



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

Università degli studi di Padova

Scuola di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

**Sviluppo di un Modello agli Elementi Finiti per la
Caratterizzazione delle Capacità Contrattili di
Cardiomiociti Derivati da Cellule Staminali
Pluripotenti Indotte**

Laureanda

Mantovani Chiara

Relatori

Prof. Piero G. Pavan

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Dr.ssa Todros Silvia

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Anno Accademico 2021/2022

Data di laurea 4/4/2022

INDICE

Introduzione

Capitolo 1- Anatomia e fisiologia del tessuto muscolare cardiaco

1.1 Il Tessuto muscolare

1.2 Il Tessuto muscolare cardiaco

1.2.1 La struttura del miocardio

1.2.2 Confronto tra muscolatura scheletrica e cardiaca

1.3 I Cardiomiociti

1.3.1 La contrazione dei cardiomiociti

1.3.2 I cardiomiociti derivati dalle IPSC

1.3.3 Le cellule staminali nel trattamento di patologie cardiache

Capitolo 2 - La simulazione numerica e il Metodo degli Elementi Finiti

2.1 La simulazione numerica

2.2 Il Metodo degli Elementi Finiti

2.3 Il software Abaqus

Capitolo 3 - Meccanica del tessuto muscolare cardiaco

3.1 Proprietà biomeccaniche del tessuto muscolare cardiaco

3.1.1 Tensione attiva e passiva

3.1.2 La relazione tensione-lunghezza e la legge di Frank-Starling

3.1.3 La relazione forza -velocità

3.2 Modello costitutivo per i cardiomiociti

3.2.1 Il modello di Hill per il muscolo scheletrico

3.2.2 Il modello costitutivo del muscolo scheletrico

3.2.3 Adattamento del modello alle fibre cardiache

3.3 Modello FEM e simulazioni

3.3.1 Geometria del modello

3.3.2 Definizione del materiale

3.3.4 Modulo mesh

3.3.5 Condizioni al contorno

3.3.6 Analisi e risultati

Capitolo 4 - Modello costitutivo randomizzato con distribuzione Gaussiana

4.1 Geometria del modello e mesh

4.1.1 Definizione del materiale

4.1.2 Condizioni al contorno

4.2 Randomizzazione dell'orientazione delle fibre

4.2.1 Risultati

4.3 Randomizzazione della funzione di attivazione

4.3.1 Risultati

4.4 Randomizzazione della massima tensione isometrica

4.4.1 Risultati

Capitolo 5 - Modello costitutivo randomizzato con distribuzione di Von Mises

5.1 La distribuzione di Von Mises

5.2 Calcolo del coefficiente di dispersione

5.3 Risultati

Conclusioni

Bibliografia

INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel mondo. In Italia si registrano 240 mila decessi ogni anno, 150 mila infarti e oltre 1,5 milioni sono le ospedalizzazioni dovute a scompenso cardiaco [1]. I fattori di rischio sono differenti e legati sia a particolari stili di vita quali fumo, inattività fisica, sia al quadro clinico del paziente: obesità, storia familiare, ipertensione, diabete e sindromi metaboliche.

Il trattamento definitivo per l'insufficienza terminale d'organo è rappresentato dal trapianto d'organo, pratica ben consolidata dal punto di vista clinico. Tuttavia, questa procedura presenta due problemi importanti: in primo luogo il numero delle richieste di trapianto risulta largamente maggiore alla disponibilità di organi donati, in secondo luogo, in seguito al trapianto, sussiste il rischio di rigetto cronico che comporta la somministrazione di una terapia immunosoppressiva a vita. La stessa, presenta effetti collaterali pesanti e rende il paziente più vulnerabile al rischio di infezioni [2, 3].

È quindi necessario mettere a punto nuove strategie cliniche e terapeutiche al fine di ripristinare la corretta funzionalità cardiaca. Soluzioni innovative vengono proposte dall'ingegneria tissutale e dalla medicina rigenerativa che si occupano di creare tessuti, organi e sostituti bioartificiali combinando tecniche di diverse discipline. L'ingegneria tissutale rappresenta un campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze biologiche per realizzare costrutti biologici funzionali mentre la medicina rigenerativa si occupa di sostituire o rigenerare la componente cellulare.

Per quanto riguarda il cuore, la possibilità di creare un sostituto bioingegnerizzato nasce in seguito alla scoperta delle cellule staminali cardiache. Queste presentano capacità autoreplicative e la possibilità di differenziarsi in cardiomiociti, cellule endoteliali e fibroblasti cardiaci. Tuttavia, le cellule staminali presentano capacità di espansione in vitro limitate e questo è in antisonanza con le necessità dell'ingegneria tissutale che richiede invece l'utilizzo di grandi quantità di cellule per ottenere valori fisiologici di

densità cellulare. A tale proposito sono state individuate altre fonti cellulari come le cellule staminali embrionali (ES) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Queste ultime derivano dalla riprogrammazione in vitro di cellule somatiche adulte e sono in grado di ripristinare la capacità di differenziarsi nella maggior parte di tipi cellulari, tra cui le cellule del cuore, i cardiomiociti.

Le malattie cardiache danneggiano il normale comportamento cellulare intervenendo sul naturale processo di contrazione e rilassamento del cuore, sulle forze contrattili e sulle proprietà meccaniche del tessuto cardiaco. Pertanto, è di fondamentale importanza lo studio del comportamento meccanico delle cellule cardiache sia per una comprensione quantitativa e qualitativa della nascita e sviluppo di patologie cardiache, sia per la realizzazione di sostituti biologici come il cuore artificiale [3].

Il presente lavoro di tesi ha quindi lo scopo di sviluppare un approccio numerico per lo studio del comportamento meccanico delle cellule cardiache ponendo particolare attenzione al comportamento presentato dai cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte. L'approccio mira ad ottenere una valutazione quantitativa di alcune caratteristiche fondamentali di queste cellule, come la capacità di contrazione. Questo studio è reso possibile grazie all'analisi computazionale e allo sviluppo di un modello agli elementi finiti.

CAPITOLO 1

Anatomia e fisiologia del tessuto muscolare

1.1 Il tessuto muscolare

Il 50% del corpo umano è costituito da tessuto muscolare. A seconda delle caratteristiche funzionali si distinguono tre tipologie di tessuto muscolare:

- tessuto muscolare scheletrico,
- tessuto muscolare cardiaco,
- tessuto muscolare liscio.

Il tessuto muscolare scheletrico (Fig. 1A) compone i muscoli volontari che aderiscono alle ossa del sistema scheletrico e controllano i movimenti dello scheletro stesso. Il tessuto muscolare cardiaco (Fig. 1B) costituisce la componente principale del miocardio di lavoro, si trova nella tunica contrattile del cuore e permette, per mezzo di contrazioni involontarie, il movimento del sangue all'interno dei vasi che compongono il sistema circolatorio. Il tessuto muscolare liscio (Fig. 1C) compone le tuniche contrattili e avvolge gli organi interni e cavi come lo stomaco, la vescica e i vasi sanguinei, svolge funzioni di tipo fisiologico come la regolazione del flusso ematico e della pressione sanguigna [4].

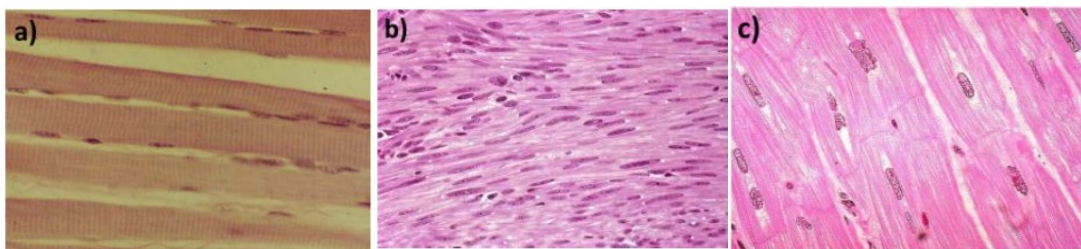


Fig. 1: Le tre diverse tipologie di tessuto muscolare: a) Tessuto muscolare striato, b) liscio c) cardiaco.

1.2 Il tessuto muscolare cardiaco

Il tessuto muscolare cardiaco, anche chiamato miocardio, è una tipologia di tessuto muscolare che condivide caratteristiche comuni sia con la muscolatura striata che con la muscolatura liscia. Si suddivide in miocardio di lavoro e miocardio specifico. Il miocardio di lavoro rappresenta circa il 90% dell'intero miocardio, costituisce la muscolatura cardiaca atriale e ventricolare ed è responsabile dell'attività contrattile del cuore. Il miocardio specifico è in presenza minore e costituisce il sistema di conduzione del cuore svolgendo le funzioni di pacemaker e di trasmissione dell'impulso contrattile. Il miocardio specifico possiede velocità di conduzione elevata, gli stimoli che nascono dalla sua sede si propagano fino al miocardio comune [4,5].

1.2.1 La struttura del miocardio

Il miocardio è organizzato in modo da formare due sistemi fra loro indipendenti uno per gli atri e uno per i ventricoli, separati dall'interposizione di uno scheletro fibroso. Il tessuto muscolare cardiaco è costituito da cellule mononucleate chiamate cardiomiociti. Le cellule cardiache sono connesse tra loro mediante la presenza di dischi intercalari e sono sostenute da tessuto connettivo lasso chiamato endomisio. I cardiomiociti sono raggruppati in fasci di dimensioni variabili e compongono una struttura continua, simile ad un reticolo (Fig.2). I fasci aderiscono allo scheletro fibroso del cuore e sono inframmezzati da tessuto connettivo. Recenti studi di sezioni microscopiche hanno dimostrato che, muovendosi dall'interno all'esterno della parete ventricolare, si riscontra una continua e ben ordinata distribuzione angolare dell'orientazione delle fibre: le fibre endocardiche, più intese, hanno una direzione predominante longitudinale e muovendosi verso l'epicardio ruotano a spirale compiendo un angolo di 180 gradi [4].

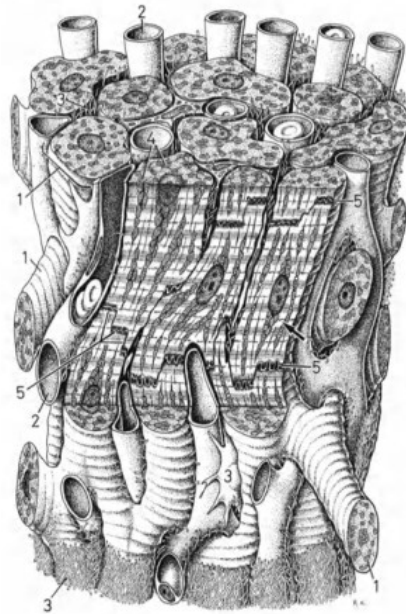


Figura 2: Visione tridimensionale della muscolatura cardiaca. Le cellule muscolari (1) della muscolatura cardiaca sono interconnesse in modo da formare una struttura simile ad una rete. Tale struttura presenta elevata vascolarizzazione (2) ed i fasci muscolari sono inframmezzati da fibre di tessuto connettivo (3). Il sezionamento trasversale permette di evidenziare la presenza dei dischi intercalari (5).

1.2.2 Confronto tra muscolatura scheletrica e cardiaca

I muscoli cardiaci e scheletrici sono entrambi muscoli striati e pertanto presentano un meccanismo contrattile comune: le fibre contrattili sono arrangiate in sarcomeri e l'interazione tra filamenti di actina e miosina è mediata dal rilascio di calcio. La striatura caratteristica di questi tessuti è legata alle proteine contrattili all'interno delle miofibrille che interagendo col piano di polarizzazione della luce delimitano due bande distinte: quella isotropa I, banda chiara, e quella anisotropa A, banda scura (Fig. 3).

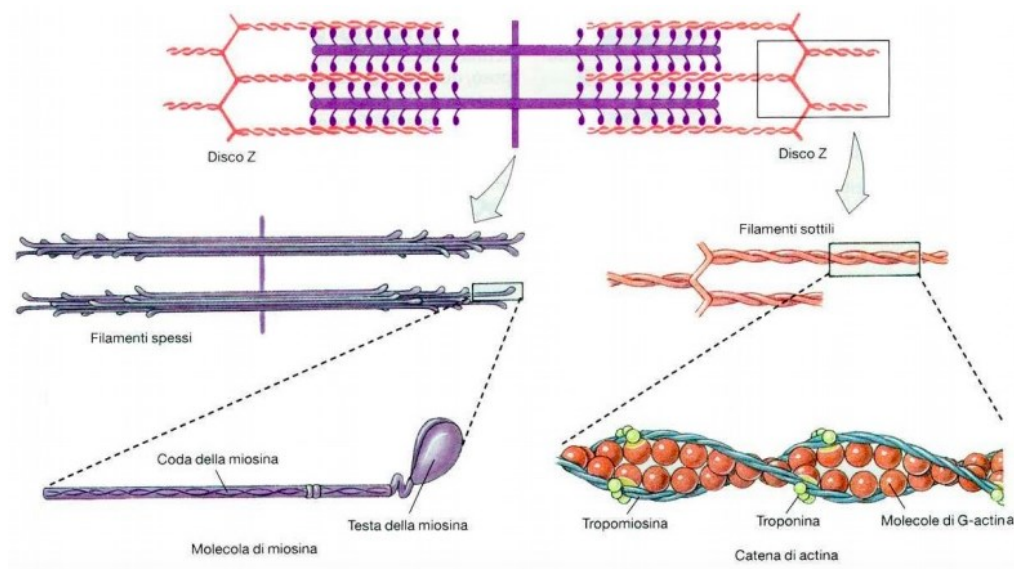


Fig.3: Il sarcomero si estende tra due dischi Z ed è costituito dall'alternanza di proteine contrattili: filamenti spessi di Miosina e sottili di Actina.

Gli aspetti principali che differenziano la muscolatura scheletrica da quella cardiaca sono elencati in seguito [4,5]:

- le cellule muscolari cardiache presentano minore estensione in lunghezza e generalmente si dividono in due o più rami, i quali anastomizzano nei tratti terminali con altre cellule al livello dei dischi intercalari;
- le cellule muscolari cardiache sono mononucleate;
- la struttura complessiva del muscolo cardiaco è dovuto ad un intreccio di fasci muscolari, i quali non costituiscono singole unità e non presentano, come nel caso di muscolo scheletrico, una disposizione ordinata;
- la contrazione dei muscoli cardiaci è involontaria, la frequenza viene regolata dal sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico.

1.3 I Cardiomiociti

I cardiomiociti sono le unità funzionali del miocardio, hanno dimensioni comprese tra 85-100 μm in lunghezza e 15 μm in larghezza (Fig. 4). Generalmente possiedono un unico nucleo collocato in posizione centrale ed un numero elevato di mitocondri. Come già accennato, l'organizzazione delle proteine contrattili risulta analoga a quella presente nel tessuto muscolare scheletrico, è infatti presente la bandeggiatura trasversale tipica dell'organizzazione sarcomerica. Le cellule cardiache entrano in contatto tra loro per mezzo dei dischi intercalari. La cellula muscolare cardiaca è delimitata da una membrana chiamata sarcolemme con caratteristiche morfologiche e proprietà funzionali peculiari. Il citoplasma è differenziato in tubuli a T e vescicole, delimitati da membrane costituenti nel loro insieme il sistema sarcotubulare. Tale complessa organizzazione, unitamente a una continua spesa energetica, mantiene differenze di concentrazione ionica tra l'interno e l'esterno della cellula ed è funzionale al ciclo contrazione-rilassamento.

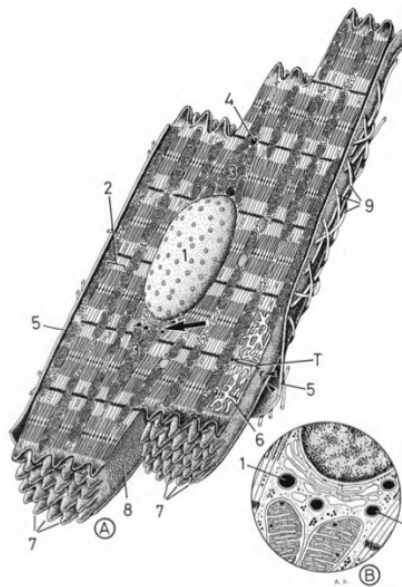


Fig. 4: Il cardiomiocita. Il nucleo è localizzato al centro della cellula cardiaca ed è visibile la striatura trasversale dovuta all'alternanza dei due tipi di miofilamenti, l'actina e la miosina.

1.3.1 La contrazione dei cardiomiociti

La contrazione cardiaca è mediata da due tipologie differenti di cellule: le cellule pacemaker e le cellule contrattili. Le cellule pacemaker si trovano nel nodo seno atriale e nel nodo atrioventricolare, sono morfologicamente più piccole delle cellule contrattili e non presentano sarcomeri organizzati pertanto, non contribuiscono alla produzione di forza per la contrazione del cuore. Queste cellule sono anche chiamate cellule autoritmiche perché generano lo stimolo contrattile in modo autonomo. Sono in numero inferiore rispetto alle cellule contrattili, infatti, solo l'1% delle cellule miocardiche è specializzato nel generare spontaneamente potenziali d'azione. Il segnale per la contrazione è miogeno, si origina all'interno del muscolo cardiaco stesso, non viene quindi generato dal sistema nervoso.

Il processo di contrazione cardiaca ha quindi inizio con la produzione di un potenziale d'azione che si origina spontaneamente nelle cellule pacemaker e si propaga alle cellule contrattili attraverso le giunzioni comunicanti. Una volta raggiunta la cellula contrattile, il potenziale d'azione diffonde lungo il sarcolemma e nei tubuli a T dove induce l'apertura dei canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. Il Ca^{2+} entra nella cellula e si muove secondo gradiente di concentrazione nel reticolo sarcoplasmatico. Il calcio rilasciato diffonde quindi nel citosol verso gli elementi contrattili dove si lega alla troponina dando così inizio al ciclo di formazione di ponti trasversali e quindi alla contrazione. La contrazione del miocardio avviene con lo stesso meccanismo di scorrimento dei filamenti che ha luogo nel muscolo scheletrico: la flessione delle teste di miosina legate alla actina produce la forza che fa scorrere i filamenti e accorciare i sarcomeri in un processo chiamato powerstroke [4].

1.3.2 I cardiomiociti derivati dalle IPSC

Le cellule staminali sono cellule presenti in tutti i tipi di tessuti biologici, hanno come caratteristica principale una mitosi definita “asimmetrica” o differenziativa che dà origine a due cellule figlie di cui solo una procede verso il differenziamento, mentre l'altra conserva le caratteristiche di staminalista. Questa proprietà le rende fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi tissutale e assicura il corretto turn-over cellulare in tutti i tessuti dell'organismo. Il termine *pluripotenti* con cui vengono chiamate queste cellule deriva proprio da questa caratteristica in quanto sono capaci di produrre la maggior parte di tipi cellulari del nostro corpo.

Tra le cellule staminali, le cellule staminali embrionali risultano essere le più vantaggiose per la ricerca scientifica perché garantiscono il massimo della staminalità. Tuttavia, a causa della loro origine, l'uso di queste cellule nella ricerca biomedica è soggetto a dibattiti etici e addirittura proibito in alcuni paesi. Particolare attenzione è stata recentemente rivolta allo studio delle cellule staminali pluripotenti indotte. È infatti solo nel 2006 che Shinya Yamanaka ha scoperto un nuovo modo per ‘riprogrammare’ cellule specializzate adulte in cellule staminali. Il processo di riprogrammazione consiste nella modificazione di quattro geni del genoma di una cellula adulta al fine di ripristinare la potenzialità staminale. Successivamente al ripristino della potenzialità staminale è possibile guidare il differenziamento cellulare attraverso opportuni stimoli bioattivi e quindi ottenere diversi tipi cellulari, tra cui i cardiomiociti (Fig.5). Le cellule IPS possono quindi essere facilmente prodotte in laboratorio e questo ha incentivato la ricerca scientifica e il loro utilizzo nell'ingegneria tissutale [6]. Il successo derivato dalla scoperta delle cellule staminali e dal processo di riprogrammazione cellulare porta con sé un grosso potenziale per nuove applicazioni mediche tra cui le terapie basate sulla sostituzione cellulare e lo sviluppo di costrutti ingegnerizzati per la riparazione di tessuti e organi. Il grande vantaggio dell'utilizzo di queste cellule si trova nella compatibilità: le cellule staminali pluripotenti indotte sono prodotte a partire da cellule autologhe del paziente, conservano i tratti genetici dei donatori e quindi non vanno incontro a reazioni di rigetto da parte del sistema immunitario. Questo consente di realizzare una terapia sicura e individualizzata per ogni paziente.

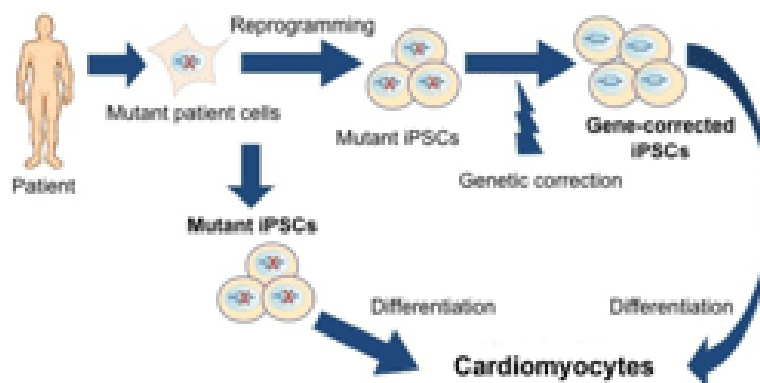


Fig. 5: Ciclo di riprogrammazione delle cellule staminali adulte in cardiomiociti.

1.3.2 Le cellule staminali nel trattamento delle patologie cardiache

Le patologie cardiache determinano una riduzione più o meno importante della funzionalità cardiaca in base alla sede e all'estensione dell'area interessata dal danno. La necrosi e l'alterazione tissutale che sorgono in seguito a danni cardiaci provocano una diminuzione del numero e della funzionalità delle cellule muscolari cardiache nella zona colpita. Poiché i cardiomiociti adulti non sono in grado di rigenerarsi, la perdita cellulare si manifesta con una disfunzione contrattile conseguente alla progressiva sostituzione delle cellule cardiache con tessuto cicatriziale. Il rimodellamento tissutale è infatti caratterizzato dalla rimozione del tessuto necrotico provocato dal danno cardiaco e accompagnata dalla formazione di tessuto di granulazione fino alla formazione di una cicatrice fibrosa non contrattile che può portare ad un danno cardiaco irreversibile.

Il trattamento d'elezione per lo scompenso cardiaco è il trapianto d'organo. Poiché questa procedura risulta limitata dalla disponibilità dei donatori e dalle complicazioni legate alla terapia immunosoppressiva, particolare attenzione è stata recentemente rivolta allo sviluppo del trapianto cellulare come alternativa al trapianto d'organo. L'obiettivo di questa nuova strategia di intervento consiste nell'ottenere cellule in grado di sostenere il lavoro cardiaco, di integrarsi con le cellule circostanti e rispondere adeguatamente a stimoli fisiologici e fisiopatologici. L'attenzione è quindi stata rivolta alle cellule staminali quali candidate ottimali per la messa a punto di efficaci terapie riparative del

miocardio danneggiato. Sono state pertanto proposte diverse strategie di medicina rigenerativa come, ad esempio, il trapianto di cellule staminali autologhe tramite iniezione.

Un'ulteriore strategia è quella messa a punto dai principi dell'ingegneria dei tessuti dove la crescita ed il differenziamento delle cellule staminali vengono realizzate su supporti sintetici o di derivazione biologica opportunamente funzionalizzati. Grazie allo stimolo di fattori bioattivi, si cerca di renderli il più possibile simili ai tessuti biologici sia per composizione/struttura che per funzionalità. Questi principi sono alla base dello sviluppo di tessuti ingegnerizzati e quindi di organi artificiali e dispositivi di assistenza ventricolare come le valvole cardiache [7,8].

Per quanto riguarda le bioprotesi, le cellule selezionate vengono coltivate su un supporto specifico al fine di assemblare un tessuto in grado di generare una forza di contrazione adeguata e di propagare segnali elettrici e che quindi presenti caratteristiche simili al miocardio. Gli scaffold possono essere di derivazione naturale, polimerica oppure costituiti da matrice biologica. Quest'ultima rappresenta il supporto ideale, in quanto possiede caratteristiche di biocompatibilità molto elevate ed inoltre, essendo prodotta dalle cellule residenti nello specifico tessuto, si trova in rapporto dinamico con l'ambiente circostante favorendo la migrazione, il differenziamento, la proliferazione cellulare e modulando la risposta immunitaria. Possiede quindi proprietà ottimali, dal punto di vista biologico, meccanico e funzionale, per la realizzazione di costrutti bioingegnerizzati.

Capitolo 2

La Simulazione numerica e il Metodo degli Elementi Finiti

2.1 La Simulazione numerica

La simulazione numerica è una tecnica che consente di imitare il funzionamento di un sistema reale attraverso la definizione di un modello realizzato al computer chiamato appunto modello computazionale. Oggi il ruolo della simulazione è ampiamente consolidato in svariati settori, per esempio, quello industriale e ambientale, mentre sta diventando sempre più evidente il contributo che può portare in numerosi altri ambiti, tra cui la biomeccanica.

Il modello computazionale e il sistema reale sono correlati dal processo di *modellazione* che consente di astrarre dal sistema reale le sue caratteristiche essenziali. Questo processo comporta numerose approssimazioni, pertanto, la validità del modello deve essere valutata in riferimento alle ipotesi e al contesto in cui il modello è definito. La simulazione serve a verificare che il comportamento ottenuto dal modello computazionale sia simile al comportamento del sistema reale.

Affiancare la simulazione numerica allo studio sperimentale porta a vantaggi considerevoli sotto diversi punti di vista:

- sensibile diminuzione di test sperimentali da eseguire in laboratorio;
- precisione del risultato ottenuto;
- possibilità di analisi e controllo dello sviluppo di sistemi complessi;
- possibilità di analisi del sistema nel tempo;
- capacità di elaborazione automatica dei dati.

Facendo riferimento in particolare al nostro studio, la simulazione numerica è applicata allo studio dei processi di contrazione delle cellule cardiache per una valutazione quantitativa di fenomeni che sarebbero altrimenti ignorati se ci si basasse solo sui metodi sperimentali.

2.2 Il Metodo degli Elementi Finiti

La simulazione numerica trova la stessa attuazione attraverso il metodo degli elementi finiti. Con l'acronimo F.E.M (Finite Element Method) si definisce la tecnica numerica utilizzata per la risoluzione di problemi per i quali non è possibile ricavare una soluzione analitica. Questo metodo cerca di risolvere in modo approssimato sistemi fisici descritti da equazioni differenziali alle derivate parziali, riducendoli a sistemi di equazioni algebriche. L'idea alla base di questo metodo è la *discretizzazione* di ogni sistema fisico in un numero finito di parti, chiamati appunto elementi finiti (Fig.6). Il comportamento del sistema originale è quindi approssimato dal modello discreto costruito assemblando tutti gli elementi. Si parla quindi di approssimazione in quanto i risultati sono ottenuti a partire da un numero finito di elementi.

In generale questo metodo si adatta molto bene per risolvere problemi relativi a comportamenti meccanici complessi dei materiali, geometrie complesse, particolari condizioni al contorno e consente di trattare una grande varietà di problemi ingegneristici.

Per quanto riguarda il funzionamento generale del Metodo degli Elementi Finiti si possono identificare quattro passaggi fondamentali: idealizzazione, discretizzazione, modellazione e assemblaggio.

La fase di idealizzazione consiste nell'estrarre dal modello fisico reale un modello matematico che ne descriva, in modo semplificato, il comportamento meccanico. Generalmente una maggior aderenza al sistema reale implica una maggiore complessità del modello; pertanto, è opportuno considerare solo le caratteristiche essenziali al fine dello studio. Questa semplificazione consente di descrivere il sistema reale in un opportuno linguaggio di calco e quindi di sviluppare una analisi computazionale. Successivamente a questa prima fase si realizza la discretizzazione o meshatura del sistema in elementi finiti. Questi elementi sono connessi tra loro tramite nodi.

Gli elementi finiti possono avere diverse forme e dimensioni che si rispecchiano poi in una maggiore o minore accuratezza nel risultato.

La fase di modellazione consiste nell'approssimazione locale del sistema attraverso l'utilizzo delle funzioni di forma: si ipotizza che la funzione incognita, ad esempio lo spostamento u_e^i , possa essere approssimata per ciascun elemento con la seguente funzione:

$$u_e^i = \sum_{j=1}^M N_{ij} \cdot u_j^j$$

dove u_j^j sono gli spostamenti nodali e j è il numero di nodi di ciascun elemento. N_{ij} sono chiamate funzioni di forma (o funzioni di interpolazione) ed M è il numero di elementi. Grazie alle funzioni di forma è possibile legare gli spostamenti nodali agli spostamenti del generico elemento, queste hanno un ruolo importante perché rappresentano il polinomio che approssima il valore esatto degli spostamenti e quindi determinano la convergenza del metodo.

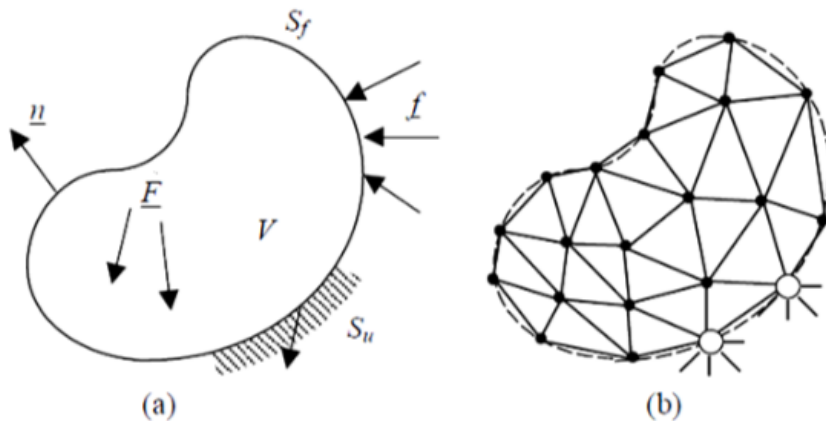


Fig.6: Esempio di discretizzazione di un corpo generico in elementi finiti.

L'ultima fase è quella di assemblaggio in cui, a partire dalle matrici di rigidezza dei singoli elementi finiti, si definisce la matrice di rigidezza globale del sistema da qui poi dipende la formulazione del sistema di equazioni di equilibrio.

Si ottiene quindi un sistema di equazioni algebriche che, in una analisi lineare, assumono la seguente forma:

$$\sum_{i=1}^N [K_{ij}^e] \cdot u_i^e = \sum_{i=1}^N (f_i^e)$$

dove,

- $[K_{ij}^e]$ è la matrice di rigidezza del sistema ottenuta dall'assemblaggio delle matrici di rigidezza dei singoli elementi;
- u_i^e è il vettore incognito degli spostamenti nodali;
- (f_i^e) è il vettore delle forze interne all'elemento.

Per la soluzione di tali sistemi si utilizzano algoritmi di calcolo numerico che possono essere di tipo diretto o iterativo a seconda della linearità del problema. Noti i valori degli spostamenti nodali si ricavano il campo di deformazione e di tensione per ogni elemento.

2.3 Il software Abaqus

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato il software Abaqus (di Simulia), uno tra i solutori commerciali maggiormente diffusi sul mercato. Il software Abaqus è stato utilizzato per realizzare le simulazioni descritte nei prossimi capitoli.

Questo tipo di software opera seguendo tre fasi:

1. Pre-processing;
2. Processing;
3. Post-processing.

La prima fase consente di costruire la struttura, definire le proprietà dei materiali, assegnare a ciascuna parte della struttura il materiale corrispondente, definire il carico e le condizioni al contorno. La costruzione della geometria è creata attraverso i solutori CAD (Computer-Aided Design) implementati nel programma stesso. Una volta introdotte tutte le parti costituenti della struttura da simulare, queste devono essere discretizzate in modo da creare una serie di nodi in cui sono calcolate le soluzioni. Ottenute tutte le informazioni necessarie, il solutore calcola le matrici di rigidezza del modello, nonché le forze interne ed esterne agenti in esso.

Nella fase di processing vengono risolte le equazioni di equilibrio e calcolati gli spostamenti nodali. I tipi di analisi che si possono effettuare sono sia analisi statiche lineari che non lineari.

Nella fase di post-processing si analizzano i risultati ottenuti dalla soluzione che è stata calcolata. Tali risultati sono visualizzati e analizzati attraverso un'interfaccia grafica.

Capitolo 3

Meccanica del tessuto muscolare cardiaco

3.1 Proprietà biomeccaniche del tessuto muscolare cardiaco

I tessuti biologici presentano caratteristiche meccaniche fortemente differenziate e correlate al binomio struttura-funzione. Gli aspetti biomeccanici sono il risultato dell'azione delle varie componenti che costituiscono il tessuto e delle loro interazioni. Dal punto di vista costitutivo, il tessuto muscolare cardiaco si presenta come un materiale non omogeneo, anisotropo e incompressibile. Caratteristica meccanica che accomuna la maggior parte dei tessuti molli è inoltre la non linearità per struttura e per materiale.

L'eterogeneità: il tessuto muscolare cardiaco è definito come un materiale composito in cui convivono lo stretto rapporto una componente cellulare, i cardiomiociti, ed una componente amorfa, la matrice extracellulare. Queste due componenti variano in percentuale nelle differenti parti del tessuto, pertanto, il comportamento meccanico risulta essere fortemente differenziato anche a livello locale e microstrutturale.

L'incompressibilità: come la maggior parte dei tessuti molli, il tessuto muscolare cardiaco contiene grandi quantità di acqua e liquidi biologici che lo rendono incompressibile.

La Simmetria: le caratteristiche di simmetria del tessuto muscolare cardiaco sono fortemente correlate all'organizzazione microstrutturale che esso possiede. Questa organizzazione dipende soprattutto da come sono tridimensionalmente disposte le varie componenti del tessuto e dalla loro interazione. Il tessuto muscolare cardiaco presenta una struttura ben organizzata e complessa, l'architettura interna del tessuto suggerisce una configurazione anisotropa, in particolare, considerando il comportamento delle fibre a trazione, si osserva una direzione preferenziale di sviluppo dei fenomeni meccanici che rende il tessuto trasversalmente isotropo.

La non linearità: I tessuti molli sono caratterizzati dal presentare deformazioni finite pertanto il processo deformativo deve essere descritto mediante una formulazione

cinematica non lineare, si parla quindi di non linearità per geometria. Inoltre, la relazione tenso-deformativa è anch'essa non lineare determinando così anche una non linearità per materiale. Il miocardio presenta quindi caratteristiche di non linearità per materiale e per geometria.

3.1.1 Tensione attiva e passiva

La tensione sviluppata del tessuto muscolare cardiaco può essere scomposta come somma di due componenti, una attiva e una passiva. La tensione passiva si sviluppa durante l'allungamento del muscolo e dipende dalla lunghezza iniziale delle fibre. La tensione passiva è tanto maggiore quanto più il sarcomero viene "stirato" rispetto alla lunghezza iniziale. La tensione attiva invece è sviluppata dai filamenti contrattili durante la contrazione muscolare, anch'essa dipende dalla lunghezza del sarcomero che condiziona il numero di interazioni actina-miosina e quindi il powerstroke. Nel grafico in (Fig.7) si possono osservare gli andamenti delle due componenti di tensione la cui somma è la tensione totale prodotta dal muscolo.

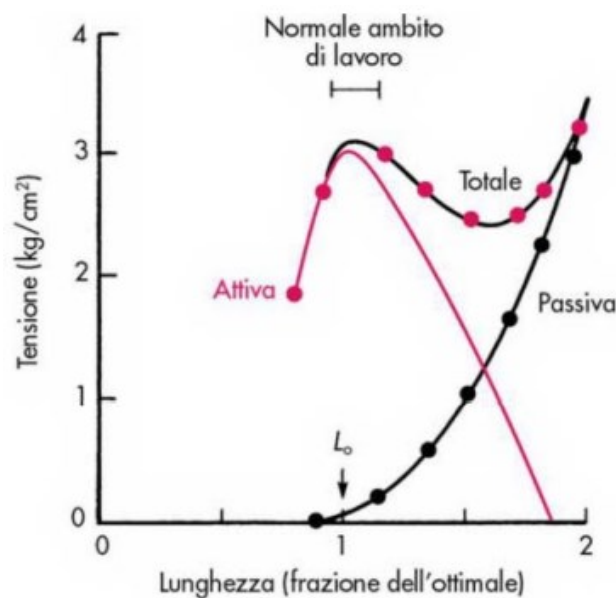


Fig. 7. Grafico della tensione attiva e passiva in funzione della lunghezza della fibra, dalla somma delle due tensioni si ottiene la tensione totale.

3.1.2 La relazione tensione - lunghezza e la legge di Frank-Starling

Nei muscoli striati la tensione generata da una fibra muscolare durante una contrazione è direttamente correlata alla lunghezza iniziale del sarcomero e quindi alla lunghezza iniziale della fibra muscolare (Fig.8). Durante la contrazione il sarcomero sviluppa la sua forza massima se si trova ad una lunghezza di lavoro ottimale, non deve essere né troppo accorciato né troppo allungato. La lunghezza del sarcomero è in stretta relazione con il grado di sovrapposizione tra i filamenti spessi e i filamenti sottili. Per la teoria dello scorrimento dei filamenti, infatti, la tensione generata da una fibra muscolare è direttamente proporzionale al numero di legami che si formano tra i filamenti sottili e i filamenti spessi: se le fibre iniziano la contrazione a lunghezze del sarcomero troppo grandi, i filamenti spessi e sottili sono sovrapposti solo in piccola parte e formano un numero limitato di ponti trasversali sviluppando quindi poca forza. Alla lunghezza ottimale invece, si può formare il massimo numero di ponti trasversali tra filamenti spessi e sottili e la fibra riesce quindi a generare il massimo della forza contrattile [4].

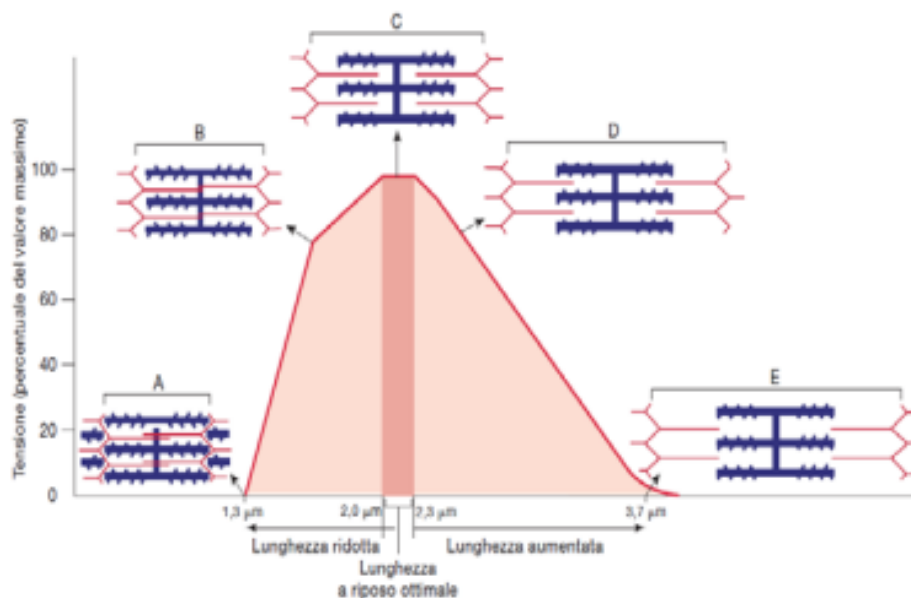


Fig.8: Grafico della tensione sviluppata dal sarcomero in funzione della sua lunghezza: per lunghezze superiori a 3,7 μm non si ha sviluppo di forza a causa della non interazione tra i miofilamenti; analogamente succede per lunghezze inferiori a 1,3 μm.

Nel cuore, la relazione tensione-lunghezza, prende il nome di legge di Frank-Starling: all'aumentare della richiesta ematica, aumenta lo stiramento della parete ventricolare e quindi anche il volume della gittata sistolica. Questa richiesta si traduce in un allungamento delle fibre muscolari e in una maggiore forza sviluppata. A differenza del muscolo scheletrico che lavora a lunghezze vicino alla sua lunghezza ottimale, le fibre miocardiche del cuore sano hanno una lunghezza inferiore rispetto a quella ottimale per la contrazione. Nel sarcomero scheletrico, superato il range di overlap ottimale per lo sviluppo di tensione si registra un andamento decrescente della massima tensione isometrica sviluppabile, imputabile al diminuire del numero di cross-link attivabili. Per il muscolo cardiaco la situazione ad alti livelli di allungamento è differente: è stato infatti dimostrato che, in esperimenti in cui il muscolo veniva sottoposto a carichi elevati, i sarcomeri si mantenevano comunque ad una lunghezza media di 2,3 μm . La ragione di ciò è ricercabile nel fatto che, per sicurezza, il muscolo cardiaco non può correre il rischio di non contrarsi e, per dare una spiegazione a questo fenomeno, si ipotizza che alte tensioni a riposo invochino lo scivolamento delle fibre le une rispetto alle altre, tali da contenere il più possibile i sarcomeri nella condizione di poter esercitare tensione.

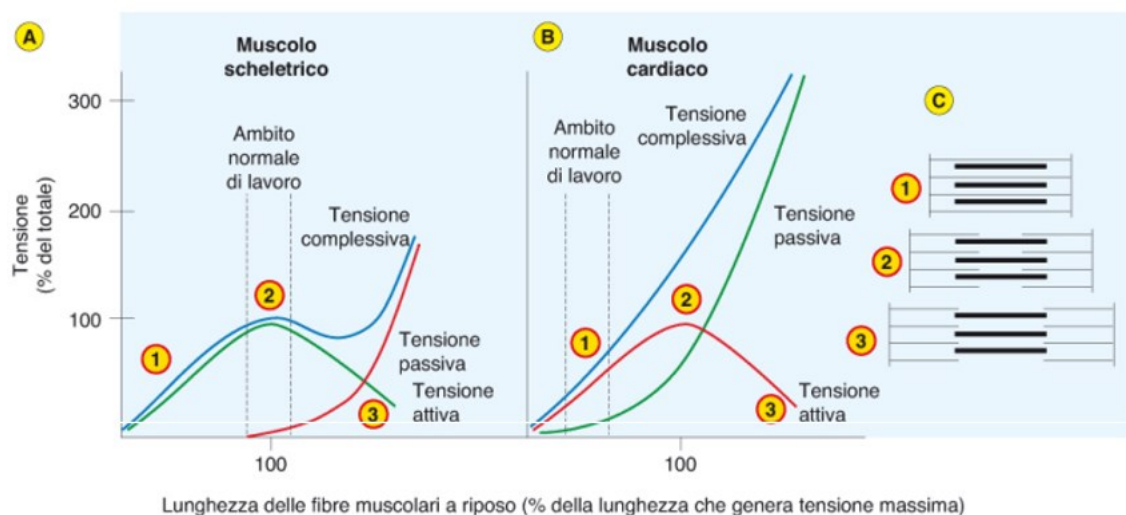


Fig.9: Grafici delle tensioni sviluppate da muscolo scheletrico e cardiaco in funzione della lunghezza delle fibre muscolari.

La relazione tra allungamento e forza sviluppata è rappresentata dalla curva di Starling in figura 10. L'asse delle ascisse rappresenta il volume telediastolico che è indice dello stiramento dei ventricoli e quindi della lunghezza del sarcomero. L'asse delle ordinate rappresenta la gittata sistolica, indicatore della forza contrattile.

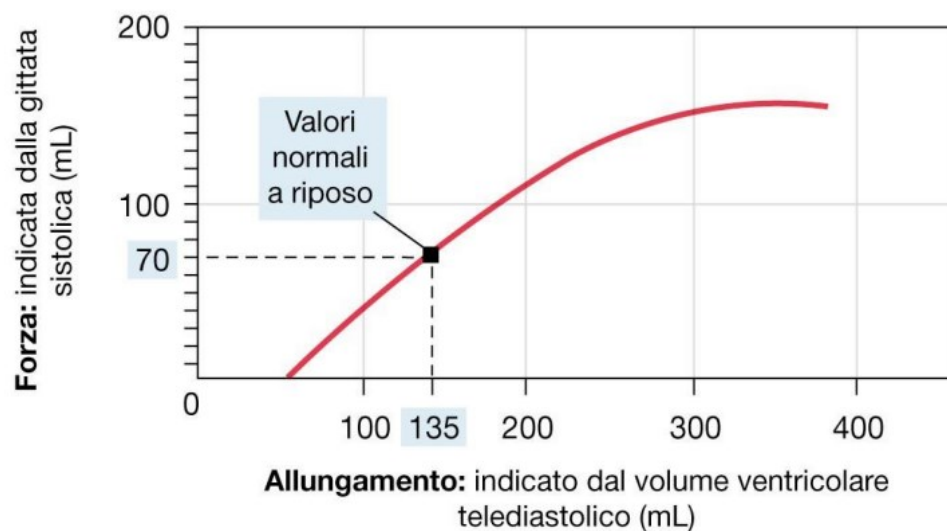


Fig.10: Relazione forza-lunghezza nel cuore: la curva di Starling.

3.1.3 La relazione forza - velocità

Nello studio della contrazione muscolare è importante comprendere la reazione del muscolo, in termini di velocità di contrazione, in presenza di un carico crescente. La relazione forza - velocità per il muscolo cardiaco è simile a quella del muscolo scheletrico, ad eccezione che la velocità massima di accorciamento per il muscolo cardiaco è più bassa a causa di un più lento processo di formazione dei ponti trasversali tra actina e miosina. La relazione forza-velocità per il tessuto scheletrico e cardiaco è di tipo iperbolico, la velocità di accorciamento è tanto maggiore quanto minore è il carico applicato. Come si può osservare in figura 11, la velocità di accorciamento è massima a carico nullo, mentre è nulla quando il carico raggiunge la massima forza isometrica F_0 . Per valori negativi di velocità si verifica la contrazione eccentrica e l'allungamento delle fibre, per valori positivi di velocità si ha invece l'accorciamento della fibra.

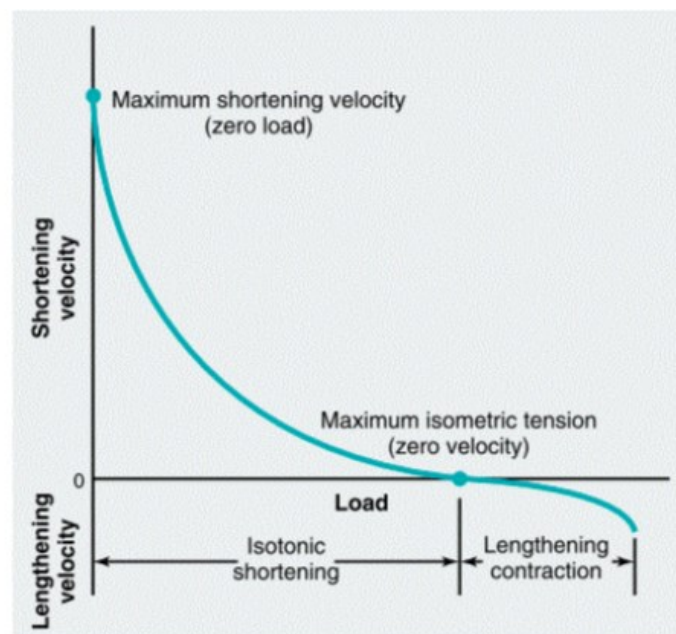


Fig.11: Grafico della velocità di accorciamento in funzione del carico applicato.

Il comportamento della fibra in fase di accorciamento è descritto dall'equazione di Hill:

$$(v + b)(F + a) = b(F_0 + a) = \text{cost}$$

dove:

- F forza generata dal muscolo
- v velocità di accorciamento
- F_0 massima forza isometrica
- a opposto dell'asintoto verticale dell'iperbole
- b opposto dell'asintoto orizzontale dell'iperbole

La relazione iperbolica tra forza sviluppata e velocità è valida anche per il muscolo cardiaco ma la massima velocità di accorciamento è più bassa in accordo con una velocità più bassa dei cicli dei ponti trasversali.

3.2 Modello costitutivo per i cardiomiociti

La modellazione costitutiva dei tessuti biologici è uno dei temi centrali della ricerca biomeccanica. La comprensione delle proprietà meccaniche dei tessuti è infatti alla base dello studio di patologie al fine di migliorare la prevenzione e il trattamento. Uno modello strutturale continuo che incorpora le principali caratteristiche del tessuto può potenzialmente fornire il legame tra microstruttura e risposta meccanica macroscopica dei tessuti biologici e quindi fornire indicazioni sul binomio struttura-funzione.

Un modello costitutivo è un modello matematico che descrive il comportamento meccanico del materiale e traduce in termini matematici ciò che si osserva sperimentalmente. Il modello costitutivo da cui si è partiti per lo studio del comportamento meccanico delle fibre cardiache è quello descritto da Hill per il tessuto muscolare scheletrico e presentato in seguito [10].

3.2.1 Il modello di Hill per il muscolo scheletrico

Per fornire un'interpretazione adeguata ai fenomeni meccanici che caratterizzano il tessuto muscolare scheletrico sono stati proposti diversi modelli, il più diffuso è il modello di Hill a tre elementi. Per descrivere il funzionamento del muscolo Hill ipotizzò che questo possa essere rappresentato da un modello costituito da tre elementi e rappresentato in figura 12.

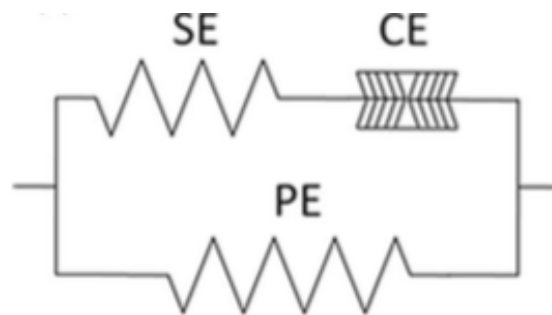


Fig.12: Il modello di Hill a tre elementi.

Sono disposti in serie un elemento contrattile CE rappresentato da un generatore di forza istantaneo che presenta rigidità nulla quando è a riposo e produce una forza contrattile quando è attivo e un elemento elastico SE. In parallelo a questo ramo è quindi posto un elemento elastico PE.

- L'Elemento Contrattile

L'elemento CE, rappresenta la tensione attiva del sistema, generata dal muscolo in risposta agli impulsi nervosi. La forza prodotta può variare a seconda della lunghezza del muscolo e della velocità del movimento. L'elemento contrattile modella quindi la tensione attiva generata da parte dei ponti trasversali di actina e miosina.

- L'Elemento Elastico in Serie

Assieme all'azione contrattile delle miofibrille è presente una componente muscolare rappresentata da strutture elastiche. Questa componente è identificata nelle fibre di elastina che compongono la matrice extracellulare e può essere suddivisa in strutture elastiche in serie e in parallelo: le strutture elastiche in serie, hanno funzione di ammortizzare le sollecitazioni prodotte da stiramenti e contrazioni e quindi possono essere considerate come l'equivalente di una molla.

- L'Elemento Elastico Parallelo

L'elemento elastico parallelo identifica il comportamento delle fibre passive in funzione dell'allungamento muscolare e descrive quindi il comportamento non lineare del muscolo scheletrico.

Per quanto riguarda la caratterizzazione delle deformazioni degli elementi, con riferimento alla figura è conveniente definire le seguenti dimensioni:

- L_{SE} lunghezza dell'elemento SE;
- L_{CE} lunghezza dell'elemento CE ed il loro rapporto è definito da $k = \frac{L_{SE}}{L_{CE}}$;
- l_{CE} e l_{SE} sono i valori di allungamento degli elementi CE e SE rispettivamente;
- L_{PE} e l_p sono la lunghezza e l'allungamento dell'elemento PE.

In ogni istante, le lunghezze dei due rami devono essere uguali quindi deve valere che:

$$L_{PE} = L_{CE} + L_{SE}$$

In termini di dilatazioni avremo quindi:

- dilatazione dell'elemento CE $\lambda_m = \frac{l_{CE}}{L_{CE}}$;
- dilatazione dell'elemento SE $\lambda_s = \frac{l_{SE}}{L_{SE}}$;
- dilatazione dell'elemento PE $\lambda_f = \frac{l_{PE}}{L_{PE}}$.

3.2.2 Il modello costitutivo muscolo scheletrico

Il modello costitutivo per il tessuto muscolare scheletrico consiste nella definizione del comportamento meccanico del modello di Hill precedentemente descritto. Poiché gli elementi CE e SE sono disposti in serie, la caduta di tensione sugli elementi deve essere la stessa, per cui deve valere che $P_{SE} = P_{CE}$.

L'elemento PE è responsabile dell'elasticità passiva, indicando con P_0 la massima tensione isometrica della fibra, la risposta allo stress dell'elemento PE è data dall'equazione:

$$P_{PE} = \begin{cases} 4P_0(\lambda_f - 1)^2 & \lambda_f \geq 0 \\ 0 & \lambda_f \leq 0 \end{cases}$$

La risposta in tensione dell'elemento contrattile CE è invece descritta dalla seguente equazione:

$$P_{CE} = P_0 f_a(t) f_l(\lambda_m) f_v(\dot{\lambda}_m)$$

dove:

- P_0 è la massima tensione isometrica
- $f_a(t)$ è la funzione di attivazione delle fibre nel tempo
- $f_l(\lambda_m)$ è la funzione forza-lunghezza
- $f_v(\dot{\lambda}_m)$ è la funzione forza - velocità

La funzione di attivazione è caratterizzata da due funzioni esponenziali che rappresentano rispettivamente l'attivazione ed il rilassamento delle fibre ed ha la seguente espressione:

$$f_a(t) = \begin{cases} a_0 & t \leq t_0 \\ a_0 + (a_1 - a_0) \times h_t(t, t_0), & t_0 \leq t \leq t_1 \\ a_0 + (a_1 - a_0) \times h_t(t, t_0) \times [1 - h_t(t, t_1)] & t_1 < t \end{cases}$$

dove t_0 e t_1 sono gli istanti iniziale e finale di attivazione e le costanti a_0 e a_1 sono poste rispettivamente a 0 e 1.

La funzione h_t è definita:

$$h_t(t, t_i) = 1 - \exp [-S(t - t_i)]$$

con S costante di tempo.

La funzione forza-lunghezza è definita:

$$f_l(\lambda_m) = \begin{cases} \frac{\lambda_m - \lambda_{min}}{\lambda_{opt} - \lambda_{min}} \times \exp \left[\frac{(2\lambda_{min} - \lambda_m - \lambda_{opt})(\lambda_m - \lambda_{opt})}{2(\lambda_{min} - \lambda_{opt})^2} \right] & \lambda_m > \lambda_{min} \\ 0 & \lambda_m \leq \lambda_{min} \end{cases}$$

con λ_{min} minima dilatazione della fibra e λ_{opt} dilatazione ottimale della fibra.

La funzione forza - velocità è definita:

$$f_v(\dot{\lambda}_m) = \begin{cases} \frac{1 - \frac{\dot{\lambda}_m}{\dot{\lambda}_{max}}}{1 + \frac{k_c \dot{\lambda}_m}{\dot{\lambda}_{max}}} & \dot{\lambda}_{max} < \dot{\lambda}_m < 0 \\ 0 & \dot{\lambda}_m \leq \dot{\lambda}_{max} \end{cases}$$

con $\dot{\lambda}_m$ velocità di deformazione e $\dot{\lambda}_{max}$ massima velocità di deformazione dell'elemento CE. Il parametro k_c è legato alla tipologia di fibra muscolare, a seconda che sia una fibra veloce o una fibra lenta.

Infine, il valore di tensione dell'elemento elastico serie SE è dato da:

$$P_{SE} = \beta \{ \exp[\alpha(\lambda_f - 1)] - 1 \}$$

La deformazione della fibra è invece definita dalla seguente espressione:

$$\lambda_f = \sqrt{\tilde{\mathbf{C}} : (\mathbf{n}_0 \otimes \mathbf{n}_0)}$$

dove $\tilde{\mathbf{C}}$ è la componente iso-volumetrica del tensore destro delle deformazioni di Cauchy-Green che è definito $\tilde{\mathbf{C}} = J^{-2/3} \mathbf{F}^T \mathbf{F}$ con $\mathbf{F}$ gradiente di deformazione, $\mathbf{n}_0$ è il versore che rappresenta la direzione delle fibre nella configurazione indeformata e l'operatore $\otimes$ indica il prodotto tensoriale o prodotto diadico.

Il valore di tensione del tessuto muscolare è espresso dal tensore dello stress di Piola-Kirchhoff $\mathbf{P}$ definito come somma di una componente isotropa $\mathbf{P}_{iso}$ e una anisotropa $\mathbf{P}_{aniso}$:

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}_{iso} + \mathbf{P}_{aniso}$$

La componente anisotropa è definita come il contributo di un termine passivo $\mathbf{P}_{PE}$ ed uno attivo $\mathbf{P}_{SE}$:

$$\mathbf{P}_{aniso} = (P_{PE} + P_{SE}) \mathbf{F} \mathbf{n}_0 \otimes \mathbf{n}_0$$

La componente isotropa invece, è ricavata a partire dalla formulazione dell'energia di deformazione:

$$W_{iso} = \alpha_{m1} \exp[\alpha_{m2}(\tilde{I}_1 - 3)] + \frac{k_{mv}}{2} [J^2 - 1 - 2 \ln(J)]$$

dove α_{m1} e α_{m2} sono parametri costitutivi legati al comportamento delle fibre della matrice isotropa del tessuto. $\tilde{I}_1$ è il primo invariante del tensore $\tilde{\mathbf{C}}$ e definito come la traccia di tale matrice, k_{mv} rappresenta il modulo di rigidezza volumetrica e J è il determinante del tensore di deformazione $\mathbf{F}$.

3.2.3 Adattamento del modello alle fibre cardiache

Come descritto nel paragrafo 3.1, sono evidenti alcune differenze tra il comportamento meccanico delle fibre muscolari scheletriche e cardiache. Queste differenze si traducono anche nel modello costitutivo che quindi deve essere opportunamente adattato al comportamento meccanico presentato dalle fibre muscolari cardiache. Le principali differenze tra le due tipologie di fibre si registrano nelle funzioni caratteristiche di forza-lunghezza e nella funzione di attivazione.

La prima modifica apportata al modello costitutivo è relativa alla funzione di attivazione delle fibre. Per le fibre muscolari scheletriche la funzione di attivazione è rappresentata nel grafico in figura 13.

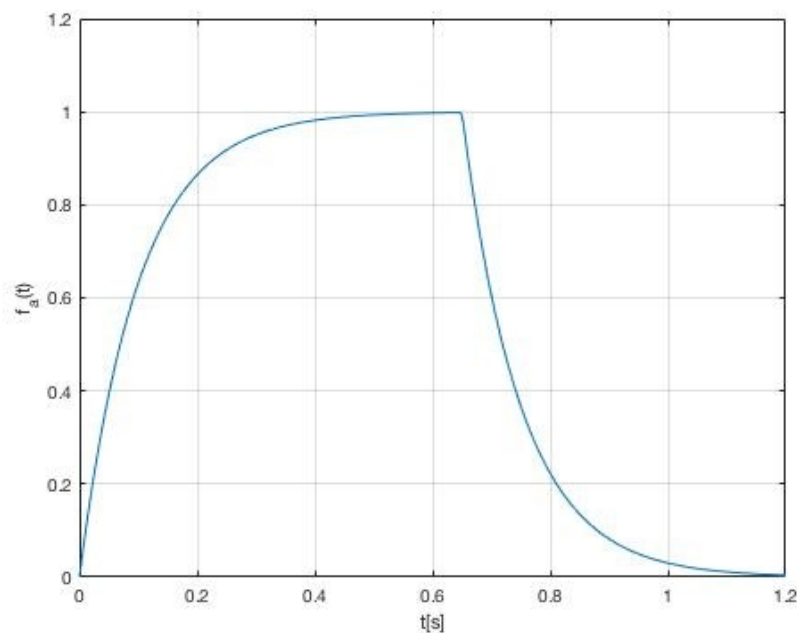


Fig.13: Funzione di attivazione delle fibre muscolari scheletriche

La funzione di attivazione dipende dal particolare protocollo sperimentale che si vuole simulare, nel nostro caso è caratterizzata da due funzioni esponenziali che rappresentano rispettivamente l'attivazione durante la contrazione e il decadimento durante il rilassamento.

Per adattare la funzione di attivazione alle fibre muscolari cardiache è posta particolare attenzione al modello computazionale proposto da Shim et al. nell'articolo [11]. Il modello proposto dagli autori è un modello costitutivo di tipo fenomenologico che tiene conto sia la deformazione passiva del tessuto, compreso il precarico, che il comportamento attivo dei cardiomiociti. A riposo le cellule muscolari cardiache sono soggette ad uno stato tensionale dovuto ad un carico imposto al miocita prima della sua contrazione e che è necessario a produrre l'allungamento della cellula durante la fase di sistole. Questa condizione è però trascurata nelle analisi realizzante in seguito poiché, ciò che è di interesse al nostro studio è la caratterizzazione della contrazione delle fibre a partire dalla loro lunghezza naturale. La formulazione del modello costitutivo proposto dagli autori prevede una funzione di attivazione delle fibre cardiache che ha la seguente equazione funzione del tempo t :

$$f_a(t) = \left(\frac{t}{\hat{T}}\right)^2 \exp\left[1 - \left(\frac{t}{\hat{T}}\right)^2\right]$$

il parametro $\hat{T}$ posto pari a 0.21 s indica l'istante di tempo in cui si registra il picco di attivazione della fibra e dopo il quale ha inizio la fase di rilassamento. In figura 14 è riportato il grafico della funzione di attivazione così definita. Questa funzione è quindi sostituita alla funzione di attivazione del modello computazionale descritto nel paragrafo 3.2.2 poiché interpreta in modo più raffinato il ciclo attivazione-rilassamento delle fibre muscolari cardiache.

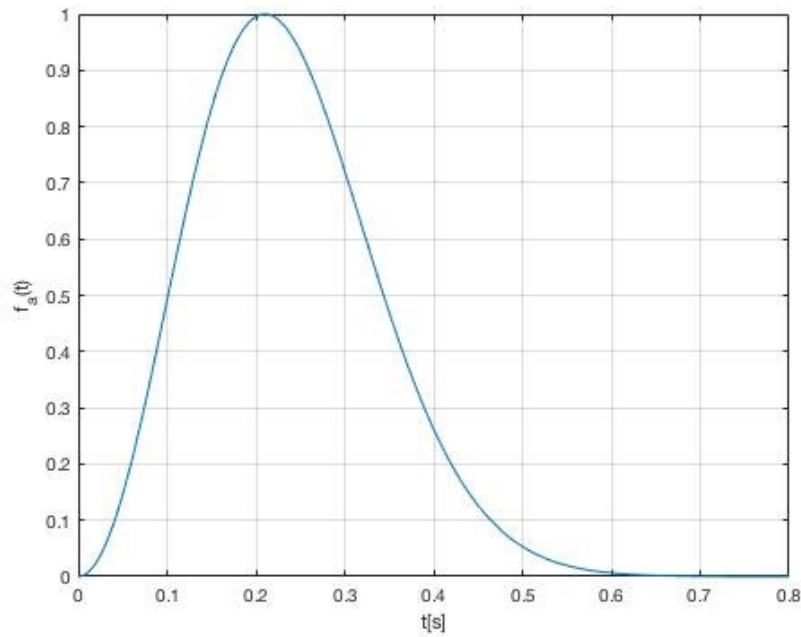


Fig.14: Funzione di attivazione modello costitutivo Shim et al. [11].

Per quanto concerne la funzione forza-lunghezza del modello costitutivo proposto dagli autori, questi tengono conto della presenza del precarico. I cardiomiociti, pertanto, prima dell'inizio della contrazione, sono in uno stato pre-stirato e contraggono a partire da una lunghezza iniziale maggiore della lunghezza a riposo. Questa condizione iniziale di pre-stretch, si traduce in una minore contrazione delle fibre.

Trascurando la presenza del precarico e la contrazione eccentrica del tessuto cardiaco, la funzione forza-lunghezza utilizzata nelle seguenti simulazioni è analoga a quella precedentemente descritta per le fibre muscolari scheletriche nel paragrafo 3.2.2 ed è ottenuta impostando i seguenti parametri per i cardiomiociti:

- Dilatazione ottimale del sarcomero rispetto alla lunghezza considerata

$$\lambda_{\text{opt}} = 0.9293$$

- Dilatazione minima del sarcomero rispetto alla lunghezza considerata

$$\lambda_{\text{min}} = 0.6993$$

I parametri sopra riportati sono ottenuti attraverso una procedura di ottimizzazione della curva forza-lunghezza descritta nel paragrafo 3.2.2 rispetto ai valori riportati dagli autori [11]. In figura 15 è riportato il grafico della funzione forza-lunghezza ottenuta e utilizzata nelle successive analisi.

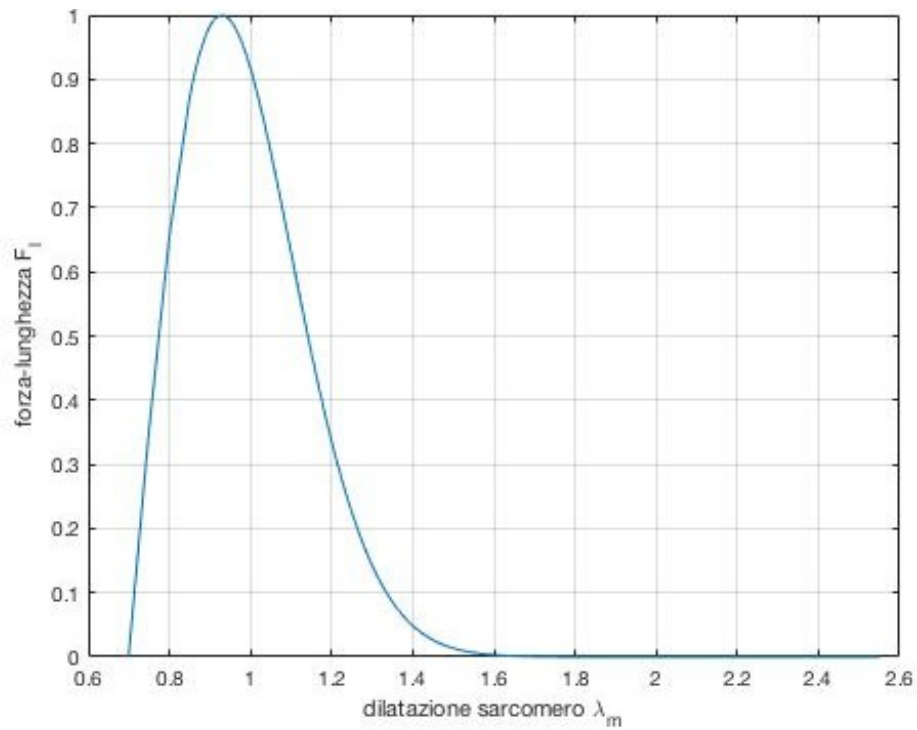


Fig.15: Funzione forza-lunghezza per i cardiomiociti.

3.3 Modello FEM e Simulazioni

Sperimentalmente lo studio del comportamento contrattile dei cardiomiociti è reso possibile, ad esempio, grazie all'utilizzo di materiali bio-ibridi contrattili ottenuti dalla cultura di cellule cardiache su substrati molto sottili di materiale elastomerico. Come descritto dagli autori [11], le cellule cardiache sono coltivate su un film sottile di PDMS opportunamente funzionalizzato con proteine della matrice extracellulare come la fibronectina. Il PDMS è un materiale polimerico ampiamente utilizzato per le sue ottime proprietà chimico-fisiche e di biocompatibilità. È inoltre molto utilizzato nello studio delle interazioni cellule-substrato in quanto capace di modificare le sue proprietà meccaniche e adeguarsi alle caratteristiche dell'ambiente fisiologico. Le cellule cardiache dissociate sono seminate sul PDMS e legandosi alla fibronectina si auto-organizzano in un monostrato anisotropo (Fig.16).

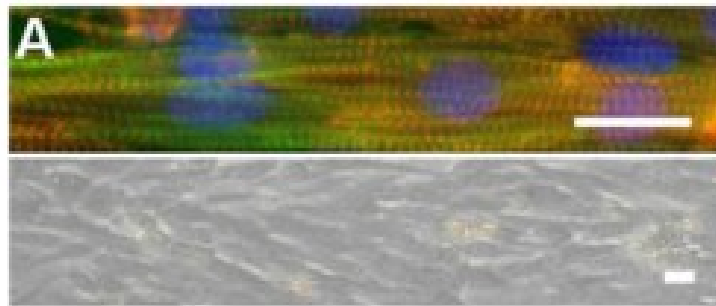


Fig.16: Allineamento cellulare: in alto si osserva l'allineamento dei sarcomeri e i nuclei delle cellule (in blu). Nell'immagine inferiore si osserva l'allineamento generale delle cellule sul tessuto. In entrambi i casi la lunghezza delle barre di scala è di 20 μm [11].

Il film contrattile prodotto ha dimensioni 2 mm di larghezza, 4 mm di lunghezza e 4 μm di spessore ed è vincolato su un lato corto. Per registrare sperimentalmente la contrazione delle cellule cardiache, il film bio-ibrido è posto in una soluzione eccitante e stimolato elettricamente. I cardiomiociti contraendosi, costringendo il costrutto a deformarsi e adottare una conformazione caratterizzata da un parziale avvolgimento.

La cinematica di avvolgimento del costrutto è registrata attraverso telecamere ad alta velocità e grazie al supporto di uno stereomicroscopio (Fig.17).

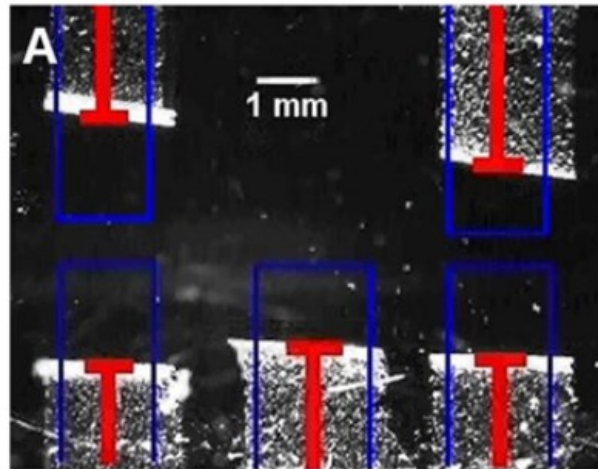


Fig.17: Immagine al microscopio ottico del comportamento contrattile del MTF (muscle thin film) con cellule allineate longitudinalmente. La linea blu determina la configurazione iniziale del foglietto completamente spiegato [11].

Queste procedure sperimentali sono molto difficili da realizzare e richiedono il supporto di tecnologie molto sofisticate a causa delle dimensioni microscopiche dei costrutti studiati. Pertanto, un supporto fondamentale a queste procedure di valutazione sempre più complesse è fornito dalla sperimentazione virtuale e dalla simulazione dei modelli in silico alla base dell'analisi computazionale. Inoltre, le analisi in silico sono necessarie per valutare alcune grandezze che, viceversa, risulterebbero non quantificabili. Il nuovo modello costitutivo per le fibre cardiache è quindi utilizzato per la simulazione del costrutto appena descritto, ed è implementato attraverso una specifica subroutine Fortran nel software Abaqus per l'analisi agli elementi finiti.

3.3.1 Geometria del Modello

Il primo passo, nella realizzazione di una simulazione numerica è la generazione della geometria dei componenti da analizzare. Nel modulo Parts del software Abaqus sono create due parti distinte rispettivamente relative allo strato cellulare e al materiale elastomerico al fine di ottenere il modello mostrato in figura 18.

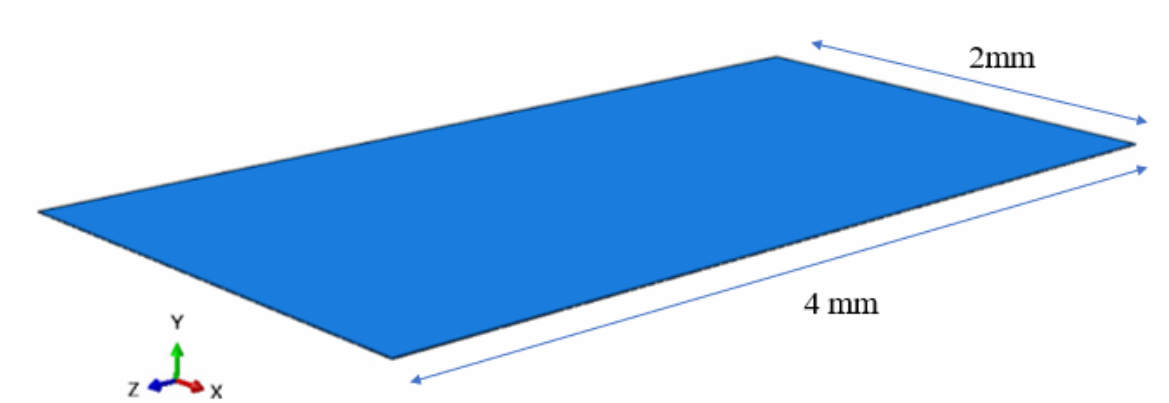


Fig.18: Geometria del foglietto costituito da due strati sovrapposti: substrato il PDMS e strato di cardiomiociti.



Fig.19: Sezione del foglietto e spessori dei due strati.

3.3.2 Definizione del Materiale

La fase successiva consiste nell'assegnare alla geometria le caratteristiche del materiale andando quindi a impostare i parametri relativi al modello costitutivo. I parametri relativi allo strato di cardiomiociti sono riassunti nella tabella seguente:

Modulo di rigidezza volumetrica della parte isotropa	$k_v = 0.38 \text{ MPa}$
Parametri della parte isotropa deviatorica esponenziale	$k_m = 0.051004 \text{ Mpa}$ $a_m = 4.21387$
Massima tensione isometrica	$P_0 = 0.02 \text{ Mpa}$
Parametri della funzione di attivazione	$S_{rate} = 10 \text{ s}^{-1}$ $n_0 = 0$ $n_1 = 1$ $t_0 = 0 \text{ s}$ $t_1 = 0.21 \text{ s}$
Dilatazione ottimale del sarcomero	$l_{opt} = 0.994$
Dilatazione minima del sarcomero	$l_{min} = 0.48$
Minima velocità di accorciamento del sarcomero	$dl_{fibmin} = -1.43362 \text{ L}_0\text{s}^{-1}$
Parametri della curva forza- velocità	$d = 4.63574$ $k_c = 2$ $k_e = 2.8465$
Parametri elemento passivo ramo CE-SE	$\beta = 0.1 \text{ MPa}$
	$\alpha = 0.3$
Componenti del vettore direzione C	$C_1 = 0$
	$C_2 = 0$
	$C_3 = 1$

La disposizione delle fibre sullo strato di PDMS è determinata dalla direzione del vettore $\mathbf{C}$ in figura 20. Le componenti del vettore $\mathbf{C}$ sono i coseni direttori del vettore e φ è l'angolo che il vettore $\mathbf{C}$ forma con l'asse z del sistema di riferimento xyz . Il vettore $\mathbf{C}$ ha quindi componenti $\mathbf{C} = [\cos(\pi/2 - \varphi) \ 0 \ \cos\varphi]$.

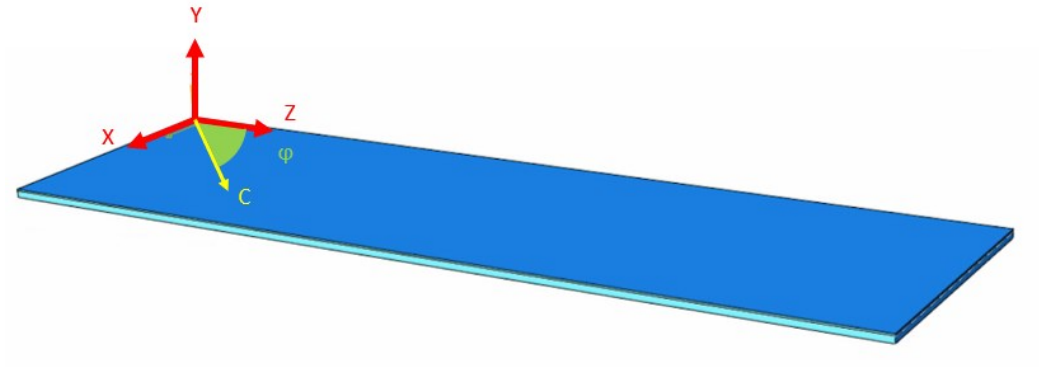


Fig.20: Vettore $\mathbf{C}$ di direzione delle fibre.

Il materiale utilizzato come scaffold per il supporto cellulare è il polidimetilsilossano (PDMS). È un materiale elastomerico che evidenzia un comportamento quasi lineare in un ampio intervallo deformativo, pertanto, il modello costitutivo utilizzato per descrivere il comportamento meccanico del PDMS è il modello Neo-Hookeano quasi-incomprimibile descritto dalla seguente equazione dell'energia di deformazione:

$$W = C_{10}(\tilde{I}_1 - 3) + \frac{1}{D_1}(J - 1)^2$$

dove C_{10} , D_1 sono parametri del materiale, I_1 è l'invariante primo deviatorico, J è lo Jacobiano di deformazione. I parametri C_{10} e D_1 sono determinati dalle seguenti relazioni:

- modulo di taglio

$$\mu = 2C_{10} = \frac{E}{2(1 + \nu)}$$

- modulo di rigidità volumetrica

$$k = \frac{2}{D_1}$$

dove E è il modulo di Young e ν è il coefficiente di Poisson.

3.3.4 Modulo Mesh

Per quanto riguarda la scelta degli elementi finiti della mesh, sono utilizzati elementi esaedrici lineari, a formulazione ibrida. La scelta è stata fatta in base alle assunzioni del modello che presenta una semplice geometria tridimensionale. La dimensione degli elementi è diversa per i singoli strati: per lo strato cellulare sono usati elementi esaedrici di altezza $4\text{ }\mu\text{m}$, larghezza $10\text{ }\mu\text{m}$ e profondità $10\text{ }\mu\text{m}$. Lo strato cellulare è quindi discretizzato con 80'000 elementi. Per lo strato realizzato in PDMS sono usati elementi esaedrici di altezza $14.5\text{ }\mu\text{m}$, larghezza $20\text{ }\mu\text{m}$ e profondità $20\text{ }\mu\text{m}$. Il PDMS è quindi partizionato con 20'000 elementi. Il modello discretizzato è rappresentato nella figura seguente è quindi discretizzato con 100'000 elementi esaedrici per un totale di 605'520 gradi di libertà.

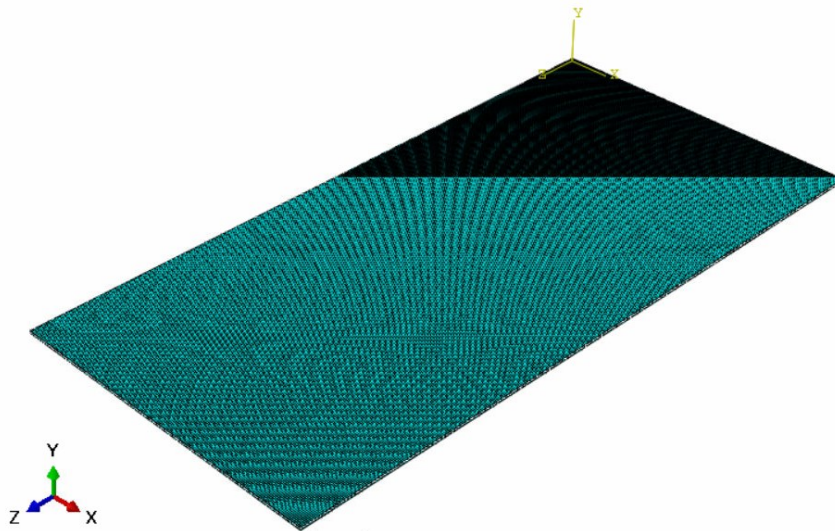


Fig.21: Foglietto meshato con 100'000 elementi finiti.

3.3.5 Condizioni al Contorno

Tra le superfici a contatto dei due materiali è imposto un constraint di tipo tie, questa tipologia di vincolo consente di separare due superfici in modo che non ci sia scorrimento relativo tra esse. Inoltre, permette di fondere due regioni anche se le relative mesh non sono congruenti garantendo quindi la continuità di spostamenti. È possibile scegliere se applicare il vincolo tra gli spigoli degli elementi finiti o tra le facce delle superfici a contatto, nel caso in esame è stata imposta un'interazione di tipo TIE tra le superfici a contatto dei due substrati.

Successivamente sono imposte le condizioni di vincolo nel modulo BCs: per poter osservare il cambio conformazionale del foglietto in seguito alla contrazione dei cardiomiociti, il foglietto è vincolato lungo una delle estremità (Fig.22). È quindi applicato il vincolo Displacement/Rotation in modo da impedire gli spostamenti lungo tutte le direzioni: $U_1 = U_2 = U_3 = 0$.

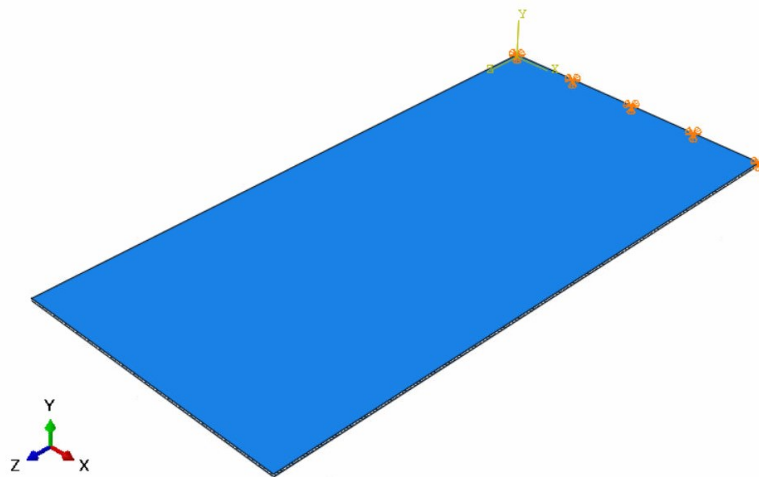


Fig.22: Foglietto vincolato lungo una estremità.

3.3.6 Analisi e Risultati

Nel modulo Steps è creata l'analisi di tipo Static/General. Per questo tipo di analisi Abaqus utilizza il metodo alla Newton-Raphson per risolvere le equazioni di equilibrio non lineari del problema. Le analisi svolte tengono conto della non linearità geometrica.

Inizialmente sono confrontati i risultati ottenuti da due diverse analisi che si differenziano unicamente per l'orientazione preferenziale delle fibre sul foglietto. Sono quindi analizzate le seguenti configurazioni:

1. Nel primo caso le fibre sono disposte con un angolo di 0 gradi rispetto all'asse z, il vettore $\mathbf{C}$ ha quindi componenti $\mathbf{C} = [0 \ 0 \ 1]$, come si osserva in figura 23.

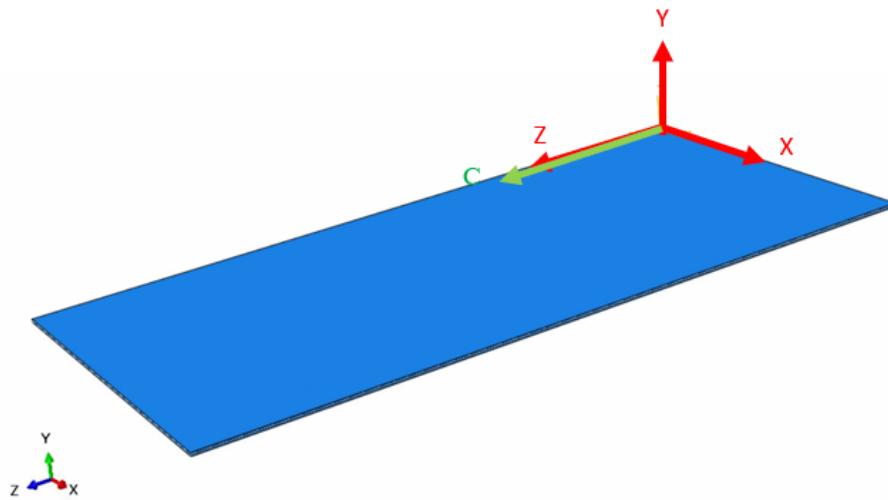


Fig.23: Vettore $\mathbf{C}$ di direzione prevalente delle fibre, $\mathbf{C}$ è parallelo all'asse z.

2. Nel secondo caso le fibre sono disposte con un angolo di 30 gradi rispetto all'asse z, il vettore ha quindi componenti $C = [0.5 \ 0 \ 0.866]$, come in figura 24.

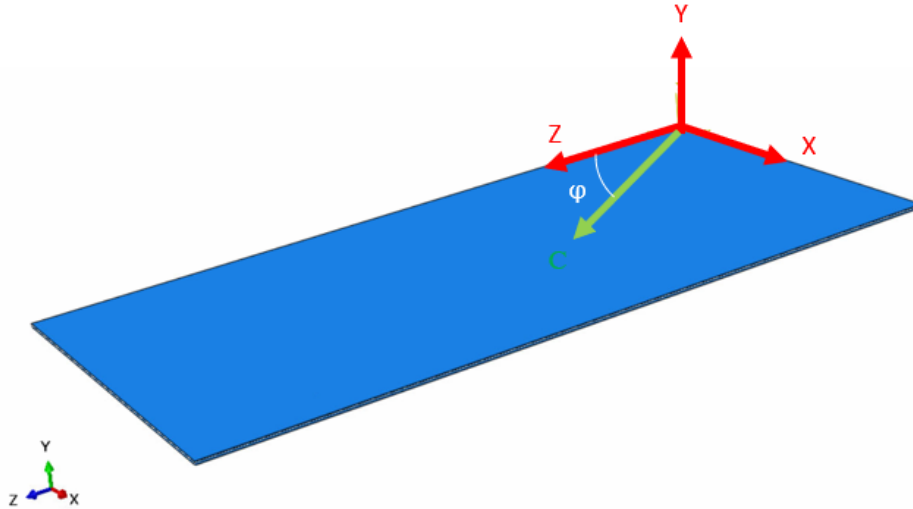


Fig.24: Vettore C di direzione prevalente delle fibre, C forma un angolo di 30 gradi con l'asse z. Le fibre sono disposte diagonalmente e parallele a C .

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che, analogamente a quanto accade a livello fisiologico durante la fase di sistole, le cellule cardiache contraggono e accorciandosi, inducono una deformazione del foglietto. La contrazione delle fibre ha inizio a partire dalla lunghezza ottimale, non sono quindi considerate le condizioni in cui le fibre sono prestirate e soggette a precarico.

A seconda della disposizione delle cellule lungo il foglietto, il modello assume una conformazione tridimensionale diversa. Nel modello in cui le fibre sono disposte nella direzione parallela all'asse maggiore del foglietto e quindi caratterizzate da un angolo di 0 gradi, la deformata flessionale del modello è rappresentata da un avvolgimento simmetrico e privo di traslazione orizzontale lungo x (Fig.25).

Nel secondo caso, la direzione principale delle fibre forma un angolo di 30 gradi con l'asse z. La deformata flessionale che si registra è caratterizzata da una traslazione orizzontale in x che si può osservare in figura 25.

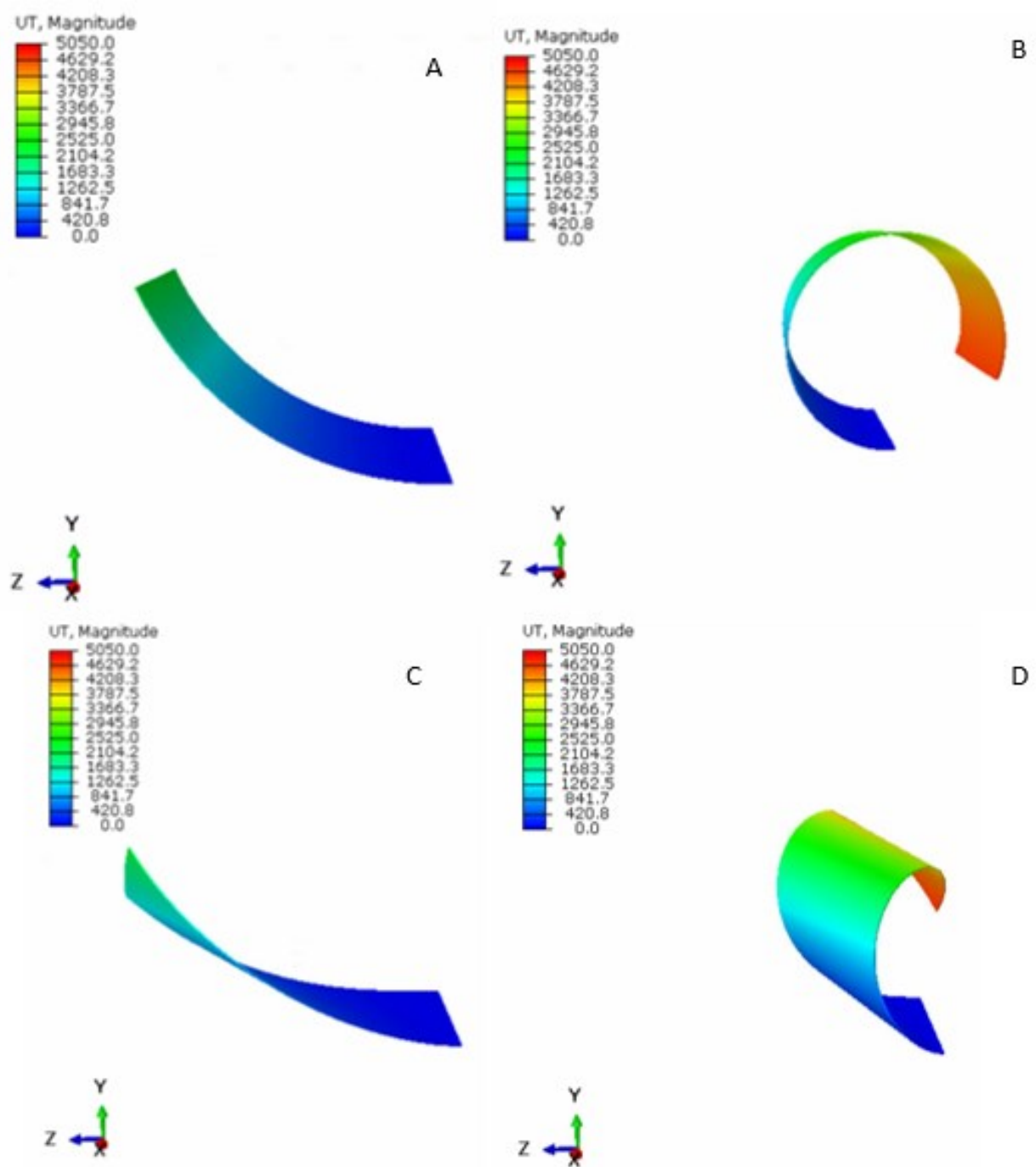


Fig.25: A-B Avvolgimento del foglietto con fibre parallele all'asse z. C-D Avvolgimento del foglietto con fibre a 30 gradi rispetto all'asse z.

Il risultato ottenuto computazionalmente cattura la risposta sperimentale del foglietto (Fig.26) il cui comportamento chemio-meccanico è molto complicato. Il modello costitutivo proposto è quindi capace di adattarsi a fenomeni piuttosto complessi e seguire simulazioni raffinate.

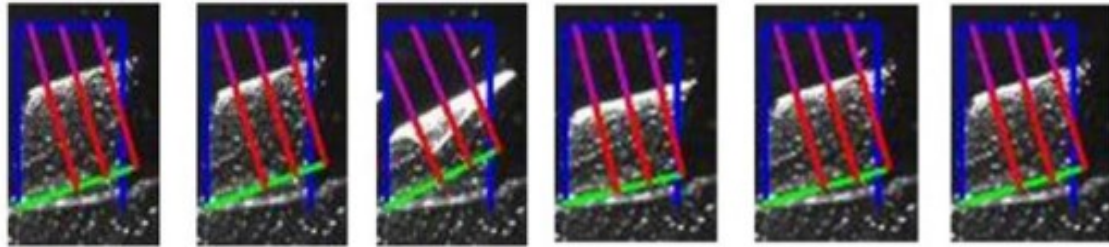


Fig.26: Avvolgimento ottenuto sperimentalmente del foglietto con fibre disposte in diagonale [11].

Ulteriore conferma della qualità dei risultati osservati si ottiene confrontando i risultati precedenti con quelli conseguiti dell'analisi in cui sono utilizzati i parametri di modello proposti da Shim et al. [11]. Rispetto ai parametri del modello precedente, sono modificati i valori relativi alla curva forza-lunghezza $\lambda_{\text{opt}} = 0.9293$ $\lambda_{\text{min}} = 0.6993$ che sono rispettivamente la dilatazione ottimale e la dilatazione minima del sarcomero rispetto alla lunghezza considerata.

In figura 27 sono riportate le funzioni forza-lunghezza per i due modelli a confronto. Come si osserva dal grafico, partendo dallo stato indeformato delle fibre posto uguale a 1, queste iniziano a contrarsi e raggiungono livelli di accorciamento diversi: modificando i parametri della curva forza-lunghezza si può osservare che le fibre sono soggette ad una deformazione meno marcata, si arriva infatti ad avere un accorciamento di circa 0.7 rispetto alla lunghezza iniziale della fibra.

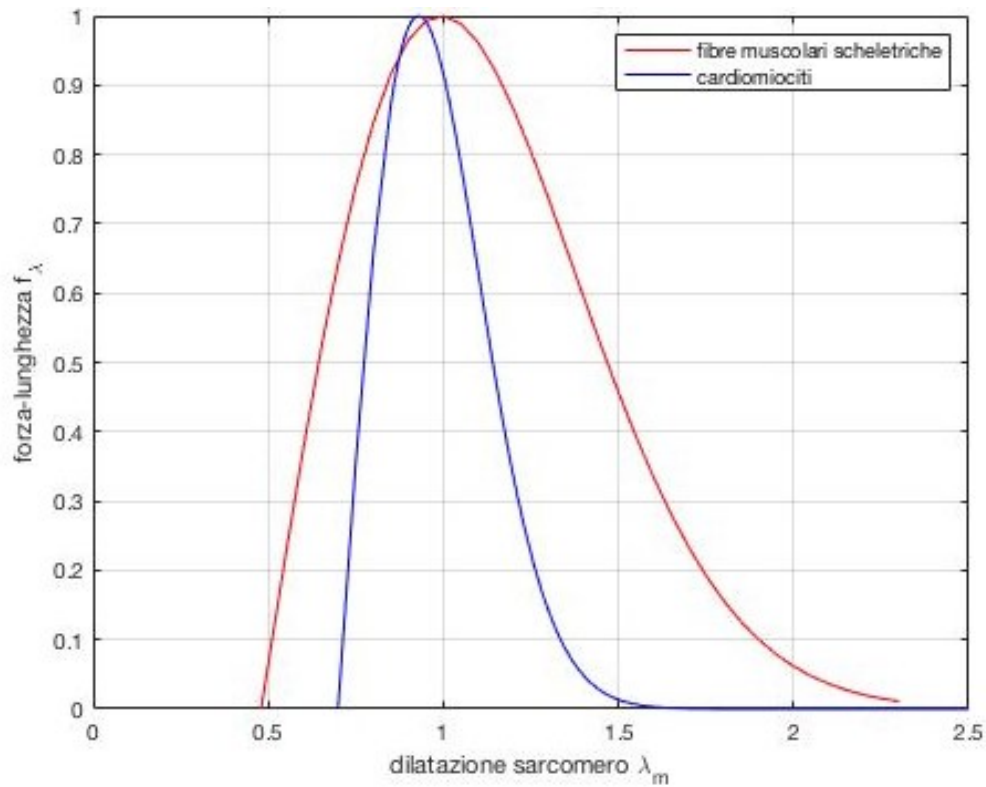


Fig.27: Curve forza-lunghezza a confronto

Dai risultati ottenuti si evidenzia che la deformata flessionale del foglietto ottenuto con il modello costitutivo così modificato risulta più modesto rispetto a quello ottenuto in precedenza e questo è coerente con le assunzioni fatte dagli autori [11]. Infatti, il modello costitutivo proposto dagli autori prevede che le fibre cardiache siano soggette ad uno stato tensionale passivo che le costringe ad una condizione di stiramento iniziale. Di conseguenza, il processo di contrazione non ha inizio a partire dalla lunghezza ottimale della fibra e quindi la contrazione che si sviluppa è minore. Questo si traduce quindi in un minore avvolgimento del foglietto osservabile in figura 28.

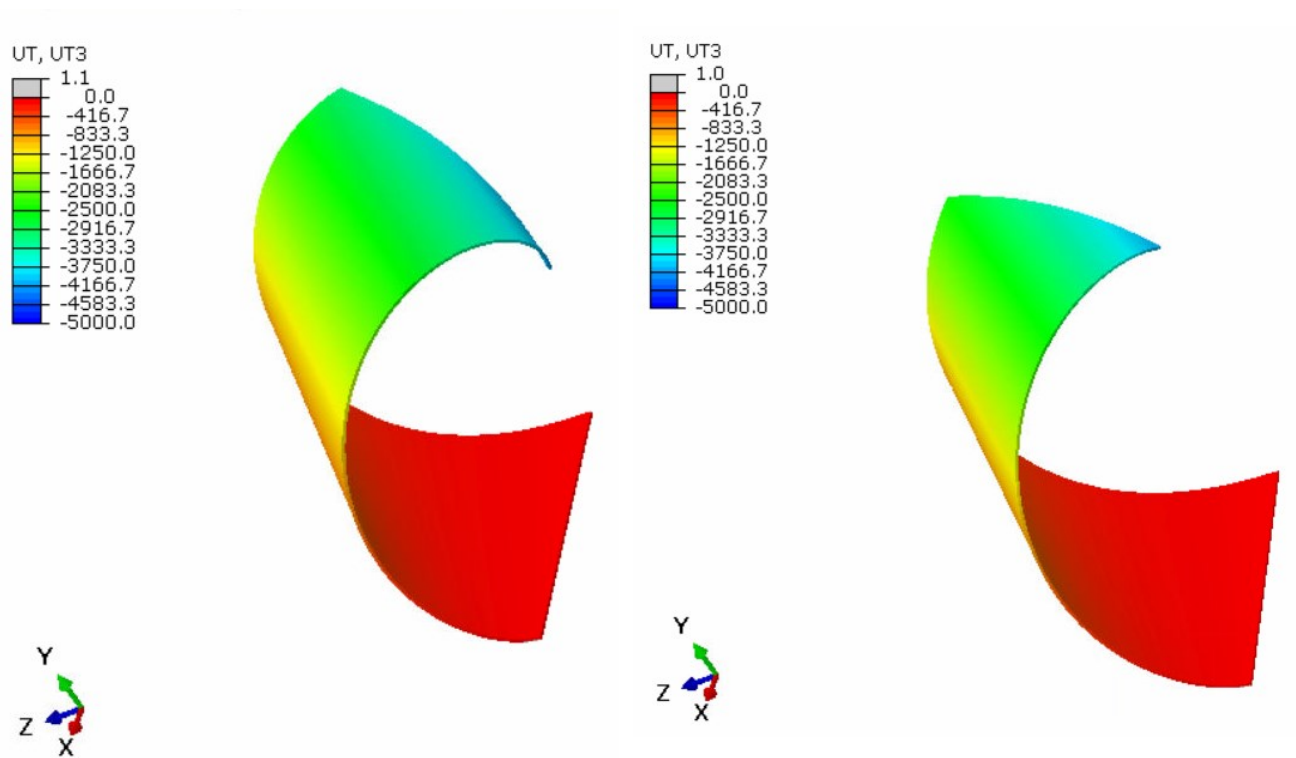


Fig.28: Modelli a confronto: a destra si osserva l'avvolgimento del foglietto ottenuto impostando i parametri ricavati dall'articolo Shim et al. [11]. Le immagini sono relative all'istante di massima deformazione. La scala dei valori è relativa agli spostamenti nodali in direzione z.

Capitolo 4

Modello costitutivo randomizzato con distribuzione Gaussiana

Il tessuto muscolare cardiaco è considerato un materiale anisotropo, è infatti caratterizzato da proprietà meccaniche e fisiche diverse a seconda della direzione in cui le si considera. L'anisotropia del materiale è strettamente correlata alla sua microstruttura, in particolare alla componente cellulare. Le fibre muscolari cardiache, infatti, non sono tutte orientate lungo la stessa direzione ma presentano direzioni casuali. Inoltre, le fibre muscolari sono generalmente differenziate in fibre lente e fibre veloci a seconda delle differenti proprietà metaboliche e contrattili. Le fibre a contrazione veloce sono caratterizzate da tempi di attivazione minori rispetto alle fibre lente, pertanto, anche la cinematica del processo di contrazione è differente per le due tipologie di fibre. Infine, le fibre muscolari cardiache non presentano tutte le stesse dimensioni in termini di lunghezza e di area della sezione trasversale e possono andare incontro a condizioni di ipertrofia. Poiché la massima tensione isometrica che una fibra muscolare può sviluppare dipende dalla sua lunghezza, si hanno diversi valori di tensione sviluppata dalle fibre in funzione della relativa dimensione.

Per tenere conto di questi importanti aspetti e affinare ulteriormente il modello costitutivo che descrive il comportamento meccanico dei cardiomiociti sono state introdotte alcune modifiche:

1. Il modello costitutivo è stato modificato in modo da attribuire in forma randomizzata la direzione assunta delle fibre sul foglietto. Essendo la direzione delle fibre determinata dai coseni direttori del vettore C , la randomizzazione è stata applicata all'angolo φ a livello dei punti di integrazione del modello. La distribuzione randomica utilizzata è di tipo gaussiano: in questo modo la maggior parte delle fibre ha direzione pari al valore medio della distribuzione mentre le restanti fibre risultano disperse sul foglietto seguendo deviazione standard.

2. Procedura analoga è stata applicata alla funzione di attivazione al fine di differenziare le fibre rispetto alla cinematica di contrazione. Il tempo di attivazione delle fibre è quindi attribuito in forma randomica ai punti di integrazione del modello. Seguendo una distribuzione di tipo normale, i punti di integrazione del modello hanno in prevalenza un tempo di attivazione medio t_1 e i restanti sono dispersi rispetto al valore medio seguendo la deviazione standard.
3. Anche per la massima tensione isometrica è applicata una distribuzione gaussiana randomizzata con un certo valore medio P_0 e deviazione standard. Anche in quest'ultimo caso l'attribuzione è fatta a livello dei punti di Gauss.

4.1 Geometria del modello e mesh

Per valutare gli effetti della randomizzazione del modello costitutivo è stato utilizzato un modello FEM semplificato. Le dimensioni della geometria sono analoghe a quelle descritte nel paragrafo 3.3.1, la discretizzazione è creata con un numero inferiore di elementi finiti. Il modello meshato è riportato in figura 29, sono utilizzati 750 elementi esaedrici di tipo lineare a deformazione ibrida per discretizzare lo strato cellulare e 3'000 elementi esaedrici per la mesh relativa al layer sintetico. Il modello così discretizzato ha 7'894 nodi per un totale di 23'682 gradi di libertà.

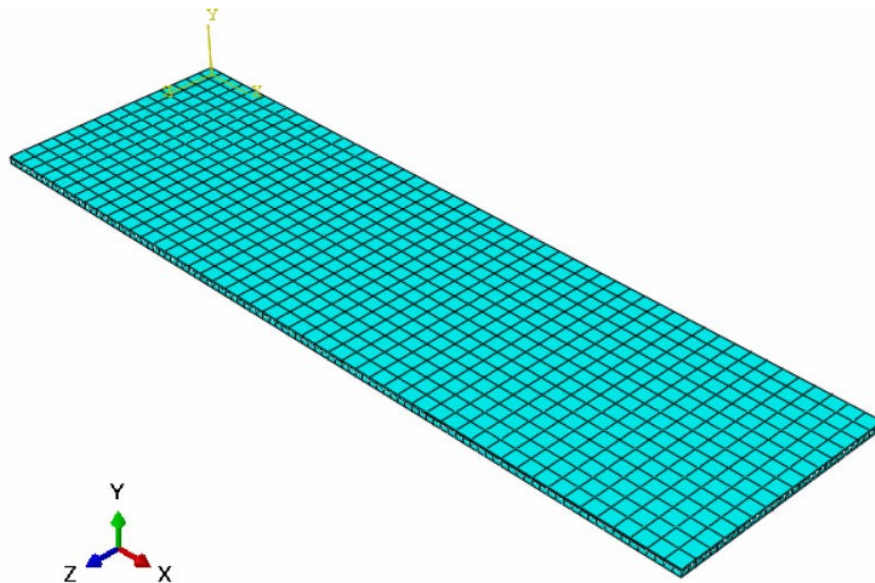


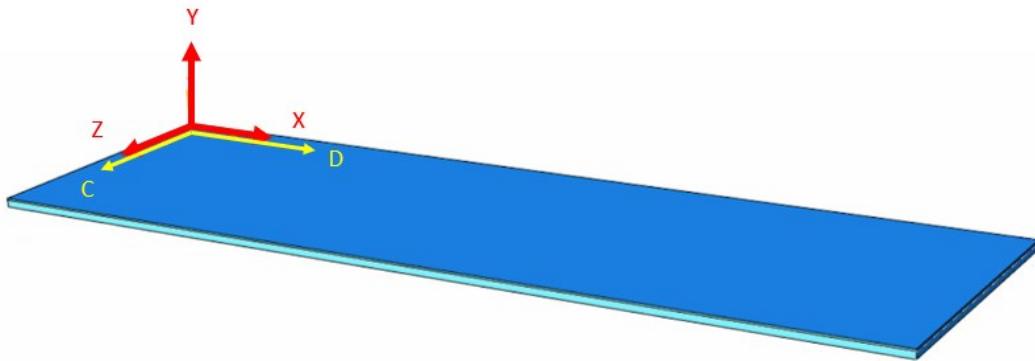
Fig:29: Modello discretizzato.

4.1.1 Definizione del materiale

I parametri del modello sono analoghi a quanto riportato nel paragrafo 3.3.2., sia per la componente cellulare che per lo strato di PDMS. Tuttavia, per il modello costitutivo randomizzato sono introdotti alcuni nuovi parametri.

- È introdotto un vettore **D** che definisce, assieme a **C**, il piano in cui le fibre sono disposte. Le fibre sono localmente planari e la direzione dominante è indicata dal vettore **C** come descritto in precedenza. Il vettore **D** e il vettore **C** sono tra loro perpendicolari.

Nelle analisi realizzate in seguito è posta come direzione prevalente delle fibre quella parallela all'asse *z* del sistema di riferimento. Il vettore **C** ha quindi componenti $\mathbf{C} = [0 \ 0 \ 1]$ e il vettore **D** ad esso perpendicolare ha componenti $\mathbf{D} = [1 \ 0 \ 0]$ (Fig.30).



*Fig.30: Orientazione delle fibre sul foglietto, le fibre sono disposte parallelamente al lato corto delle geometrie. La direzione è descritta dal vettore **C**. Il vettore **D** definisce il piano in cui sono arrangiate le fibre ed è perpendicolare al vettore **C**.*

- Sono introdotti tre parametri relativi alla deviazione standard della curva gaussiana utilizzata nella randomizzazione:
 - SD ϕ deviazione standard dell'angolo ϕ ;
 - SDP₀ deviazione standard per la massima tensione isometrica;
 - SDt₁ deviazione standard del tempo di attivazione.

4.1.2 Condizioni al contorno

Il foglietto è vincolato su un lato lungo come riportato in figura 31, è imposto un vincolo

Displacement/Rotation in modo da impedire gli spostamenti lungo tutte le direzioni:

$$U_1 = U_2 = U_3 = 0.$$

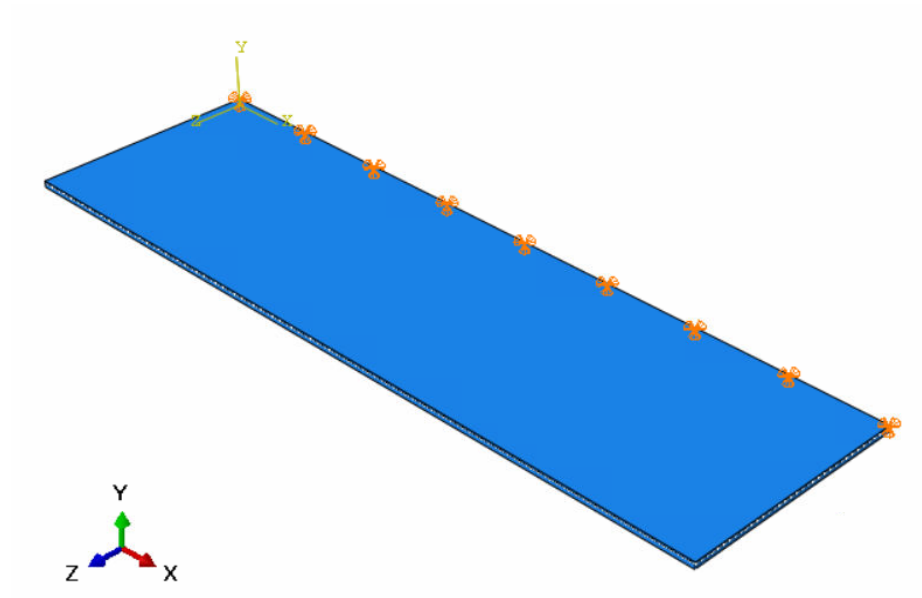


Fig.31: Foglietto vincolato lungo una estremità.

4.2 Randomizzazione dell'orientazione delle fibre

In prima analisi sono stati studiati gli effetti prodotti dalla randomizzazione dell'orientamento delle fibre sulle proprietà meccaniche di contrazione del foglietto. Sono quindi posti a zero i parametri di modello relativi alle deviazioni standard $SD\phi_0$ e $SD\phi_1$. Il valore medio dell'angolo ϕ utilizzato nella distribuzione gaussiana è pari a zero.

Sono quindi condotte tre diverse simulazioni:

1. Foglietto 1: ottenuto stabilendo un valore di deviazione standard $SD\phi = 0^\circ$. In questo modo le fibre sono tutte orientate lungo la stessa direzione preferenziale C senza alcuna dispersione
2. Foglietto 2: ottenuto impostando un valore di deviazione standard $SD\phi = 20^\circ$
3. Foglietto 3: è ottenuto impostando un valore di deviazione standard $SD\phi = 30^\circ$

In figura 32 è riportato l'istogramma delle direzioni delle fibre assegnate dal modello randomizzato ai punti di integrazione. È inoltre riportata la relativa curva gaussiana, i grafici in figura sono relativi al Foglietto 2 con $SD\phi = 20^\circ$.

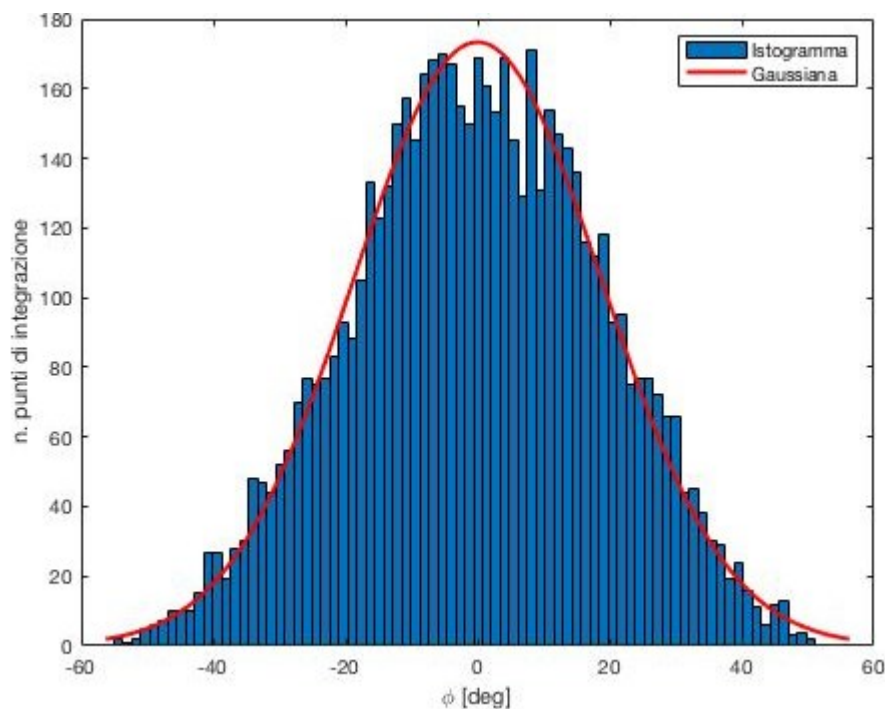


Fig.32: Istogramma e curva gaussiana delle direzioni attribuite ai punti di integrazione.

Sono inoltre confrontati gli istogrammi e le relative stime delle distribuzioni relative alle direzioni attribuite dal modello randomizzato ai punti di integrazione per i casi $SD\phi = 20^\circ$ e $SD\phi = 30^\circ$.

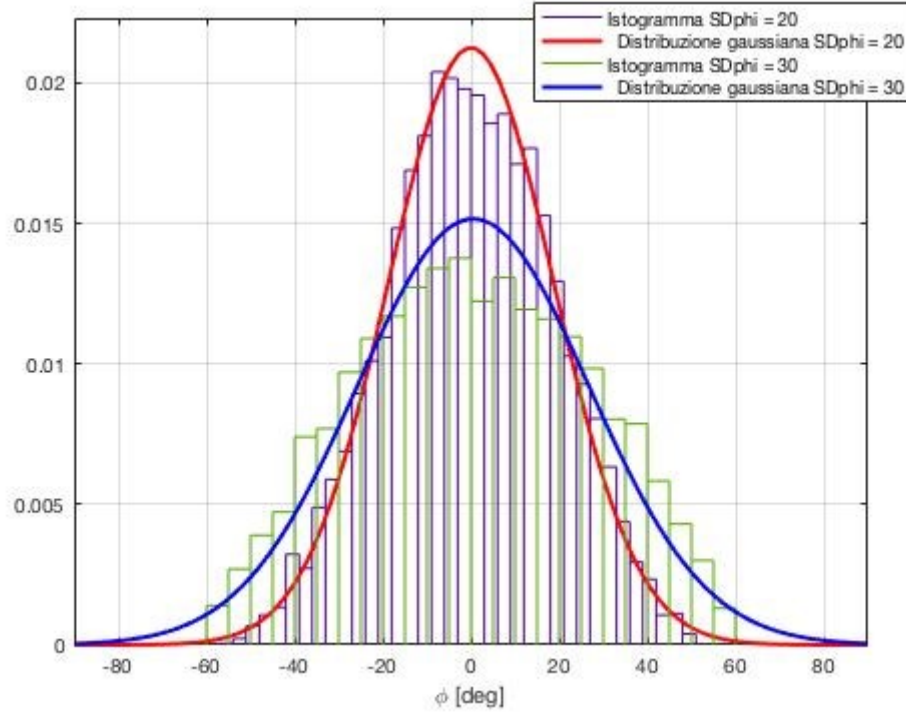


Fig.33: Istogrammi e curve gaussiane per i modelli con deviazione standard $SD\phi = 20^\circ$ e $SD\phi = 30^\circ$ a confronto.

4.2.1 Risultati

Dai risultati ottenuti dalle simulazioni precedenti è possibile osservare che all'aumentare della dispersione delle fibre sul foglietto, la deformata flessionale che ne consegue risulta essere meno accentuata. Come si osserva in figura 34 il foglietto che si deforma maggiormente è il Foglietto 1 in cui le fibre sono tutte disposte lungo la stessa direzione. Essendo concentrate lungo la direzione prevalente, la contrazione è più efficace e ne consegue un avvolgimento maggiore del foglietto. Aumentando la deviazione standard, aumenta la dispersione delle fibre che sono quindi maggiormente sparse in modo casuale lungo diverse direzioni e questo va ad inficiare sul processo di contrazione e quindi sulla deformata del modello.

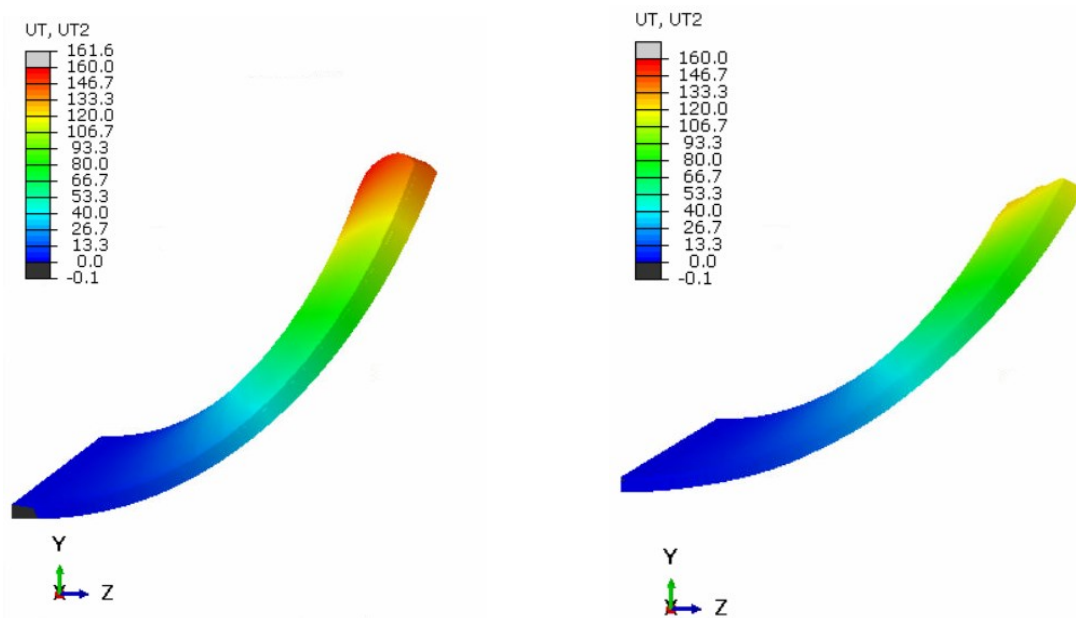


Fig.34: In figura sono riportati gli spostamenti nodali in direzione y per il foglietto 1 a sinistra e per il foglietto 3 a destra. È evidente una diminuzione di deformazione all'aumentare della dispersione delle fibre.

Inoltre, è stato osservato che ad una maggiore dispersione delle fibre corrisponde una maggiore tensione di contrazione. Questo risultato è stato verificato ricavando i grafici della tensione di contrazione riportati in figura 35 ed è coerente con quanto ci si aspetta dal comportamento meccanico delle fibre cardiache. Infatti, ad un minore avvolgimento del foglietto corrisponde un minore accorciamento delle fibre ed in accordo con la curva forza-lunghezza la tensione sviluppata è maggiore.

I grafici seguenti fanno riferimento alla tensione di contrazione media calcolata ai punti di integrazione dei modelli. Dai grafici riportati si può osservare che il maggiore incremento di tensione di contrazione si registra passando dal caso privo di dispersione al caso in cui la dispersione è legata ad una deviazione standard di 30 gradi. Infatti, nel caso in cui la deviazione standard è pari a 20 gradi, la tensione di contrazione risulta simile al caso privo di dispersione e le curve sono quindi sovrapposte.

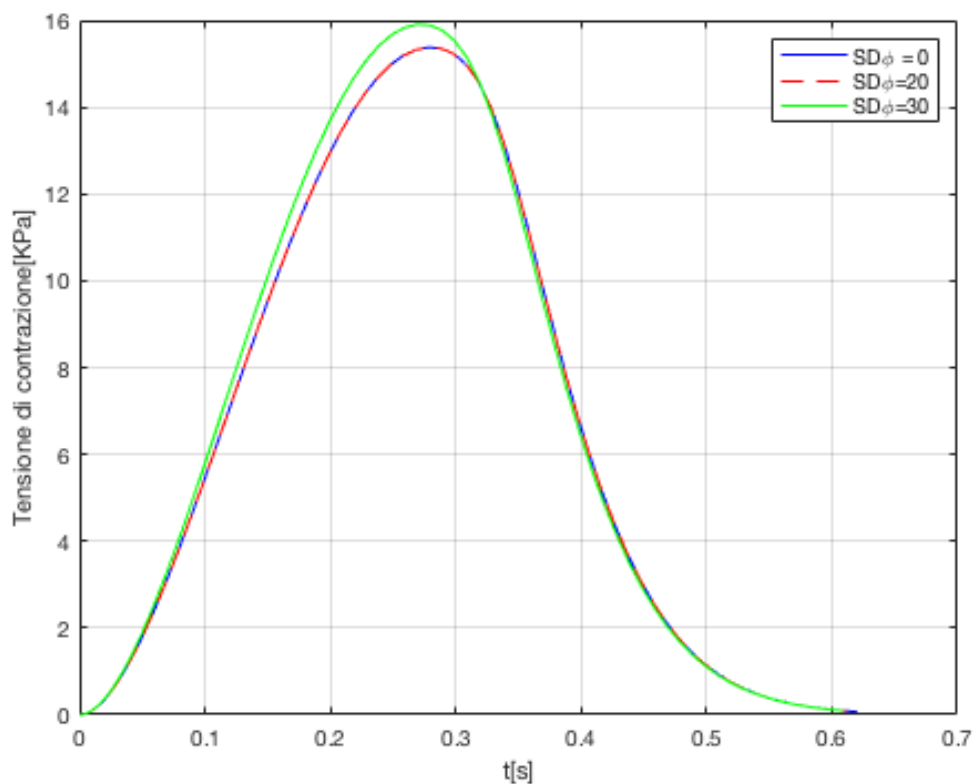


Fig.35: Tensione di contrazione media per i tre casi analizzati: la tensione di contrazione è maggiore in corrispondenza di una maggiore dispersione delle fibre.

4.3 Randomizzazione della funzione di attivazione

In seconda analisi sono studiati gli effetti prodotti dalla randomizzazione del modello applicata alla funzione di attivazione delle fibre. In questo caso sono posti a zero i parametri di modello relativi alle deviazioni standard SDP_0 e $SD\phi$. Il valore medio del tempo di attivazione delle fibre è posto pari a $t_1 = 0.21$ s. Sono confrontati i risultati ottenuti dai seguenti modelli:

1. Foglietto 1: per questo modello è posta una deviazione standard $SDt_1 = 0$ s. Essendo nulla la deviazione standard il modello attribuisce il valore medio t_1 a tutti i punti di integrazione e quindi non si registra alcuna dispersione dei tempi di attivazione delle fibre. Tutte le fibre contraggono seguendo la stessa cinematica di attivazione e raggiungono il picco di attivazione a 0.21 s.
2. Foglietto 2: è imposta una deviazione standard $SDt_1 = 0.006$ s. In questo caso i tempi di attivazione sono distribuiti in modo randomico seguendo la distribuzione gaussiana riportata in figura 36. L'attribuzione dei diversi tempi di attivazione è applicata ai punti di integrazione del modello FEM, pertanto i punti di integrazione hanno in maggior numero tempo di attivazione prossimo al valore medio della distribuzione gaussiana e i restanti punti hanno tempo di attivazione maggiore o minore in funzione della deviazione standard.

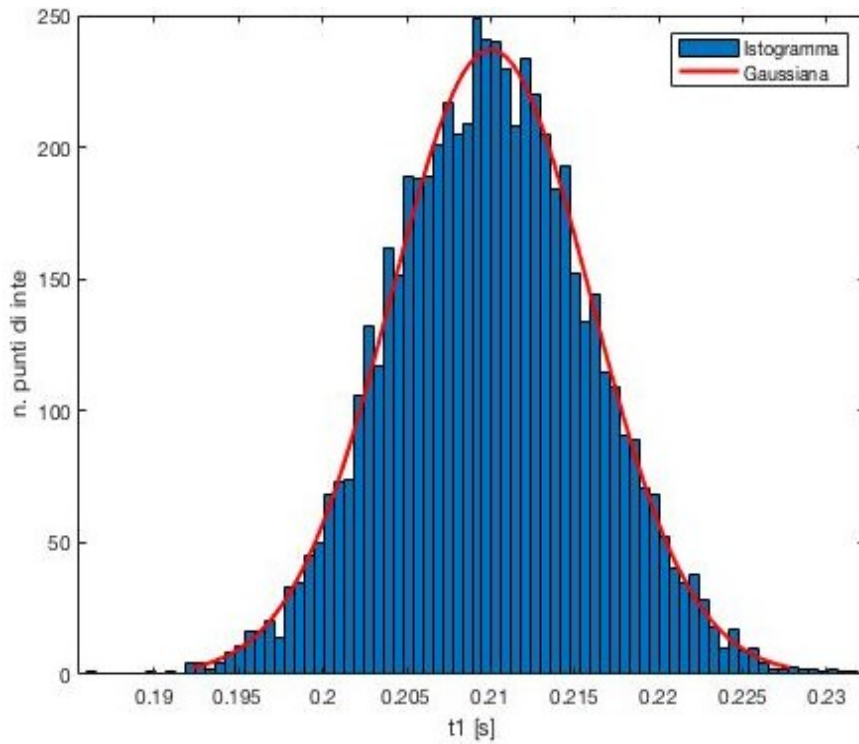


Fig.36: Distribuzione gaussiana dei tempi di attivazione ai punti di integrazione e relativo istogramma.

4.3.1 Risultati

Gli effetti prodotti dalla randomizzazione del modello costitutivo applicata ai tempi di attivazione delle fibre sono principalmente evidenti nella cinematica di avvolgimento del foglietto: in particolare si evidenzia che, nel caso in cui le fibre si attivano in modo asincrono, l'avvolgimento è ritardato e pertanto il foglietto inizia a deformarsi più lentamente. Al contrario, se le fibre sono sincronizzate allo stesso tempo di attivazione, la deformazione del foglietto avviene più velocemente.

Per quanto concerne la deformazione dei due modelli si può osservare che è analoga in entrambi i casi. Il Foglietto 2 è più lento ma raggiunge lo stesso stato deformativo. Il risultato è mostrato in figura 37 dove sono riportati gli spostamenti nodali in direzione y che rappresenta la direzione di maggiore deformazione del modello.

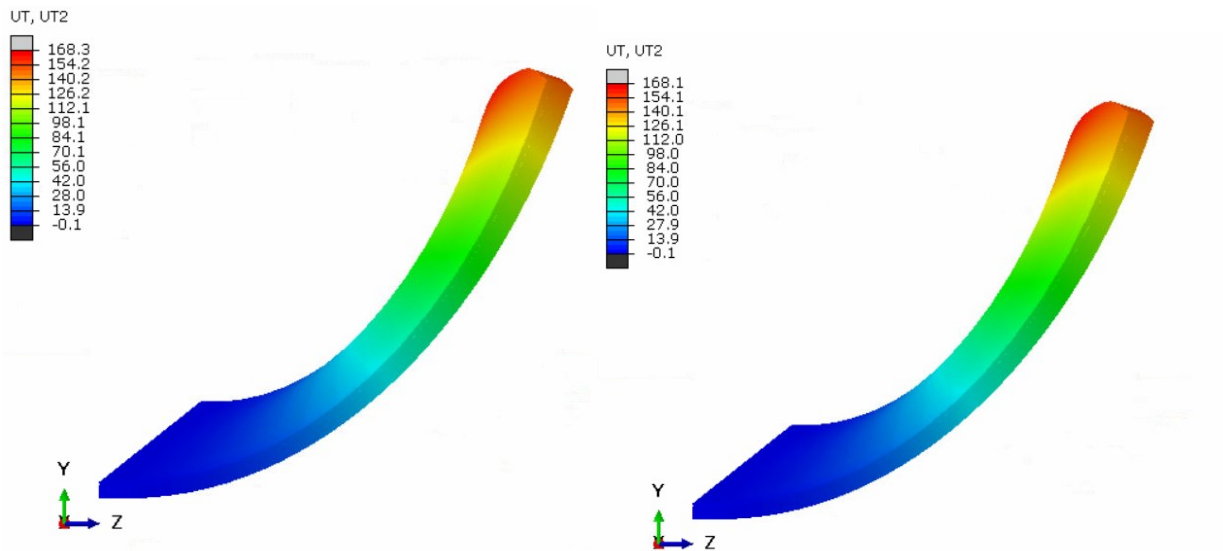


Fig.37: Spostamenti nodali in direzione y per i due foglietti a confronto: Foglietto 1 a sinistra, Foglietto 2 a destra

Questo risultato è confermato anche dal grafico relativo agli spostamenti nodali in direzione y riportato in figura 38. Gli spostamenti nodali non sono influenzati dalla dispersione dei tempi di attivazione, infatti, rimangono uguali all'aumentare della deviazione standard. Le curve riportate sono sovrapposte e quindi è possibile affermare che le deformazioni dei foglietti sono coincidenti. Per ulteriore convalida sono stati ricavati gli spostamenti nodali del modello ottenuto aumentando la deviazione standard a $SDt_1 = 0.0099$. Anche in questo caso la curva relativa agli spostamenti nodali risulta sovrapposta alle precedenti. Le curve fanno riferimento al ciclo contrazione-rilassamento delle fibre nell'intervallo di tempo riportato.

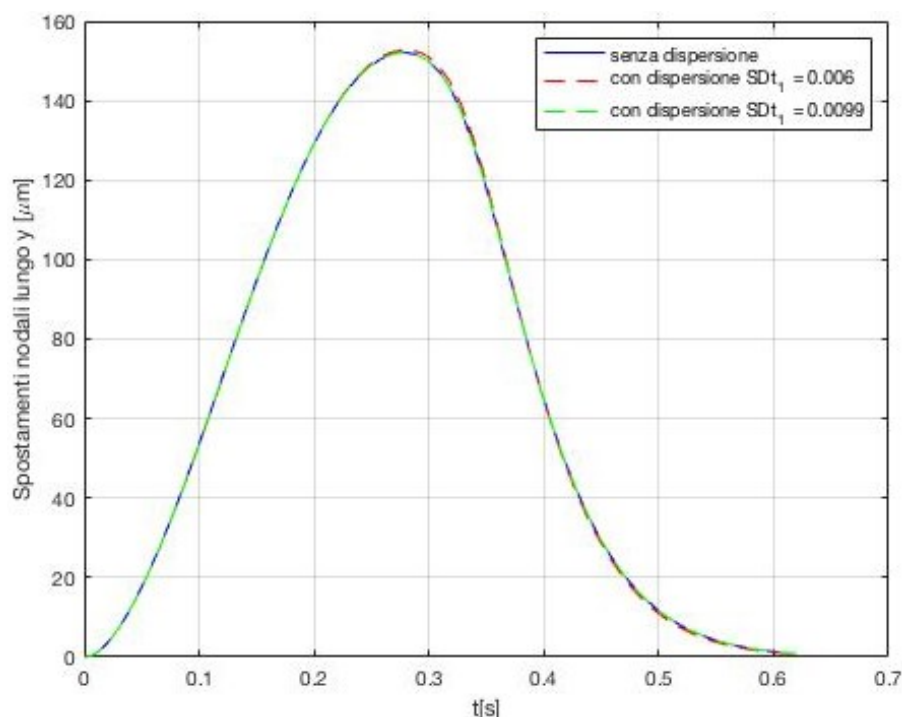


Fig.38: Grafici degli spostamenti nodali all'aumentare della dispersione sui tempi di attivazione delle fibre. Le curve riportate sono relative al ciclo contrazione-rilassamento delle fibre.

Anche la tensione di contrazione e la funzione forza-velocità non sono influenzate dalla dispersione dei tempi di attivazione. Questo risultato si può osservare ricavando i grafici delle funzioni riportati nelle figure 39-40. Le curve riportate sono relative ai valori medi delle funzioni calcolate ai punti di integrazione del modello, si può verificare che sono sovrapposte in entrambi i casi. Poiché i valori medi delle funzioni sono uguali sia nel caso privo di dispersione che nel caso con dispersione, è possibile concludere che la dispersione dei tempi di attivazione delle fibre non ha effetti sulle caratteristiche meccaniche in esame.

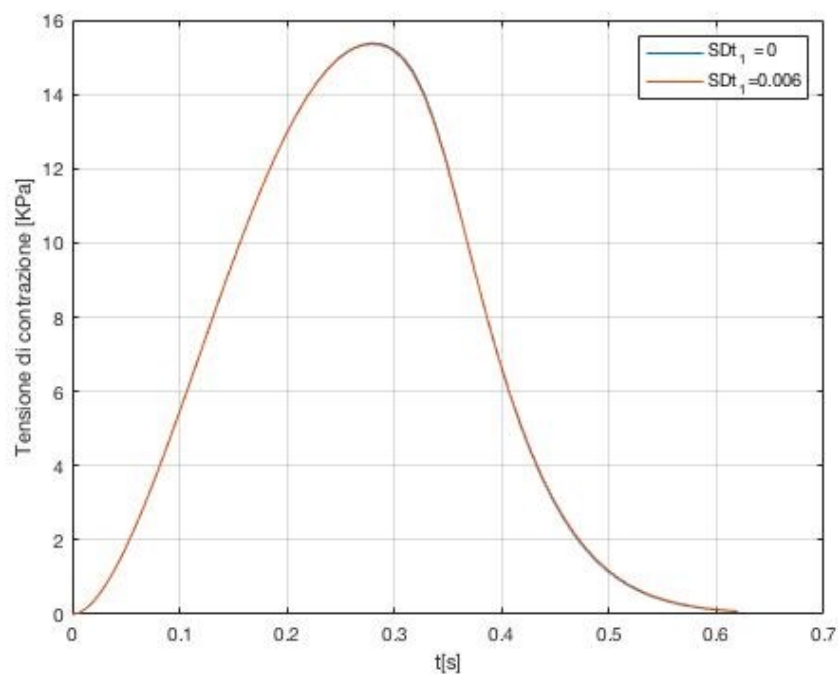


Fig.39: Grafico della tensione di contrazione sviluppata dalle fibre durante la deformazione del foglietto.
La tensione di contrazione sviluppata è la stessa a prescindere dalla condizione di attivazione delle fibre. Le curve fanno riferimento al ciclo contrazione-rilassamento delle fibre nell'intervallo di tempo riportato.

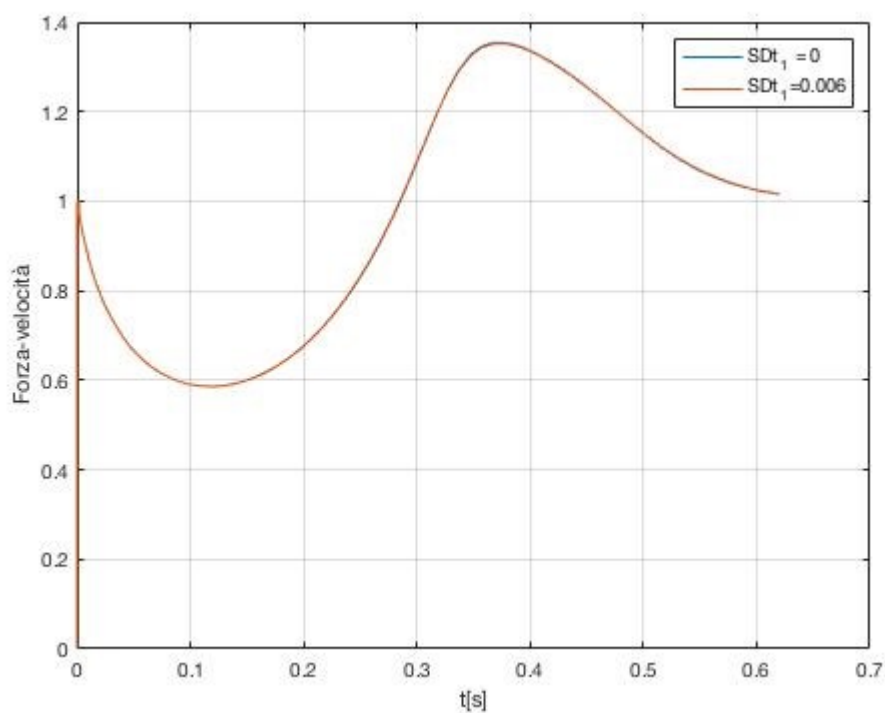


Fig.40: Grafico della funzione forza-velocità sviluppata dalle fibre durante la deformazione del foglietto.
Le curve fanno riferimento al ciclo contrazione-rilassamento delle fibre nell'intervallo di tempo riportato.

4.4 Randomizzazione della massima tensione isometrica

In ultima analisi sono stati studiati i risultati prodotti applicando la randomizzazione gaussiana alla massima tensione isometrica delle fibre cardiache. Sono quindi posti a zero i parametri relativi alle distribuzioni gaussiane dei tempi di attivazione e delle direzioni delle fibre $SDt_1 = 0s$ e $SD\varphi = 0^\circ$.

Sono scelti come valore medio della massima tensione isometrica $P_0 = 0.02$ MPa e una deviazione standard pari a $SDP_0 = 0.005$ MPa. La distribuzione gaussiana relativa alla massima tensione isometrica è applicata ai punti gauss del modello FEM, pertanto, la maggior parte dei punti di integrazione ha tensione isometrica pari al valore medio $P_0 = 0.02$ MPa mentre i restanti punti di integrazione hanno un valore maggiore o minore di P_0 in funzione della deviazione standard.

L'attribuzione della massima tensione isometrica che il modello assegna ai punti di integrazione è rappresentata nell'istogramma in figura 41, i parametri assegnati seguono la distribuzione gaussiana riportata nel grafico.

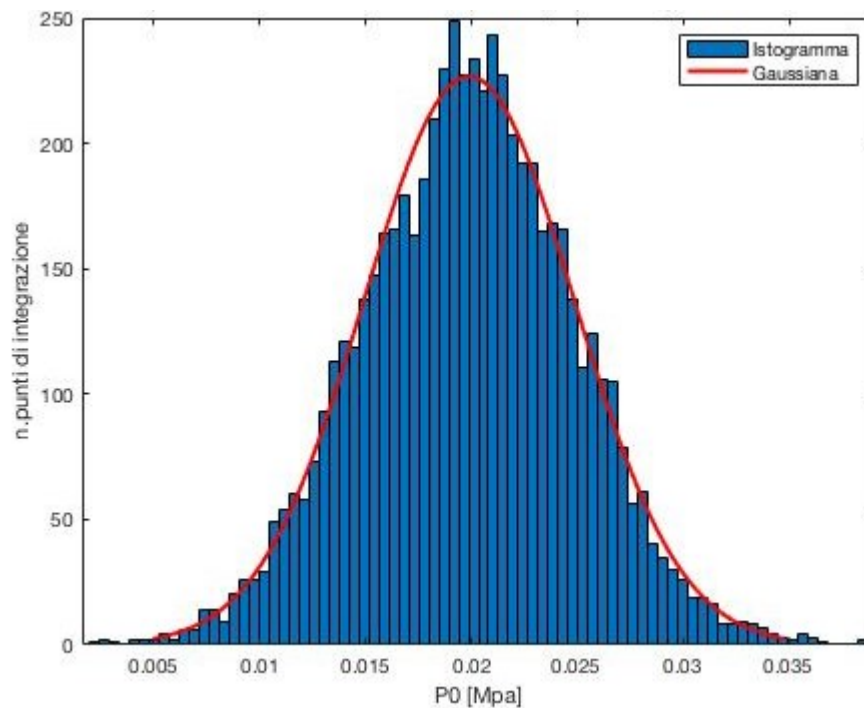


Fig. 41: istogramma e distribuzione gaussiana dei parametri assegnati dal modello ai punti di integrazione.

4.4.1 Risultati

Sono confrontati i risultati ottenuti da:

1. Foglietto 1 caratterizzato dai parametri $SD\phi = 0$, $SDt_1 = 0$, $SDP_0 = 0$. Il Foglietto 1 non è caratterizzato quindi da alcuna dispersione della massima tensione isometrica.
2. Foglietto 2 caratterizzato da una dispersione della massima tensione isometrica che segue una curva gaussiana di media $P_0 = 0.02$ MPa e deviazione standard $SDP_0 = 0.005$ Mpa.

Dal confronto tra le due analisi è stato osservato che la dispersione della massima tensione isometrica delle fibre cardiache ha effetti sulla deformazione del modello. Si registra infatti una minore deformazione nel Foglietto 2 rispetto al caso privo di dispersione. I risultati sono osservabili in figura 42 dove sono riportati gli spostamenti nodali in direzione y.

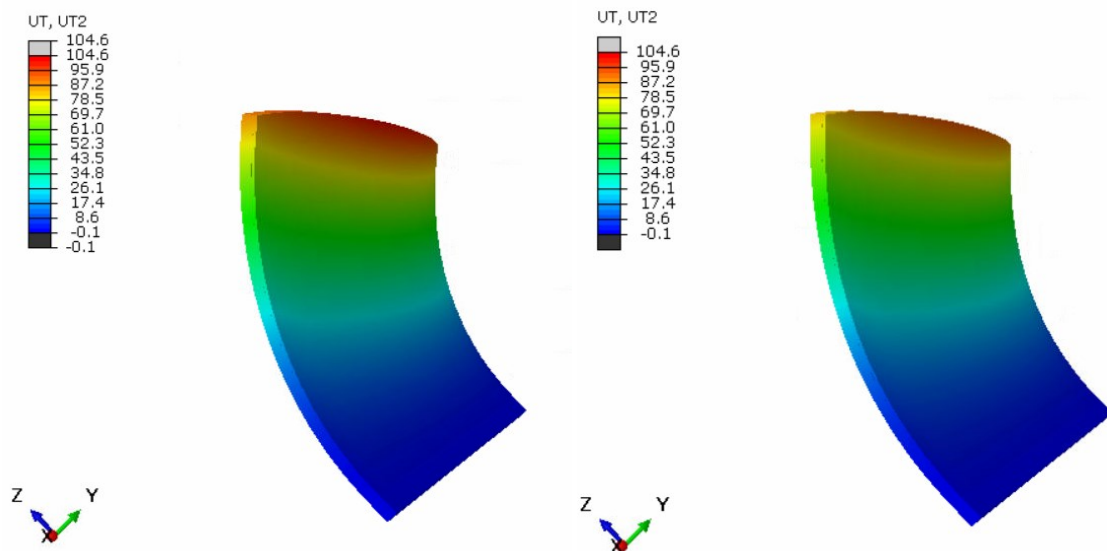


Fig.42: Deformata flessionale del foglietto: a destra il Foglietto2 a sinistra il Foglietto1. Si riportano gli spostamenti nodali in direzione y.

Il risultato è confermato dal grafico degli spostamenti nodali in figura 44. Gli spostamenti nodali riportati sono relativi a due punti corrispondenti nei due foglietti posizionati lungo l'estremità mobile. Sono graficati gli spostamenti che i nodi assumono nel tempo in direzione y. Come si osserva dal grafico, il foglietto che presenta uno spostamento nodale inferiore è quello caratterizzato dalla dispersione della massima tensione isometrica.

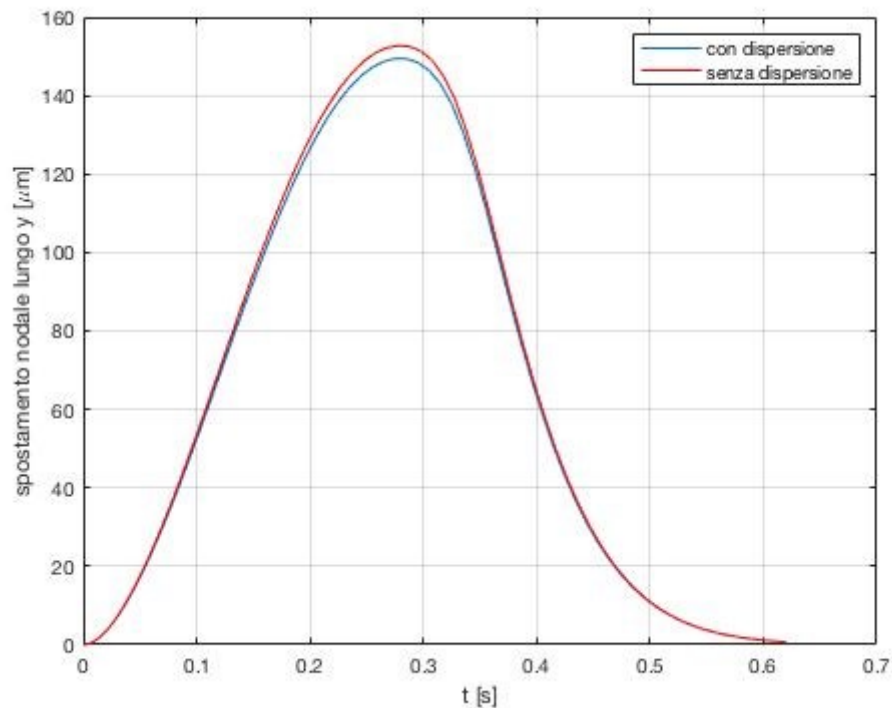


Fig.44: Grafico degli spostamenti nodali lungo y in funzione del tempo.

Come affermato in precedenza, una deformazione minore del foglietto corrisponde ad un minore accorciamento delle fibre cardiache durante la contrazione e questo si traduce in un aumento della tensione di contrazione sviluppata dalle fibre stesse. Questo risultato è osservabile confrontando i grafici della tensione di contrazione media nei due casi in esame: la tensione di contrazione delle fibre aumenta con la dispersione della massima tensione isometrica sviluppabile.

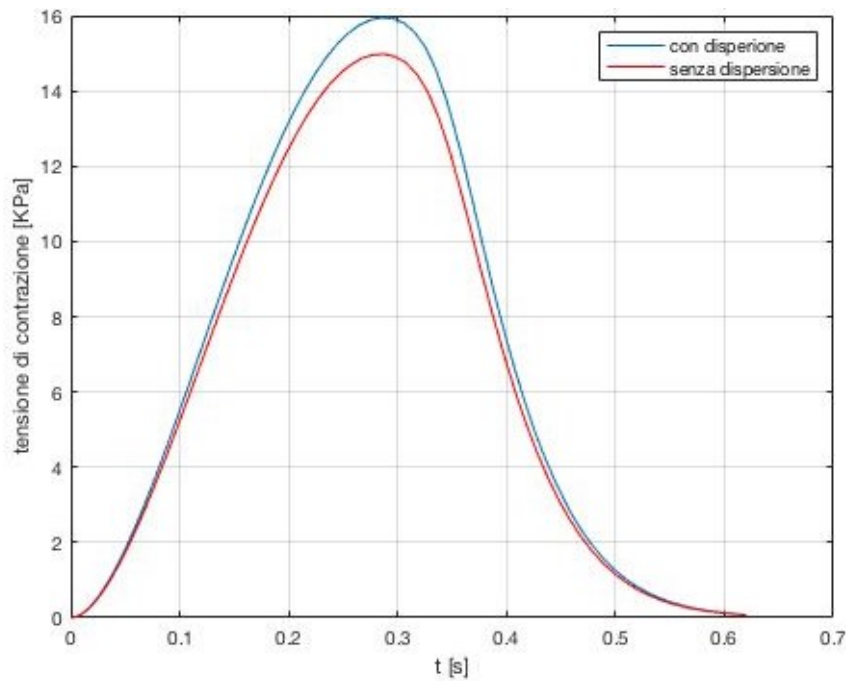


Fig.45: Grafici relativi alla tensione di contrazione sviluppata dalle fibre durante il ciclo contrazione-rilassamento per il caso con e senza dispersione della massima tensione isometrica.

La dispersione della massima tensione isometrica non comporta variazioni nel comportamento meccanico delle fibre relativo alla curva forza-velocità. Infatti, confrontando i grafici dei valori medi delle funzioni nei due casi studiati, si osserva che le curve sono coincidenti (Fig.46).

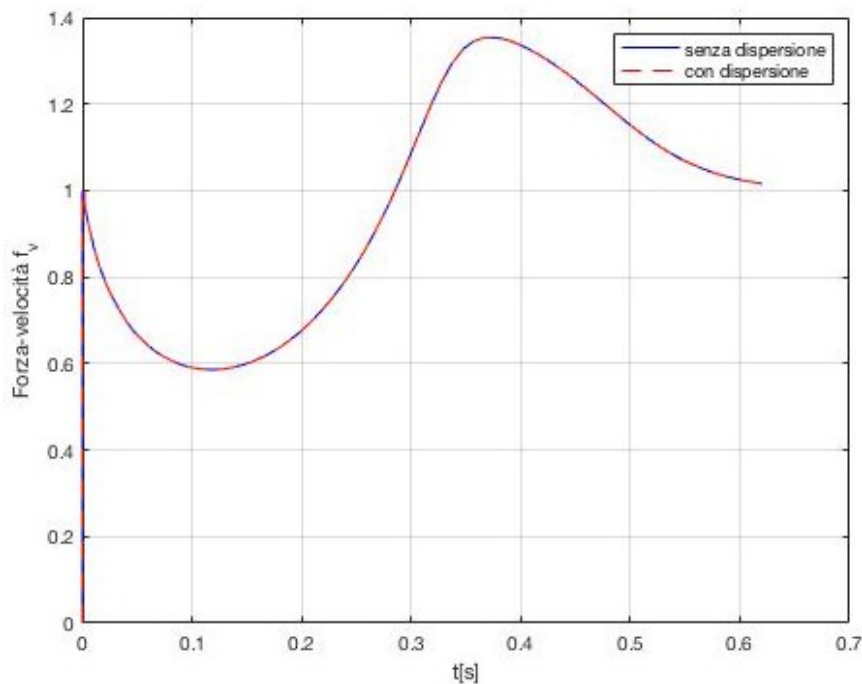


Fig.46: Grafici relativi alla funzione forza-velocità di deformazione del tessuto per il caso con e senza dispersione della massima tensione isometrica. Le curve fanno riferimento al ciclo contrazione-rilassamento delle fibre nell'intervallo di tempo riportato.

Capitolo 5

Modello costitutivo randomizzato con distribuzione di Von Mises

A causa della mancanza di prevedibilità degli aspetti fenomenologici è opportuno costruire modelli strutturali più sofisticati e basati su parametri osservabili. Comprendere il ruolo che la struttura gioca nel rendere specifiche le proprietà meccaniche e funzionali di un particolare tessuto, è infatti di fondamentale importanza per la biomimesi di costrutti funzionali.

Un approccio più sofisticato alla simulazione del modello presentato nei capitoli precedenti è quindi proposto in seguito.

5.1 La distribuzione di Von Mises

La distribuzione relativa all'orientamento delle fibre applicata ai modelli FEM precedentemente descritti tiene conto solamente del numero di fibre orientate nelle diverse direzioni rispetto alla direzione prevalente e quindi consente di descrivere in modo poco raffinato l'anisotropia complessiva del materiale.

Nel caso di fibre localmente planari è ragionevole considerare una distribuzione delle fibre che sia periodica rispetto all'angolo φ , una distribuzione adatta a descrivere questo tipo di organizzazione microstrutturale e la distribuzione di Von Mises.

La distribuzione di Von Mises è una distribuzione probabilistica simile a quella gaussiana che è generalmente utilizzata per descrivere una distribuzione caratterizzata da una variabile periodica [12].

La distribuzione di Von Mises π - periodica ha funzione densità di probabilità di equazione:

$$\rho(\varphi) = \frac{\exp(b \cdot \cos(2\varphi))}{\pi \cdot I^0(b)}$$

con $I^0(b) = \frac{1}{\pi} \cdot \int_0^\pi \exp(b \cdot \cos(2\varphi)) \delta\varphi$ funzione di Bessel di ordine zero.

Il parametro b è chiamato parametro di concentrazione, rappresenta quindi la concentrazione dei valori della distribuzione attorno al valore medio φ . Il parametro b è anche definito come il reciproco della dispersione statistica, pertanto, vale la seguente relazione [13]:

$$b = \frac{1}{\sigma^2}$$

- per $b = 0$ la distribuzione di Von Mises è uniforme
- per b grande, la distribuzione di Von Mises risulta molto concentrata attorno al valore medio e all'aumentare di b , approssima la distribuzione gaussiana di media φ e deviazione standard σ [13].

È inoltre definito il parametro di dispersione χ :

$$\chi = \int_{-\pi/2}^{\pi/2} \rho(\varphi) \cdot \sin^2(\varphi) \delta\varphi$$

Il parametro χ assume valori compresi tra 0 e 0.5:

- per $\chi = 0$ la distribuzione non presenta dispersione dei valori attorno al valore medio e le fibre sono tutte orientate lungo la stessa direzione.
- al crescere di χ , aumenta la dispersione delle fibre attorno alla direzione media. Quando $\chi = 0.5$ la dispersione è massima e le fibre sono totalmente disperse.

5.2 Calcolo del coefficiente di dispersione

La distribuzione di Von Mises è implementata all'interno di un modello costitutivo e utilizzata per rendere più omogenea la distribuzione dell'orientamento delle fibre sul foglietto. Ciò consente di descrivere in modo più realistico l'anisotropia del tessuto e, di conseguenza, il comportamento meccanico delle fibre muscolari cardiache.

Per implementare la distribuzione di Von Mises all'interno del modello costitutivo, è introdotto un nuovo invariante $\tilde{I}_4^*$ nella funzione densità di energia di deformazione relativa alla componente anisotropa del tessuto e quindi in P_{aniso} definito nel paragrafo 3.2.2.

Posto $\tilde{I}_4 = \tilde{\mathbf{C}} : (\mathbf{n}_0 \otimes \mathbf{n}_0)$, è definito:

$$\tilde{I}_4^* = \chi \cdot (\tilde{I}_1 - (\mathbf{n}_0 \otimes \mathbf{n}_0) : \tilde{\mathbf{C}}) + (1 - 2 \cdot \chi) \tilde{I}_4$$

con χ coefficiente di dispersione della distribuzione di Von Mises, I_1 primo invariante di deformazione definito come la traccia del tensore $\tilde{\mathbf{C}}$ e $\mathbf{n}_0$ versore di direzione delle fibre nella configurazione.

Il modello costitutivo relativo alla distribuzione di Von Mises è quindi utilizzato per simulare l'avvolgimento del foglietto definito nei capitoli precedenti. I risultati ottenuti dalla simulazione sono confrontati con i corrispondenti ottenuti applicando il modello con distribuzione gaussiana descritto nel capitolo 4. Per entrambi i modelli, i valori delle distribuzioni sono assegnati ai punti di integrazione del modello FEM. Il modello costitutivo che utilizza la distribuzione probabilistica di Von Mises, non contiene la randomizzazione della funzione di attivazione delle fibre né quella relativa alla massima tensione isometrica

Per confrontare le due analisi è opportuno che i modelli costitutivi siano applicati alla stessa geometria, è quindi utilizzato lo stesso modello FEM del foglietto usato nelle analisi precedenti. È poi imposta la medesima direzione prevalente delle fibre, per entrambi i modelli è stato considerato come angolo medio di orientazione delle fibre $\varphi = 0$ pertanto le fibre hanno direzione prevalente parallela all'asse z del sistema di riferimento (Fig.48).

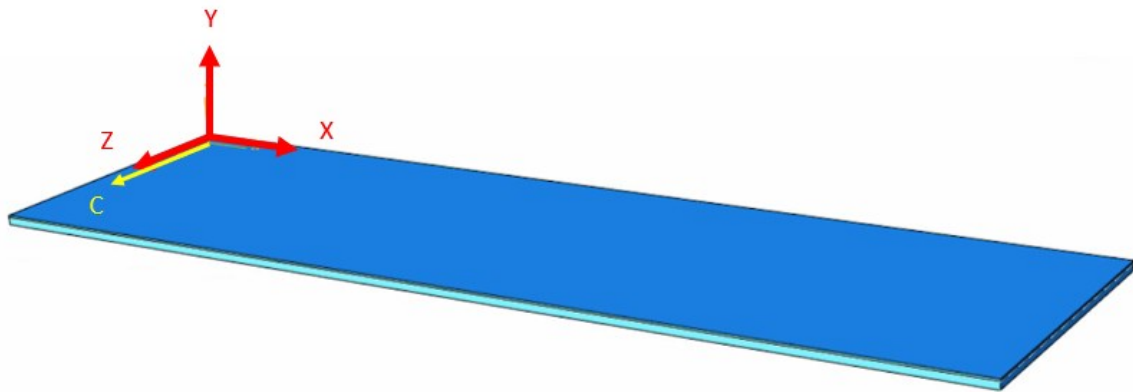


Fig.48: Vettore C di direzione prevalente delle fibre.

Infine, è opportuno che la distribuzione probabilistica dell'orientamento delle fibre attorno alla direzione predominante sia più o meno identica nei due modelli. A tale proposito è necessario calcolare i parametri della distribuzione probabilistica di Von Mises che corrispondano in modo ragionevole alla distribuzione Gaussiana.

Questa operazione si traduce nel ricavare il parametro di dispersione χ della distribuzione di Von Mises che consente di approssimare al meglio la distribuzione Gaussiana utilizzata. Il calcolo del coefficiente di dispersione è elaborato grazie al codice di calcolo numerico Matlab. Il coefficiente χ è calcolato a partire dalla deviazione standard scelta per la distribuzione Gaussiana e pari a $SD\varphi = 20$.

Dalle relazioni precedentemente descritte, è ricavato inizialmente il parametro di concentrazione b e quindi il parametro di dispersione χ . Il coefficiente di dispersione che meglio approssima la distribuzione gaussiana di media $\varphi = 0$ e $SD\varphi = 20$ è $\chi = 0.0315$. Le distribuzioni ottenute sono riportate nel grafico in figura 49.

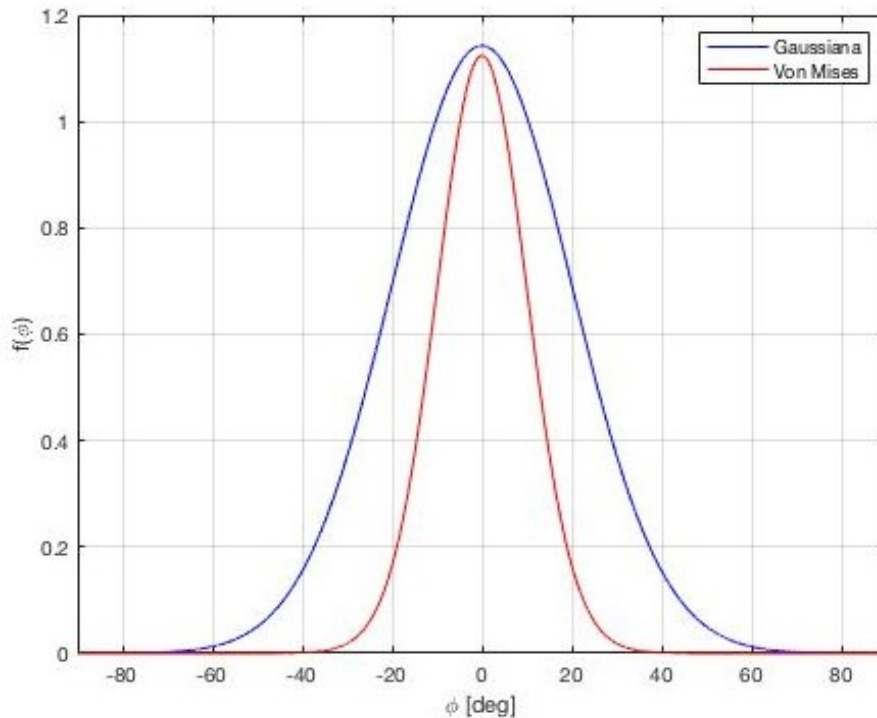


Fig.49: Distribuzione gaussiana e distribuzione di Von Mises a confronto.

5.3 Risultati

Inizialmente sono confrontati i risultati ottenuti dalle simulazioni di:

- Foglietto 1 a cui è applicata la distribuzione gaussiana all'orientamento delle fibre di media $\varphi = 0^\circ$ e deviazione standard $SD\varphi = 20$
- Foglietto 2 dove l'orientamento delle fibre è assegnato seguendo la distribuzione di Von Mises con coefficiente di dispersione pari a $\chi = 0.0315$.

Dalle istantanee della cinematica di avvolgimento dei foglietti è possibile osservare che le deformate dei due modelli sono molto simili, le immagini prese allo stesso istante di tempo sono riportate in figura 50. Si può infatti osservare che gli spostamenti nodali lungo la direzione prevalente di deformazione y sono analoghi nei due modelli.

Il risultato è coerente con quanto assunto in precedenza e conferma la correttezza del parametro χ scelto per approssimare la distribuzione gaussiana.

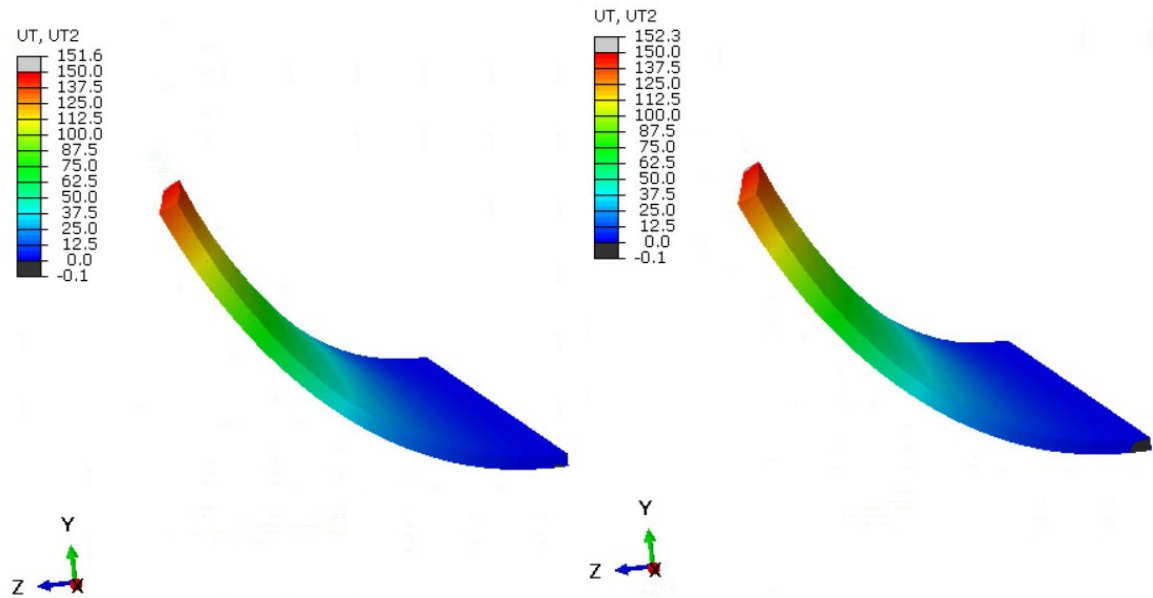


Fig.50: Deformata del Foglietto 1 a sinistra e del Foglietto 2 a destra: sono riportati gli spostamenti nodali in direzione y .

Il risultato è confermato anche osservando i grafici degli spostamenti nodali relativi a nodi corrispondenti nei due modelli. I nodi scelti appartengono all'estremità mobile del foglietto e sono posizionati al centro di tale estremità. Sono quindi selezionati gli spostamenti nodali in direzione y , direzione prevalente di deformazione, dai grafici in figura 51 si osserva che le curve hanno lo stesso andamento e raggiungono valori di spostamento molto simili in corrispondenza del picco di attivazione cellulare al tempo $t = 0.21$ s.

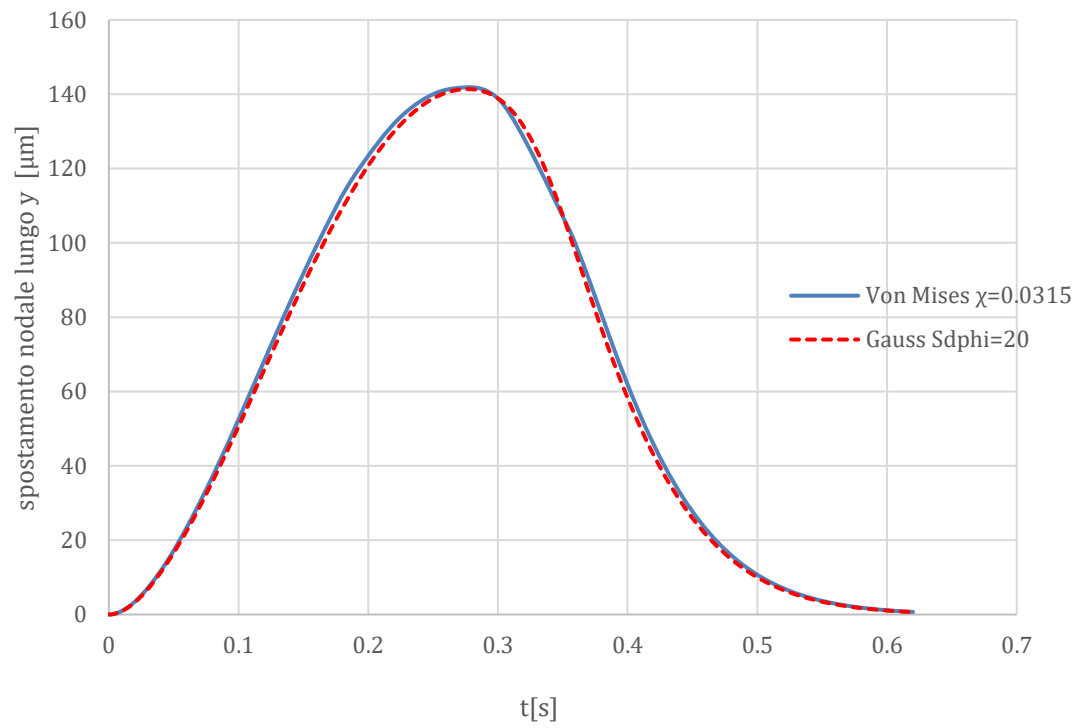


Fig.51: Grafici degli spostamenti nodali in direzione y nell'intervallo di tempo relativo alla contrazione e rilassamento delle fibre.

In ultima analisi sono confrontati i risultati ottenuti dalle simulazioni del Foglietto 2 con i risultati ottenuti dal Foglietto 3 caratterizzato da fibre cardiache totalmente disperse corrispondenti ad un coefficiente di dispersione χ pari 0.5.

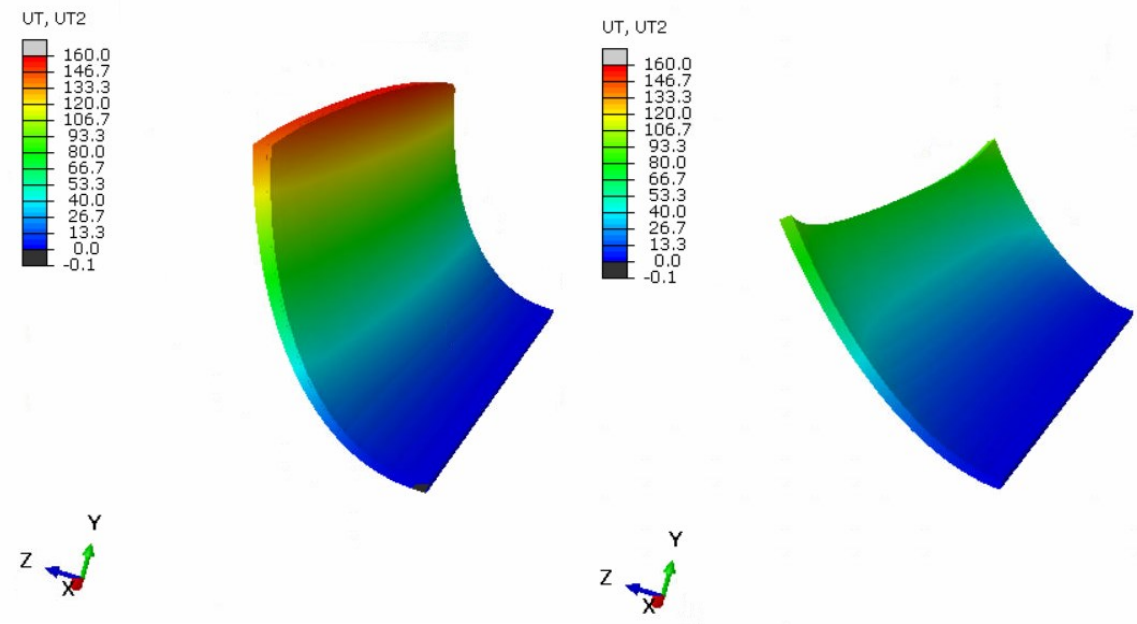


Fig. 53: Deformazione dei modelli ottenuti impostando un diverso coefficiente di dispersione delle fibre: a sinistra il Foglietto 2 con $\chi = 0.0315$ a destra il Foglietto 3 con $\chi = 0.5$. Sono quindi riportati gli spostamenti nodali lungo direzione prevalente di deformazione y.

Come si può osservare dalle istantanee riportate in figura 53 il foglietto in cui le fibre sono totalmente disperse ha una deformazione diversa e meno accentuata.

Infatti, se le fibre sono maggiormente concentrate attorno alla direzione prevalente, la contrazione delle fibre è più efficace perché la maggior parte delle fibre si contrae nella stessa direzione. Aumentando il coefficiente di dispersione χ le fibre tendono a disporsi in modo sparso sul foglietto, con angoli di orientazione compresi tra 0 e 180 gradi, ciascuna fibra si contrae in una direzione diversa e questo è causa di un minore avvolgimento del modello.

Nei grafici seguenti è riportato l'andamento degli spostamenti nodali lungo la direzione y di nodi corrispondenti nei due modelli, è evidente che, nel foglietto in cui le fibre sono sparse in tutte le direzioni, gli spostamenti nodali sono più contenuti e quindi il foglietto raggiunge valori di deformazione minore (Fig.54).

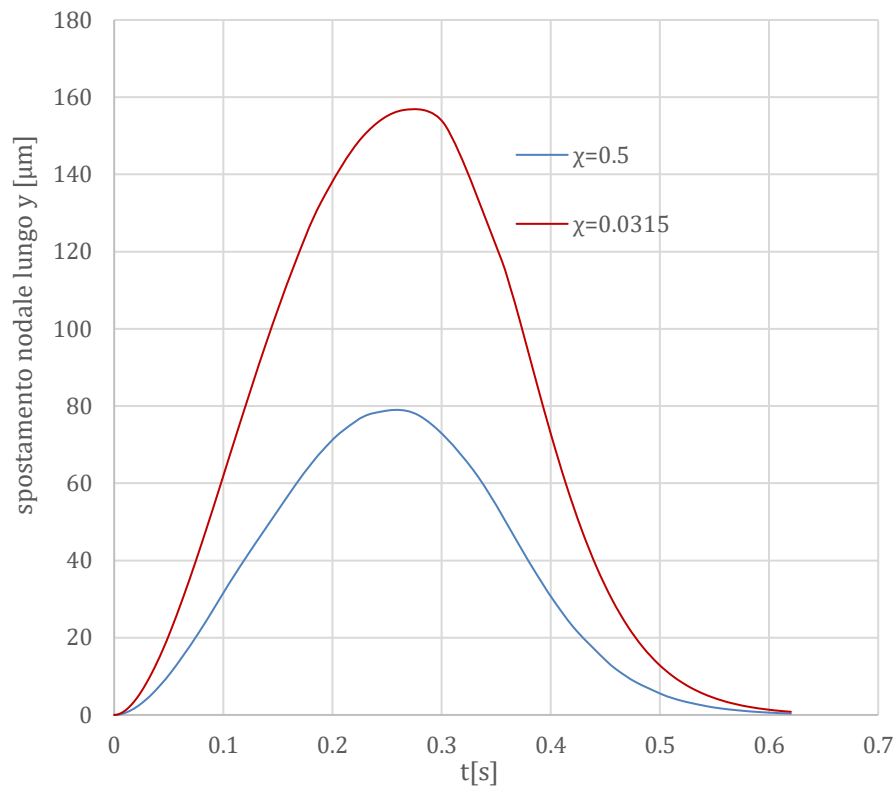


Fig.54: Grafici degli spostamenti nodali lungo y durante la fase di contrazione e rilassamento del foglietto.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi l'analisi numerica è stata utilizzata con l'obiettivo di valutare il comportamento meccanico delle cellule muscolari cardiache, i cardiomiociti. Si è posta particolare attenzione al processo di contrazione delle cellule per fornire una analisi quantitativa delle forze sviluppate nei processi di meccano-trasduzione cellulare. Questi processi mediante i quali le cellule convertono segnali meccanici in risposte di tipo biochimico, sono studiati sperimentalmente attraverso costrutti ingegnerizzati come membrane contrattili formate da substrati polimerici e cellule. Tuttavia, a causa delle dimensioni ridotte di questi costrutti è difficile determinare in maniera sperimentale le tensioni e deformazioni risultanti da una sollecitazione di questi substrati, oltre ad essere dispendioso sia in termini di tempo che di costo. Per questo ci si avvale dell'analisi numerica che consente di riprodurre computazionalmente i fenomeni che si osservano a livello sperimentale in modo più preciso e accurato.

Pertanto, sono stati simulati per via numerica gli avvolgimenti di questi costrutti prodotti dalla contrazione dei cardiomiociti, utilizzando modelli costitutivi sempre più raffinati.

Inizialmente sono stati caratterizzati alcuni parametri del modello di Hill ed è stata adattata la funzione di attivazione cellulare grazie a quanto proposto nell'articolo [11], questo ha consentito di affinare il modello ad una descrizione più realistica del comportamento meccanico dei cardiomiociti. Successivamente sono stati sviluppati dei modelli numerici agli elementi finiti in cui l'attribuzione dei parametri è fatta in modo randomico e questo ha permesso di studiare la risposta cellulare in situazioni più vicine alla condizione fisiologica, tenendo quindi conto dell'anisotropia del tessuto e delle differenti caratteristiche che le singole cellule presentano in termini di attivazione cellulare e tensione isometrica.

Lo sviluppo e l'analisi di questi modelli è fondamentale per lo studio del rapporto tra comportamento meccanico e patologie cardiache, infatti, le alterazioni cellulari causate da malattie cardiovascolari comportano una mutazione del comportamento meccanico delle cellule cambiando, ad esempio, gli stati di attivazione delle cellule e le forze da esse prodotte.

Inoltre, grazie al supporto di questi modelli, è possibile studiare i processi meccanici delle cellule cardiache e comprender come queste riescono ad integrarsi e a funzionare su supporti sintetici al fine di sviluppare sostituti funzionali capaci di mimare al meglio il tessuto muscolare cardiaco e quindi sviluppare nuovi dispositivi come il cuore totale artificiale.

Bibliografia

- [1] Epicentro: il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica
- [2] Taylor D. A. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. *Current opinion in biotechnology*, 20:598–605, 2009.
- [3] Atala A. Engineering organs. *Current opinion in biotechnology*, 20:575– 592, 2009.
- [4] Fisiologia umana. Colombi, Perego, Rufini. Settima edizione.
- [5] Standring S. *Grey's anatomy*. Elsevier, 39th edition, 2004.
- [6] Human iPSC-derived cardiomyocytes as platforms for cardiac disease modeling, therapeutic discovery and safety pharmacology- 2016,
- [7] Constructing a new myocardial bioprosthesis for cardiac repair. Gálvez-Montòn C., Prat-Vidal C., Roura S., Soler-Botija C., and BayesGenis A.
- [8] Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart. *Revista española de cardiología*, 66(5):391–399, May 2013.
- [9] Iyer R. K., Chiu L. L. Y., Reis L. A., and Radisic M. Engineered cardiac tissues. *Current opinion in biotechnology*, 22(5):706–714, 2011.
- [10] From single muscle fiber to whole muscle mechanics: a finite element model of a muscle bundle with fast and slow fibers- Lorenzo Marcucci, Carlo Reggiani, Arturo N. Natali, Piero G. Pavan- 2017.
- [11] Modeling of cardiac muscle thin films: Pre-stretch, passive and active behavior- Jongmin Shim, Anna Grosberg, Janna C. Nawroth, Kevin Kit Parker, Katia Bertoldi- 2011.
- [12] A mixed Von Mises distribution for modeling soft biological tissues with two distributed fiber properties Y. Wang, S. Son, S.M. Swartz, N.C. Goulbourne-2011
- [13] Von Mises Distribution-Wikipedia