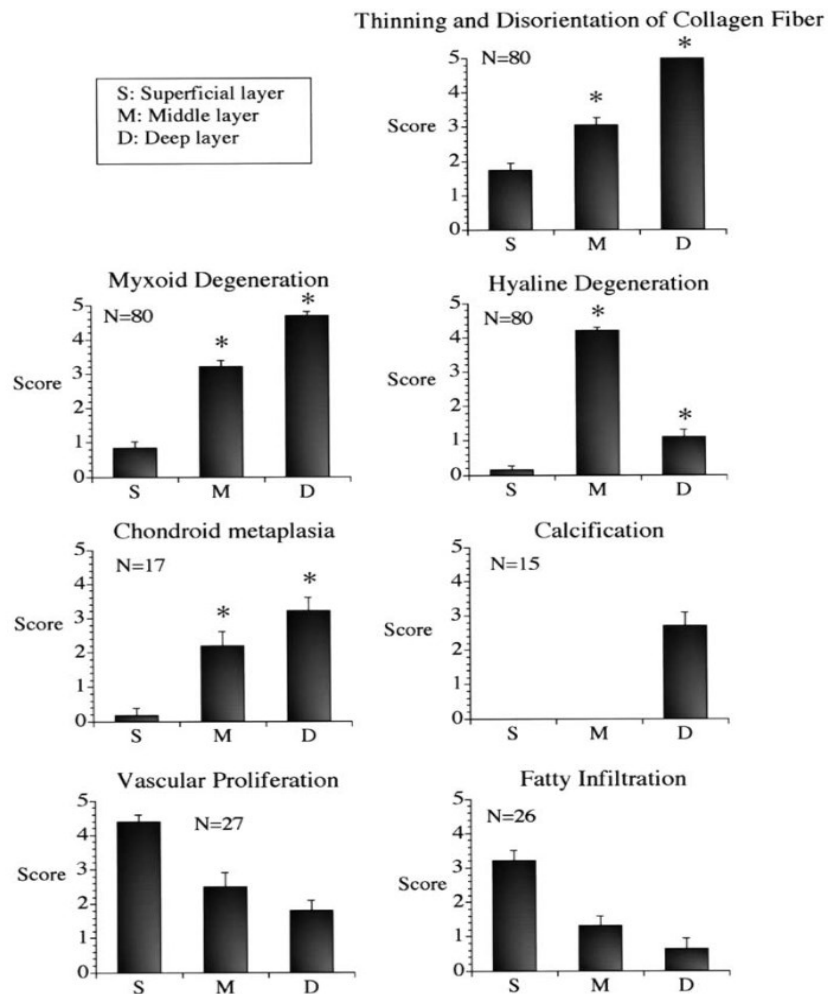


Figura 1.5. Distribuzione delle degenerazioni. N= numero di monconi esaminati. Lo score viene assegnato sulla base della presenza della degenerazione sulle 5 divisioni del tendine.

I normali processi di guarigione dei tessuti si basano sulla proliferazione di nuovi vasi sanguigni e fibroblasti per formare il tessuto di granulazione. I fibroblasti migrano nella ferita e subiscono un periodo di intensa attività mitotica. Il ruolo di questi fibroblasti è principalmente quello di secernere proteine della matrice extracellulare, in particolare collagene di tipo-I e di tipo-III, e i glicosaminoglicani. Il tessuto di granulazione prodotto si sviluppa lentamente in tessuto cicatriziale maturo con la guarigione della ferita.

T. J. W. Matthews, G. C. Hand, J. L. Rees, N. A. Athanasou, A. J. Carr, del centro ortopedico di Nuffield, Oxford, Inghilterra, esaminando le biopsie del tendine sovraspinato di 40 pazienti con lacerazioni croniche della cuffia dei rotatori sottoposti a intervento chirurgico, hanno riscontrato che la popolazione di fibroblasti diminuisce con l'aumentare delle dimensioni della lacerazione della cuffia dei rotatori [2].

La popolazione di fibroblasti più numerosa osservata nelle lacerazioni più piccole prolifera attivamente, ed è parte di un processo riparativo attivo. Al contrario, nelle lacerazioni più

grandi è presente un numero minore di fibroblasti, senza alcuna evidenza di proliferazione cellulare, e vi è evidenza di una minore risposta riparativa alla guarigione.

È stato inoltre osservato che alcune delle lacerazioni più piccole presentavano un ispessimento del rivestimento sinoviale, non riscontrato nelle lacerazioni più grandi. La presenza di un rivestimento sinoviale ispessito e infiammato indica un tentativo di riparazione ed è regolarmente riscontrabile in condizioni come l'osteoartrite e l'artrite reumatoide.

Il numero di vasi sanguigni è diminuito significativamente con l'aumentare delle dimensioni della lacerazione. Questi risultati indicano un processo riparativo significativamente maggiore nelle lacerazioni più piccole rispetto a quelle più grandi.

I processi di risoluzione, rigenerazione e riparazione sono sequenziali nell'infiammazione acuta, ma si verificano in modo simultaneo nell'infiammazione cronica. L'infiammazione cronica è caratterizzata dalla presenza di macrofagi, dalla formazione di nuovi vasi, fibroblasti e deposizione di collagene, insieme ad altre cellule infiammatorie come i linfociti e i mastociti. Sono state trovate prove di questo stato infiammatorio cronico in misura maggiore nelle lacerazioni più piccole del tendine della cuffia dei rotatori. I macrofagi sono diminuiti significativamente in numero dalle lacerazioni piccole a quelle medie e da quelle medie a quelle grandi e massicce. Questa tendenza è stata osservata anche per i mastociti e leucociti.

## Capitolo 2: Scaffold

### 2.1 Ingegneria tissutale e caratteristiche funzionali desiderate

Le limitazioni delle attuali strategie di riparazione della cuffia dei rotatori possono essere riassunte nella mancata riproduzione del normale processo di guarigione del tendine, mancata produzione delle quattro zone dell'entesi e mancato mantenimento di una sufficiente resistenza meccanica dopo la riparazione.

Le attuali tecniche di riparazione della cuffia dei rotatori si concentrano sul fissaggio sicuro dei tendini alle ossa mediante suture e ancoraggi ossei. Tuttavia, il tessuto che si forma dopo la riparazione è di qualità inferiore rispetto al tendine nativo della cuffia dei rotatori. Le proprietà meccaniche del tessuto cicatriziale fibrovascolare formatosi all'interfaccia non sono simili a quelle di una normale entesi tendinea. L'incapacità di ricreare la struttura e la meccanica dell'entesi sana può predisporre il sito di riparazione al fallimento.

L'entesi riduce il trasferimento di stress tra materiali meccanicamente dissimili: il modulo elastico a trazione del tendine nella direzione dell'azione muscolare è dell'ordine di 200 MPa, mentre quello dell'osso è di 20 GPa, con il risultato che il modulo dell'osso è circa 100 volte superiore a quello del tendine. Il ripristino di interfacce duro-morbide con un così grande disallineamento delle proprietà dei materiali può essere clinicamente impegnativo.

La resistenza meccanica iniziale dopo la riparazione è un'altra preoccupazione. Per ottenere un'adeguata resistenza meccanica subito dopo la riparazione, si dovrebbe mirare ad approssimare la rigidità ( $\sim 200$  N/mm), il modulo ( $\sim 150$  MPa) e il carico limite ( $\sim 800$  N) della cuffia dei rotatori umana, e a combinare adeguatamente le proprietà di ritenzione della sutura.

Per superare l'alto tasso di fallimento e per migliorare la guarigione tendine-osso, è stata studiata l'ingegneria tissutale. L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per favorire lo sviluppo di sostituti biologici che conservano, mantengono o migliorano la funzionalità dei tessuti danneggiati. L'ingegneria tissutale consiste nel coltivare nuovi tessuti in laboratorio combinando scaffold, cellule tissutali autologhe e molecole bioattive per emulare i processi biologici dell'organismo.

L'obiettivo principale dell'ingegneria tissutale della cuffia dei rotatori è quello di riparare i difetti della cuffia introducendo una struttura tissutale ingegnerizzata che possa essere riconosciuta e utilizzata nella rigenerazione del tessuto nativo.

Cellule, scaffold e segnali di stimolazione della crescita sono le tre componenti chiave.

Gli scaffold forniscono una "piattaforma meccanica" per le cellule e possono regolare la funzione e il comportamento cellulare attraverso le interazioni cellula-matrice (Figura 2.1). Tale piattaforma facilita la penetrazione delle cellule e fornisce un ambiente efficace che fornisce ossigeno e nutrienti alle cellule, consentendo così di ottenere una rigenerazione tissutale di successo. Dopo che il tessuto desiderato è stato rigenerato, lo scaffold è progettato per degradarsi naturalmente.

Si prevede che questi materiali siano in grado di migliorare la guarigione nel primo periodo critico post-operatorio, perché migliorano la resistenza meccanica iniziale e contengono molecole bioattive.

Le proprietà dello scaffold dovrebbero corrispondere il più possibile a quelle del tendine nativo per ottenere di conseguenza un successo a lungo termine.

Le caratteristiche specifiche per il funzionamento fisiologico di un tendine ingegnerizzato sono complesse quasi quanto la cuffia dei rotatori nativa, ma in generale gli scaffold devono essere:

- istruttivi per le cellule sia del tendine che dell'interfaccia tendine-fibrocartilagine-osso, fornendo supporto micro-architettonico e bioattivo per la differenziazione cellulare, la proliferazione e il mantenimento della matrice e dell'attività cellulare specifiche del tessuto;
- intatti, con proprietà meccaniche adeguate a sostenere la riparazione per almeno 12 settimane dopo l'impianto, e in grado di imitare l'ambiente di carico del tessuto nativo per fornire stimoli meccanici per la differenziazione cellulare;
- lentamente degradabili per consentire al nuovo tendine e all'interfaccia tendine-osso di integrarsi e rigenerarsi completamente. I sottoprodotti di degradazione non tossici devono essere prontamente metabolizzati o eliminati dall'organismo senza generare una risposta da corpo estraneo;
- porosi per consentire l'infiltrazione di cellule, lo scambio di nutrienti e l'angiogenesi e avere buone caratteristiche di ritenzione della sutura e di manipolazione chirurgica;
- resistenti all'usura e alle infezioni ed essere biocompatibili cioè in grado di non evocare infiammazioni o reazioni immunitarie in ambiente sinoviale;
- adattabili ad approcci artroscopici in cui lo spessore dell'impalcatura iniziale e del tendine ingegnerizzato rimodellato è limitato per ridurre la probabilità di impingement sub-acromiale;
- stabili alle condizioni di sterilizzazione, lavorazione e conservazione;
- in grado di migliorare il rapporto rischio/beneficio rispetto all'attuale standard di cura.

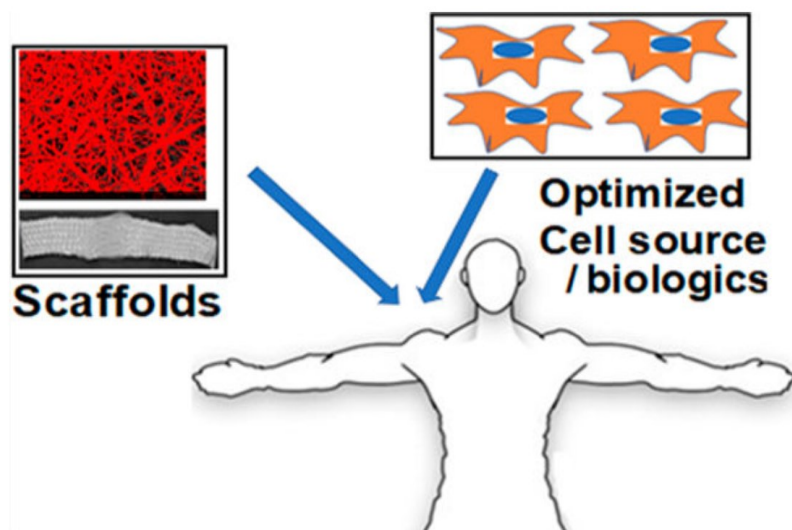


Figura 2.1. Rappresentazione grafica a scopo dimostrativo della combinazione di scaffold, cellule e fattori di crescita per l'ingegneria tissutale

## 2.2 Tipologie di scaffold

Nell'ultimo decennio si è assistito ad una significativa ricerca e sviluppo di scaffold biologici e sintetici per la riparazione del tendine della cuffia dei rotatori. Attualmente, gli scaffold di origine biologica ottenuti dalla matrice extracellulare (ECM) di mammifero, polimeri sintetici e una combinazione di questi sono stati autorizzati dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti e sono commercializzati come dispositivi medici per la riparazione della cuffia dei rotatori nell'uomo.

Si ritiene che gli scaffold di matrice extracellulare forniscano un ambiente chimicamente e strutturalmente istruttivo per le cellule ospiti grazie a una combinazione di fattori, tra cui la loro composizione naturale, la struttura tridimensionale e le biomolecole di rimodellamento. Al contrario, gli scaffold sintetici possono avere un impatto limitato sulla biologia della guarigione riparativa; tuttavia, la loro capacità di mantenere le proprietà meccaniche nel tempo può servire a stabilizzare meccanicamente il costrutto di riparazione fino a quando non si completi la guarigione del tessuto ospite.

Gli scaffold biologici si dividono in innesti xenogenici e innesti allogenici. Gli scaffold sintetici, invece, si dividono in degradabili e non degradabili (Figura 2.2).



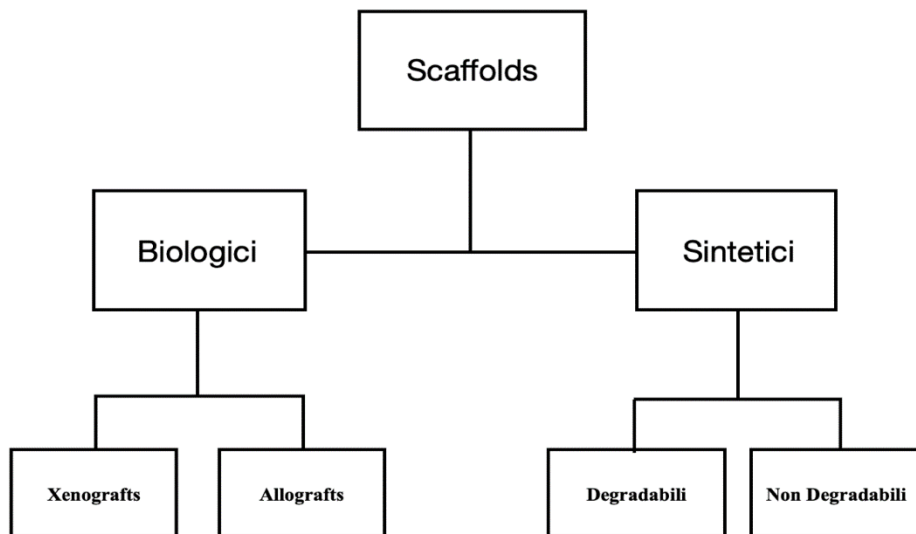


Figura 2.2. Le diverse tipologie di scaffold.

### 2.2.1 Scaffold biologici: innesti xenogenici e innesti alloigenici

Gli scaffold biologici di matrice extracellulare (ECM) sono diversi dai dispositivi ortopedici tradizionali, come quelli polimerici e metallici, che sono destinati a ripristinare la funzione meccanica e a rimanere sostanzialmente inalterati per tutta la vita del paziente. Il loro uso per la riparazione della cuffia dei rotatori sta guadagnando interesse nella comunità ortopedica. Le macromolecole native della ECM possono modulare i processi dell'ospite, come la migrazione, la proliferazione e l'orientamento delle cellule, l'angiogenesi e la risposta immunitaria; tutto ciò in modo da migliorare e accelerare la biologia della riparazione tissutale.

Gli innesti xenogenici hanno origine da tessuti di diverse specie animali, mentre quelli alloigenici provengono da un donatore umano. Per queste impalcature, un rigoroso processo di decellularizzazione è un passaggio fondamentale per evitare risposte immunitarie avverse.

Attualmente, le ECM sono commercializzate come cerotti e derivano dal derma, dalla sottomucosa dell'intestino tenue (SIS), dalla fascia lata e dal pericardio. Tra questi i più importanti sono le matrici extracellulari ricche di collagene come quelle del derma (GraftJacket, TissueMend e Zimmer Collagen Repair Patch) e della SIS (Restore e CuffPatch) (Figura 2.3).

Product Name	Manufacturer	Industrial Source	Tissue Type	Source	Chemically Cross-Linked
Restore Orthobiologic Implant	DePuy Orthopaedics (Warsaw, IN)	DePuy Orthopaedics (Warsaw, IN)	Small intestine submucosa	Porcine	No
CuffPatch Bioengineered Tissue Reinforcement	Organogenesis (Canton, MA)	Arthrotek (Warsaw, IN)	Small intestine submucosa	Porcine	Yes (carbodiimide)
GraftJacket Regenerative Tissue Matrix	LifeCell (Branchburg, NJ)	Wright Medical Technology (Arlington, TN)	Dermis	Human	No
TissueMend Soft Tissue Repair Matrix	TEI Biosciences (Boston, MA)	Stryker Orthopaedics (Mahwah, NJ)	Dermis (fetal)	Bovine	No
Zimmer Collagen Repair Patch	Tissue Science Laboratories (Aldershot, Hampshire, UK)	Zimmer (Warsaw, IN)	Dermis	Porcine	Yes (diisocyanate)

Figura 2.3. Scaffold biologici commerciali derivati da derma e SIS.

GraftJacket Regenerative Tissue Matrix è prodotto da LifeCell (Branchburg, New Jersey) e distribuito da Wright Medical Technology (Arlington, Tennessee) per il mercato ortopedico e podologico. Esso deriva da un allotrapianto di pelle umana che viene trattato con una tecnica brevettata per rimuovere l'epidermide, le cellule e i residui cellulari. Lo strato dermico acellulare rimanente viene conservato utilizzando un metodo di liofilizzazione brevettato, che mantiene l'architettura extracellulare nativa e i canali vascolari. La matrice contiene componenti biochimiche come collagene, elastina e proteoglicani e non è reticolata artificialmente. È confezionata a secco e il materiale è un singolo strato, che viene fornito in una varietà di spessori (da 0,5 a 2 mm) e dimensioni per indicazioni chirurgiche mirate (Figura 2.4).



Figura 2.4. Immagine GraftJacket.

La matrice di riparazione dei tessuti molli TissueMend è prodotta da TEI Biosciences (Boston, Massachusetts) e commercializzata da Stryker Orthopaedics (Mahwah, New Jersey). Questo prodotto è commercializzato come membrana di collagene acellulare non denaturata derivata da derma fetale bovino. Non è reticolata artificialmente. Il dispositivo è a uno strato e ha uno spessore nominale di 1 mm. TissueMend è composto principalmente da fibre di collagene di tipo I e di tipo III. Viene trattato per rimuovere carboidrati, lipidi e cellule adipoce. Viene liofilizzato e confezionato secco.

Lo Zimmer Collagen Repair (ZCR) Patch è prodotto da Tissue Science Laboratories (Aldershot, Hampshire, Regno Unito). È distribuito da Zimmer (Warsaw, Indiana) per indicazioni relative alla cuffia dei rotatori. Lo ZCR Patch è commercializzato come un foglio acellulare di derma suino reticolato. Vengono effettuate estrazioni organiche ed enzimatiche per rimuovere grasso, materiale cellulare e proteine solubili. Il materiale è reticolato e resistente alla degradazione enzimatica. È costituito da uno strato e ha uno spessore nominale di 1,5 mm (Figura 2.5).

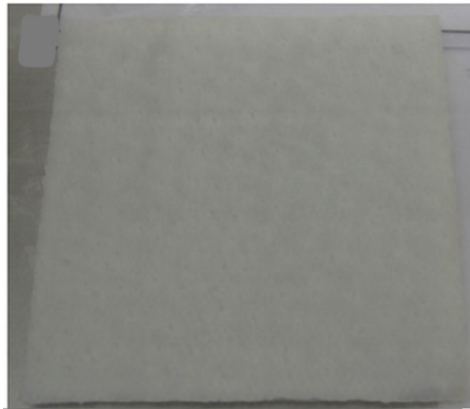


Figura 2.5. Immagine Zimmer Patch.

L'impianto ortobiologico Restore è prodotto e commercializzato da DePuy Orthopaedics (Warsaw, Indiana) ed è composto da un disco di dieci strati di sottomucosa di intestino tenue suino. La sottomucosa dell'intestino tenue viene disinfettata con acido peracetico ed etanolo e non contiene cellule vitali. La matrice extracellulare della sottomucosa dell'intestino tenue contiene prevalentemente collagene di tipo I, fibronectina, condroitina solfato, eparina, eparina solfato, ialuronano e fattori di crescita (come il fattore di crescita dei fibroblasti-2 [FGF-2], il fattore di crescita trasformante- $\beta$  [TGF- $\beta$ ] e il fattore di crescita endoteliale vascolare [VEGF]). Per produrre l'impianto ortobiologico Restore, i dieci singoli strati di sottomucosa dell'intestino tenue sono orientati a circa 20° l'uno rispetto all'altro e laminati insieme sotto una pressa a vuoto. Restore non è reticolato artificialmente. L'impianto è confezionato a secco e ha uno spessore nominale di 0,8-1 mm.

Il rinforzo tissutale bioingegnerizzato CuffPatch è prodotto da Organogenesis (Canton, Massachusetts) e commercializzato da Arthrotek (Warsaw, Indiana). CuffPatch è un foglio di sottomucosa di intestino tenue suino acellularizzato a otto strati. Un protocollo di pulizia chimica rimuove le cellule e i detriti cellulari alla sottomucosa dell'intestino tenue, senza danneggiare la struttura collagenica nativa. Dopo la laminazione dei singoli strati della sottomucosa dell'intestino tenue, il prodotto viene reticolato con carbodiimide idrosolubile. Esso viene confezionato idratato e ha uno spessore nominale di 0,6 mm.

### 2.2.2 Scaffold sintetici: degradabili e non degradabili

A causa delle continue preoccupazioni riguardanti l'immunogenicità degli xenotrapianti e degli allotrapianti, si è registrato un notevole interesse per i costrutti sintetici. Gli scaffold sintetici possono essere fabbricati con morfologie, forme e dimensioni desiderate, consentendo ai chirurghi di personalizzare il prodotto finale prima dell'intervento chirurgico. Altri vantaggi dell'uso di scaffold sintetici includono un rischio basso o nullo di trasmissione di malattie, tassi di degradazione prevedibili e una potenziale elevata biocompatibilità. D'altra parte, la mancanza di crescita tissutale dovuta alla mancanza di epitopi (parti di antigeni che legano gli anticorpi specifici) di superficie può essere un problema per queste strutture. Per la rigenerazione della cuffia dei rotatori sono state valutate sia impalcature degradabili che non degradabili di origine sintetica (Tabella 2.1).

L'uso di scaffold non degradabili è legato all'opzione di riparazione più comune, che consiste in un semplice riattacco chirurgico del tendine all'osso con una sutura non riassorbibile. Questo approccio presuppone che il supporto meccanico e permanente della riparazione consenta l'autoguarigione. Questa logica ha portato allo sviluppo di diversi cerotti non degradabili, caratterizzati da una forte resistenza alla trazione, da una buona compatibilità con i tessuti e da eccellenti proprietà di manipolazione. Tra questi polimeri vengono utilizzati il politetrafluoroetilene e il polietilene tereftalato.

<b>Nome</b>	<b>Materiale</b>	<b>Produttore</b>	<b>Degradabilità</b>
<i>Gore-Tex Soft Tissue Patch</i>	Politetrafluoroetilene (PTFE)	Gore, Flagstaff, AZ, USA	No
<i>LARS Ligament</i>	Polietilene tereftalato (PET)	LARS, Arc-sur-Tille, Borgogna, Francia	No
<i>X-Repair</i>	Acido poli-L-lattico (PLLA)	Synthasome Inc, San Diego, CA, USA	Si
<i>SportMesh Soft Tissue Reinforcement</i>	Poliuretano ureico (Artelon)	(Artimplant AB, Frölunda, Svezia), Biomet Sports Medicine	Si

Tabella 2.1. Alcuni degli scaffold sintetici degradabili e non degradabili in commercio.

Il politetrafluoroetilene (PTFE) (Figura 2.6), commercialmente noto come Teflon, è un polimero del tetrafluoroetilene che possiede un insieme di caratteristiche fisico chimiche come:

- eccellente resistenza al calore;
- ottime caratteristiche dielettriche;
- ottima resistenza all'invecchiamento;
- massima resistenza ai solventi;
- minimo coefficiente di attrito;

- estrema inerzia chimica;
- caratteristiche autolubrificanti.

Uno dei più rilevanti scaffold sintetici di PTFE sul mercato è il Gore-Tex Soft Tissue Patch prodotto da Gore, Flagstaff, AZ, USA.

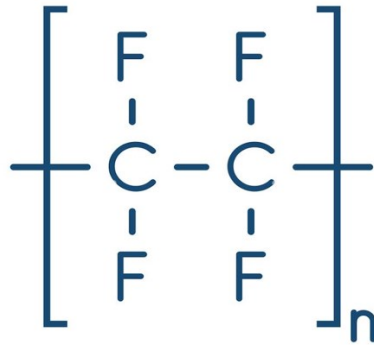


Figura 2.6. Formula chimica del PTFE.

Il polietilene tereftalato (PET), conosciuto come Dacron, è un polimero termoplastico che appartiene alla famiglia dei poliesteri (Figura 2.7). È formato dall'acido tereftalico e dal glicole etilico tramite la reazione di poli-condensazione dei monomeri. Il PET presenta un'eccellente resistenza chimica, buona solidità, rigidità, resistenza all'usura e all'abrasione. Inoltre, esso ha un'elevata resistenza alla trazione con sollecitazione lineare e può resistere a forze fino a 3000 N. Uno scaffold di PET ben noto sul mercato è il LARS Ligament prodotto da LARS in Arc-sur-Tille, Borgogna, Francia. (Figura 2.8).

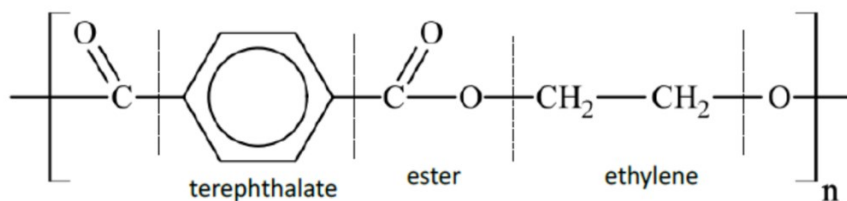


Figura 2.7. Formula chimica del PET



Figura 2.8. Immagine LARS Ligament.

I polimeri sintetici degradabili tipicamente impiegati per la costruzione di scaffold per la cuffia dei rotatori sono l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e alcuni poliuretani (PU).

Il PGA è un polimero biodegradabile termoplastico ed è il più semplice membro della famiglia di poliesteri lineari alifatici. Esso polimero possiede un'elevata cristallinità ed in generale è insolubile in solventi organici a unica eccezione dei solventi altamente fluorurati. Il PLA, invece, è il polimero dell'acido lattico. Rispetto al PGA, il PLA si degrada più lentamente (nell'ordine di molti mesi), perché è più idrofobico. Il copolimero acido poli (lattico-co-glicolico), PLGA, viene sintetizzato, mediante co- polimerizzazione del PLA e PGA, per le applicazioni di ingegneria tissutale del tendine della cuffia dei rotatori, degradandosi in acqua per idrolisi dei legami esterei (Figura 2.9).

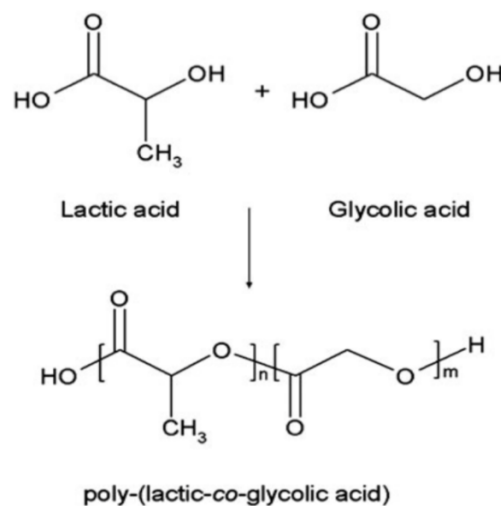


Figura 2.9. Formula chimica del PLGA e dei suoi monomeri.

Inoltre, per quanto riguarda il PLA, esistono in due forme enantiomeriche (L e D) ma il polimero cristallino è ottenibile soltanto dall'isomero otticamente attivo L, il PLLA (acido poli-L-lattico) come rappresentato in Figura 2.10.

Sul mercato il più utilizzato scaffold di PLLA è l'X-Repair prodotto da Synthasome Inc, (San Diego, CA, USA), progettato specificamente per rinforzare la riparazione dei tendini, con proprietà meccaniche simili a quelle del tendine umano, un'elevata resistenza a trazione della sutura e un lento assorbimento (Figura 2.11).

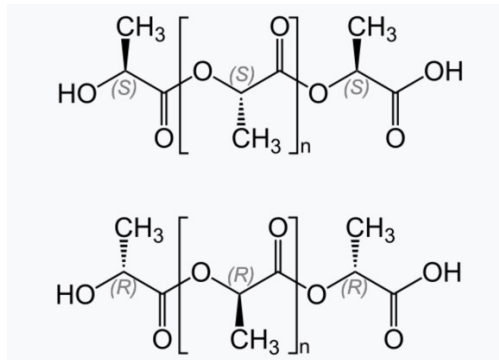


Figura 2.10. Le due forme enantiomeriche del PLA. Sopra il PLLA, sotto il PLDA.



Figura 2.11. Immagine X-Repair.

I poliuretani (PU) sono una vasta famiglia di polimeri in cui la catena polimerica è costituita da legami uretanici  $\text{-NH-(CO)-O-}$ . In generale, i PU sono biomateriali polimerici con una buona biocompatibilità ed emocompatibilità. Vengono utilizzati principalmente nelle protesi vascolari e in Ingegneria Tissutale, e possono essere elettrofilati con diversi solventi a diverse concentrazioni. L'innesto SportMesh Soft Tissue Reinforcement è un tessuto a maglia in poliuretano ureico prodotto con fibre di Artelon (Artimplant AB, Frölunda, Svezia) e distribuito da Biomet Sports Medicine. Esso è biocompatibile e fornisce un rinforzo a breve e lungo termine, agendo al tempo stesso come un'impalcatura parzialmente degradabile. È disponibile in fogli di 4 - 6 cm e ha uno spessore di 0,8 mm. Si tratta di un materiale sintetico che viene sterilizzato con una dose di radiazioni a fascio elettronico.

### Capitolo 3 Valutazione di scaffold commerciali

In questo capitolo vengono presi in considerazione due studi che hanno analizzato le caratteristiche funzionali di diversi scaffold commerciali: ciascuno studio ha valutato caratteristiche differenti, quella istologiche e quella meccaniche.

Il primo studio è quello di R.D.J. Smith, A. Carr, S.G. Dakin, S.J.B. Snelling, C. Yapp e O. Hakimi [3]. Lo scopo di questo studio in vitro è stato quello di confrontare la risposta dei tenociti di pazienti con strappo della cuffia dei rotatori a otto scaffold disponibili in commercio in termini di adesione iniziale delle cellule, proliferazione cellulare, numero finale di cellule, espressione genica e morfologia cellulare. Di questi otto scaffold, solo quattro sono stati selezionati per l'esperimento (tutti trattati precedentemente): si tratta di due scaffold sintetici e due scaffold di origine biologica. I primi due sono l'X Repair, formato da PLLA, e il LARS Ligament costituito da Polietilene Tereftalato. Quelli biologici sono il GraftJacket (derma umano) e il Permacol (derma suino), altro nome con il quale è conosciuto lo Zimmer Collagen Repair (ZCR) Patch. In questo studio, tre pazienti di sesso maschile e di età compresa tra 40 e 65 anni hanno subito biopsie di tendini sovraspinati lacerati e sono stati sottoposti a riparazione chirurgica di lesioni estese o massicce della cuffia dei rotatori. Durante l'intervento chirurgico, le biopsie sono state immediatamente trasferite in provette sterili contenenti terreno DMEM F12 Media (un terreno di base ampiamente utilizzato per supportare la crescita di molte cellule di mammifero) e utilizzate per l'isolamento cellulare. I tenociti sono stati estratti tagliando le biopsie di tessuto in piccoli quadrati di  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  e trasferiti in piastre a 6 pozzetti. Le cellule sono state coltivate in terreni DMEM F12, contenenti 10% di siero fetale bovino e 1% di penicillina e streptomina. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state raschiate e trasferite in piastre petri da 10 cm. Le cellule sono state seminate con densità di 100.000 cellule/cm<sup>2</sup> per tutti gli esperimenti, tranne che per la morfologia cellulare, dove le cellule sono state seminate a una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> e la plastica per colture tissutali (TCP) è stata utilizzata come controllo positivo.

Prima di eseguire la microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM), utile all'analisi della morfologia degli scaffold, un pezzo di  $0,25 \text{ cm}^2$  di ogni scaffold è stato risciacquato in tampone fosfato salino per 10 minuti e poi fissato in glutaraldeide al 2,5% per 24 ore. Gli scaffold sono stati risciacquati in acqua deionizzata prima di essere sottoposti a soluzioni di etanolo con concentrazione crescente (40, 70, 90, 95 e 100 % ciascuno per 10 minuti). Gli scaffold sono stati rivestiti d'oro utilizzando un sistema chiamato SC7620 Mini Sputter Coater



e il diametro delle singole fibre è stato determinato utilizzando ImageJ, che è un programma per elaborazione digitale delle immagini (Figura 3.1).

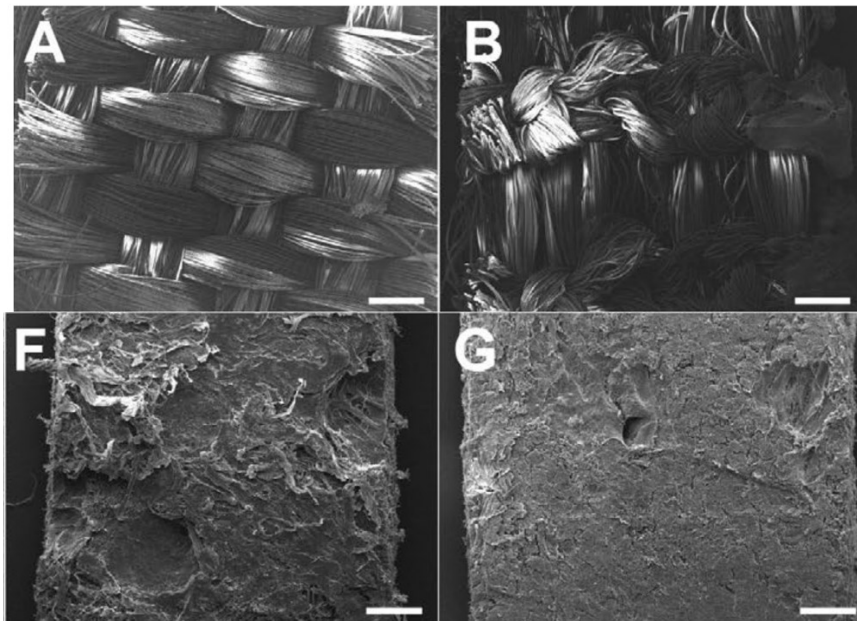


Figura 3.1. Morfologia delle superfici degli scaffold investigati. X-Repair (A), LARS Ligament (B), GraftJacket (F), Permacol (G).

L'analisi ha portato all'identificare morfologicamente gli scaffold. L'X-Repair ha una trama semplice, con fasci di fibre dritti e perpendicolari. Il legamento LARS presenta una serie di fibre diritte con l'aggiunta di fasci di fibre ritorte. Al contrario, lo scaffold dermico umano GraftJacket appare più ruvido rispetto a quello di derma suino Permacol. Successivamente, tre scaffold sono stati trattati il giorno 1 per misurare l'adesione iniziale delle cellule, e il giorno 13 gli scaffold rimanenti sono stati trattati per valutare il numero finale di cellule, misurando la quantità di DNA. Per quantificare la proliferazione cellulare sugli scaffold è stato utilizzato il saggio AlamarBlue Assay, che è un indicatore di vitalità cellulare (Figura 3.2 e Figura 3.3).

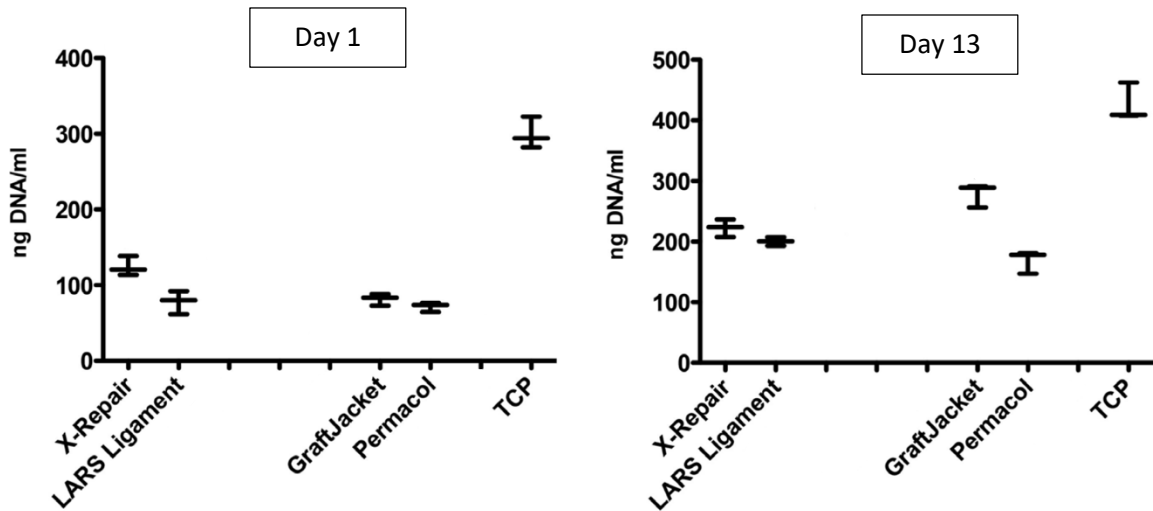


Figura 3.2. Quantità di DNA estratto dalle cellule sugli scaffold al primo giorno e al tredicesimo giorno.

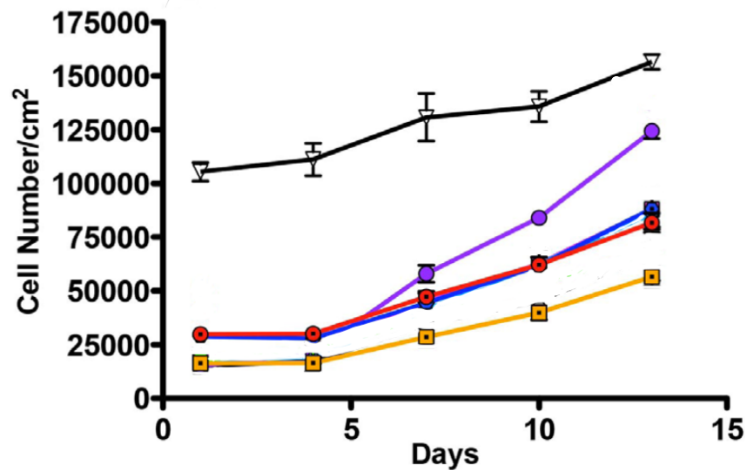


Figura 3.3. Proliferazione cellulare nell'arco dei 13 giorni. Legenda: viola-GraftJacket, blu-Permacol, rosso-X-Repair, arancio-Lars, nero-controllo positivo.

Il giorno 1, X-Repair presentava una quantità di DNA maggiore rispetto a tutti gli altri scaffold. Al tredicesimo giorno, GraftJacket aveva quantità di DNA e numero di cellule/cm<sup>2</sup> più alti, seguito da Permacol e X-Repair, i quali hanno mostrato valori paragonabili, e infine da Lars Ligament. La espressione genica di mRNA dei diversi scaffold ha evidenziato che l'espressione del collagene di tipo 1 (COL1A1) e del collagene di tipo 3 (COL3A1) è maggiore nel Graftjacket e Permacol. Inoltre, il rapporto tra COL1A1 e COL3A1, che descrive la sottigliezza delle fibre di collagene, è maggiore nell'X-Repair e Lars, quindi negli scaffold sintetici rispetto a quelli di origine dermica (Figura 3.4).

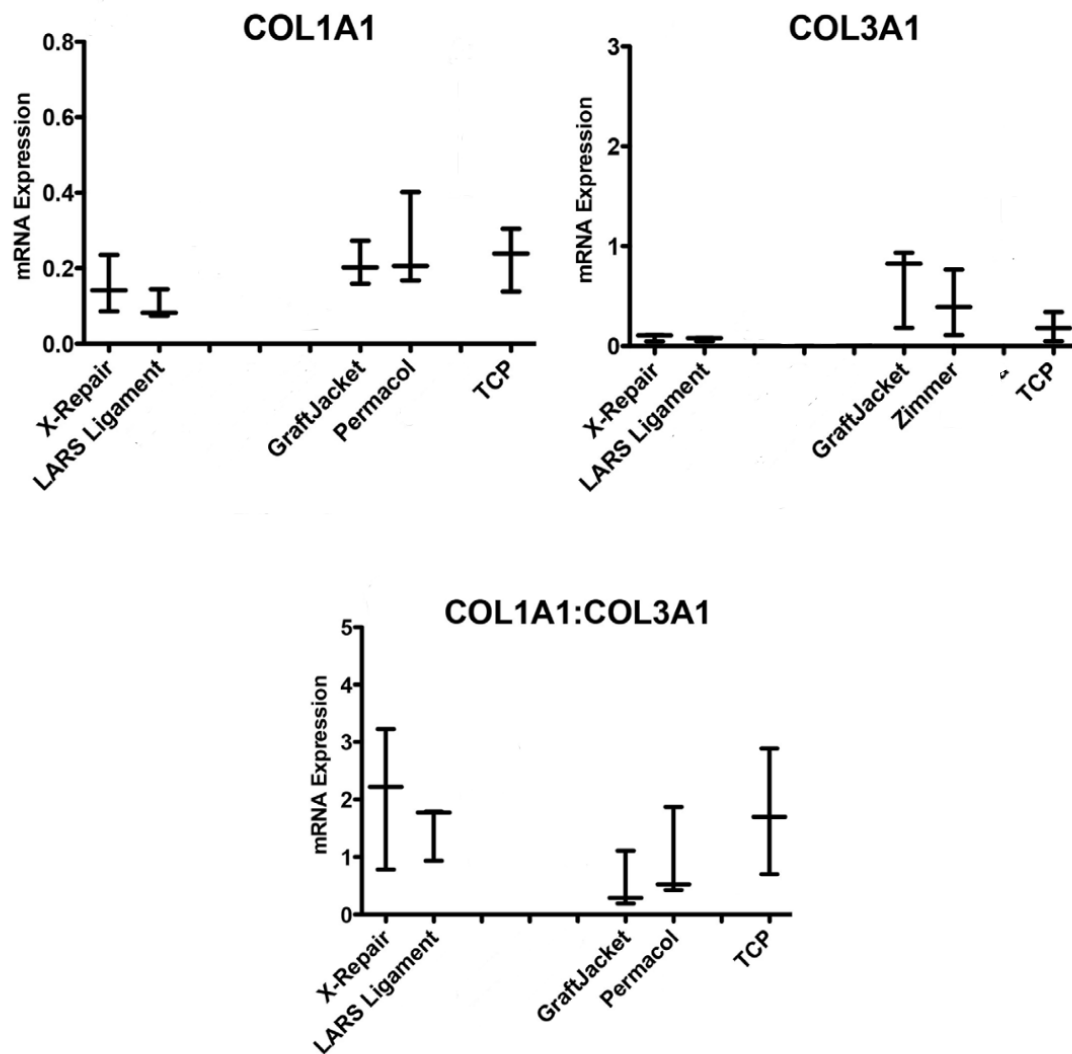


Figura 3.4. Espressione genica del collagene di tipo 1 e di tipo 3, e rapporto tra i due.

La morfologia cellulare su X-Repair e sul legamento LARS è indicativa di tenociti nativi sani, con estesi lamellipodi che si allineano lungo le fibre dello scaffold (Figura 3.5). Le cellule su GraftJacket sono lisce e quelle su Permacol appaiono dendritiche e punteggiate, e entrambi mostrano filopodi (filamenti di actina che agiscono come antenne) che si estendono in direzioni diverse (Figura 3.6).

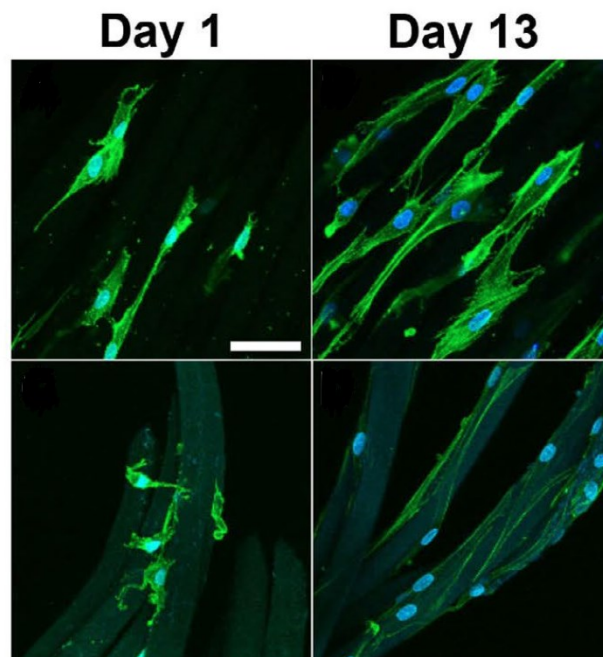


Figura 3.5. Morfologia cellulare su X-Repair (sopra) e LARS Ligament (sotto).

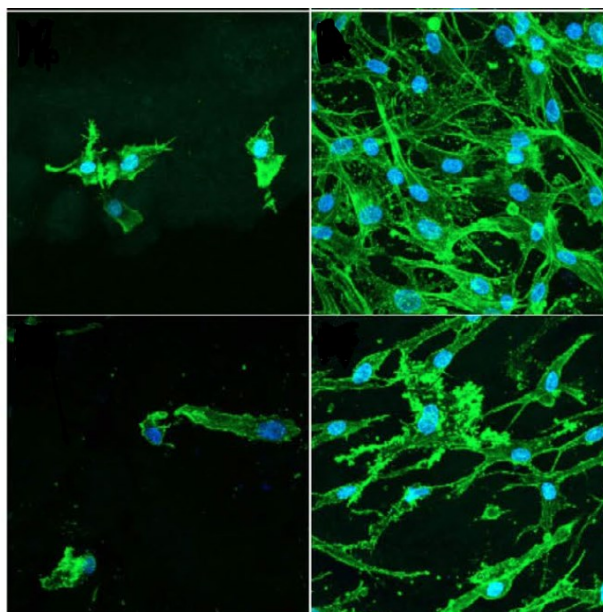


Figura 3.6 Morfologia cellulare su GraftJacket (sopra) e Permacol (sotto).

Il secondo studio preso in considerazione è quello del Nuffield Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences, University of Oxford, UK [4]. Il confronto è stato fatto con sette scaffold in commercio sulle proprietà meccaniche su macro-scala e su nano/microscala con i tendini del sovraspinato umano. Le proprietà macro-meccaniche sono state determinate mediante prove di trazione e reometria. Per valutare le proprietà dei materiali alla nano/microscala (morfologia, modulo di Young e Loss tangent) sono state eseguite la

microscopia a forza atomica e la microscopia elettronica a scansione. Gli stessi quattro scaffold investigati in precedenza (X-Repair, Lars Ligament, GraftJacket e Permacol) sono stati valutati. I campioni dei tendini del sovraspinato sono stati estratti da 5 cadaveri umani congelati di individui di età compresa tra 60 e 93 anni. Questi sono stati immersi in soluzione fisiologica tamponata con fosfato per cinque minuti e poi asciugati prima di essere analizzati.

Le micrografie elettroniche a scansione hanno rivelato, come nel precedente studio, che le fibre di X-Repair e del LARS Ligament sono lisce e perpendicolari. Lo stesso risultato del primo studio è stato ottenuto per le fibre di GraftJacket e Permacol, le quali presentano superfici eterogenee. La superficie del tendine sovraspinato, invece, mostra fasci di fibrille di collagene paralleli e allineati.

Nel microscopio a forza atomica le misure sono state eseguite mediante mappatura a modulazione di ampiezza e frequenza. Sono state selezionate e misurate a caso cinque immagini di ciascun materiale e per ogni immagine sono state registrate mappe di  $512 \times 512$  pixel del modulo di Young (Figure 3.7 e 3.8) e della Loss tangent (Figure 3.9 e 3.10).

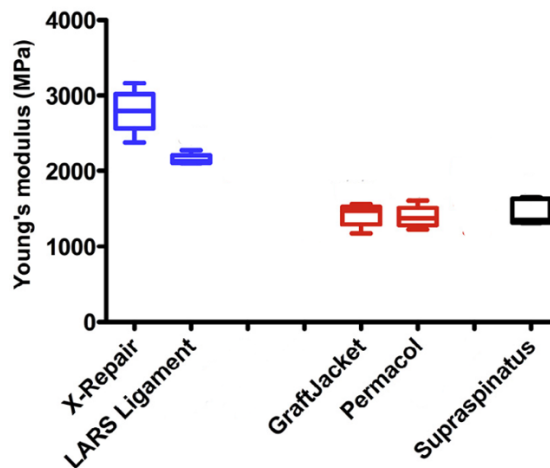


Figura 3.7. Modulo di Young derivato dalla microscopia a forza atomica.

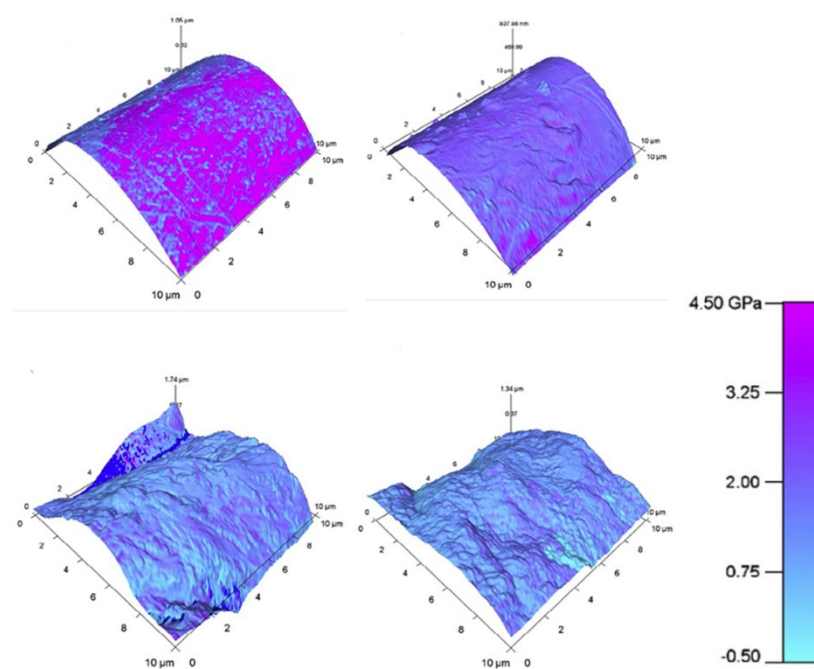


Figura 3.8. Mappatura del modulo di Young sulla superficie dei materiali. In alto a sinistra X-Repair, in alto a destra LARS, in basso a sinistra GraftJacket e in basso a destra Permacol.

È evidente come il modulo di Young localizzato di X-Repair sia significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri scaffold, e il modulo di Young localizzato del legamento LARS sia maggiore di quelli di GraftJacket, Permacol e del tendine sovraspinato.

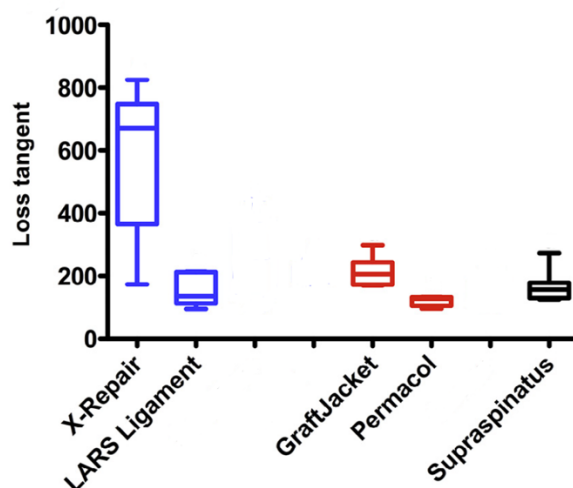


Figura 3.9. Loss tangent derivato dalla microscopia a forza atomica.

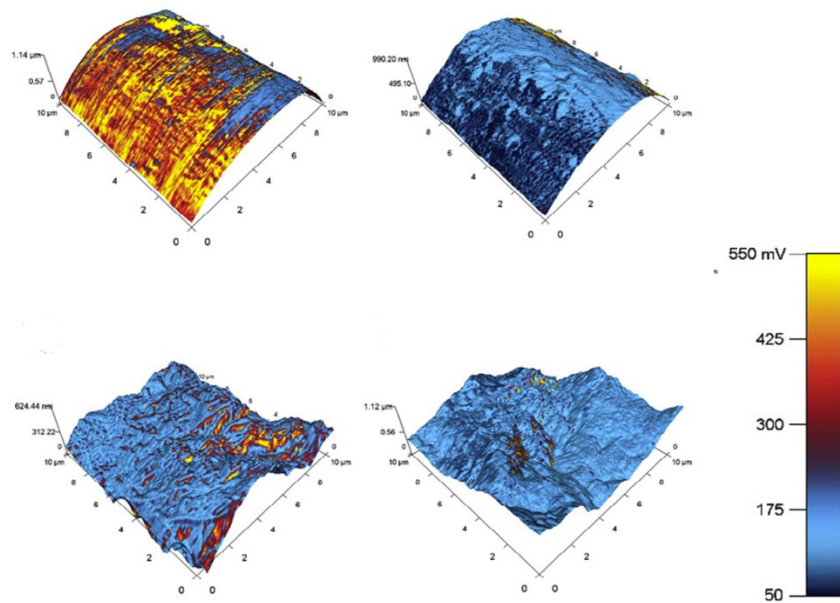


Figura 3.10. Mappatura della Loss tangent. In alto a sinistra X-Repair, in alto a destra LARS, in basso a sinistra GraftJacket e in basso a destra Permacol.

La Loss tangent, calcolata mediante reometria, rappresenta la tangente dell'angolo  $\delta$ . Essa è definita come il rapporto tra  $G'$ (storage modulus) e  $G''$ (viscous modulus). È un fattore di dissipazione di energia meccanica in energia termica, dovuto all'attrito interno.

X-Repair presenta la Loss tangent significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri materiali testati.

Le misurazioni del modulo di Young e della Loss tangent (Figura 3.11) sono state eseguite anche a livello macroscopico attraverso una prova di trazione mono-assiale.

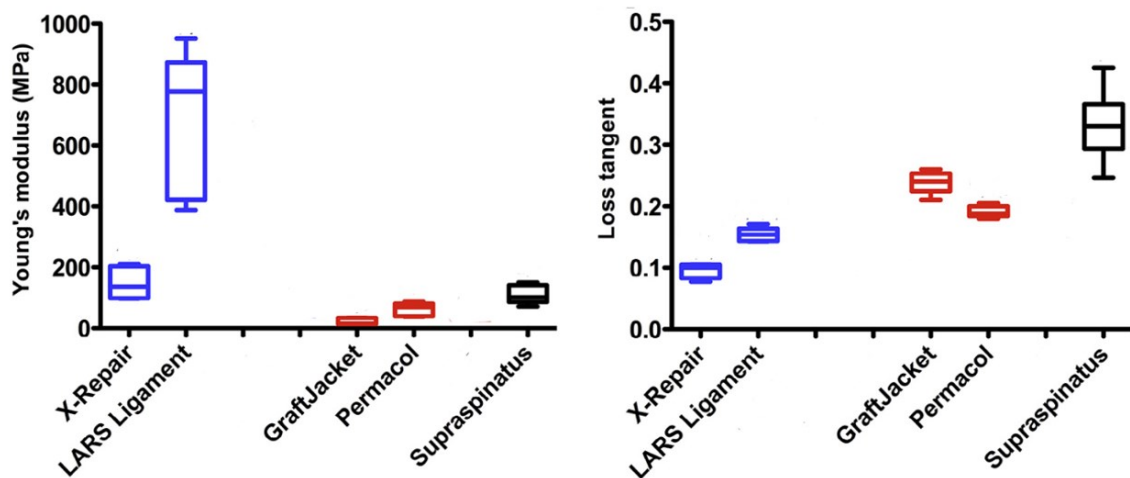


Figura 3.11. Modulo di Young e Loss tangent a livello macroscopico degli scaffold investigati.

Il modulo di Young del legamento LARS é chiaramente molto più alto rispetto agli altri materiali testati (compreso il sovraspinato umano) essendo costituito da polietilene tereftalato. Per quanto riguarda la Loss tangent, il valore del GraftJacket è maggiore degli altri, secondo solo a quello del sovraspinato.

La prova a trazione è stata eseguita anche per calcolare il carico a rottura come rappresentato nella Figura 3.12: il LARS Ligament è caratterizzato da una forza massima di rottura maggiore degli altri scaffold, ma comunque inferiore rispetto al sovraspinato.

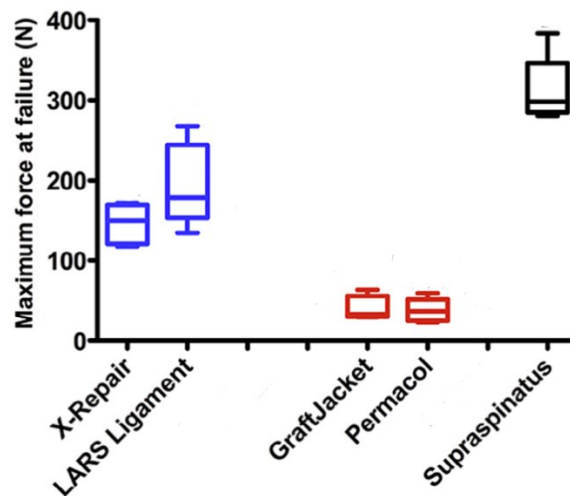


Figura 3.12 Carico a rottura dei materiali misurato durante la prova di trazione.

Vi sono molteplici osservazioni derivabili dai risultati di questi due studi riguardo ai quattro tipi di scaffold analizzati.

Nonostante le cellule tendano solitamente a aderire maggiormente su superfici idrofiliche, come quelle derivate dal derma di mammifero, i risultati mostrano come l'X-Repair, costituito da una superficie idrofobica (PLLA), presenti maggiore adesione cellulare al primo giorno. Probabilmente la vasta area di superficie delle microfibre sintetiche favorisce particolarmente l'adesione e la deposizione tra le fibre. La situazione al tredicesimo giorno, con GraftJacket notevolmente più ricco di cellule, seguito da Permacol, suggerisce che la proliferazione dei tenociti umani è maggiore sugli scaffold biologici, in particolare più sul derma umano che su quello suino. E inoltre, riconoscendo il fatto che lo scaffold GraftJacket ha subito minori trattamenti in fase di produzione rispetto al Permacol, il quale è stato sottoposto a processi enzimatici e meccanici, può essere considerato un punto di partenza per ulteriori studi.



L'espressione genica del collagene di tipo I e tipo III, è apprezzabilmente maggiore negli scaffold biologici, i quali però hanno fibre più sottili di quelle che si formano sulle superfici sintetiche.

Anche lo studio sulla macro e micromeccanica porta a considerevoli conclusioni [4]. A livello microscopico, gli scaffold biologici possiedono caratteristiche meccaniche equiparabili a quelle del tendine sovraspinato umano. A livello macroscopico, invece, sono gli scaffold sintetici a riprodurre più fedelmente le caratteristiche del tendine sovraspinato, nonostante il carico a rottura del sovraspinato sia comunque maggiore di tutti gli scaffold.

Con tali valutazioni, per progettare scaffold costituiti da materiali con micro-proprietà e caratteristiche di sforzo-deformazione alla trazione affini al tendine umano sano, si potrebbe aumentare lo spessore degli scaffold biologici oppure sarebbe ragionevole combinare le due tipologie di scaffold.

Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per migliorare le caratteristiche funzionali degli scaffold.

## **Conclusioni**

Il contenuto della tesina ha messo in luce la complessità delle patologie associate alla lacerazione della cuffia dei rotatori, che sono caratterizzate da una crescente frequenza nel corso degli ultimi anni e in età avanzata.

L'ingegneria tissutale si è posta l'obiettivo di facilitare il processo di rigenerazione del tessuto, concentrandosi sul miglioramento meccanico e biologico per quanto concerne la velocità e la qualità della guarigione del tendine; e la strategia più comunemente utilizzata è quella degli scaffold. Il materiale ideale per l'impalcatura dovrebbe fungere da modello induttivo, con proprietà meccaniche appropriate per prevenire o limitare la rottura del tendine nel corso della degradazione, dell'innesto e del rimodellamento, con conseguente integrazione o ricostruzione di un tessuto muscolo-tendineo funzionale.

I dispositivi attualmente disponibili potrebbero non fornire tutte queste prestazioni, ma le strategie di combinazione di scaffold con fattori di crescita o cellule seminate, o entrambi, possono soddisfare diversi di questi obiettivi.

Gli scaffold biologici e sintetici possono avere un enorme potenziale terapeutico, ma sarà necessario uno sforzo continuo da parte di produttori, medici e ricercatori per sviluppare e convalidare la tecnologia degli scaffold come trattamento sicuro ed efficace per migliorare la guarigione e gli esiti delle riparazioni della cuffia dei rotatori.

## **Bibliografia**

- [1] Takashi Hashimoto, Katsuya Nobuhara, Tetsuo Hamada. Pathologic Evidence of Degeneration as a Primary Cause of Rotator Cuff Tear. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. 2003; 415:111-120.
- [2] T. J. W. Matthews, G. C. Hand, J. L. Rees, N. A. Athanasou, A. J. Carr. Pathology of the torn rotator cuff tendon. The Journal of Bone and Joint Surgery. 2006; 88(4):489-495.
- [3] R.D.J. Smith, A. Carr, S.G. Dakin, S.J.B. Snelling, C. Yapp, O. Hakimi. The response of tenocytes to commercial scaffolds used for rotator cuff repair. European Cells and Materials. 2016; 31:107-118.
- [4] Richard D.J. Smith, Nasim Zargar, Cameron P. Brown, Navraj S. Nagra, Stephanie G. Dakin, Sarah J.B. Snelling, Osnat Hakimi, Andrew Carr. Characterizing the macro and micro mechanical properties of scaffolds for rotator cuff repair. Journal of Shoulder and Elbow Surgery. 2017; 26:2038-2046.