

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**VALUTAZIONE BIOMECCANICA DEL  
PERICARDIO BOVINO E PORCINO PER LA  
PRODUZIONE DI PROTESI VALVOLARI  
CARDIACHE**

RELATORE: Prof. Andrea Bagno

CORRELATORE: Dott. Paola Aguiari

LAUREANDA: Emanuela Minio

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

# INDICE

SOMMARIO	1
CAPITOLO 1 – Introduzione. Dalle valvole cardiache agli obiettivi del lavoro sperimentale	3
1.1 Le valvole cardiache	3
1.1.1 Struttura e Funzioni delle valvole	3
1.1.2 Le valvulopatie	5
1.2 Le protesi valvolari cardiache	7
1.2.1 Protesi valvolari meccaniche	7
1.2.2 Protesi valvolari biologiche	8
1.2.3 Valvole cardiache prodotte con tecniche di ingegneria tessutale	9
1.2.4 Impianto transcateretere della valvola aortica	10
1.3 Il pericardio	14
1.3.1 Anatomia ed istologia	14
1.3.2 Applicazioni del pericardio come biomateriale	15
1.4 Obiettivi e motivazioni della tesi	19
CAPITOLO 2 – Materiali e Metodi. Gli strumenti e le fasi della sperimentazione	21
2.1 Il Sistema Bose ElectroForce	21
2.1.1 Componenti principali del sistema	21
2.1.2 Il software WinTest	23
2.2 Prelievo e trattamento dei campioni	25
2.2.1 Pericardio bovino	27
2.2.2 Pericardio porcino	29
2.3 Analisi delle proprietà fisiche dei campioni	30
2.4 Procedura sperimentale	33
2.4.1 Pericardio bovino	34
2.4.1.1 Prima configurazione	34
2.4.1.2 Seconda configurazione	35

2.4.2 Pericardio porcino	36
2.5 Determinazione delle curve di interesse	37
2.6 Estrazione dei parametri di interesse: Modulo Elastico	42
2.6.1 Analisi statistiche	45
CAPITOLO 3 – Risultati e Discussione	46
3.1 Pericardio bovino senza pre-tensionamento	46
3.1.1 Analisi fisiche: spessore e densità	46
3.1.2 Modulo Elastico	50
3.2 Pericardio bovino con pre-tensionamento	53
3.2.1 Analisi fisiche: spessore e densità	53
3.2.2 Modulo Elastico	55
3.2.3 Pericardio in parallelo	59
3.2.3.1 Modulo Elastico	59
3.3 Pericardio porcino	63
3.3.1 Analisi fisiche: spessore e densità	63
3.3.2 Modulo Elastico	64
3.4 Bovino vs porcino	68
CONCLUSIONI	70
APPENDICE: trattamenti TRICOL e TRITDOC	72
BIBLIOGRAFIA	76
RINGRAZIAMENTI	79

## SOMMARIO

Le malattie delle valvole cardiache sono dette valvulopatie. In presenza di una valvulopatia si procede con la sostituzione della valvola malata con dispositivi protesici. Tre sono le tipologie di protesi valvolari che si differenziano per alcune caratteristiche principali: meccaniche, biologiche e valvole transcutanee.

Le protesi valvolari meccaniche e biologiche presentano severi svantaggi: le prime richiedono terapia anticoagulante a vita e provocano reazioni avverse come tromboembolismo ed endocarditi; le biologiche non richiedono terapia anticoagulante e possiedono un profilo emodinamico migliore, ma il loro limite principale è il possibile rigetto per effetto della risposta immunitaria del ricevente. Per questo motivo si è cercato di trattare il tessuto con glutaraldeide in modo da evitare reazioni avverse. Questo reagente però provoca reticolazioni, citotossicità e calcificazioni. Inoltre causa la rottura del network di collagene-elastina ed infiltrazioni nella matrice di collagene.

Per bypassare questo problema sono state sviluppate nuove tecniche di decellularizzazione, in modo da rimuovere i residui cellulari presenti nel tessuto. In questo lavoro vengono utilizzati due metodi innovativi: triton-colato (TRICOL) e il triton-taurodeossicolato (TRITDOC), capaci di eliminare le cellule del donatore.

Le valvole transcutanee, invece, sono costituite da lembi di tessuto pericardico (bovino o porcino) suturati su un supporto metallico (stent) ed inserite via arteria femorale o apice del cuore, evitando così l'intervento chirurgico a cuore aperto.

L'obiettivo di questo lavoro è valutare le caratteristiche biomeccaniche del pericardio bovino e porcino, definendo quale zona all'interno del tessuto sia più adatta per la produzione di protesi valvolari, in quanto più resistente dal punto di vista biomeccanico. Vengono inoltre valutati gli effetti dei due trattamenti di decellularizzazione allo scopo di determinare se essi migliorino o peggiorino le caratteristiche meccaniche del tessuto.

Metodi – I tessuti pericardici di bovino e porcino vengono prelevati da un mattatoio e ogni pericardio viene suddiviso in quattro zone: ALV, PRV, ARV e PLV. I campioni vengono tagliati in forme rettangolari di  $20 \times 3 \text{ mm}^2$ , in tre diverse direzioni di orientamento ( $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $45^\circ$ ) per il porcino e solo a  $90^\circ$  per il bovino; una parte di essi viene sottoposta ai due trattamenti di decellularizzazione. Successivamente vengono misurate le caratteristiche fisiche (area, densità e peso) dei campioni e quest'ultimi vengono sottoposti a prove di trazione

monoassiale, attraverso l'uso del Sistema Bose ElectroForce. Viene calcolato il modulo elastico di ogni campione, estraendo dalla curva sforzo-deformazione l'ottavo ciclo di carico e calcolando la pendenza di questa curva nella zona lineare (prima che il tessuto arrivi a rottura).

Risultati – Vengono confrontati i pericardi bovini con i porcini (entrambi nativi), e i tessuti nativi con i decellularizzati del bovino, in modo da decidere quale tessuto resista meglio alla trazione. Vengono inoltre effettuati dei confronti all'interno dello stesso pericardio, in modo da decidere quale zona risponde meglio alla sollecitazione.

Per il tessuto bovino, la zona che presenta un valore di modulo elastico più alto è l'ALV e l'orientamento preferenziale per il taglio dei campioni è quello a 90°.

Per il tessuto porcino, invece, l'orientamento migliore appare quello a 0°.

Conclusioni – E' possibile affermare che il pericardio bovino presenta un comportamento meccanico migliore rispetto al tessuto pericardico porcino. Il porcino non resiste alla stessa sollecitazione del bovino, in quanto più sottile.

Inoltre i tessuti trattati talvolta migliorano, talvolta peggiorano le proprietà del tessuto rispetto a quello nativo, in base alla configurazione del sistema. I risultati ottenuti dimostrano che i due trattamenti, TRICOL e TRITDOC, hanno effetti diversi sul pericardio.

## INTRODUZIONE

### Dalle valvole cardiache agli obiettivi del lavoro sperimentale

#### 1.1 Le valvole cardiache

##### 1.1.1 Struttura e funzioni delle valvole

Le valvole cardiache (Fig. 1.1) sono costituite da lamine sottili dette lembi, flessibili e resistenti, di tessuto fibroso rivestito da endotelio. I movimenti dei lembi sono passivi: è l'orientamento delle valvole ad assicurare l'unidirezionalità del flusso sanguigno attraverso il cuore.

Nel cuore sono presenti due tipi di valvole: le *atrioventricolari* (AV) e le *semilunari*. Sono valvole atrioventricolari la valvola *tricuspide*, posta tra l'atrio destro e il ventricolo destro, e la valvola *mitrale*, posta tra l'atrio sinistro e il ventricolo sinistro: sono formate rispettivamente da tre e due cuspidi. Le valvole semilunari sono poste tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare e tra il ventricolo sinistro e l'aorta e vengono chiamate rispettivamente *valvola polmonare* e *valvola aortica*. Sono costituite da tre cuspidi a forma di coppa e sono attaccate all'anello valvolare fibroso [1].

In un cuore normale, durante il riempimento ventricolare, i lembi valvolari sono chiusi a formare una specie di imbuto per il passaggio del sangue dagli atri ai ventricoli.

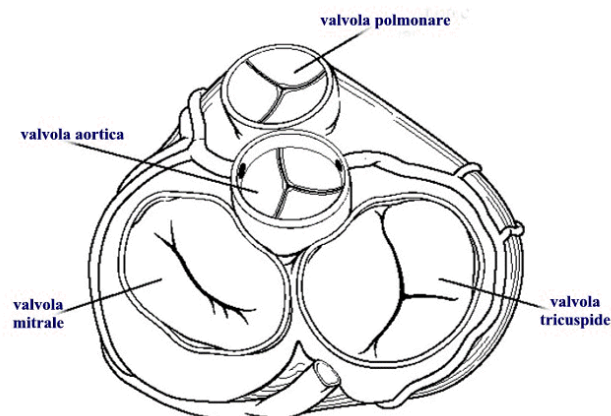


Fig. 1.1 - Rappresentazione delle valvole cardiache semilunari e atrioventricolari.

La chiusura e l'apertura delle valvole cardiache atrioventricolari e semilunari sono fondamentali per il ciclo cardiaco. Un ciclo comprende tutti gli eventi che si verificano dall'inizio di un battito all'inizio del successivo e si suddivide in:

- contrazione o *sistole* atriale
- rilasciamento o *diastole* atriale
- contrazione ventricolare
- rilasciamento ventricolare

Nella *sistole atriale*, i due atri si contraggono e la forza di contrazione spinge il sangue, attraverso le valvole atrioventricolari aperte, all'interno dei due ventricoli. I ventricoli sono rilasciati e si riempiono. Le valvole semilunari sono chiuse, perciò il sangue non può entrare in aorta o nell'arteria polmonare. Successivamente, la pressione nei ventricoli sale bruscamente, causando la chiusura delle valvole atrioventricolari. Durante questo evento, definito *periodo di contrazione ventricolare isovolumetrica*, si verifica la contrazione del ventricolo, ma non il suo svuotamento.

La *fase di eiezione*, invece, avviene quando la pressione ventricolare sale al di sopra di 80 mm<sub>Hg</sub> e le pressioni ventricolari inducono l'apertura delle valvole semilunari. Il sangue viene così spinto nel circolo sistemico attraverso l'aorta e l'arteria polmonare. Durante la *diastole ventricolare* si ha la chiusura delle valvole semilunari, per far sì che il sangue non retroceda nei ventricoli; le valvole atrioventricolari non sono ancora aperte perché la pressione degli atri non supera quella dei ventricoli che si stanno rilasciando.

Le valvole semilunari aortica e polmonare funzionano in modo diverso dalle valvole AV. In primo luogo perché l'alta pressione nelle arterie, alla fine della sistole, causa una brusca chiusura delle semilunari, in contrasto con la chiusura più dolce delle AV. In secondo luogo, a causa del piccolo lume di apertura, la velocità di eiezione del sangue attraverso le valvole aortica e polmonare è molto più elevata rispetto a quella attraverso le AV, che hanno una apertura più grande. A causa della rapidità della chiusura e dell'eiezione, i margini delle valvole semilunari sono soggetti a un'abrasione meccanica molto maggiore rispetto alle valvole AV [2].

Alla fine della fase di eiezione, il flusso di sangue si inverte momentaneamente verso i ventricoli: questa inversione provoca l'accollamento rapido delle cuspidi, impedendo così il reflusso del sangue.

Durante la sistole ventricolare, le cuspidi non aderiscono alle pareti dei vasi ma si librano nel sangue, rimanendo circa a metà strada tra la parete del vaso e la posizione di chiusura. Dietro le valvole semilunari dell'arteria polmonare e dell'aorta sono presenti piccole tasche, detti seni di Valsalva, ove si formano vortici che impediscono alle cuspidi di aderire alle pareti dei vasi.

Le valvole cardiache risultano indispensabili per il normale funzionamento del cuore, in quanto consentono l'unidirezionalità del flusso ematico generato dall'attività di pompa del miocardio. In particolare, le valvole AV impediscono il flusso retrogrado (rigurgito) di sangue dai ventricoli agli atri, mentre le valvole semilunari impediscono il reflusso del sangue dall'aorta e dall'arteria polmonare nei rispettivi ventricoli [3].

### 1.1.2 Le valvulopatie

Le malattie che colpiscono le valvole cardiache sono dette valvulopatie o cardiopatie valvolari. Esse sono di due tipi: *stenosi*, cioè incompleta apertura, per la quale il sangue passa attraverso un orifizio più piccolo della norma; *insufficienza*, cioè incompleta chiusura, per la quale parte del sangue torna indietro attraverso la valvola che dovrebbe essere chiusa. Le valvulopatie possono essere congenite o acquisite e quest'ultime possono essere di origine degenerativa, ischemica, traumatica o secondaria.

Le malattie del settore destro del cuore, ove vige un regime pressorio più basso, sono rare ed in genere dovute a problemi congeniti. Le malattie delle valvole mitraliche e aortiche sono invece molto più frequenti [1].

Le cardiopatie più importanti sono:

- stenosi aortica
- insufficienza aortica
- stenosi mitralica
- insufficienza mitralica

La *stenosi aortica* è caratterizzata dal restringimento della valvola aortica con conseguente aumento della resistenza all'efflusso del sangue dal ventricolo sinistro all'aorta, durante la sistole (Fig. 1.2). Si associa un'ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro. Tale anomalia si



riscontra in particolar modo nel sesso maschile; in alcuni casi è dovuta a malformazioni congenite, in altri la stenosi può evolvere nel tempo e comparire solo nell'età adulta.



**Fig. 1.2 – Esempio di stenosi aortica.**

L'*insufficienza aortica*, invece, è caratterizzata dall'incompleta chiusura della valvola aortica durante la diastole e dal conseguente reflusso di una quota di sangue dall'aorta nel ventricolo sinistro. Le cause di questa malattia possono essere varie: deformazione e accorciamento delle cuspidi valvolari, endocardite batterica o alterazioni congenite.

La *stenosi mitralica* si caratterizza per la riduzione dell'orifizio valvolare di circa metà del suo valore normale. Si presenta soprattutto nel sesso femminile e di solito è conseguente alla malattia reumatica, ovvero i lembi valvolari vanno incontro a fenomeni di accorciamento, deformità e retroazione. Riduzioni dell'orifizio mitralico comportano la riduzione della portata cardiaca, anche a riposo.

Un apparato ventricolare *mitralico insufficiente*, invece, causa, durante la sistole, un rigurgito di sangue dal ventricolo sinistro all'atrio. Il meccanismo di compenso utilizzato per mantenere la portata cardiaca normale è l'aumento del volume telediastolico del ventricolo sinistro, il quale va incontro a dilatazione ed ipertrofia. Le cause dell'insufficienza mitralica possono essere alterazioni congenite dei lembi valvolari (come ad esempio la valvola mitrale a paracadute, un difetto di sviluppo dei cuscinetti endocardici), o alterazioni dei muscoli o delle corde tendinee, che causano malfunzionamento dell'apparato ventricolare [3].

In presenza di una valvulopatia emodinamicamente significativa, l'unica cura è quella chirurgica. Tuttavia oggi le tecniche chirurgiche si sono evolute e spesso risulta possibile riparare la valvola senza doverla sostituire. In alternativa, si può ricorrere alla sostituzione della valvola malata con protesi valvolari cardiache.

## 1.2 Le protesi valvolari cardiache

La protesi valvolare cardiaca "ideale" dovrebbe essere facilmente impiantabile, non trombogenica e non immunogenica; dovrebbe inoltre sviluppare una performance emodinamica fisiologica senza causare deterioramento strutturale [4].

Al momento, in commercio sono disponibili varie tipologie di protesi valvolari, le quali differiscono per particolari caratteristiche: durezza, trombogenicità e profilo emodinamico. In particolare, esistono valvole cardiache meccaniche e valvole cardiache biologiche; recentemente però si è fatto ricorso ad innovative tecniche di ingegneria tessutale per arrivare a produrre valvole biologiche autologhe e viventi, favorendo nuovi approcci che non richiedono il tradizionale intervento chirurgico a torace aperto. È il caso dell'impianto percutaneo transcatetere della valvola aortica (TAVI).

### 1.2.1 Protesi valvolari meccaniche

Le valvole meccaniche (mechanical heart valves, MHVs) sono composte da carbonio pirolitico, metallo e componenti polimerici e hanno una durata media variabile tra 20 e 30 anni. Il loro limite principale è quello di richiedere una terapia anticoagulante a vita ed inoltre il loro uso, spesso, porta reazioni avverse, come tromboembolismo, infezione, eventi emorragici ed endocarditi.

Le valvole meccaniche sono difficili da ottenere in una forma che riproduca fedelmente la struttura delle valvole native, inoltre i materiali utilizzati per la fabbricazione possiedono limitata emocompatibilità e non permettono l'adesione di cellule autologhe.

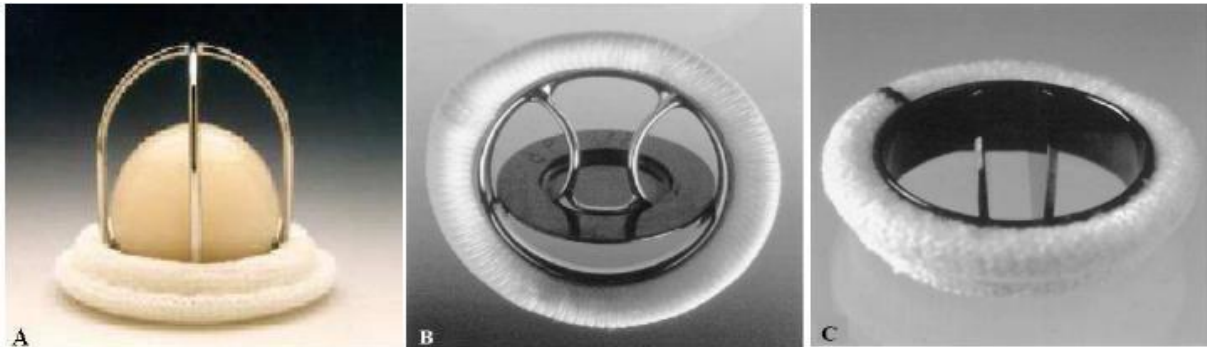
Questi sostituti sono preferiti nei pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore a 10 o 15 anni, sono trombogenici e si classificano in base alla loro struttura.

Tutte le MHVs hanno una struttura di base simile, formata da 3 costituenti essenziali:

- *occluder*, di solito rappresentato da una o più parti rigide e mobili, come una palla (nelle protesi Starr-Edwards), un disco (nelle protesi Bjork-Shiley) o un "hinged leaflet" circolare o semicircolare (Fig. 1.3). Deve essere in grado di aprirsi e chiudersi senza interferire con il flusso ematico e di adattarsi alle differenze di pressione;
- *housing o alloggiamento*, in cui è inserito l'occluder;

- *sewing ring*, rappresenta la base della protesi. È in materiale polimerico e riveste un anello in metallo (o in grafite) ricoperto da carbonio pirolitico. È il punto di congiunzione della protesi con i tessuti del miocardio.

La protesi deve essere progettata in modo da minimizzare le turbolenze del flusso ematico, il lavoro compiuto dal cuore, la probabilità di formazione di trombi e di comparsa di fenomeni emolitici [5].



**Fig. 1.3 - Esempi di valvole cardiache meccaniche: (A) caged-ball (Starr-Edwards); (B) single-tilting disk (Bjork-Shiley); (C) bileaflet-tilting disk (St. Jude Medical).**

### 1.2.2 Protesi valvolari biologiche

La morfologia delle protesi valvolari biologiche è del tutto simile a quella della valvola da sostituire: il loro limite è legato al possibile rigetto per effetto della risposta immunitaria del ricevente. Per evitare questo problema, le valvole devono essere “decellularizzate” per eliminare tutte le cellule del donatore. La loro durata media si aggira intorno ai 15 anni.

Esistono due tipi di protesi valvolari biologiche: *eterologhe*, se composte da tessuto non umano montato su un supporto; oppure *omologhe*, ossia valvole umane prelevate da cadavere. Il principale vantaggio di questi sostituti valvolari è dovuto al basso potenziale trombogenico, in virtù del quale non è richiesta una terapia anticoagulante a lungo termine.

Di solito, le protesi sono ottenute applicando il tessuto biologico su uno *stent* metallico, il quale ha il duplice scopo di fornire sostegno al tessuto e di favorire la successiva applicazione al cuore. Uno dei problemi causati dalla presenza dello *stent* è la possibile ostruzione del flusso ematico che causa stenosi residue, degenerazione e calcificazione. Sono state progettate, infatti, valvole biologiche *stent-less* che esibiscono migliori proprietà emodinamiche. In tutti i casi, le valvole biologiche ottenute in questo modo non sono vitali,

dal momento che i trattamenti applicati ai tessuti prelevati dal donatore ne compromettono la funzionalità biologica (Fig. 1.4) [1].

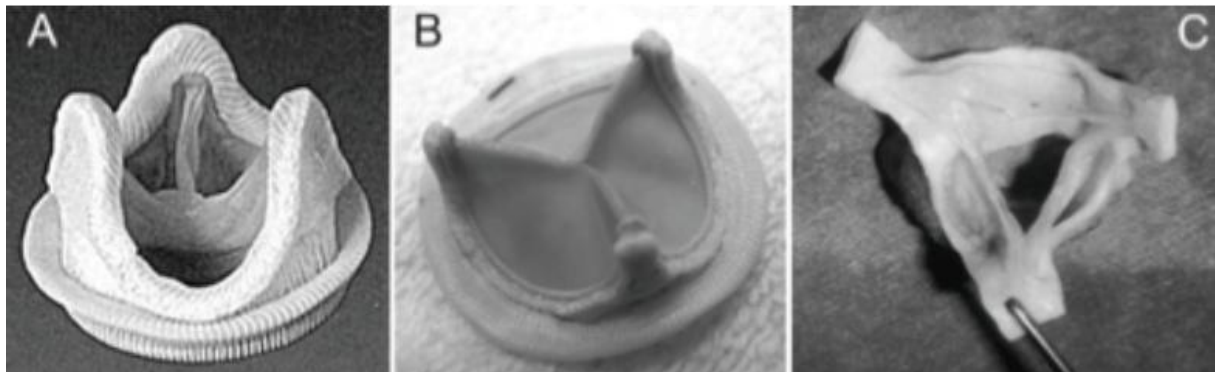


Fig. 1.4 - Esempi di protesi valvolari biologiche: (A) porcina; (B) bovina; (C) omologa.

### 1.2.3 Valvole cardiache prodotte con tecniche di ingegneria tessutale

In considerazione degli attuali limiti delle valvole cardiache meccaniche e biologiche e per migliorare la qualità delle protesi valvolari cardiache, si fa ricorso alla costruzione di valvole ingegnerizzate attraverso tecniche di ingegneria tessutale, in modo da creare una valvola completamente funzionale, autologa e vivente (tissue engineered heart valves, TEHVs). Per produrre questi sostituti valvolari si richiedono alcuni passaggi fondamentali:

- costruzione di un supporto (*scaffold*) sul quale far aderire e crescere le cellule;
- prelievo delle cellule dal paziente e preparazione della coltura cellulare per la semina sul supporto;
- semina delle cellule ed incubazione in un bioreattore;
- intervento chirurgico di sostituzione della valvola nativa malata con la valvola ingegnerizzata.

Per la produzione del supporto si può scegliere di utilizzare materiali sintetici, come biopolimeri biodegradabili e biorisorbibili, in particolare acido polilattico e acido poliglicolico (PGA, PLA) e i loro copolimeri; oppure utilizzare un supporto di derivazione animale, opportunamente trattato.

Lo scaffold deve essere sottoposto ad un particolare trattamento di sola fissazione con glutaraldeide o ad un vero e proprio "lavaggio" (decellularizzazione) per eliminare qualsiasi residuo cellulare dell'organismo donatore, lasciando intatta la sola matrice extracellulare.

Questa procedura deve essere condotta con grande cautela, per evitare che il trattamento di rimozione delle cellule alteri la funzionalità della matrice biologica.

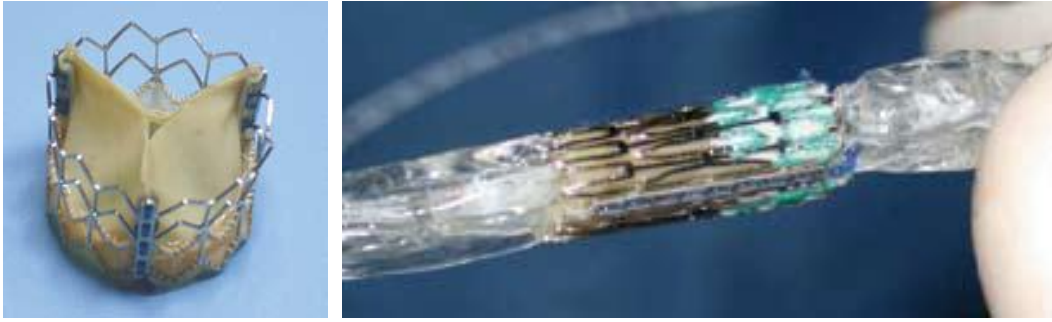
Le cellule utilizzate per la semina in vivo sono raccolte da vene o da arterie periferiche; recentemente, hanno suscitato molto interesse le *cellule staminali mesenchimali* del midollo osseo (mesenchymal stem cells, MSCs), in quanto sono facili da ottenere, mostrano una elevata capacità di proliferazione e riescono a differenziarsi in diversi tipi cellulari.

Dopo la fase di semina si usa un bioreattore, che deve riprodurre l'ambiente adeguato per la crescita cellulare. Ci sono due tipi di bioreattore: *statico*, lasciando alle cellule il tempo di depositarsi e di aderire allo scaffold; e *dinamico*, creando condizioni di esercizio tipiche del flusso sanguigno pulsatile in pressione. Tutto questo favorisce la crescita cellulare, portando ad un tessuto molto simile a quello nativo [1].

#### 1.2.4 *Impianto transcateretere della valvola aortica*

Una delle moderne procedure volte a curare la stenosi aortica consiste nell'approccio TAVI, acronimo inglese di "Transcatheter Aortic Valve Implantation". Tale approccio prevede l'impianto di bioprotesi valvolari per mezzo di procedure percutanee da eseguire all'interno di sale operatorie 'ibride', cioè a metà tra le sale tradizionali di cardiocirurgia e di emodinamica. La tecnica è meno invasiva della chirurgia tradizionale poiché risparmia al paziente la sternotomia ed evita il ricorso alla circolazione extracorporea; è rivolta particolarmente a pazienti anziani che mal sopporterebbero la terapia chirurgica classica, a causa di complicanze postoperatorie, permettendo in questo modo un recupero migliore. In particolare, l'operazione può essere eseguita praticando una piccola incisione sul torace sinistro, attraverso l'apice del muscolo cardiaco o per mezzo di un catetere che, dall'arteria femorale, procede verso il cuore: sono quindi due le vie di accesso al cuore, *trans-apicale* o *trans-femorale*. L'uso dell'una o dell'altra via è essenzialmente legato alla dimensione delle arterie periferiche: più le arterie sono piccole o malate, più è consigliabile la scelta della via trans-apicale poiché la via femorale potrebbe comportare rischi maggiori.

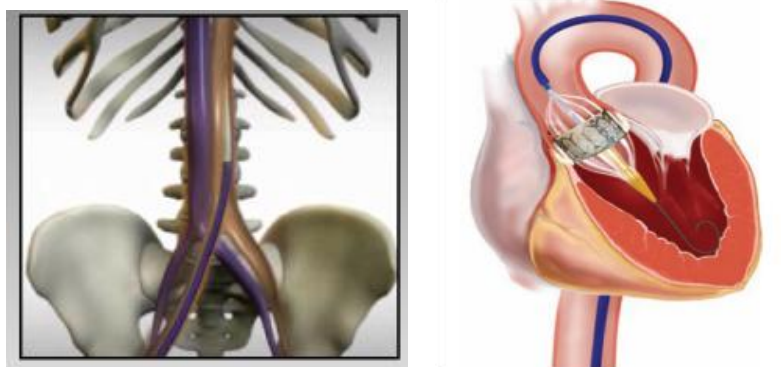
La bioprotesi utilizzata è costituita da una struttura metallica (stent) alla quale viene fissato il tessuto biologico in forma di valvola cardiaca: si sceglie, per questo impiego, pericardio bovino o porcino. Prima dell'impianto, la protesi biologica, ancorata allo stent metallico, viene compressa (crimpata) con un apposito macchinario per farla aderire al catetere (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5 – A sinistra lo stent con il tessuto pericardico animale; a destra la protesi compressa prima dell’impianto.**

Una fase preliminare all’intervento vero e proprio è il procedimento di valvuloplastica. Essa prevede l’apertura della valvola cardiaca malata, eseguita con l’ausilio di un palloncino che, gonfiato, dilata la valvola stenotica favorendone l’apertura: la valvola nativa viene così aperta, permettendo il successivo alloggiamento della protesi.

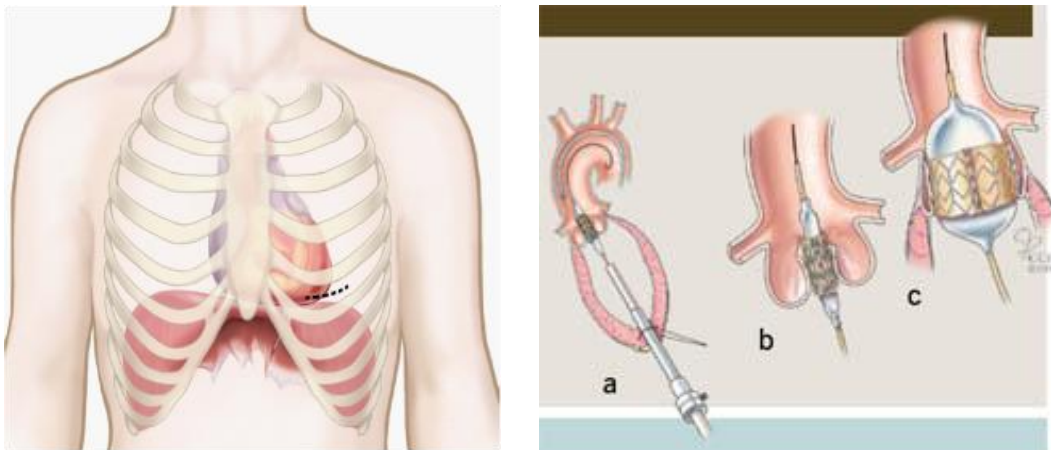
L’impianto della valvola aortica per via trans-femorale viene eseguita in anestesia locale e prevede sostanzialmente due fasi: valvuloplastica e impianto. È attraverso una serie di cateteri che il palloncino, posizionato entro valvola aortica, viene gonfiato a pressione, permettendo l’apertura della valvola malata. Rimosso il palloncino, viene inserito il catetere che permetterà il rilascio della bioprotesi: tutto ciò avviene sotto la guida fluoroscopica e sotto visione diretta. Raggiunta l’esatta posizione, il palloncino su cui è posizionata la protesi viene gonfiato; così facendo, lo stent metallico al quale è suturato il tessuto biologico, si espande e viene collocata la protesi, che funzionerà come una normale valvola aortica (Fig. 1.6).



**Fig. 1.6 - Approccio trans-femorale: a sinistra l’introduzione del catetere dall’arteria femorale e a destra il posizionamento del palloncino a ridosso della valvola nativa.**

Più complesso è l’intervento per via trans-apicale, poiché è prevista l’anestesia generale. Praticando l’incisione sul torace, attraverso l’apice cardiaco vengono inseriti alcuni cateteri

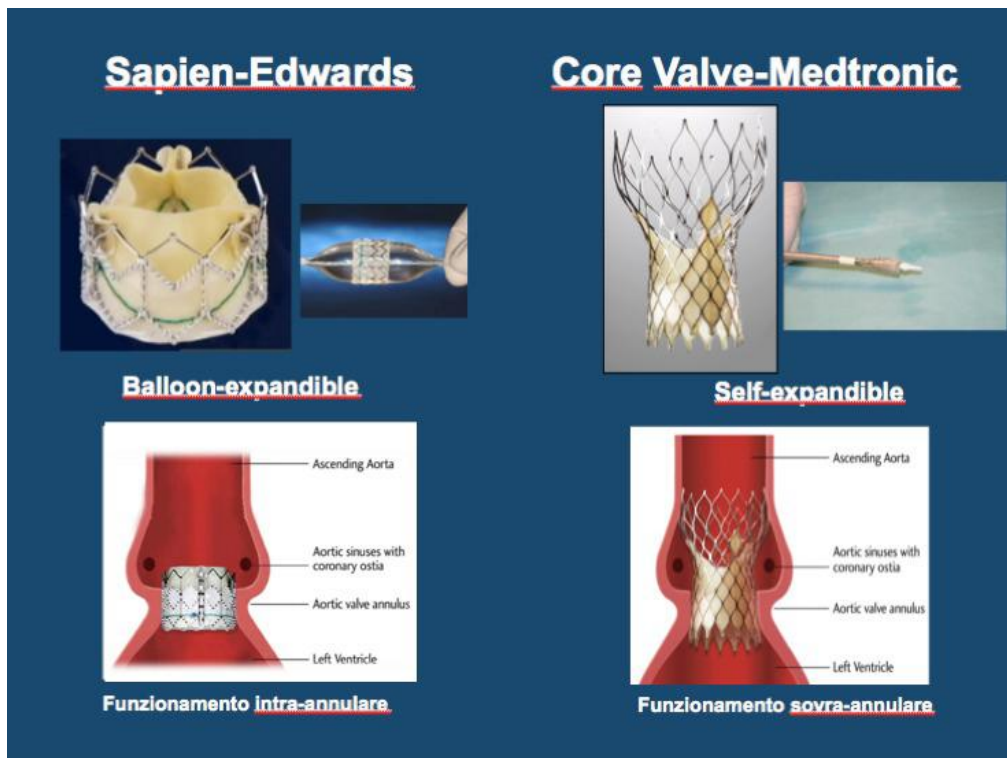
adatti alla valvuloplastica e all'impianto. L'incisione avviene a livello del 4°-5° spazio intercostale sinistro, con un piccolissimo taglio che consenta di isolare la punta del cuore. Da questo momento in poi, la procedura risulta analoga alla precedente: la bioprotesi, sistemata sullo stent metallico, arriva a livello della valvola aortica stenotica attraverso l'apice del cuore; raggiunta la posizione, la valvola viene aperta per mezzo del palloncino che, gonfiato, consente la perfetta adesione della nuova valvola a ridosso di quella nativa (Fig. 1.7). Quest'ultima non verrà asportata ma "schiacciata" e appiattita in modo che si dilati e consenta all'orifizio di allargarsi, essendo così sostituita nelle sue funzioni dalla protesi di corrispondente misura.



**Fig. 1.7 – Approccio trans-apicale: a sinistra la posizione del taglio chirurgico per l'introduzione del catetere; a destra: (a) la valvola viene fatta arrivare a livello della valvola aortica, (b) e (c) trovata la corretta posizione, il palloncino viene gonfiato in modo da far aderire lo stent e sostituire la valvola nativa ammalata.**

Caso limite all'utilizzo di tale procedura è la grave calcificazione o la vicinanza delle coronarie al piano valvolare; comunque, resta particolarmente indicata per pazienti attentamente selezionati, con elevato rischio operatorio o con un'aspettativa di vita non ottimale, a causa delle generali condizioni cliniche [6,7,9].

Attualmente in commercio sono disponibili due diversi tipi di endoprotesi valvolari: *CoreValve Medtronic* e *Sapien Edwards* (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8 – Rappresentazione dello stent, del catetere e del posizionamento del sostituto per le valvole Edwards Sapien (a sinistra) e CoreValve (a destra).**

La *CoreValve Medtronic* è una valvola autoespandibile montata su un frame di nitinolo (lega di nichel a memoria di forma), entro il quale è suturata una valvola tricuspide in pericardio porcino. Tale endoprotesi può essere utilizzata con l'approccio trans-femorale; limitata, invece, è l'esperienza per via trans-apicale. Sono disponibili tre diverse misure del dispositivo: 26, 29 e più recentemente 31 mm, in grado di adattarsi ad anelli aortici di diametri compresi tra 20 e 29 mm. Lo stent ha una lunghezza di circa 53-55 mm e si estende dal ventricolo sinistro fino all'aorta, consentendo il corretto orientamento e ancoraggio della valvola.

La valvola biologica utilizzata nella prima versione della *Sapien Edwards* era costituita da pericardio equino; successivamente, fu utilizzato quello bovino, fissato con glutaraldeide. Nella versione più aggiornata, la valvola è costituita da tre foglietti di pericardio bovino su uno stent in lega cromo-cobalto, espandibile mediante palloncino. È disponibile nei diametri 23 e 26 mm ed è in grado di coprire anelli valvolari di misura compresa tra 18 e 27 mm.

La chiusura dello stent, che avviene con un dispositivo di piegatura monouso, deve essere eseguita con attenzione perché, in caso contrario, potrebbe danneggiare la valvola. Questa valvola, al contrario della *CoreValve*, può essere utilizzata sia con l'approccio trans-femorale che con quello trans-apicale [8,10].

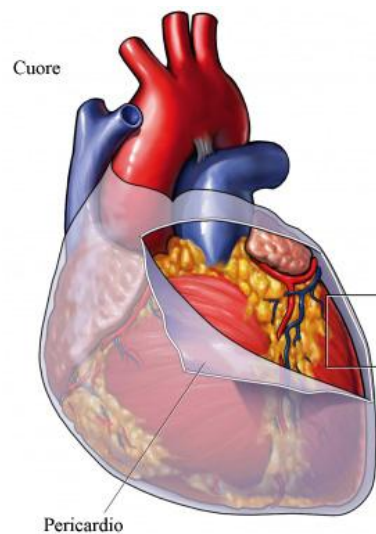


## 1.3 Il pericardio

### 1.3.1 Anatomia ed istologia

Il pericardio è un sacco fibrosiero che accoglie il cuore e il suo peduncolo vascolare. È costituito da uno strato esterno di tessuto fibroso, *pericardio fibroso*, rivestito, sulla superficie interna, dal foglietto parietale della sierosa cardiaca, *pericardio serioso*, che si riflette nel foglietto viscerale (*epicardio*) aderente al miocardio. La sierosa cardiaca con i suoi due foglietti delimita una cavità chiusa, che favorisce gli spostamenti del cuore durante l'attività contrattile.

Il sacco pericardico (Fig. 1.9) appare come una robusta membrana di colore biancastro e presenta forma a tronco di cono. Nel soggetto adulto ha altezza di 12-14 cm, larghezza massima di 13-14 cm e spessore di 9-10 mm in corrispondenza della base e di 6-7 mm in sede apicale. È possibile considerare quattro zone: *base*, *faccia anteriore*, *faccia posteriore* e *apice tronco*.



**Fig. 1.9 – Il sacco pericardico.**

La base poggia sulla cupola diaframmatica: per questo motivo il pericardio segue il diaframma durante gli atti respiratori. La faccia anteriore, convessa, si prolunga indietro su ogni lato fino all'ilo del polmone.

La faccia posteriore è rivolta verso la colonna vertebrale nel tratto compreso tra la quinta e la sesta vertebra toracica; infine, l'apice tronco abbraccia il peduncolo vascolare.

Il tessuto pericardico è mantenuto in sede sia dall'adesione della base alla cupola diaframmatica e dell'apice tronco al peduncolo, sia da tralci fibrosi che lo uniscono agli organi vicini; questi ultimi rappresentano i legamenti del pericardio.

Il pericardio fibroso è costituito da tessuto connettivo denso a fasci intrecciati, che profondamente continua con la lamina propria della sierosa, particolarmente ricca di fibre elastiche. Lo *strato sieroso* è tappezzato da cellule mesoteliali appiattite, le quali hanno la superficie libera coperta da un sottile velo liquido (*liquido pericardico*) [11].

### 1.3.2 Applicazioni del pericardio come biomateriale

Il pericardio è un tessuto biologico ampiamente utilizzato come biomateriale per applicazioni in ingegneria tessutale, per la ricostruzione di una varietà di bioprotesi come innesti vascolari, patch per la ricostruzione di pareti vaginali e addominali, e più frequentemente, per valvole cardiache.

Come anticipato, attualmente in commercio sono presenti bioprotesi valvolari cardiache preparate con pericardio bovino o suino. Sono stati valutati e utilizzati nella pratica clinica tessuti pericardici provenienti anche da altre specie animali come cavalli, struzzi o canguri. Tuttavia tali innesti esogeni provocano diversi problemi, principalmente per risposta immunitaria. Gli allografts, che sono la principale fonte per la costruzione di protesi biologiche in uso, devono subire protocolli di decellularizzazione prima di essere utilizzati, in modo da ridurre la risposta dell'ospite. Esistono diverse procedure per la rimozione dei residui cellulari, la cui scelta influenza le proprietà meccaniche del tessuto, la sua integrità e lo sviluppo di calcificazione a lungo termine.

Il pericardio è stato in gran parte utilizzato per applicazioni cardio-vascolari e per valvole cardiache e per il trattamento di patologie cardiache acquisite, come i difetti postinfartuali del setto, per la ricostruzione dell'anello della valvola mitrale o per l'ostruzione del flusso. Inoltre il pericardio è stato utilizzato anche per il trattamento di difetti che non riguardano il cuore, come ad esempio per la tracheoplastica, per la riparazione di tendini e difetti delle pareti addominali e toraciche [12].

In generale, la disponibilità di questo tessuto ha catturato l'attenzione di numerosi chirurghi: di fatto, però, è difficile trovare tessuti pericardici umani e per questo motivo, in ambito clinico, vengono utilizzati quelli di origine animale.

A lungo, il pericardio bovino è stato considerato un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle bioprotesi; tuttavia, da studi presenti in letteratura, è stato dimostrato che le protesi in pericardio bovino hanno una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, comporterebbe una maggiore durata della valvola stessa [13].

Oggi, in ambito cardiovascolare, il pericardio bovino è il materiale di elezione per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi cardiache, sia tradizionali che percutanee. Tali valvole biologiche sono costruite ex-novo utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene ed uno spessore tissutale costante [14].

Si vuole adesso procedere con un excursus per descrivere alcuni prodotti realizzati dalle più grandi società biomedicali del mondo, utilizzando pericardio bovino o porcino.

Il primo prodotto descritto è il *Veritas Peristrips® Dry* (Fig. 1.10). È un nuovo materiale rimodellabile ideato per aumentare la resistenza della linea di sutura, favorendo il naturale processo di guarigione dei tessuti [15].



**Fig. 1.10 – Matrice di collagene Veritas per suturatrici circolari fabbricato da Synovis Life Technology.**

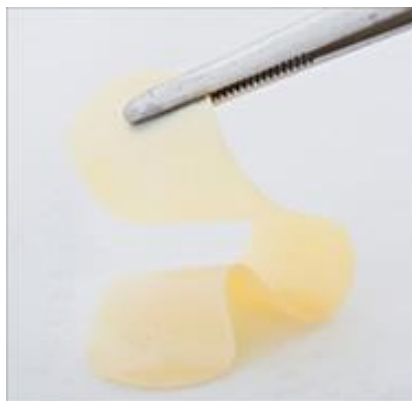
Nella pratica clinica, per la riparazione di tessuti molli, ernie e difetti nelle pareti addominali e toraciche vengono utilizzati [16,17]:

- *Peripatch®* *Implantable surgical tissue*: patch costituito da tessuto bovino prelevato da un'area uniforme del pericardio dopo essere stato trattato chimicamente; questo tipo di matrice è utilizzata anche per la riparazione e ricostruzione cardiaca;
- *Tutomesh®*: agisce come una struttura per la chiusura del difetto; per avere un buon rimodellamento è necessario che la mesh sia ben aderente al tessuto vitale (Fig. 1.11);



**Fig. 1.11 - A sinistra: Peripatch costruito da Neovasc Inc; a destra: Tutomesh realizzato da Tutogen medical GmbH.**

Il *Peripatch®* *biologic vascular patch* (Fig. 1.12), invece, è utilizzato per endoarteriectomie e per la ricostruzione vascolare. È costituito da un tessuto bovino, è molto maneggevole, resistente e semplice da suturare [16].



**Fig. 1.12 – Patch vascolare prodotto da Neovasc Inc.**

Per la realizzazione di sostituti valvolari sono stati realizzati numerosi prodotti (Fig. 1.13 e Fig. 1.14), tra cui:

- *Percevals<sup>®</sup> aortic valve*: è una valvola di nuova generazione sutureless per la chirurgia a cuore aperto. Senza la necessità di suture, questa valvola semplifica la tecnica chirurgica; non richiede decalcificazione e ciò riduce ulteriormente i tempi chirurgici;
- *Mitroflow<sup>®</sup> pericardial aortic valve*: questo tipo di valvola ha un buon profilo emodinamico, un'ampia apertura e un'azione sincrona dei lembi; è piccola, versatile e offre buoni risultati clinici a lungo termine;
- *Freedom solo<sup>®</sup>*: è una valvola che funziona bene in esercizio, grazie all'assenza di un supporto rigido; offre un recupero veloce e completo della massa ventricolare sinistra e ripristina la funzione cardiaca in modo efficace [18].



Fig. 1.13 – A sinistra: Percevals; al centro: Mitroflow; a destra: Freedom solo (tutte realizzate da Sorin).

- *Carpentier-Edwards Perimount<sup>®</sup> Magna Ease Aortic Heart Valve*: è realizzata come sostituto della valvola aortica; ha un basso profilo valvolare, ciò rende semplice l'inserimento; offre una forma anatomica ottimale e possiede dei marcatori di sutura per favorirne l'alloggiamento;
- *Carpentier-Edwards Perimount<sup>®</sup> Magna Mitral Ease Heart Valve*: utilizzato come sostituto della valvola mitrale; offre una buona prestazione e durata; ha un profilo valvolare ultrasottile che ottimizza il deflusso emodinamico e il flusso fisiologico [19].



Fig. 1.14 – A sinistra: Magna Ease Aortic; a destra: Magna Mitral Ease (Edwards Lifesciences).

#### 1.4 Obiettivi e motivazioni della tesi

Il lavoro sperimentale proposto prevede l'analisi delle proprietà fisiche e meccaniche del pericardio bovino e porcino per la fabbricazione di protesi valvolari transcutanee. In particolare sono state studiate le caratteristiche biomeccaniche attraverso prove di trazione mono-assiale, con l'utilizzo del Sistema *Bose ElectroForce*.

Gli obiettivi di tale lavoro sperimentale sono molteplici:

- confrontare la resistenza meccanica a trazione del pericardio bovino con quello porcino e valutare quale dei due tessuti abbia migliori proprietà dal punto di vista biomeccanico;
- valutare e selezionare le zone tessutali all'interno del pericardio, sia bovino che porcino, che appaiono più adatte alla produzione di sostituti valvolari, in quanto più resistenti.

Per una caratterizzazione completa del tessuto vengono misurati spessore, area e densità e come parametro d'interesse biomeccanico viene stimato il *modulo elastico*. Nel lavoro, vengono utilizzati in particolare 4 tipologie di pericardio:

- pericardio bovino nativo e pericardio porcino nativo;
- pericardio bovino dopo *trattamento di decellularizzazione TRICOL*;
- pericardio bovino dopo *trattamento di decellularizzazione TRITDOC*.

I due processi di decellularizzazione sviluppati dal gruppo di ricerca del prof. Gerosa del Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari e del prof. Spina del Dipartimento di Scienze Biomediche, entrambi dell'Università di Padova, si differenziano per il tipo di detergente utilizzato.

Il *TRICOL* prevede l'uso combinato di due detergenti: il Triton X-100 e il Sodio Colato ed elimina effettivamente cellule e citomembrane, preservando l'endotelio della membrana basale e la texture della matrice extracellulare. Dalle analisi chimiche, meccaniche e strutturali si deduce che i tessuti con il trattamento *TRICOL* esibiscono un comportamento entro i limiti fisiologici, con potenziale di calcificazione molto basso [20,21,23].

Il *TRITDOC*, invece, utilizza il Triton X-100 e il Taurodeossicolato. Anche questo tipo di trattamento è capace di produrre uno scaffold poroso, privo di cellule e detriti cellulari e non altera sostanzialmente l'architettura della matrice e l'organizzazione delle fibre di collagene [5].

In *Appendice* i due trattamenti di decellularizzazione sono riportati in dettaglio. Entrambi sono trattamenti innovativi che superano i limiti di calcificazione e degenerazione che caratterizzano le valvole trattate con glutaraldeide. Nonostante gli studi che prevedono un uso ridotto di glutaraldeide (0.05 %) [22], il suo rilascio in forma non reagita provoca comunque problemi come citotossicità e risposta infiammatoria.

Si vogliono quindi confrontare le prestazioni meccaniche dei pericardi trattati con le due tecniche e confrontarle con quelle del tessuto nativo. Ogni pericardio viene diviso in zone secondo una precisa topografia: vengono effettuati confronti tra le varie zone di uno stesso pericardio e tra le zone corrispondenti di pericardi trattati diversamente.

Il sistema Bose ElectroForce viene utilizzato in due configurazioni che si differenziano per l'uso del motore e per la posizione della cella di carico. Vengono effettuate due tipologie di prove: in un caso, il tessuto pericardico viene sottoposto ad un carico ciclico preceduto da una fase di pre-tensionamento, che permette al tessuto di distendersi; nel secondo caso, il tessuto viene sottoposto soltanto ad un carico ciclico.

## **MATERIALI E METODI**

### **Gli strumenti e le fasi della sperimentazione**

#### *2.1 Il Sistema Bose ElectroForce*

ElectroForce Systems Group appartiene alla multinazionale Bose, dalla sua origine impegnata nel campo della ricerca e dell'innovazione, che fornisce apparecchiature di test anche per applicazioni legate allo sviluppo di prodotti cardiovascolari. Queste apparecchiature offrono prestazioni eccellenti per l'applicazione di test su biomateriali, tessuti molli e materiali ingegnerizzati. In particolare, con il sistema disponibile presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Industriale, è possibile eseguire con elevata precisione prove di trazione/compressione mono-assiale su tessuti biologici, utilizzando da uno a quattro motori lineari disposti secondo opportune configurazioni. Con il sistema Bose, inoltre, è possibile sottoporre il materiale biologico a test di torsione assiale e caratterizzazione dinamica, grazie alla possibilità di riprodurre le condizioni fisiologiche del corpo umano.

##### *2.1.1 Componenti principali del sistema*

Il sistema *Bose ElectroForce* è costituito da due motori lineari a magnete permanente, posizionati su un banco di prova (Fig. 2.1). Per le prove di trazione vengono utilizzate due *grip* in titanio, molto leggere, tra le quali si inserisce il campione da testare. Affinché il campione abbia un buon ancoraggio e non 'scivoli' tra le *grip* si utilizzano quattro pezzetti di legno di balsa di dimensioni 10 x 5 mm<sup>2</sup>. La balsa viene collocata all'estremità del campione proprio dove avviene l'ancoraggio con la pinza. Il tessuto viene a trovarsi compreso tra i due pezzi di legno [24].

Per fornire al campione un ambiente simil-fisiologico tale da mantenere un comportamento analogo a quello naturale, viene utilizzato un bagno salino (Fig. 2.2) in plexiglass trasparente, di dimensioni 30x20 cm<sup>2</sup>, riempito con circa 7 litri di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%).

Le *grip*, di circa 57 grammi, vengono montate all'interno della vasca in modo da tenere il tessuto idratato per tutta la durata della prova. Esse hanno una capacità resistente di circa 450 N (100 lb); in generale la loro temperatura di esercizio varia tra i -150°C e i 350°C.



La larghezza massima che può avere il campione è di 12,5 mm e 8,4 mm è lo spessore massimo del provino.

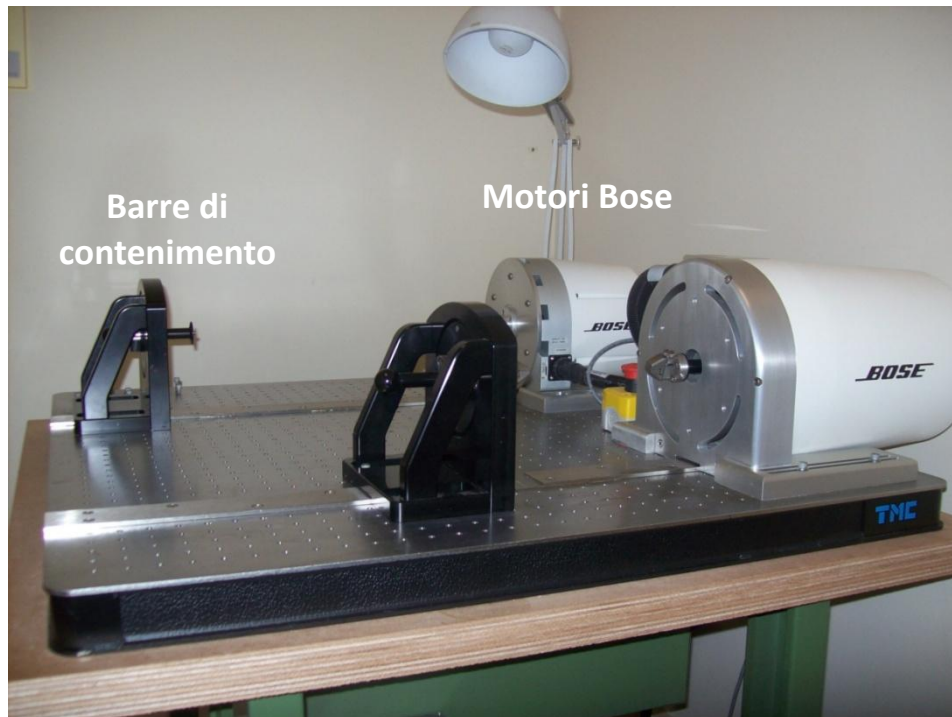


Fig. 2.1 – Il Sistema Bose utilizzato per le prove di trazione.

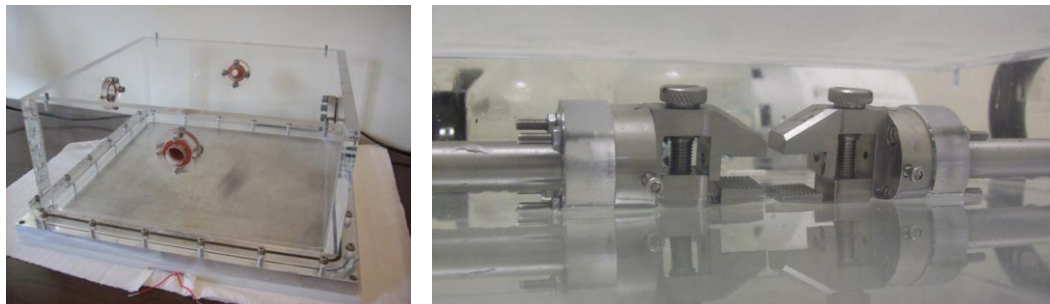


Fig. 2.2 – Il bagno salino e il particolare delle grips in assenza del campione.

Per rilevare e misurare la resistenza a trazione ad intervalli di tempo costanti vengono utilizzati i trasduttori, o *celle di carico*, costruite in acciaio inossidabile. Il loro campo di misura varia da 250 g a 450 N e sono già pre-calibrate all'acquisto [25].

Nelle prove sperimentali vengono utilizzate due tipi di celle di carico (Fig. 2.3): una da 100 lb e una da 50 lb. Quella da 100 lb viene utilizzata fuori dal bagno salino e montata alla barra di contenimento del motore; quella da 50 lb, montata ad una delle due pinze, viene immersa in soluzione fisiologica con il campione.



Fig. 2.3 – Cella di carico da 50 lb.

### 2.1.2 Il software WinTest

Il sistema Bose è accompagnato dal software *WinTest* [26] che possiede un'interfaccia grafica intuitiva e consente all'utente di impostare rapidamente le routine di prova con un minimo di formazione. Può essere configurato per l'esecuzione di un'ampia gamma di test.

La prima finestra che viene visualizzata quando si avvia il software è la "Project Windows", che contiene i menu per settare tutti i parametri necessari per la prova. Il software contiene numerose finestre, quali "Group Windows", "Scope Windows" e "Meters" (Fig. 2.4).

La "Group Windows" include i menu e le funzioni necessarie per l'inizio e la fine del test. In particolare, il comando *Local* consente l'accensione e lo spegnimento dei motori. Il tasto *Run* permette l'avvio del test di prova, invece, *Stop Level* l'arresto della prova (Fig. 2.5).

Con la "Scope Windows" è possibile visualizzare l'andamento delle grandezze desiderate nel corso della prova. Si può visualizzare, ad esempio, il carico in funzione dello spostamento oppure in funzione del tempo.

"Meters" sono piccole finestre in cui è possibile visualizzare i valori della forza e dello spostamento, utili anche per controllare se il sistema sta eseguendo il comando. All'inizio di ogni prova i valori delle "Meters" devono essere portati a zero.

Altro importante parametro da regolare all'inizio della prova è la scala del tempo. Si può cliccare sulla barra *TimeSeconds* della "Scope Windows", se il tempo è stato selezionato per l'asse x, oppure si può cliccare su *Scans* e poi su *Time* e immettere il numero di secondi e quello dei dati che si vogliono rappresentare durante tutta la scansione.

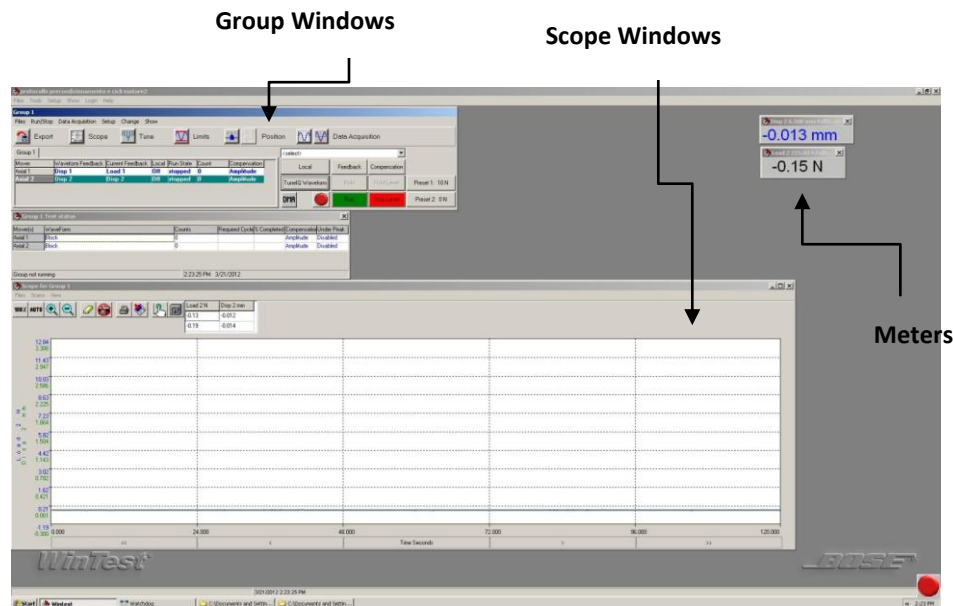


Fig. 2.4 – Schermata principale del software e indicazione delle finestre di lavoro.

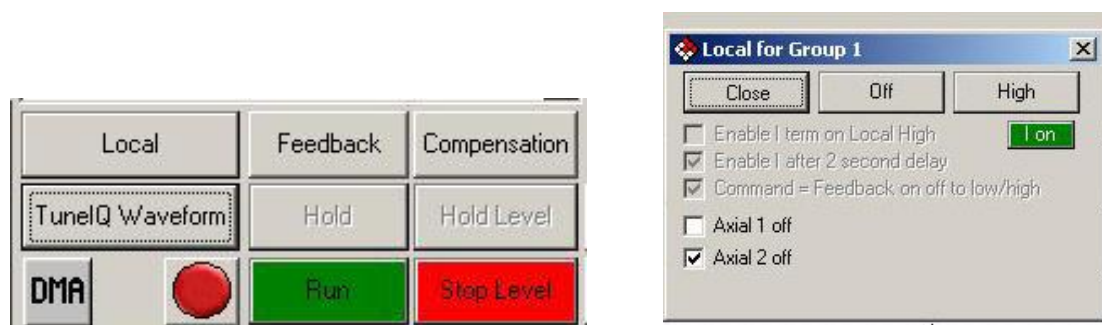


Fig. 2.5 – A sinistra: i principali comandi della “Group Windows”; a destra: la finestra che appare quando si clicca su Local, utile per l’accensione e lo spegnimento dei motori.

Prima di cominciare un test viene creato un protocollo, detto “Project File”, in cui vengono inserite tutte le informazioni necessarie per la prova, come la velocità di deformazione del campione, la forma d’onda desiderata oppure il tipo di grandezza che si vuole comandare. La prova, infatti, può essere effettuata comandando la forza oppure lo spostamento. Questo file viene creato cliccando sul *TunnelQ Waveform* della “Group Windows” (Fig. 2.6).

Il sistema offre un’ampia gamma di test: per questo motivo si possono avere più file di progetto. In particolare, in questo lavoro sono stati utilizzati due project file con specifiche diverse, descritte nel paragrafo *Procedura Sperimentale*.

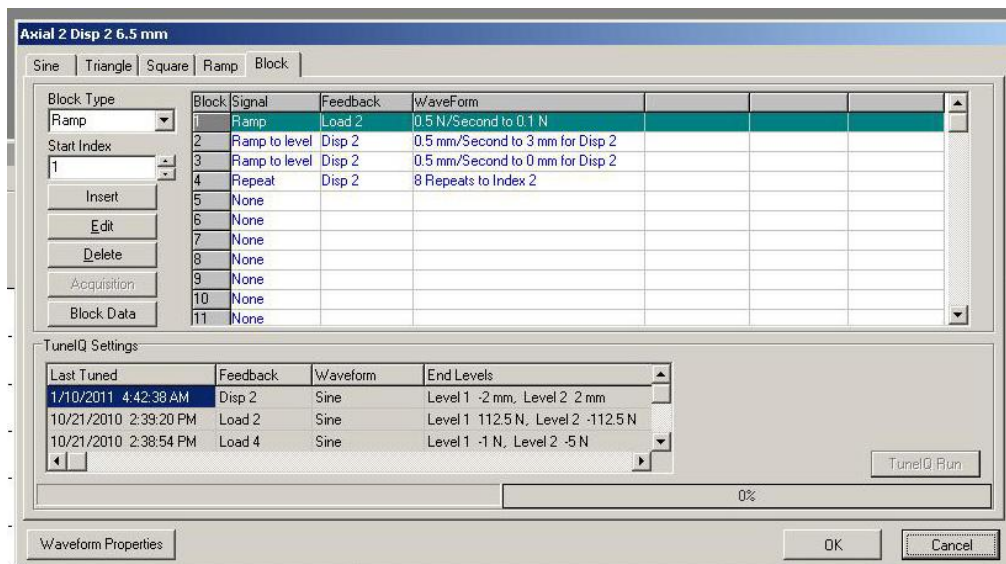


Fig. 2.6 – Finestra per la compilazione del "Project File".

Una volta completata la prova, i dati vengono salvati in un file .txt che contiene in particolare 4 colonne, una per ogni grandezza considerata: numero dei punti acquisiti, tempo [sec], carico [N] e spostamento [mm].

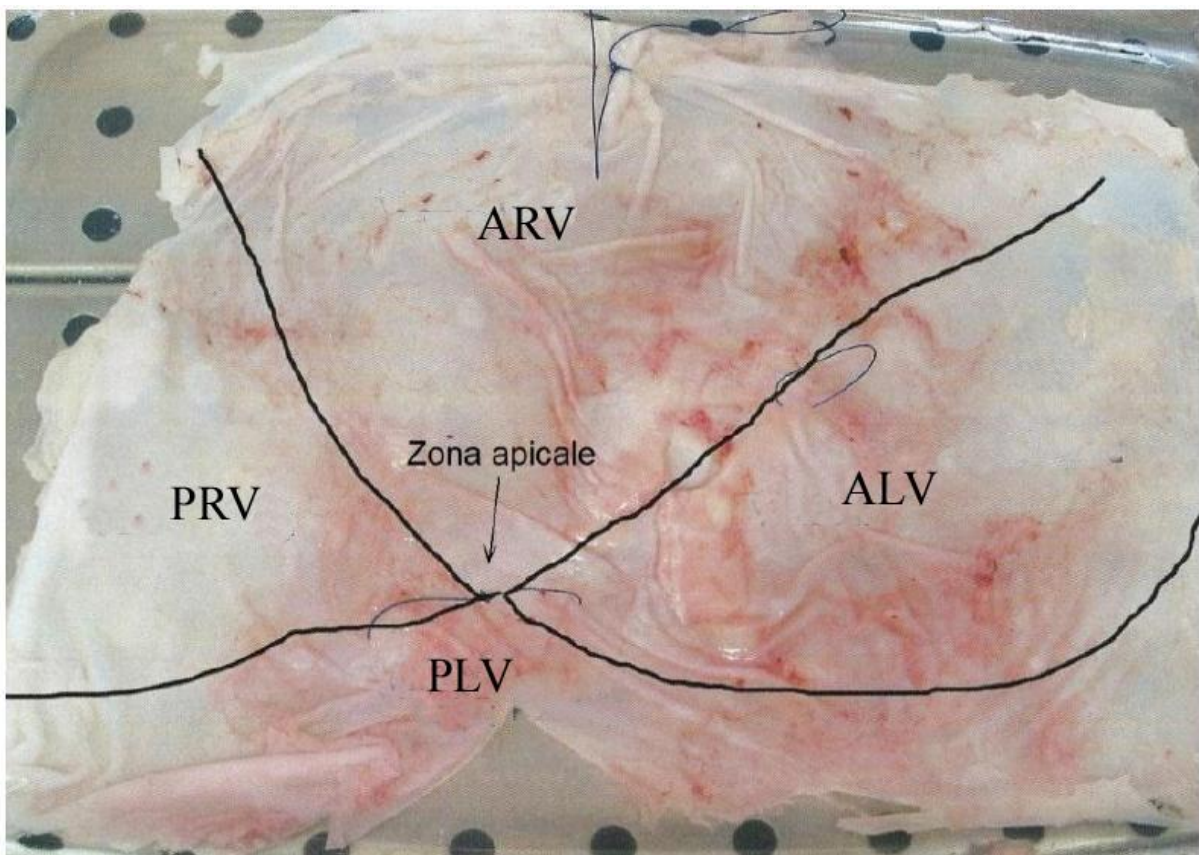
## 2.2 Prelievo e trattamento dei campioni

Il tessuto pericardico viene prelevato da vitelli e suini direttamente al macello dopo il loro sacrificio. Una volta prelevati, i tessuti vengono trasportati in laboratorio dentro a sacche d'organo contenenti una soluzione sterile di PBS (Phosphate Buffered Saline).

Seguendo alcuni studi trovati in letteratura [13,14], viene deciso di utilizzare la parte del pericardio che ricopre la porzione *ventricolare* del cuore, che appare quella con maggiore uniformità di spessore rispetto alla porzione atriale. Sacks et al, infatti, utilizzarono la *small-angle light scattering* (SALS), tecnica ottica non distruttiva, per valutare l'architettura delle fibre di 20 sacchi pericardici bovini. L'architettura delle fibre viene descritta in termini di direzione preferenziale delle fibre, grado di orientamento e asimmetria della distribuzione angolare delle fibre. Uniformità ed omogeneità del tessuto sono fondamentali per l'applicazione bioprotesica.

Il tessuto 'aperto' e disteso su un piano orizzontale, viene diviso in quattro aree di interesse (Fig. 2.7), in base alla camera cardiaca che esso ricopre:

- ventricolo posteriore destro (*PRV*): porzione che ricopre la faccia posteriore del ventricolo destro;
- ventricolo posteriore sinistro (*PLV*): porzione che ricopre la faccia posteriore del ventricolo sinistro;
- ventricolo anteriore destro (*ARV*): porzione che ricopre la faccia anteriore del ventricolo destro;
- ventricolo anteriore sinistro (*ALV*): porzione che ricopre la faccia anteriore del ventricolo sinistro.



**Fig. 2.7 – Il pericardio aperto, posto su un piano orizzontale e suddiviso in 4 zone.**

Un riconoscimento preliminare delle zone avviene al macello, quando il cuore dell'animale è ancora in sede ed in particolare viene marcato il confine tra la porzione anteriore e quella posteriore del pericardio. Per i due tessuti, bovino e porcino, vengono selezionate ed escluse zone diverse del pericardio, in base alla disposizione delle fibre di collagene. Di seguito vengono analizzate separatamente le due parti sperimentali, mettendo in evidenza le motivazioni che hanno spinto alla scelta di una zona pericardica piuttosto che un'altra.

Dal gruppo di ricerca del prof. Gerosa del Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari e del prof. Spina del Dipartimento di Scienze Biomediche, entrambi dell'Università di Padova, sono stati effettuati studi sulla disposizione ed organizzazione delle fibre di collagene nelle varie zone del pericardio bovino e porcino. Il tessuto è stato colorato con il *Picrosirius Red*, colorante utilizzato per evidenziare le fibre di collagene. Il Picrosirius Red, in particolare, è una molecola colorante che reagisce con il collagene e promuove un miglioramento della sua normale birifrangenza, dovuta al fatto che molte molecole di colorante sono allineate in parallelo con l'asse longitudinale di ogni molecola di collagene. L'aumento della birifrangenza promossa dal metodo di polarizzazione Picrosirius è quindi specifico per le strutture di collagene composte da aggregati di molecole orientate. È un metodo estremamente semplice, affidabile, economico e sensibile, e presenta il vantaggio di consentire una facile e precisa localizzazione e caratterizzazione dei componenti del tessuto, permettendo così una stretta correlazione tra osservazione morfologica e istochimica [27].

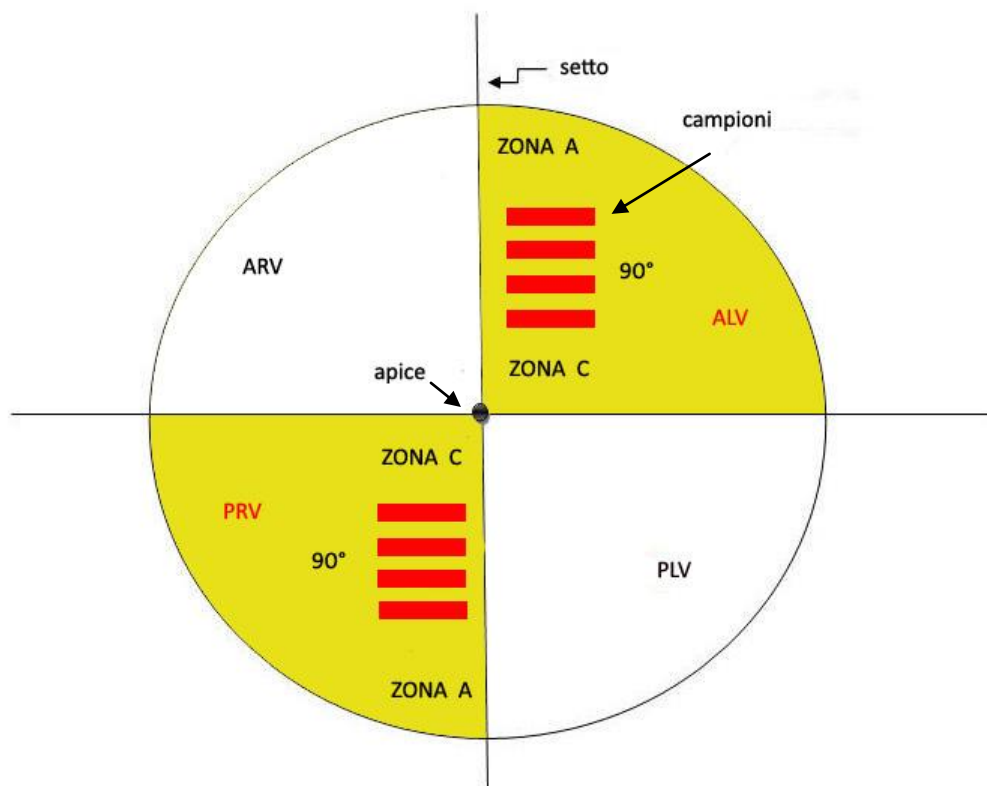
### *2.2.1 Pericardio bovino*

L'osservazione sotto luce polarizzata del tessuto pericardico bovino ha mostrato delle differenze sostanziali nell'organizzazione delle fibre: in particolare, nell'ALV le fibre sono disposte in direzione parallela a quella di osservazione e i fasci sono organizzati in modo da formare strutture ondulate distinguibili. Questa zona presenta un andamento più regolare delle fibre di collagene. Nel PRV, invece, le fibre sembrano formare un reticolo intrecciato con angolature diverse. Nelle altre due zone, le fibre non hanno una direzione preferenziale e presentano un comportamento intermedio rispetto alle altre due zone [5,28].

Da questi approfondimenti, l'ALV, che presenta un'organizzazione delle fibre collagene più ordinata, e il PRV che presenta dati fisici di densità, spessore e contenuto d'acqua più variabile tra gli individui e con una configurazione fibrosa non omogenea, vengono scelti come aree di prelievo dei campioni. Si vuole così valutare se le diversità strutturali delle due zone scelte determinano differenti caratteristiche meccaniche. ARV e PLV vengono esclusi dall'analisi mentre ALV e PRV vengono suddivisi a loro volta in due sottozone, A e C. La zona vicina all'apice del cuore viene denominata Zona C, invece la zona distante dall'apice, cioè quella verso gli atri, viene denominata Zona A. Prima di tagliare i provini, si è eliminato lo strato di tessuto adiposo presente sul tessuto pericardico.

Per ogni Zona A e C del pericardio vengono tagliati, con un bisturi, 6 campioni di tessuto di forma rettangolare di dimensioni 20 x 3 mm<sup>2</sup>. Non conoscendo esattamente l'orientamento delle fibre di collagene del tessuto pericardico sarebbe più accurato tagliare i campioni orientandoli in 3 direzioni: paralleli all'asse interventricolare (0°, orizzontali), perpendicolari a quelli orizzontali (90°, verticali) e inclinati di 45° (diagonali) (Fig. 2.8) [29].

I campioni però vengono tagliati soltanto in direzione perpendicolare al setto, prendendo come riferimento diversi studi trovati in letteratura [34,35], i quali affermano che la direzione scelta, definita "circonferenziale", ha una maggiore resistenza alla trazione e maggior rigididezza.



**Fig. 2.8 –** Divisione del pericardio bovino nelle quattro zone (ARV, ALV, PRV, PLV) e visualizzazione delle zone A e C e dell'orientamento considerato per il taglio dei campioni.

Le prove sperimentali vengono organizzate in due configurazioni:

- Prima configurazione: il tessuto viene sottoposto ad una fase di pre-tensionamento seguito da 8 cicli di carico. Vengono analizzati 6 pericardi provenienti da bovini diversi, di cui 2 lasciati nativi e immediatamente utilizzabili per l'analisi delle caratteristiche fisiche e biomeccaniche; gli altri 4 vengono sottoposti a trattamenti di decellularizzazione TRICOL e TRITDOC, 2 per ogni trattamento, e vengono utilizzati

dopo aver completato i vari steps che portano all'eliminazione dei residui cellulari dalla matrice extracellulare;

- Seconda configurazione: il tessuto viene sottoposto soltanto ad 8 cicli di carico, senza pre-tensionamento. Vengono analizzati 9 pericardi diversi: 3 lasciati nativi e 6 sottoposti a processi di decellularizzazione TRICOL e TRITDOC. In questa configurazione viene analizzato un unico pericardio dal quale vengono estratti 18 campioni per ogni zona A e per ogni zona C, sia PRV che ALV, per un totale di 72 campioni, di cui 48 vengono sottoposti a processi di decellularizzazione TRICOL e TRITDOC; i restanti 24 vengono lasciati nativi.

**Tabella 2.1 – Schema del numero di pericardi bovini analizzati nel lavoro sperimentale.**

	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
Pericardio con pre-tensionamento	2	2	2
Pericardio senza pre-tensionamento	3	3	3
Pericardio "in parallelo" senza pre-tensionamento	1	1	1

### 2.2.2 Pericardio porcino

Grazie al metodo di polarizzazione Picrosirius sono state scelte due zone anche per il pericardio porcino. Dall'osservazione delle fibre di collagene si deduce che ARV è la zona del pericardio porcino che presenta un orientamento più omogeneo, invece, il PRV è la porzione di tessuto più variabile tra gli individui. Le altre due zone, ALV e PLV, presentano caratteristiche intermedie e vengono quindi escluse dall'analisi [28].

Da questo studio, quindi, si decide di considerare la zona 'migliore' (ARV) e quella 'peggiore' (PRV) del tessuto porcino e di verificare le loro differenze dal punto di vista biomeccanico.

Per quanto riguarda l'orientazione per il taglio dei campioni, non sono presenti studi in letteratura che possano suggerire quale dei tre orientamenti (0°, 90°, 45°) sia da preferire. Per questo motivo, all'interno di ogni zona del pericardio prescelta, vengono tagliati 4 campioni di dimensioni 20 x 3 mm<sup>2</sup> per ogni orientazione, in modo da valutare quale dei tre possieda una maggior resistenza alla trazione (Fig. 2.9).

Le prove sperimentali sul pericardio porcino prevedono soltanto una configurazione sperimentale: in particolare, il tessuto viene sottoposto ad 8 cicli di carico, in assenza di



pretensionamento. A causa delle tre diverse orientazioni per il taglio dei campioni è stato difficile realizzare anche la suddivisione in zone A e C.

In totale, sono stati dissezionati quattro pericardi porcini nativi di cui due completi di tutte e quattro le zone, e uno mancante solo della zona PLV.

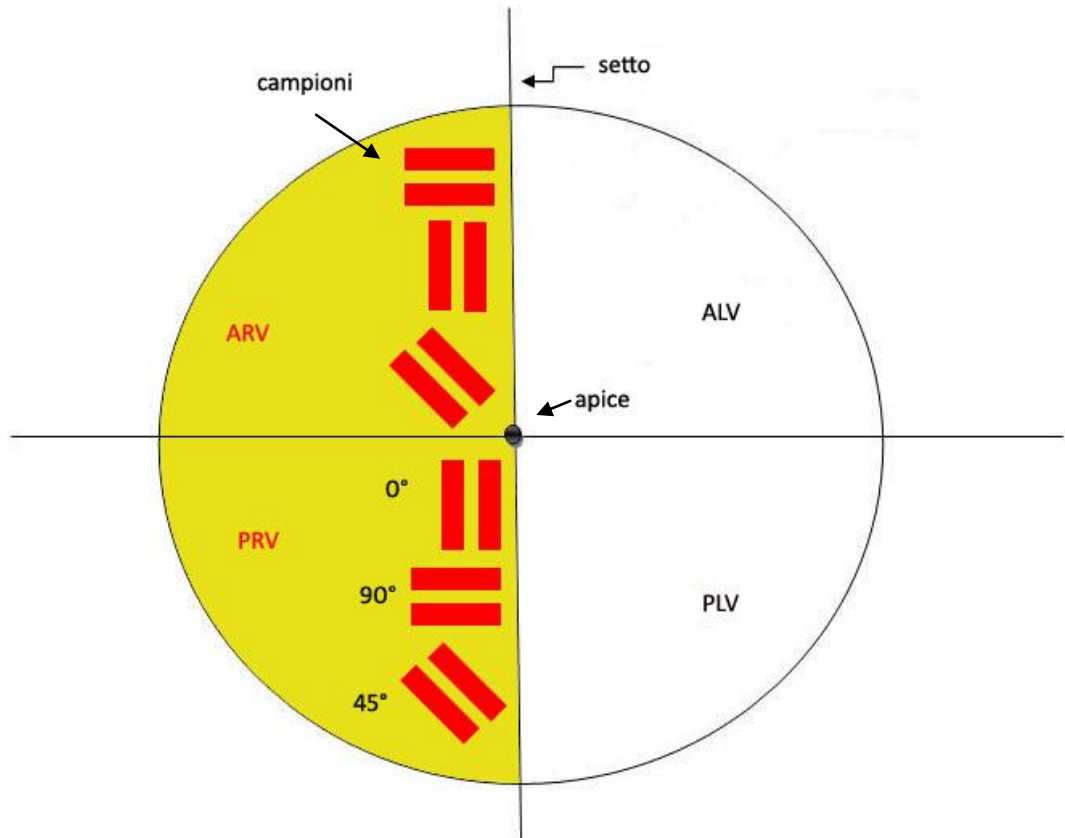


Fig. 2.9 – Schematizzazione del pericardio porcino nelle quattro zone; in giallo le zone considerate per il taglio dei campioni; in rosso i 3 orientamenti (0°, 90°, 45°).

### 2.3 Analisi delle proprietà fisiche dei campioni

Una volta effettuato il taglio dei campioni, si procede con la misura della loro densità e del loro peso presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Padova. Il procedimento per il calcolo della densità prevede la preparazione di soluzioni Percoll-77237 di densità diversa. In particolare, vengono utilizzate 9 soluzioni con una densità che varia da 1,036 g/ml a 1,061 g/ml con una differenza di 0.003 g/ml tra l'una e l'altra. Prima di misurare la densità, i campioni vengono messi sotto vuoto (Fig. 2.10) per circa 2 ore, per eliminare eventuali bolle d'aria presenti nel tessuto.



**Fig. 2.10 – I campioni sotto vuoto.**

I becker contenenti le soluzioni vengono posizionati in ordine crescente a seconda del valore di densità su un piano di lavoro. Per avere una misura più accurata è necessario tenere sempre ben miscelate le varie soluzioni. I campioni di tessuto vengono inseriti in ogni becker partendo dalla soluzione con densità minore. Se il campione tende a precipitare sul fondo del becker, allora esso viene immerso nella soluzione avente densità maggiore. Al contrario quando esso tende a risalire in superficie, viene trasferito nella soluzione con densità minore. Quando il campione rimane galleggiante all'incirca a metà della soluzione, viene assegnato il valore di densità della soluzione in cui è immerso.

Per la pesatura dei campioni si ricorre ad una bilancia analitica (Sartorius Balance Research, Fig. 2.11), che rileva la massa in grammi. Prima della pesatura, ogni campione viene asciugato con carta filtro, posizionato su un vetrino e inserito nello strumento. Ogni campione viene lasciato all'interno della bilancia per circa 2 minuti; dopo questo tempo viene registrato il valore della massa.



**Fig. 2.11 – La bilancia utilizzata per la pesatura dei campioni.**

Le altre caratteristiche fisiche dei campioni misurate sono: area, larghezza, volume, spessore e sezione.

Ogni campione viene fotografato prima dell'esperimento e ogni immagine viene analizzata con il software ImageJ. Per ogni campione fotografato viene selezionato il bordo e utilizzando un nonio accanto al campione, viene ricavata la misura dell'area 'frontale' del provino, misurata in  $\text{cm}^2$  (Fig. 2.12).

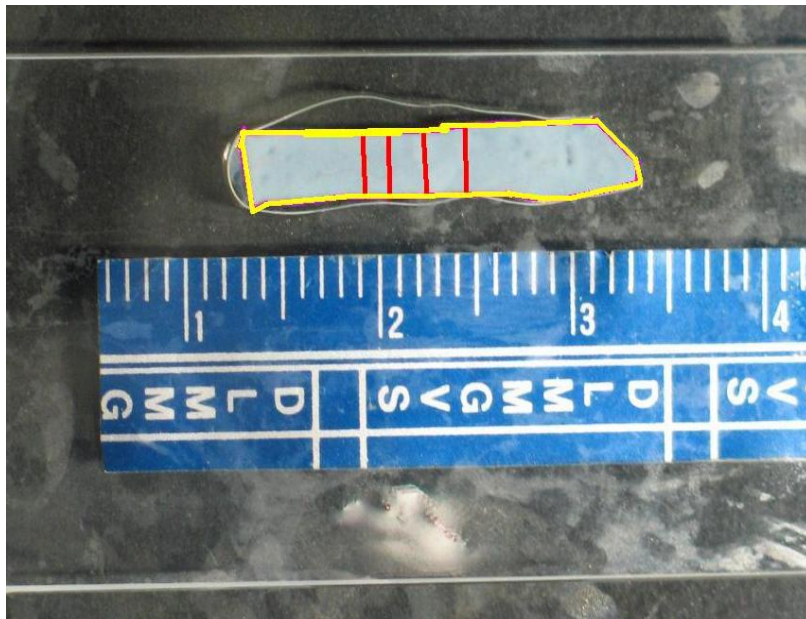


Fig. 2.12 – Esempio di campione di pericardio bovino nativo affiancato al nonio.

ImageJ viene utilizzato anche per il calcolo della *larghezza* effettiva di ogni campione. I campioni vengono tagliati a mano con un bisturi, per questo motivo non sempre sono esattamente di 3 mm di larghezza. Dalle foto si misurano quattro valori di larghezza al centro del campione e poi viene calcolato un loro valore medio. Nella precedente figura il contorno del campione viene rappresentato con una linea gialla, per le quattro misure di larghezza si utilizza una linea rossa.

Il volume di ogni campione dipende dalle grandezze appena descritte secondo la relazione:

$$\text{Volume} = \text{Peso}/\text{Densità}$$

Dimensionalmente risulta:

$$[\text{cm}^3] = [\text{g}]/[\text{g}/\text{cm}^3]$$

Lo spessore viene calcolato con volume e area applicando la relazione:

$$\text{Spessore} = \text{Volume}/\text{Area}$$

Dimensionalmente risulta:

$$[\text{cm}] = [\text{cm}^3]/[\text{cm}^2]$$

La grandezza che viene successivamente utilizzata nel calcolo del parametro biomeccanico di interesse è la sezione del campione, derivante dalla relazione:

$$\text{Sezione} = \text{Spessore} * \text{Larghezza}$$

Dimensionalmente si ottiene:

$$[\text{cm}^2] = [\text{cm}] * [\text{cm}]$$

La misura delle caratteristiche fisiche viene effettuata sia per i campioni nativi che per quelli trattati, per entrambi i tessuti, bovino e porcino.

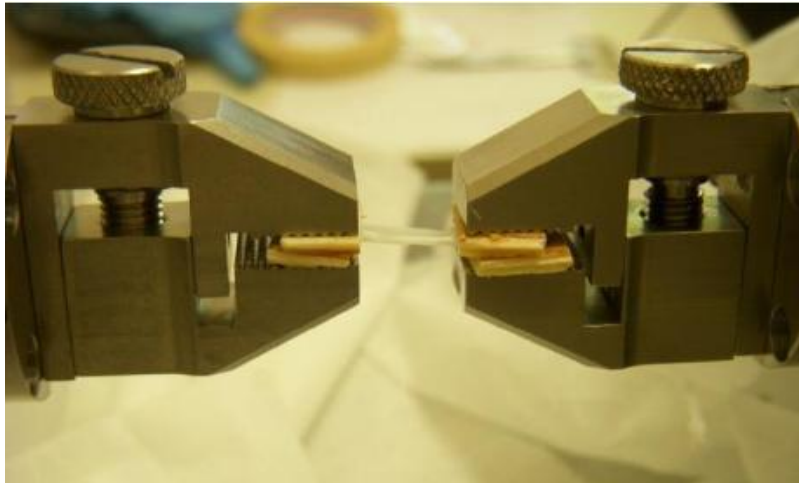
## *2.4 Procedura sperimentale*

La procedura di sperimentazione inizia con il montaggio delle grip e con la collocazione del bagno salino tra il motore e la barra di contenimento. Il bagno salino viene riempito di soluzione fisiologica a temperatura ambiente e viene agganciato con quattro viti al banco di prova. Le grip vengono collegate a barre di alluminio le quali vengono inserite all'interno delle due guarnizioni del bagno salino, in modo da avere le due pinze all'interno della vasca. Attraverso il perno della barra di contenimento, viene regolata la distanza tra le grip ponendola a circa 5 mm. Questa procedura di montaggio delle componenti viene attuata per entrambe le configurazioni del macchinario.

Viene avviato il software WinTest e scelto il protocollo adatto alla procedura sperimentale, impostando la durata della prova a 120 secondi. Tutti campioni, sia bovini che porcini, vengono sottoposti a *prove di trazione monoassiale*. Il provino viene sottoposto ad una tensione unidirezionale, con velocità di deformazione costante. Le prove di trazione servono in genere per la valutazione della rigidità di un materiale (Fig. 2.13).

La porzione di pericardio che è libera dalle grip è di circa 5 mm, l'altra parte del tessuto rimane contenuta sotto le pinze. Le maggiori deformazioni avverranno nella zona centrale

del campione, che sarà quella di analisi dello stato deformativo del materiale. Anche lo stato tensionale che caratterizza la zona centrale di misura è particolarmente favorevole, poiché si assume di tipo mono-assiale, mentre alle estremità del tessuto è di tipo multi-assiale.



**Fig. 2.13 – Esempio di campione di pericardio agganciato ai morsetti delle grip.**

#### *2.4.1 Pericardio bovino*

Di seguito sono descritti gli strumenti e i protocolli utilizzati nelle due configurazioni sperimentali per il tessuto pericardico bovino.

##### *2.4.1.1 Prima configurazione*

Nella prima configurazione del sistema (Fig. 2.14) viene utilizzato il motore da 450 N e la cella di carico da 100 lb, posizionata all'esterno del bagno salino tra la barra di contenimento del sistema e la barra di alluminio su cui viene montata una delle due grip.

In questa configurazione viene utilizzato il seguente protocollo:

- Fase I di pre-tensionamento: il tessuto viene portato ad una tensione iniziale di 0.1 N con un velocità di 0.01 N/s. Non tutti i campioni, purtroppo, vengono montati allo stesso modo in quanto viene utilizzato un tessuto biologico che è alquanto sottile e poco maneggevole. Con questa fase, quindi, si decide di uniformare il comportamento, portando il tessuto ad una conformazione “tesa”, in modo da conoscere la tensione iniziale da cui partono tutti i campioni prima della fase di carico;

- Fase II di carico: viene fissato uno spostamento di 3 mm, pari ad una deformazione del 60%, con una velocità di 0.5 mm/s;
- Fase III di scarico: il tessuto torna alla posizione iniziale corrispondente a 0 mm di spostamento con la stessa velocità di carico;
- Fase IV di ciclo carico-scarico: le fasi II e III vengono ripetute 8 volte in modo da ottenere 8 cicli di carico-scarico.

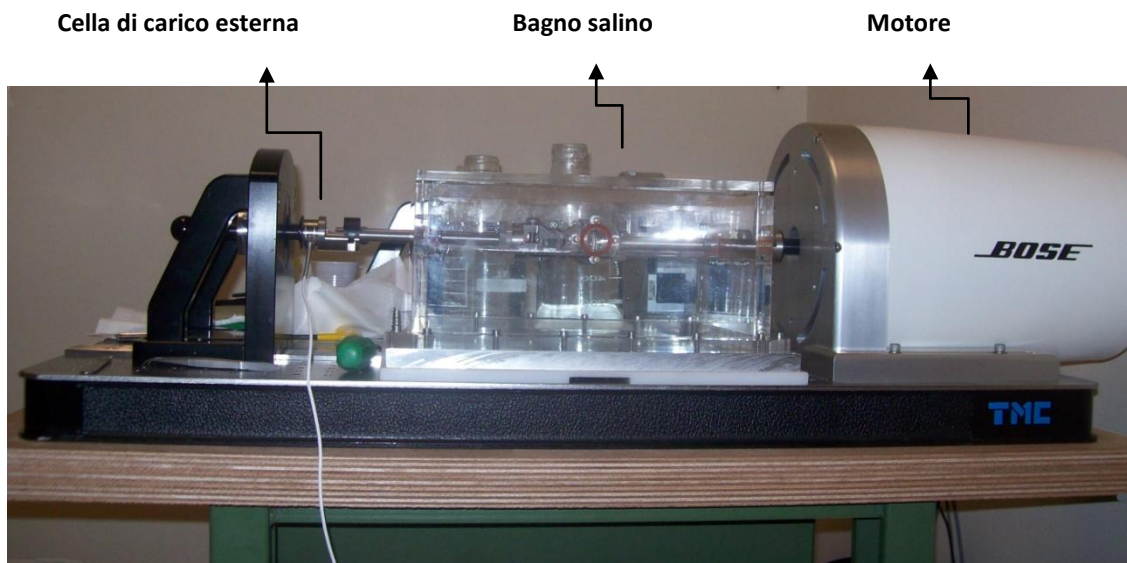


Fig. 2.14 – Visione generale del motore, del bagno salino e della cella di carico.

#### 2.4.1.2 Seconda procedura sperimentale

Nella seconda configurazione (Fig. 2.15) viene utilizzato il secondo motore, che ha potenza minore (225 N) e la cella di carico da 50 lb. In questo caso, il trasduttore viene agganciato ad una delle due grip ed insieme vengono poste in immersione all'interno del bagno salino.

Il protocollo adoperato in questa seconda tipologia di prove è il seguente:

- Fase I di carico: viene impostato uno spostamento di 3 mm, pari ad una deformazione del 60%, con una velocità di 0.5 mm/s;
- Fase II di scarico: le grips tornano alla posizione iniziale corrispondente a 0 mm di spostamento con la stessa velocità della fase di carico;
- Fase III di ciclo carico-scarico: le fasi I e II del protocollo vengono ripetute 8 volte, in modo da ottenere 8 cicli di carico-scarico.

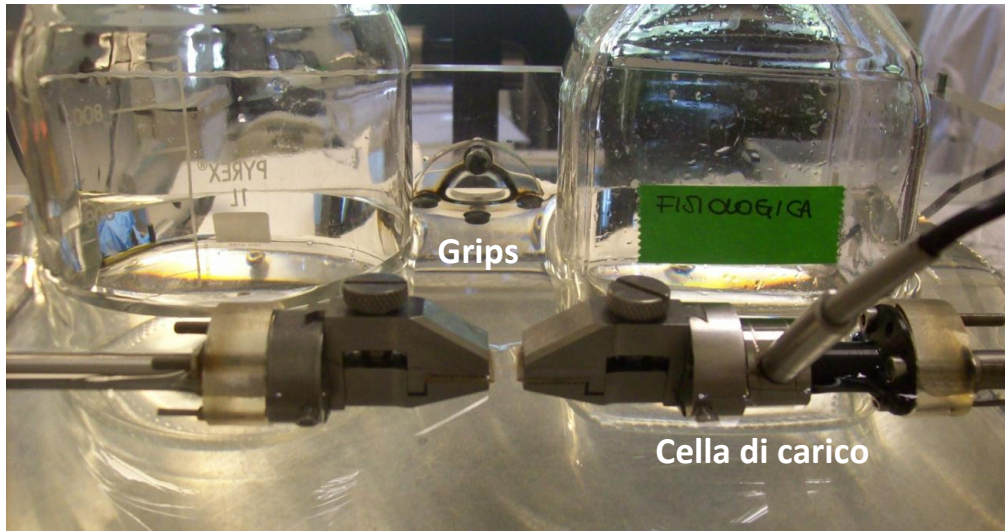


Fig. 2.15 – Visione interna del bagno salino: si notano le due grip immerse in soluzione fisiologica e la cella di carico collegata ad una di esse.

Le differenze tra le due configurazioni del sistema (Tabella 2.2) consistono nella scelta del motore e nella collocazione e capacità della cella di carico. Si vuole valutare, inoltre, se le differenze tra le due configurazioni portano a risultati congruenti o meno.

Tabella 2.2 – Differenze tra le configurazioni del sistema.

	PRIMA CONFIGURAZIONE	SECONDA CONFIGURAZIONE
MOTORE	450 N	225 N
CELLA DI CARICO	100 lb	50 lb
POSIZIONE DELLA CELLA	esterna	interna
PROTOCOLLO	Con pretensionamento	Senza pretensionamento

#### 2.4.2 Pericardio porcino

Per il pericardio porcino viene utilizzata la seconda configurazione del sistema ed il corrispondente ciclo operativo.

Sia il pericardio bovino che quello porcino subiscono quindi carichi meccanici ciclici; si parla così di *precondizionamento*, che assume un ruolo importante nello studio dei tessuti biologici molli. Tale procedura orienta la struttura molecolare dei tessuti portandola al suo orientamento naturale e permettendo ai tessuti di adeguarsi gradualmente al carico. In questo modo il precondizionamento offre una storia di carico nota e i dati ricavati dalle prove meccaniche appaiono consistenti e riproducibili [30,31].

I cicli di preconditionamento utilizzati nelle varie prove sui tessuti biologici, dagli studi in letteratura, variano da un minimo di 3 ad un massimo di 30; per ottenere una risposta ripetibile e consistente pare che siano convenienti almeno 10 cicli di carico-scarico [32].

## 2.5 Determinazione delle curve di interesse

I dati ottenuti dopo ogni singola prova vengono organizzati in quattro colonne: tempo, numero di punti acquisiti, carico registrato e spostamento. Tutti i dati vengono elaborati con Microsoft Excel 2007, per i grafici e i calcoli più semplici; per il calcolo dei parametri di interesse biomeccanico viene utilizzato il software Matlab R2009b.

Tra le curve ritenute importanti per l'analisi biomeccanica del tessuto pericardico vengono tracciate quella della forza vs tempo e dello spostamento vs tempo. Un esempio di curva tipica del pericardio bovino nativo con pre-tensionamento è illustrato in Fig. 2.16: la linea rossa rappresenta il carico in N, quella blu rappresenta lo spostamento in mm.

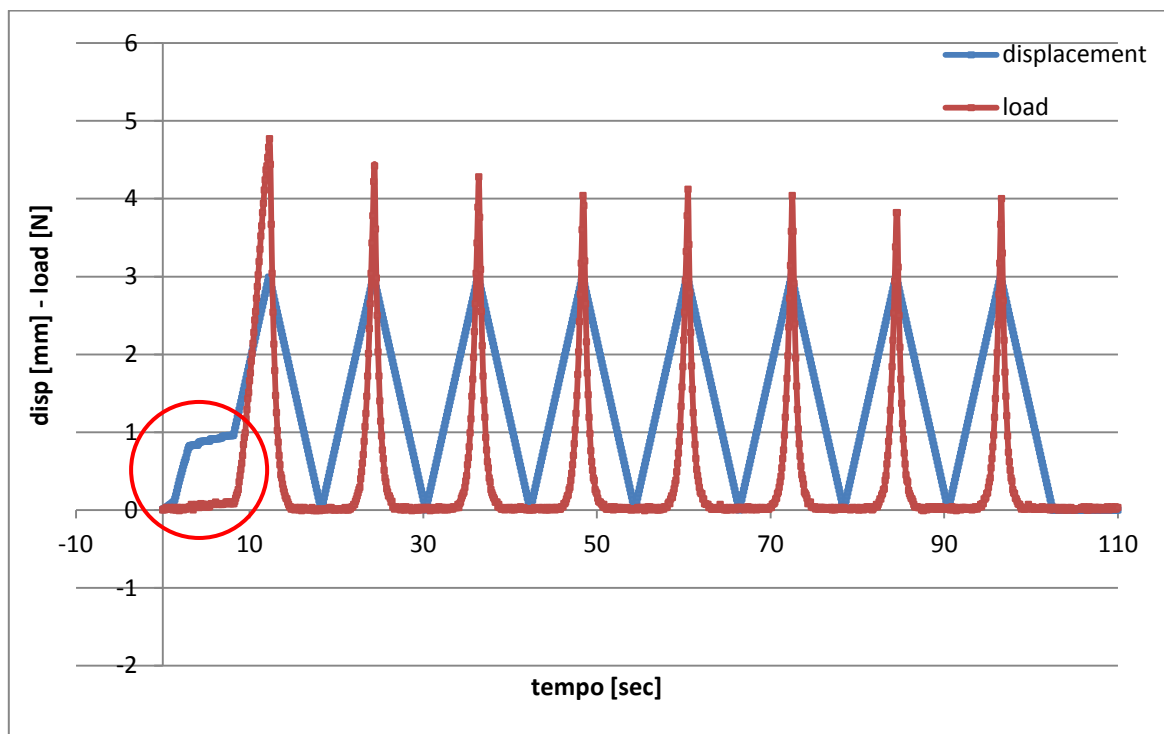


Fig. 2.16 – Esempio di curva spostamento/carico vs tempo di un campione di pericardio bovino nativo con pretensionamento.



Dal grafico è possibile notare gli 8 cicli di carico-scarico; prima che il campione raggiunga lo stato preconditionato sono necessari circa 3 cicli. Dall'andamento del carico e dello spostamento è possibile valutare in modo preliminare se il campione resiste o meno alla trazione. Nella fase iniziale del grafico, inoltre, si può notare una piccola gobba nella curva dello spostamento (nel cerchio rosso) che rappresenta la differenza di andamento tra i campioni pretensionati e no. Questo particolare della curva non si nota nei campioni in assenza del pre-tensionamento, così come mostrato nella Fig. 2.17. La curva nella fase iniziale non subisce alcun aumento del valore di spostamento.

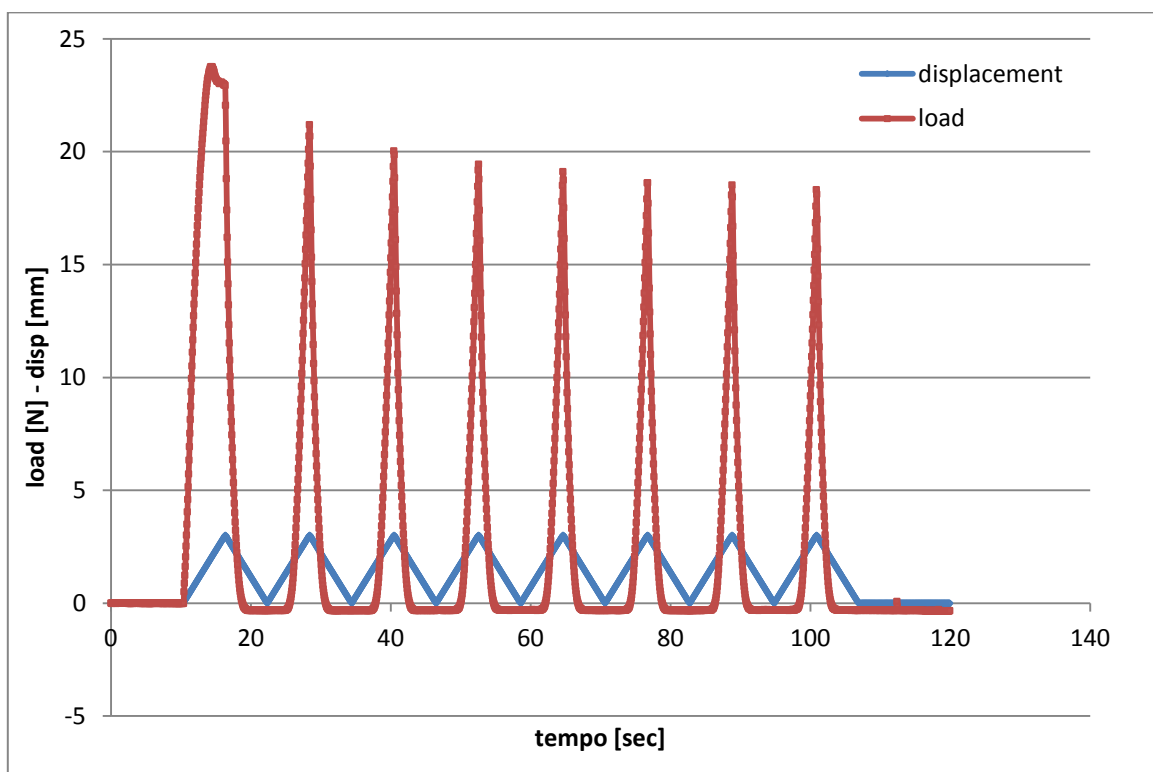


Fig. 2.17 – Esempio di curva curva spostamento/carico vs tempo di un campione di pericardio bovino nativo senza pretensionamento.

Dai file di output vengono estrapolate le colonne relative al carico e allo spostamento e vengono inserite in un nuovo grafico (Fig. 2.18).

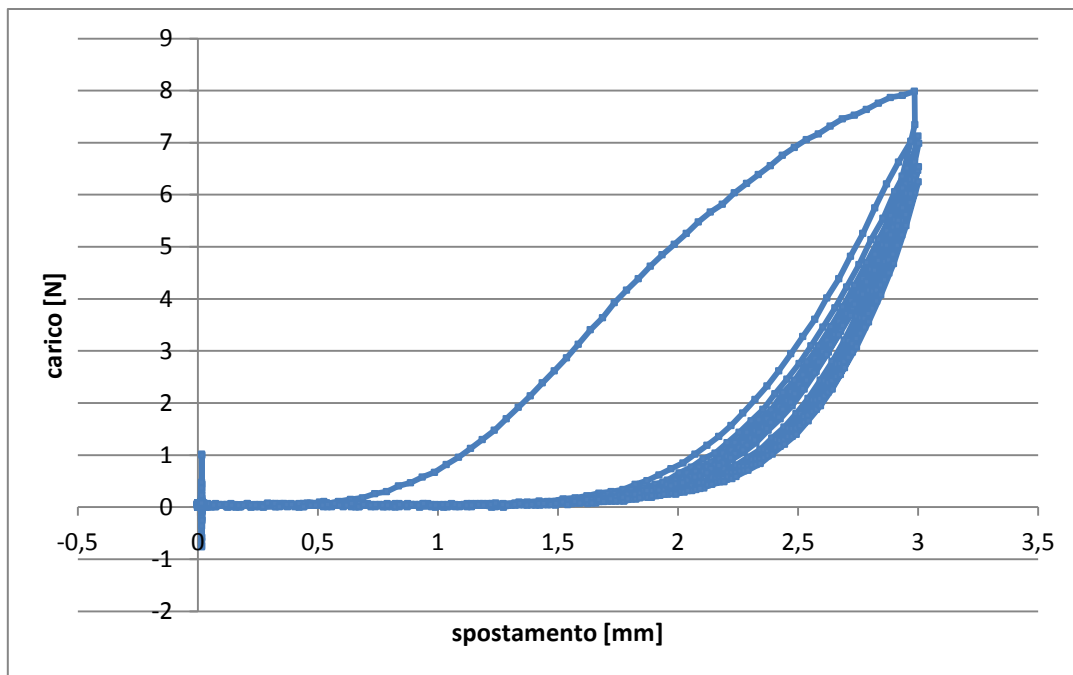


Fig. 2.18 – Andamento del carico vs spostamento di un generico campione di pericardio bovino nativo.

Dal grafico si nota che il primo ciclo è da escludere sicuramente in quanto si discosta molto dagli altri sette. Il carico ripetuto viene indicato appunto dai cicli di sforzo-deformazione che si spostano verso destra, dimostrando il fenomeno di condizionamento del tessuto biologico [30].

Da notare che tutti gli altri cicli si sovrappongono in modo netto, definendo in questo modo un comportamento omogeneo.

Da ogni grafico, carico vs tempo, viene isolato l'ottavo ciclo di carico, in modo da essere sicuri che il comportamento del tessuto si sia uniformato. Questi dati sperimentali vengono approssimati con una polinomiale di sesto grado utilizzando il Curve Fitting Toolbox di Matlab. Nel Toolbox viene poi inserito, per ogni campione, l'intervallo di tempo in cui avviene il cambiamento di concavità della curva e vengono calcolate le derivate prime e seconde della curva in esame. In output viene visualizzata una tabella con sei colonne: valori temporali, valori del fit, valore inferiore e valore superiore del fit, valore della derivata prima e della derivata seconda. Dalla tabella vengono estratte le due righe successive che presentano valori della derivata seconda opposti (uno positivo e uno negativo). (Fig.2.19)

Dai dati iniziali ricavati dalla macchina, vengono prelevati i valori di spostamento e di carico corrispondenti ai valori temporali delle due righe appena citate. Viene calcolato il valor medio dei due valori di spostamento, quest'ultimo rappresenta il punto di flesso.

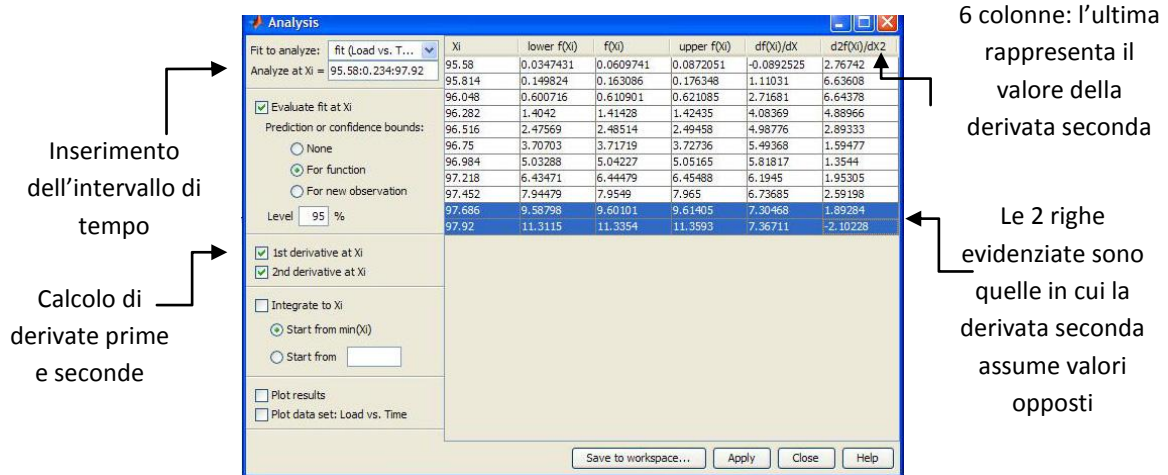


Fig. 2.19 - Schermata del Toolbox di Matlab per il calcolo del punto di flesso.

Per ogni campione analizzato vengono ricavati i relativi grafici e i corrispondenti punti di flesso.

Nel grafico successivo (Fig. 2.20) vengono rappresentate le 24 curve di carico del pericardio bovino nativo senza pre-tensionamento.

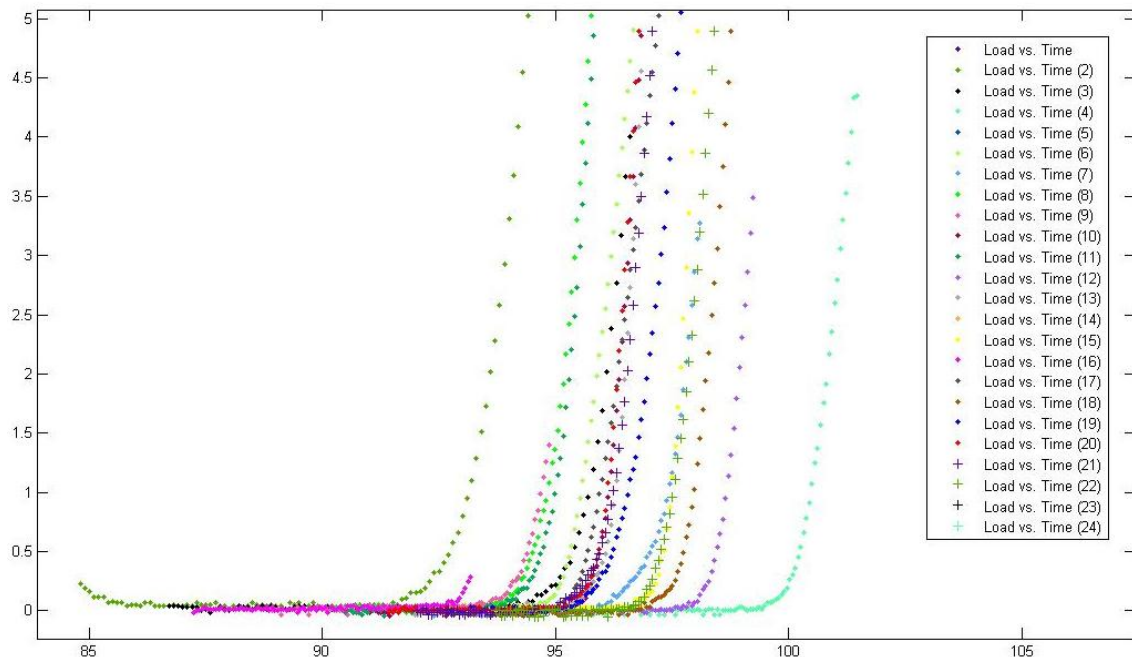


Fig. 2.20 – Zoom dell'andamento del carico (ordinata) in funzione del tempo (ascissa) di tutti i campioni di pericardio bovino nativo; su queste curve vengono calcolati i punti di flesso.

Il punto di flesso calcolato e la sezione iniziale del campione vengono utilizzati per il calcolo della curva sforzo-deformazione: infatti essi consentono la conversione della forza [N] e dello spostamento [mm] rispettivamente in tensione [MPa] e deformazione [%].

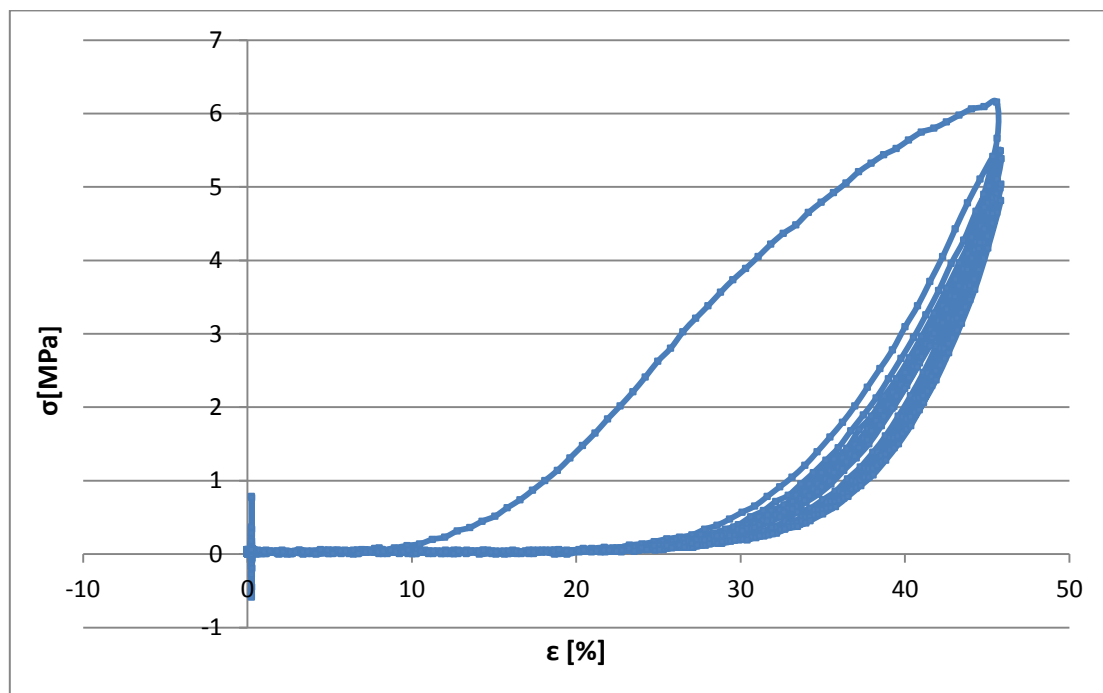
La *tensione*  $\sigma$  viene calcolata come il rapporto tra il carico [N] e la sezione [mm<sup>2</sup>]: il calcolo di quest'ultima viene descritto nel *paragrafo 2.3*.

La *deformazione*  $\varepsilon$  viene calcolata con la seguente relazione:

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0 + \text{flesso}} * 100$$

dove  $L-L_0$  è lo spostamento che si ricava direttamente dai dati sperimentali,  $L_0$  rappresenta la lunghezza iniziale del campione pari a 5 mm e il flesso è il punto oltre il quale il tessuto inizia a resistere alla trazione. Il tutto viene poi moltiplicato per 100 per avere il valore di deformazione in percentuale.

Si ricava così la curva  $\sigma$ - $\varepsilon$  (Fig. 2.21), che ha lo stesso andamento qualitativo della Fig. 2.18, ma che presenta grandezze diverse sia in ascissa che in ordinata. Questa curva è definita "ingegneristica", in quanto viene mantenuto costante nel tempo il valore della sezione del campione, ovvero viene trascurato il restringimento della sezione (strizione) durante la prova di trazione.



**Fig. 2.21 – Andamento della tensione in funzione della deformazione in un campione generico di pericardio bovino nativo.**

## 2.6 Estrazione dei parametri di interesse

Il parametro biomeccanico che viene scelto per rappresentare la caratterizzazione meccanica del materiale è il **Modulo Elastico**: è una grandezza caratteristica di un materiale che esprime il rapporto tra tensione e deformazione nel caso di condizioni di carico monoassiale ed in caso di comportamento del materiale di tipo elastico. I tessuti biologici, dopo aver subito prove di trazione monoassiale, presentano un comportamento comunemente non lineare (Fig. 2.22). La curva  $\sigma$ - $\epsilon$  tipica di un tessuto biologico molle viene divisa in tre zone principali:

- Regione I, in cui si ha un piccolo allungamento, che corrisponde all'allungamento delle fibre di collagene; inizialmente si osserva una bassa rigidità dovuta al fatto che le strutture fibrose si trovano ancora nella configurazione increspata, nella quale i legami inter- e intra-fibrillari non sono ancora completamente tensionati e le fibre presentano ancora la tipica struttura ondulata;
- Regione II: corrispondente ad un andamento lineare, in cui le fibre sono allineate nella direzione di applicazione della sollecitazione. All'aumentare della tensione applicata al tessuto si assiste un incremento della rigidità del materiale; tale fatto è associato, a livello microstrutturale, alla completa distensione dei legami inter- e intra-fibrillari e al dispiegamento delle fibre di collagene che si portano nella cosiddetta configurazione "crimped";
- Regione III: proseguendo con l'aumento della tensione, si entra in una zona che viene definita "zona di danno" delle strutture che compongono il tessuto. In questa regione inizia la rottura dei legami inter- e intra-fibrillari con conseguente deterioramento delle proprietà meccaniche del materiale. Il modulo di elasticità diminuisce drasticamente e si assiste a fenomeni di plasticità e danno, che non possono essere recuperati all'atto di scarico del provino.

Il modulo elastico viene calcolato nella porzione di curva lineare (Regione II) in cui il comportamento del tessuto può essere definito elastico. In particolare, esso viene calcolato come la pendenza della curva in tale zona lineare, ed in questa fase assume valore massimo [29,33].

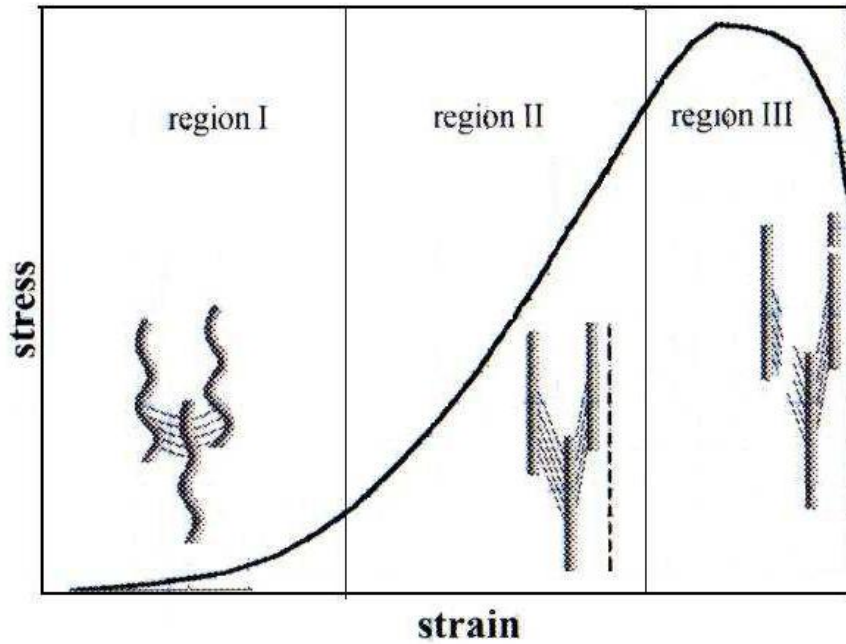


Fig. 2.22 – Rappresentazione dell’andamento non lineare della curva di sforzo vs deformazione per un generico tessuto biologico e relative zone di interesse.

Con l’uso del software Matlab R2009b, viene successivamente calcolata la curva del carico [N] in funzione dello spostamento [mm]; viene estratto l’ottavo ciclo di carico e i dati vengono approssimati con un fit lineare. Viene scelta graficamente e manualmente la zona lineare della curva eliminando man mano i punti sperimentali fino ad ottenere la somma del quadrato degli errori (SSE), indice della bontà del fit, compresa tra lo 0.4 e lo 0.6.

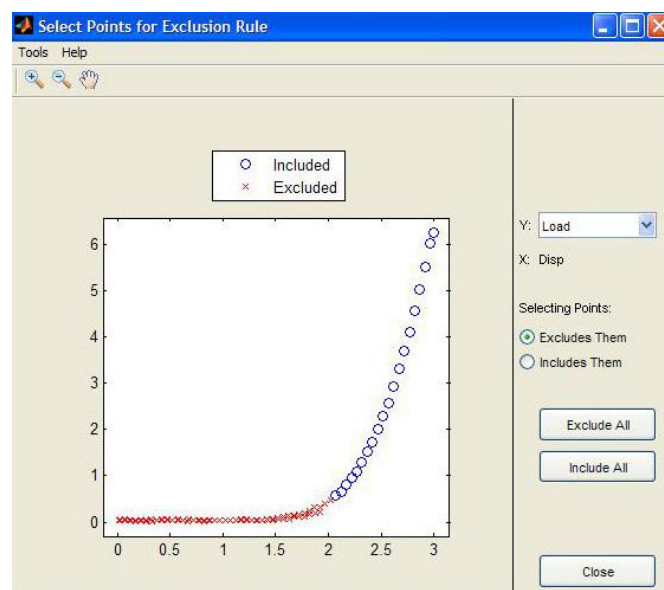


Fig. 2.23 – Finestra per l’esclusione dei punti sperimentali; i punti in rosso sono quelli esclusi, in blu quelli facenti parte della zona lineare.

Per ogni campione si ottengono numerose informazioni: il valore di pendenza della retta, la sua intercetta, il numero di campioni presenti nella zona lineare, i valori massimi e minimi di carico [N] e di spostamento [mm]. Da quest'ultimi vengono calcolati  $\Delta L$  e  $\Delta D$  come la differenza tra il valore massimo e il valore minimo sia del carico che dello spostamento.

Dal rapporto  $\frac{\Delta L}{\Delta D}$  si ottiene il valore della *pendenza*  $m$  [N/mm] della retta di approssimazione della curva nella zona lineare. Il valore  $m$  rappresenta la *stiffness*, o rigidità del materiale.

La rigidità di un materiale è la resistenza che oppone un corpo alla deformazione elastica provocata da una forza applicata. È legata alla forza dei legami interni al materiale ed è utilizzata in molte applicazioni ingegneristiche.

Una volta calcolato il valore della pendenza  $m$ , viene utilizzata la formula:

$$\sigma = m * \frac{(L_0 + \text{flesso})}{(100 * \text{Sezione})} * \varepsilon + \frac{q}{\text{Sezione}}$$

dove:

- $m$ : pendenza della retta di approssimazione [N/mm];
- $\sigma$ : tensione [MPa];
- $\varepsilon$ : deformazione [%];
- $L_0$ : lunghezza iniziale del campione pari a 5 mm, fissa per tutti i campioni;
- Flesso: punto oltre il quale il campione inizia a resistere;
- Sezione: è quella iniziale del provino, varia da campione a campione [mm];
- $q$ : coefficiente angolare della retta di approssimazione;

Moltiplicando quindi il valore di  $m$ , trovato precedentemente, con la relazione  $\frac{L_0 + \text{flesso}}{100 * \text{Sezione}}$ , viene calcolato il valore del modulo elastico in MPa.

Questa procedura di calcolo viene applicata sia per i campioni nativi che per quelli decellularizzati, per entrambi i tessuti, bovino e porcino.

I valori del modulo elastico vengono poi raggruppati in base alle zone, A e C (del pericardio bovino), ed in base alla porzione ventricolare (ALV, ARV, PRV e PLV), sia del bovino che del porcino, da cui sono stati prelevati i campioni.

### 2.6.1 Analisi statistiche

Per le analisi statistiche dei campioni nativi e trattati e per entrambi i tessuti, bovino e suino, vengono utilizzati due diversi test statistici.

Per tutti i dati, inizialmente vengono calcolati i valori medi del modulo elastico, dello spessore e della densità dei campioni, con le relative deviazioni standard ed errori standard, utili per la rappresentazione dei risultati tramite istogrammi.

L'*errore standard (se)* è definito come il rapporto tra la *deviazione standard (sd)* dei campioni e la radice quadrata del numero di campioni (*n*) considerati:

$$se = \frac{sd}{\sqrt{n}}.$$

Per le proprietà fisiche dei campioni, spessore e densità, viene utilizzato il Test di Student a due code non appaiate e viene utilizzata come soglia significativa un valore di  $p < 0.05$ .

Per valutare invece la significatività legata al modulo elastico viene utilizzato il test Kruskal Wallis, anche in questo caso, con un valore di  $p < 0.05$ .



## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

In questa sezione vengono esposti i risultati ottenuti durante le prove di trazione monoassiale. Il capitolo viene diviso in tre sezioni: nella prima sono contenuti i risultati del pericardio bovino con pre-tensionamento, nella seconda quelli del bovino senza pre-tensionamento, ed infine quelli del porcino. Tutti i risultati vengono rappresentati tramite istogrammi con le relative analisi statistiche.

### *3.1 Pericardio bovino con pre-tensionamento*

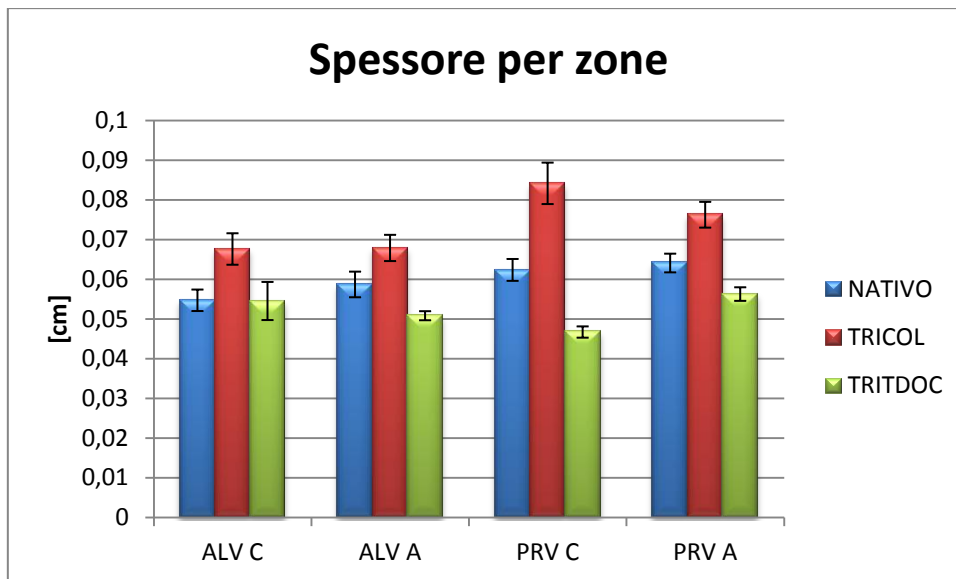
In tutti i grafici, vengono rappresentate 4 zone (due C e due A) prelevate dal ventricolo anteriore e posteriore. Per ogni zona (ALV-C, ALV-A, PRV-C, PRV-A) sono presenti 3 colonne di colore diverso che rappresentano le medie dei valori delle grandezze misurate: spessore, densità e modulo elastico. Dalla legenda è possibile leggere i nomi dei trattamenti ed il colore associato.

#### *3.1.1 Analisi fisiche: spessore e densità*

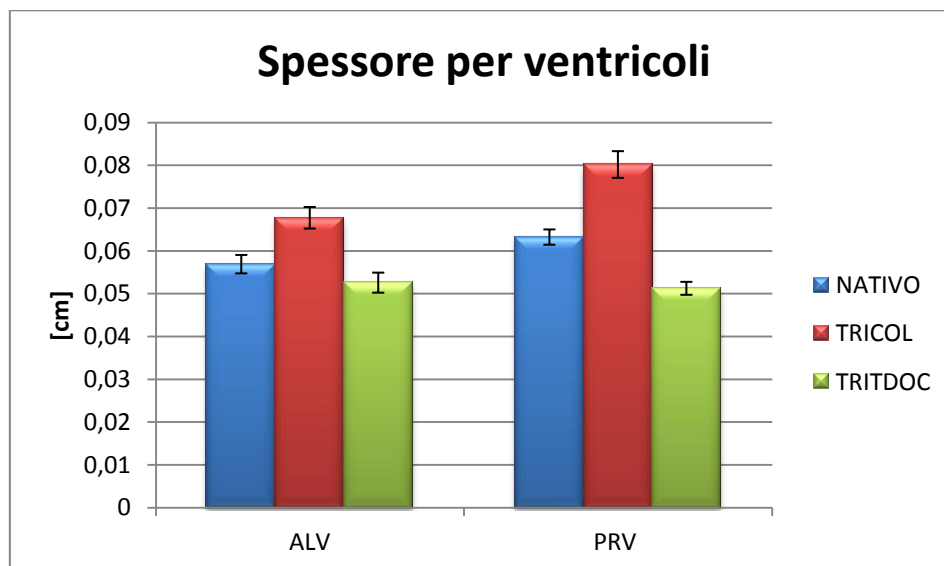
L'analisi delle caratteristiche fisiche dei campioni nativi e decellularizzati TRICOL e TRITDOC utilizzati per gli esperimenti con pre-tensionamento sono illustrati nelle Fig 3.1 e 3.2.

Nel primo istogramma (Fig. 3.1) vengono raggruppati i campioni in base alla zona (A e C) del pericardio, nel secondo (Fig. 3.2) in base alla camera cardiaca da cui vengono prelevati (ALV e PRV).

E' possibile notare che il trattamento TRICOL induce nei campioni un aumento nello spessore rispetto a quelli nativi in tutte le zone del pericardio. Al contrario, i campioni trattati con TRITDOC presentano un valore dello spessore minore rispetto ai nativi in tutte le zone del pericardio considerato. L' andamento appena descritto viene evidenziato anche nell'istogramma che divide i campioni analizzati in base ai ventricoli. Per valutare se le differenze tra le zone sono significative viene utilizzato il test di Student con significatività  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.1 – Spessore medio dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse zone analizzate.**



**Fig. 3.2 – Spessore medio dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse camere cardiache analizzate.**

Confrontando i valori di spessore tra ALV nativo e PRV nativo e tra ALV TRICOL e PRV TRICOL si ottengono differenze significative con  $p < 0.05$ . L'unica differenza non significativa è quella che consegue comparando i valori di ALV e PRV del trattamento TRITDOC ( $p > 0.05$ ). Vengono inoltre confrontati i valori dello spessore dei tre trattamenti subito dai campioni.

In Tabella 3.1 vengono riportati i risultati del test di Student, evidenziando in giallo le differenze significative. Quasi tutte le differenze sono statisticamente significative.

**Tabella 3.1 – Risultati del t-test per lo spessore.**

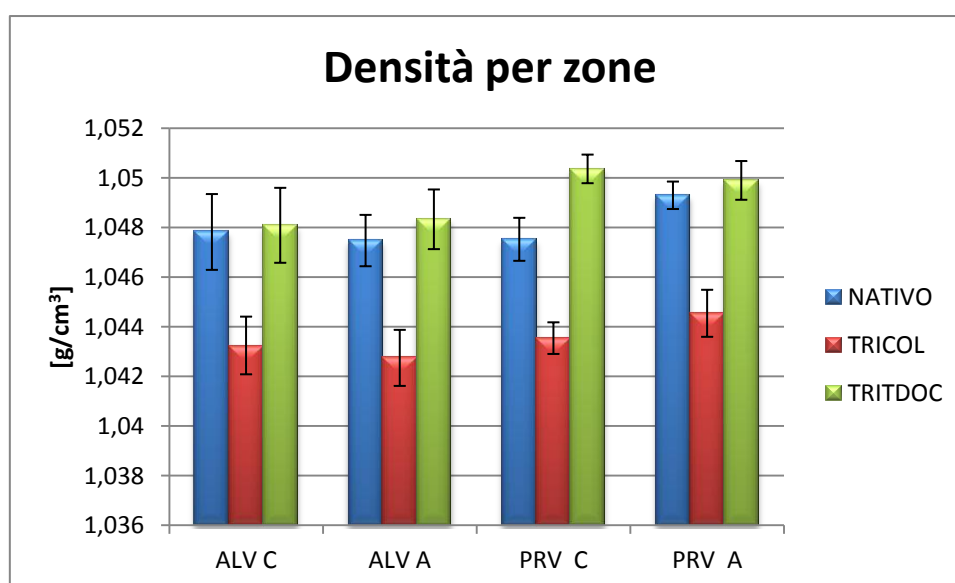
<b>NATIVO/TRICOL</b>	ALV C	0.0137		
	ALV A	0.0692	ALV	0.0019
	PRV C	0.0020	PRV	0.000037
	PRV A	0.0065		
<b>NATIVO/TRITDOC</b>	ALV C	0.9747		
	ALV A	0.0322	ALV	0.0538
	PRV C	0.0020	PRV	0.0000036
	PRV A	0.0065		
<b>TRICOL/TRITDOC</b>	ALV C	0.0482		
	ALV A	0.00026	ALV	0.000014
	PRV C	0.00002	PRV	0.000000002
	PRV A	0.00004		

In Tabella 3.2 si riportano i valori medi dello spessore dei campioni di bovino con i relativi errori, eliminando la suddivisione in zone e per ventricoli.

**Tabella 3.2 – Valori medi dello spessore del pericardio bovino.**

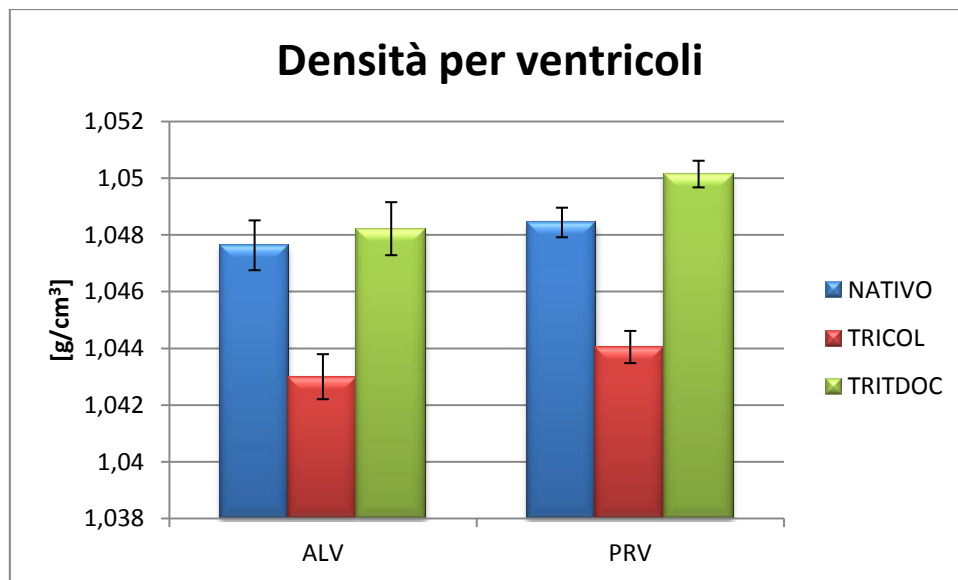
trattamento	Spessore [cm]	errore standard
NATIVO	0.06007	0.00197
TRICOL	0.07397	0.00282
TRITDOC	0.05192	0.00192

I risultati dell'analisi della densità sui campioni utilizzati per l'esperimento sono riportati in Fig. 3.3 e 3.4.



**Fig. 3.3 – Densità media dei campioni di pericardio bovino e decellularizzato nelle diverse zone analizzate.**

Dall'analisi è possibile notare che il trattamento TRICOL induce nei campioni una diminuzione del valore di densità medio in tutte le zone del pericardio. I campioni, invece, che hanno subito il trattamento TRITDOC mostrano un valore di densità medio maggiore rispetto ai campioni nativi. Nessun confronto tra ALV-C e ALV-A dei tre trattamenti (nativo, TRICOL e TRITDOC) presenta un valore statisticamente significativo ( $p > 0.05$ ); invece, l'unico confronto con  $p < 0.05$  risulta tra PRV-C e PRV-A del tessuto nativo.



**Fig. 3.4 – Densità media dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse camere cardiache analizzate.**

Dalla Fig. 3.4 si deduce che l'unica differenza significativa è quella tra ALV e PRV del trattamento TRITDOC. I confronti tra ALV e PRV del nativo e del TRICOL non sono significativi ( $p > 0.05$ ).

I valori di densità medi ottenuti sono correlati con la riduzione dello spessore: infatti la densità è inversamente proporzionale allo spessore. Da non trascurare è il fattore variabilità: le caratteristiche fisiche vengono probabilmente influenzate da fattori individuali, essendo i pericardi prelevati da bovini diversi. I tessuti ovviamente potrebbero avere valori di densità e spessore differenti tra loro.

In Tabella 3.3 si riportano, invece, i risultati del t-test, evidenziando le differenze tra i vari trattamenti. Anche in questo caso quasi tutte le differenze sono statisticamente significative (in giallo).

**Tabella 3.3 – Risultati del t-test per la densità.**

<b>NATIVO/TRICOL</b>	ALV C	0.0245		
	ALV A	0.0072	ALV	0.00024
	PRV C	0.0009	PRV	6.096E-07
	PRV A	0.00045		
<b>NATIVO/TRITDOC</b>	ALV C	0.9019		
	ALV A	0.5052	ALV	0.2571
	PRV C	0.0109	PRV	0.01766
	PRV A	0.5374		
<b>TRICOL/TRITDOC</b>	ALV C	0.0198		
	ALV A	0.0026	ALV	1.353E-06
	PRV C	1.43E-07	PRV	1.953E-10
	PRV A	0.00022		

In Tabella 3.4 si riportano i valori medi della densità dei campioni di bovino con i relativi errori, eliminando la suddivisione in zone e per ventricoli.

**Tabella 3.4 – Valori medi della densità del pericardio bovino.**

<b>trattamento</b>	<b>Densità [g/cm<sup>3</sup>]</b>	<b>errore standard</b>
NATIVO	1.04803	0.00070
TRICOL	1.04352	0.00068
TRITDOC	1.04918	0.00070

Gli andamenti finora illustrati seguono le tendenze di altri studi effettuati con pericardio bovino [5,28].

### 3.1.2 Modulo Elastico

Per la valutazione delle proprietà meccaniche, come per le proprietà fisiche, vengono riportati due tipologie di grafici del Modulo Elastico.

Dalla Fig. 3.5 si evince che sia la zona C che la zona A di ALV presentano un valore di modulo elastico maggiore rispetto alle zone A e C del PRV. Il trattamento che ha un valore di modulo elastico maggiore, in questa configurazione del sistema, è il TRITDOC, in ALV-A, ALV-C e PRV-A. L'unica zona in cui i campioni trattati con TRITDOC presentano modulo minore, rispetto ai nativi e al TRICOL, è PRV, in particolare nella zona C, in cui si ha proprio un'inversione di andamento, cioè i campioni TRITDOC hanno un modulo minore rispetto agli altri.

Il trattamento TRITDOC, quindi, induce un incremento delle proprietà meccaniche del pericardio, rispetto al nativo e al TRICOL.

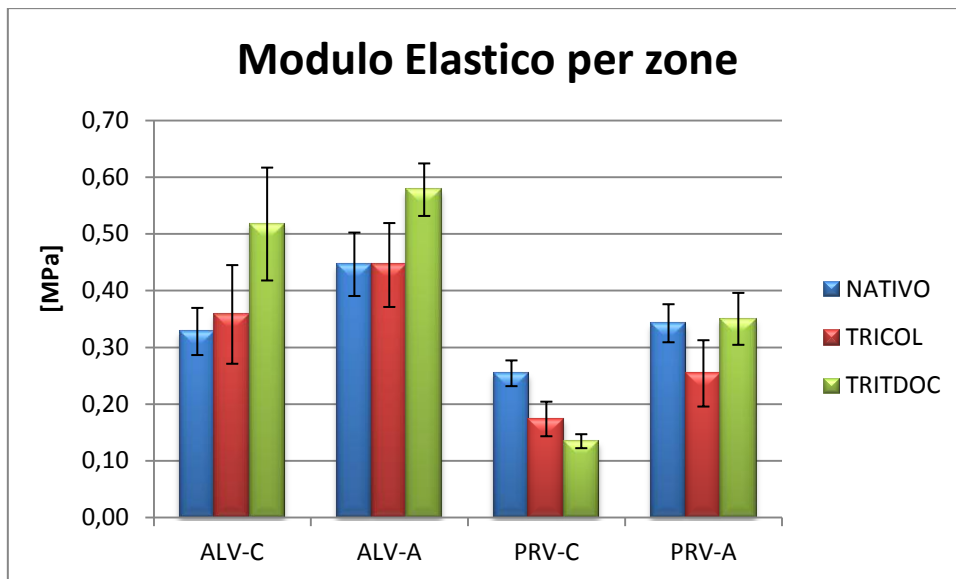


Fig. 3.5 – Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino suddivisi in base alle zone.

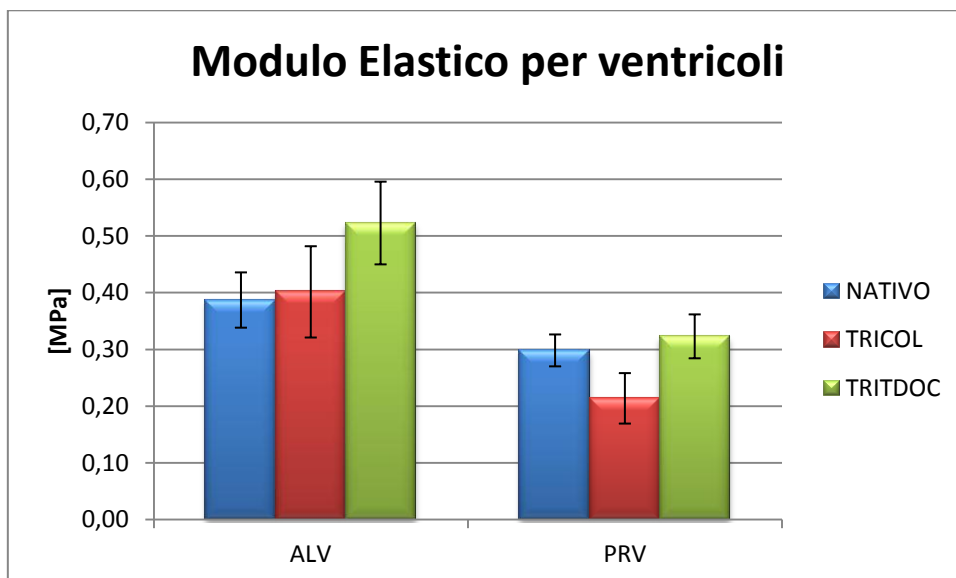


Fig. 3.6 – Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino suddivisi per ventricoli.

Nella Fig. 3.6 vengono raggruppati tutti i campioni delle zone A e delle zone C. Vengono infatti rappresentate solo le zone ALV e PRV. Anche in questo caso si nota facilmente che i valori medi del modulo elastico della porzione ventricolare anteriore sono maggiori rispetto alla porzione posteriore sia nel pericardio bovino che nei tessuti decellularizzati. Questo fattore è importante perché significa che il trattamento TRITDOC ha un effetto notevole sul tessuto pericardico bovino. Esso presenta quindi caratteristiche meccaniche superiori rispetto al tessuto nativo.

Anche nel caso del trattamento TRICOL si può affermare che esso induce un effetto sul tessuto. Come è possibile vedere dagli istogrammi precedenti, il trattamento di

decellularizzazione TRICOL provoca una riduzione del valore del modulo elastico, in particolare nel PRV, rispetto al tessuto nativo. Questo fatto ovviamente conferma le ipotesi illustrate durante la suddivisione delle zone del pericardio. Infatti era stata scelta ALV come zona “migliore”, data la sua omogeneità e organizzazione ordinata delle fibre di collagene, ed era stata scelta PRV come zona “peggiore”, in quanto più disomogenea e con dati fisici di spessore e densità più variabili tra gli individui, in modo da confrontare il comportamento meccanico delle due porzioni. Si può quindi affermare che le proprietà meccaniche del tessuto sono correlabili con le corrispondenti caratteristiche fisiche. In Tabella 3.5 si riportano i valori medi del modulo elastico dei campioni di bovino con i relativi errori, eliminando la suddivisione in zone e per ventricoli.

**Tabella 3.5 – Valori medi del modulo elastico.**

<b>trattamento</b>	<b>Modulo Elastico [MPa]</b>	<b>errore standard</b>
NATIVO	0.342751	0.038416
TRICOL	0.307718	0.062465
TRITDOC	0.423019	0.055792

Per valutare se le differenze tra i dati analizzati sono realmente significative, vengono effettuati test statistici (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ). In Tabella 3.6 vengono riportati i dati ottenuti con il test, confrontando le zone del pericardio.

**Tabella 3.6 – Confronto delle zone del pericardio.**

<b>ALV A/ALV C</b>	Nativo	0.0111
	TRICOL	0.2482
	TRITDOC	0.2726
<b>PRV A/PRV C</b>	Nativo	0.0833
	TRICOL	0.0494
	TRITDOC	0.0243
<b>ALV / PRV</b>	Nativo	0.0337
	TRICOL	0.0008
	TRITDOC	4.26E-06

I valori evidenziati in giallo rappresentano tutti i risultati significativi. Vengono quindi confrontati i risultati dei tre trattamenti in base alle zone C ed A sia del ventricolo anteriore che di quello posteriore, ed inoltre vengono confrontate le due zone principali ALV e PRV. Quasi tutti i risultati sono significativi, eccetto il confronto ALV-A vs ALV-C sia del TRICOL che del TRITDOC.

Viene poi effettuato un altro confronto statistico in base al trattamento che ha subito il tessuto pericardico. In Tabella 3.7 vengono riportati i risultati del Kruskal Wallis.

**Tabella 3.7 – Confronto fra i trattamenti: Nativo, TRICOL, TRITDOC.**

<b>NATIVO/TRICOL</b>	ALV C	0.954		
	ALV A	0.6033	ALV	0.9343
	PRV C	0.9539	PRV	0.1801
	PRV A	0.1332		
<b>NATIVO/TRITDOC</b>	ALV C	0.0111		
	ALV A	0.0647	ALV	0.0034
	PRV C	0.686	PRV	0.8206
	PRV A	0.9081		
<b>TRICOL/TRITDOC</b>	ALV C	0.119		
	ALV A	0.0941	ALV	0.0168
	PRV C	0.0152	PRV	0.001
	PRV A	0.0282		
<b>TRICOL/TRITDOC/NATIVO*</b>	ALV C	0.0547		
	ALV A	0.118	ALV	0.0086
	PRV C	0.1999	PRV	0.0195
	PRV A	0.0984		

In questo caso non tutti i risultati sono statisticamente significativi. I risultati che appaiono apprezzabili sono le differenze significative ( $p < 0.05$ ) che si ottengono confrontando contemporaneamente i tre trattamenti (quelli con \*). Dal confronto TRICOL/TRITDOC si può affermare che i due trattamenti di decellularizzazione si comportano in modo diverso ed inducono nel tessuto pericardico esiti differenti. Dal confronto Nativo/TRICOL si può affermare che la resistenza dei campioni può essere equiparabile, avendo trovato una differenza non significativa ( $p > 0.05$ ).

### *3.2 Pericardio bovino senza pre-tensionamento*

Anche per questa configurazione di esperimenti con tessuto bovino senza pre-tensionamento, i risultati vengono illustrati attraverso istogrammi, sia per le caratteristiche fisiche sia per le caratteristiche biomeccaniche.

#### *3.2.1 Analisi fisiche: spessore e densità*

Di seguito vengono riportati gli istogrammi dello spessore e della densità (Fig. 3.7 e 3.8).



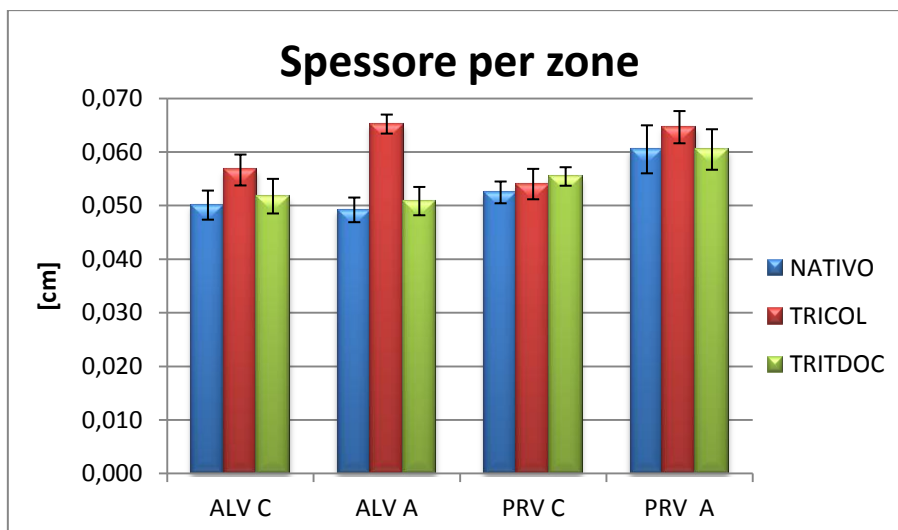


Fig. 3.7 – Spessore medio dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse zone analizzate.

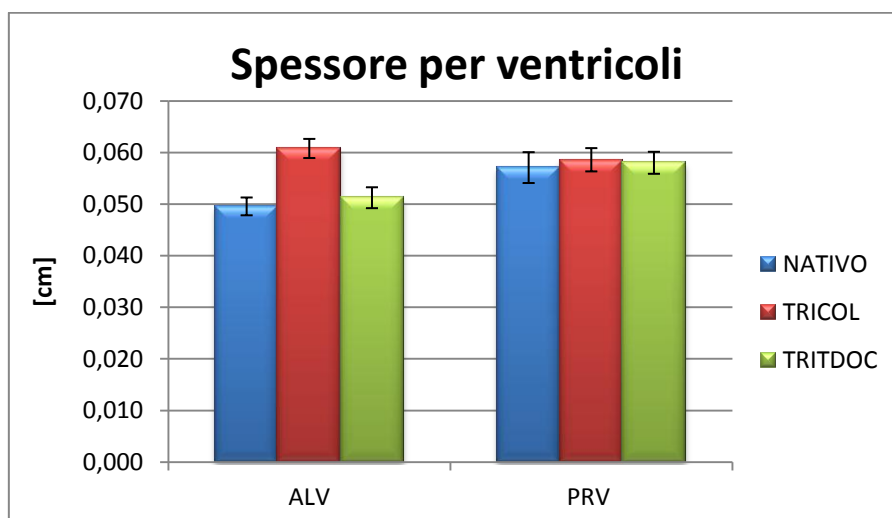


Fig. 3.8 – Spessore medio dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse camere cardiache analizzate.

Per questi grafici valgono gli stessi commenti della sezione precedente. In sintesi, il TRICOL produce un aumento di spessore del pericardio, mentre il TRITDOC non ha un effetto notevole sullo spessore e non si discosta molto dai valori del nativo.

Anche per lo studio della densità si hanno gli stessi risultati trovati in precedenza: i campioni che hanno subito il trattamento TRICOL presentano un valore di densità medio minore rispetto ai campioni nativi. Il TRITDOC, invece, produce un incremento del valore di densità medio, anche se modesto, rispetto al nativo.

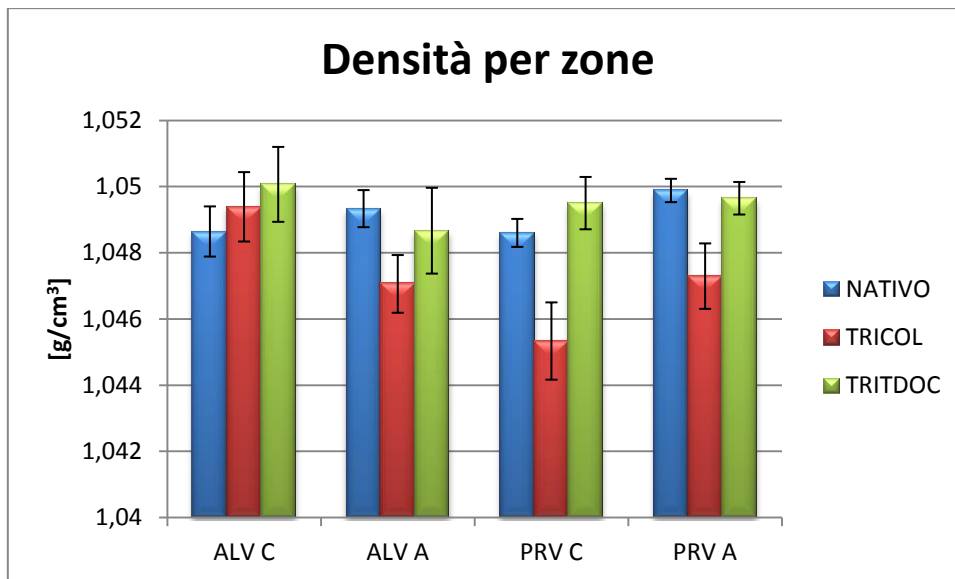


Fig. 3.9 – Densità media dei campioni di pericardio bovino e decellularizzato nelle diverse zone analizzate.

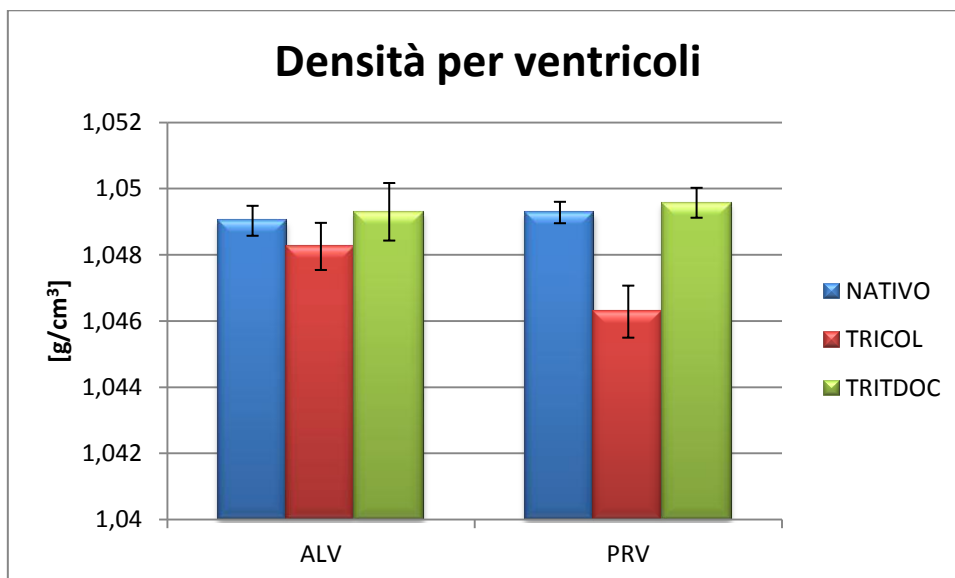


Fig. 3.10 – Densità media dei campioni di pericardio bovino nativo e decellularizzato nelle diverse camere cardiache analizzate.

### 3.2.2 Modulo Elastico

I risultati del Modulo Elastico, per questa configurazione del sistema, vengono rappresentati sempre con gli istogrammi. Anche qui i dati vengono divisi in base alle zone A e C di ALV e di PRV, nel primo istogramma (Fig. 3.11) e in base alle zone del ventricolo da cui vengono prelevati i campioni (anteriore e posteriore), nel secondo istogramma (Fig. 3.12).

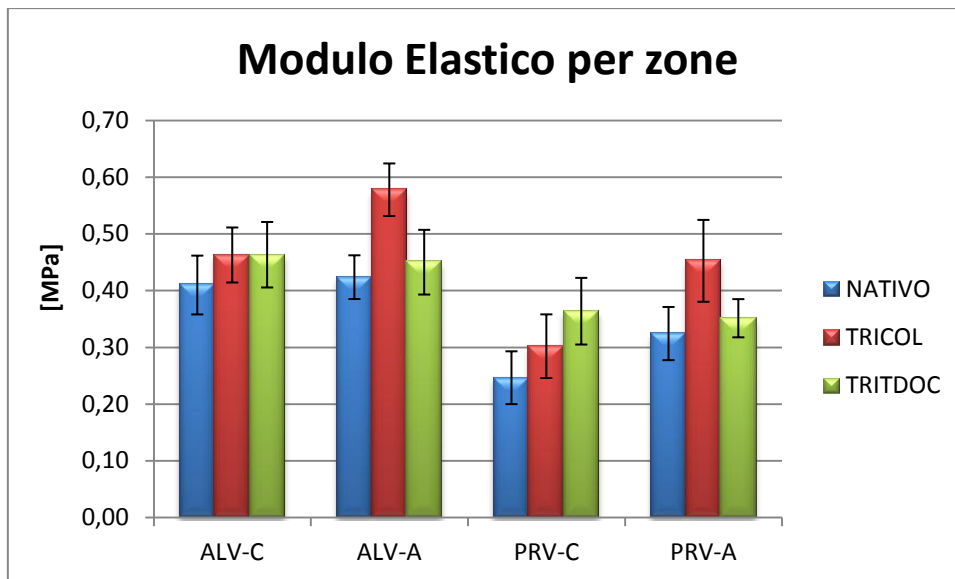


Fig. 3.11 – Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino senza pretensionamento suddivisi in base alle zone.

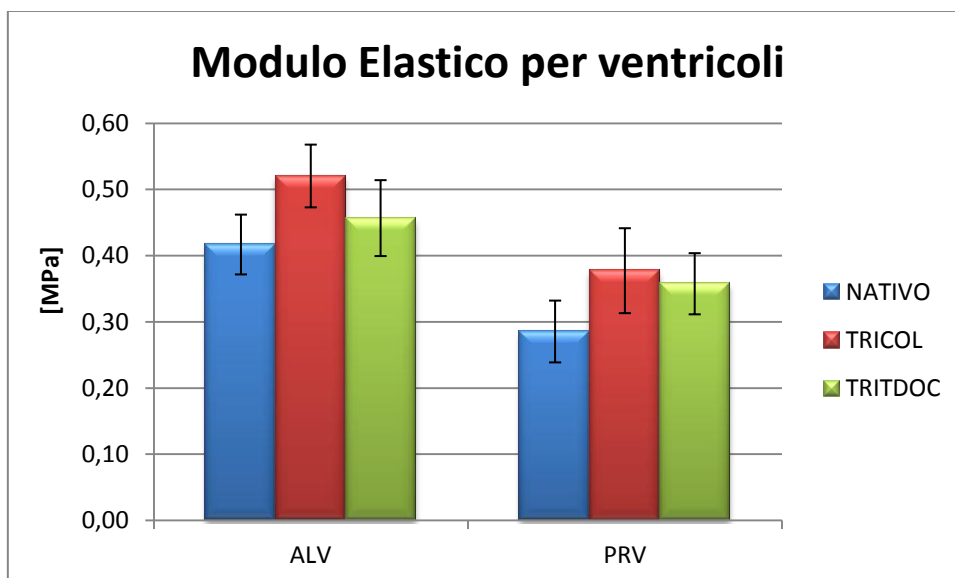


Fig. 3.12– Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino senza pretensionamento suddivisi in ventricoli.

Dai grafici è possibile ricavare diverse considerazioni. Innanzitutto si nota che il trattamento TRICOL ha valori medi di modulo elastico maggiori nelle zone ALV-C, ALV-A e PRV-A, mentre nel PRV-C i campioni trattati con TRICOL presentano valori compresi tra quelli del trattamento TRITDOC e quelli nativi. Se considero invece la suddivisione per ventricoli, il valor medio del modulo elastico nel trattamento TRICOL è maggiore sia in ALV che in PRV.

In generale anche in questa configurazione si osserva che il modulo elastico del ventricolo anteriore sinistro ha un valore maggiore rispetto a quello del ventricolo posteriore destro, sia per i campioni nativi che per quelli decellularizzati. Questo ovviamente è correlabile con

le affermazioni precedenti, cioè che le proprietà meccaniche risentono delle caratteristiche fisiche del tessuto. Si è infatti affermato che la zona “migliore” del pericardio bovino, che appare più omogenea, è quella che ricopre il ventricolo anteriore sinistro (ALV), rispetto alla zona PRV che appare meno organizzata per quanto riguarda la struttura delle fibre di collagene.

In Tabella 3.8 vengono riportati i valori medi del modulo elastico dei campioni di bovino con i relativi errori, eliminando la suddivisione in zone e per ventricoli.

**Tabella 3.8 – Valori medi del modulo elastico.**

<b>trattamento</b>	<b>Modulo Elastico [MPa]</b>	<b>errore standard</b>
NATIVO	0.351038	0.045943
TRICOL	0.448745	0.055774
TRITDOC	0.407056	0.05179

Viene effettuato il test statistico Kruskal Wallis per valutare se le differenze ottenute siano statisticamente significative. In Tabella 3.9 vengono riportati i dati ottenuti con il test, confrontando le zone A e C sia del ventricolo anteriore sinistro che del ventricolo posteriore destro. I valori evidenziati in giallo rappresentano le differenze significative tra le varie zone del pericardio ( $p < 0.05$ ). Notevole appare la differenza tra il ventricolo anteriore sinistro e il ventricolo posteriore destro in tutti e tre i trattamenti (nativo, TRICOL e TRITDOC): ciò evidenzia la maggiore resistenza dell’ALV. Significative le differenze tra le zone A e C di ALV e PRV in particolare nel trattamento TRICOL. Nel nativo e nel TRITDOC i medesimi confronti non sono statisticamente significativi ( $p > 0.05$ ).

**Tabella 3.9 – Confronto delle zone del pericardio.**

<b>ALV A/ALV C</b>	Nativo	0.9495
	TRICOL	0.0136
	TRITDOC	0.5478
<b>PRV A/PRV C</b>	Nativo	0.0816
	TRICOL	0.0192
	TRITDOC	0.8743
<b>ALV / PRV</b>	Nativo	0.0001
	TRICOL	0.0005
	TRITDOC	0.0031

Di seguito viene riportata un’ulteriore tabella (Tabella 3.10) in cui vengono sintetizzati i valori di  $p$ , calcolati con il test statistico, del pericardio bovino confrontando i trattamenti.

**Tabella 3.10 – Confronto fra i trattamenti: Nativo, TRICOL, TRITDOC.**

<b>NATIVE/TRICOL</b>	ALV C	0.3928		
	ALV A	0.0006	ALV	0.0022
	PRV C	0.3585	PRV	0.0808
	PRV A	0.0619		
<b>NATIVE/TRITDOC</b>	ALV C	0.2546		
	ALV A	0.7042	ALV	0.237
	PRV C	0.0575	PRV	0.0848
	PRV A	0.8247		
<b>TRICOL/TRITDOC</b>	ALV C	0.8743		
	ALV A	0.0024	ALV	0.05
	PRV C	0.1839	PRV	0.8658
	PRV A	0.1065		
<b>TRICOL/TRITDOC/NATIVO*</b>	ALV C	0.5023		
	ALV A	0.0008	ALV	0.0075
	PRV C	0.1254	PRV	0.1324
	PRV A	0.1269		

La maggior parte dei confronti non sono statisticamente significativi ( $p > 0.05$ ); i valori rilevanti si evidenziano soltanto nel ventricolo anteriore sinistro, in particolare nella zona A. I campioni nativi si differenziano significativamente da quelli trattati con TRICOL, in particolare nel ventricolo anteriore sinistro e nella stessa zona si ottengono risultati notevoli nel confronto fra i tre trattamenti (\*) e nel confronto tra i due trattamenti TRICOL e TRITDOC. Non vale invece nel confronto tra nativo e TRITDOC, in cui si ottiene un valore di  $p > 0.05$ .

Questo tipo di esperimento si differenzia dal primo (*Paragrafo 3.1.2*) dal tipo di strumentazione utilizzata, ciò comporta delle differenze nei risultati. In questo caso infatti il trattamento che offre una resistenza “migliore” sembra essere il TRICOL. Ma anche il tessuto trattato con TRITDOC sembra essere migliore del tessuto nativo. Al di là del valore di modulo elastico è possibile affermare che sia i campioni trattati con TRICOL che quelli con TRITDOC presentano una resistenza migliore rispetto ai tessuti nativi.

Nella configurazione precedente, invece, il miglior trattamento sembrava essere il TRITDOC. Questa differenza di risultati può dipendere dalla diversa cella di carico utilizzata, dalla potenza del motore, dalla posizione del trasduttore e dalla presenza o meno del pretensionamento. La presenza o meno di quest’ultimo elemento non appare così determinante nella discrepanza dei risultati, in quanto gli otto cicli di carico-scarico

rappresentano una sorta di preconditionamento, che va ad omogeneizzare il comportamento del tessuto.

Ciò che appare invece importante ai fini della diversità dei risultati è la potenza del motore, della cella di carico e la posizione di quest'ultima. Infatti nella prima configurazione la cella veniva posta all'esterno del bagno salino, unita alla barra che sosteneva una delle due grip. Nella seconda configurazione invece, il trasduttore veniva posizionato in immersione nel bagno salino, attaccato ad una delle due pinze. Emergeva così una diversa inerzia del sistema: nella seconda configurazione minore rispetto alla prima.

Per confermare questa differenza nei due trattamenti bisognerebbe utilizzare la cella di carico da 100 lb, in immersione, il motore da 450 N, senza il pretensionamento e valutare gli andamenti nei due trattamenti di decellularizzazione.

### *3.2.3 Pericardio bovino in parallelo*

Un fattore importante, da non dimenticare, è la variabilità inter-individuale causata dal mescolamento dei dati, sia fisici che meccanici, ricavati da tessuti pericardici prelevati da vari animali. I tessuti biologici di animali con età e razza diversa potrebbero avere caratteristiche fisiche e meccaniche molto diverse tra loro.

Per capire cosa succede e se esistono cambiamenti nelle caratteristiche meccaniche, viene effettuato un esperimento utilizzando un unico pericardio, detto "*in parallelo*", da cui vengono tagliati sia i campioni nativi sia quelli che devono essere trattati, in modo da valutare come si comporta il tessuto nativo e quello decellularizzato appartenente allo stesso animale.

Anche nel caso del pericardio in parallelo vengono analizzate sia le caratteristiche fisiche, spessore e densità, sia le caratteristiche meccaniche (modulo elastico)

#### *3.2.3.1 Modulo Elastico*

Negli istogrammi successivi (Fig. 3.13 e Fig. 3.14) vengono riportati gli andamenti del modulo elastico raggruppati sia in base alle zone A e C, sia in base ai ventricoli.

A causa del danneggiamento di alcuni campioni, in particolare quelli trattati con TRICOL, la zona C del ventricolo posteriore destro è priva dei dati di modulo elastico. Lo stesso discorso vale per il PRV totale che presenta nell'istogramma dei dati con un numero minore di campioni.

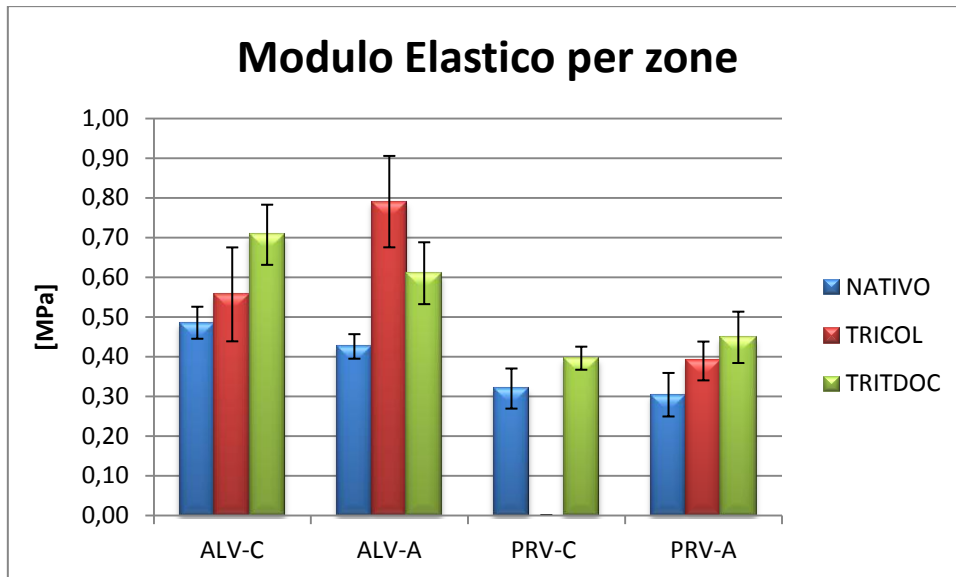


Fig. 3.13– Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino “in parallelo” senza pretensionamento suddivisi in base alle zone.

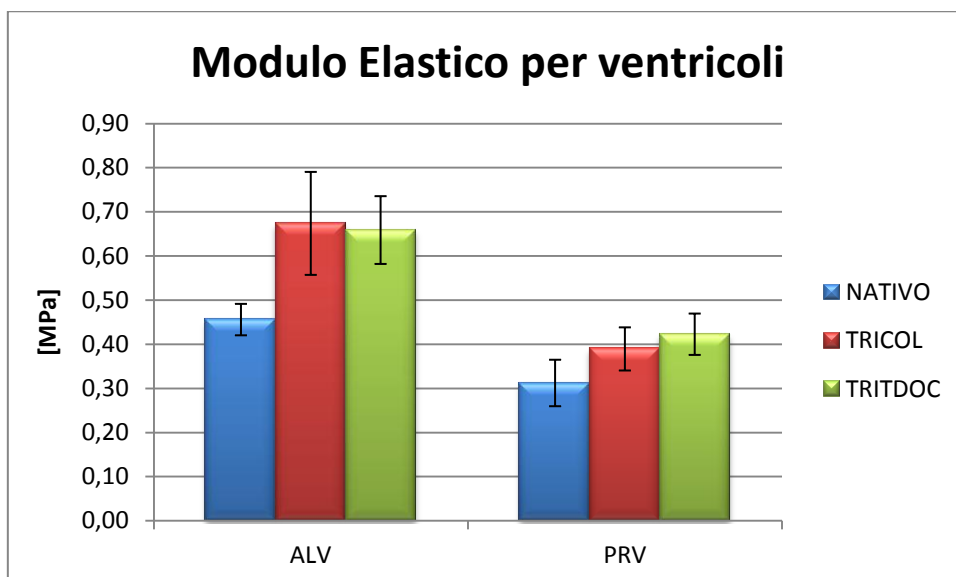


Fig. 3.14– Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio bovino “in parallelo” senza pretensionamento suddivisi in ventricoli.

L’asterisco \* della barra TRICOL del PRV dell’istogramma 3.14 indica il numero minore di campioni, in questo caso  $n = 6$ , rispetto a tutte le altre barre che presentano un numero di campioni ( $n$ ) pari a 12.

Dai grafici si deduce che l’ALV presenta valori di modulo elastico maggiori rispetto al PRV e che i campioni trattati, sia con TRICOL che con TRITDOC, presentano valori di resistenza meccanica maggiori rispetto al tessuto nativo, in tutte le zone del pericardio. Tutto questo

segue l'andamento dell'analisi svolta nel *Paragrafo 3.2.2*, ovvero quando si mescolavano i dati di pericardi diversi.

Il trattamento che presenta valori maggiori di resistenza meccanica è il TRICOL nell'ALV e il TRITDOC nel PRV: questo potrebbe derivare dal fatto che nel PRV ci sono meno campioni e ciò potrebbe provocare nei campioni trattati con TRICOL un valore di modulo elastico minore. Si potrebbe quindi riproporre l'analisi del pericardio in parallelo, evitando danneggiamenti nel taglio dei campioni, in modo da valutare meglio l'andamento del modulo elastico.

Da questa analisi preliminare è comunque possibile trarre buone conclusioni: la variabilità inter-individuale non è così notevole da modificare le proprietà meccaniche del tessuto. Infatti, sia nel pericardio in parallelo, sia nei dati ricavati da pericardi prelevati da animali diversi si ottiene comunque una tendenza comparabile ed omogenea dei valori di modulo elastico. Inoltre si può affermare che sia il trattamento TRICOL che TRITDOC producono un esito consistente sulle caratteristiche meccaniche del tessuto pericardico, favorendo, in particolare, un aumento del modulo elastico.

Vengono riportati in Tabella 3.11 i valori del modulo elastico per il pericardio bovino "in parallelo" senza pretensionamento con i relativi errori, eliminando la suddivisione in zone e per ventricoli.

**Tabella 3.11 – Valori medi del modulo elastico.**

<b>trattamento</b>	<b>Modulo Elastico [MPa]</b>	<b>errore standard</b>
NATIVO	0.383805	0.044123
TRICOL	0.531398	0.082777
TRITDOC	0.54048	0.061838

Anche nel caso del pericardio in parallelo vengono effettuate le analisi statistiche (Kruskal Wallis con  $p < 0.05$ ). In Tabella 3.12 vengono riportati i confronti tra le zone del pericardio con le differenze significative evidenziate in giallo.

Il confronto tra la zona A e la zona C dell'ALV e il confronto tra la zona A e la zona C del PRV, entrambe del trattamento TRICOL, sono statisticamente significative. Tutti gli altri confronti tra le zone A e le zone C presentano un valore di  $p > 0.05$ , quindi non significativi. Tutti i confronti tra ALV e PRV dei tre trattamenti sono statisticamente significativi ( $p < 0.05$ ), ciò conferma il fatto che l'ALV presenta valori significativamente maggiori del PRV.



**Tabella 3.12 – Confronto delle zone del pericardio.**

<b>ALV A/ALV C</b>	Nativo	0.1068
	TRICOL	0.0542
	TRITDOC	0.6304
<b>PRV A/PRV C</b>	Nativo	0.6304
	TRICOL	0.0021
	TRITDOC	0.8728
<b>ALV / PRV</b>	Nativo	0.0012
	TRICOL	0.0003
	TRITDOC	0.0015

In Tabella 3.13 si riportano invece i valori di p riguardanti i confronti fra i tre trattamenti (Nativo, TRICOL e TRITDOC). In giallo vengono evidenziate le differenze significative con  $p < 0.05$ . Quasi tutte le differenze sono statisticamente significative. Il confronto maggiormente interessante appare quello tra l'ALV e il PRV dei tre trattamenti (indicato con \*).

**Tabella 3.13 – Confronto fra i trattamenti: Nativo, TRICOL, TRITDOC.**

<b>NATIVO/TRICOL</b>	ALV C	0.5189		
	ALV A	0.0039	ALV	0.0046
	PRV C	0.0021	PRV	0.2005
	PRV A	0.3367		
<b>NATIVO/TRITDOC</b>	ALV C	0.0037		
	ALV A	0.0247	ALV	0.0003
	PRV C	0.0776	PRV	0.0433
	PRV A	0.1093		
<b>TRICOL/TRITDOC</b>	ALV C	0.0374		
	ALV A	0.0538	ALV	0.908
	PRV C	0.0021	PRV	0.02
	PRV A	0.631		
<b>TRICOL/TRITDOC/NATIVO*</b>	ALV C	0.0113		
	ALV A	0.0035	ALV	0.0009
	PRV C	0.0013	PRV	0.0264
	PRV A	0.2811		

Anche tra il Nativo e il TRITDOC si ottiene un risultato significativo sia nel confronto con l'ALV che nel PRV. Per il Nativo vs TRICOL si ottiene un risultato significativo soltanto confrontando l'ALV, invece, il confronto TRICOL vs TRITDOC è significativo solo nel PRV.

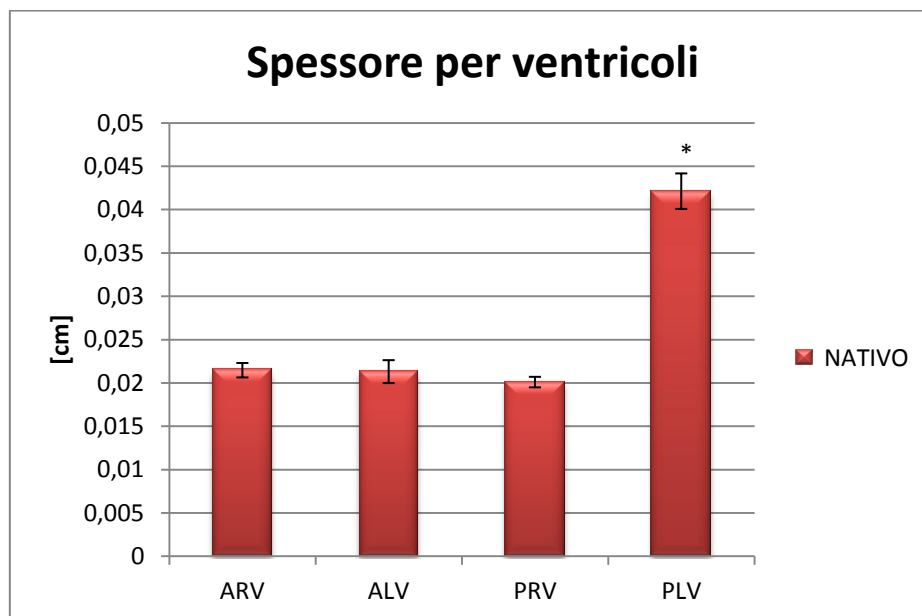
Inoltre appaiono significativi i confronti tra le zone ALV-A, ALV-C e PRV-C del Nativo vs TRICOL e del TRICOL vs TRITDOC e nel confronto fra i tre trattamenti. Invece nel confronto Nativo vs TRICOL i dati significativi sono soltanto tra ALV-A e PRV-C.

### 3.3 Pericardio porcino

Le prove sperimentali con il Sistema Bose Electroforce sul tessuto porcino vengono effettuate senza il pretensionamento e, inoltre, vengono utilizzati soltanto pericardi porcini nativi; anche per il porcino vengono effettuate le analisi delle caratteristiche fisiche e biomeccaniche.

#### 3.3.1 Analisi fisiche: spessore e densità

A causa della mancanza dei campioni trattati con TRICOL e TRITDOC, i risultati medi di spessore e densità vengono riportati in istogrammi con una sola colonna, che rappresenta appunto il tessuto nativo. Nonostante l'analisi sotto luce polarizzata (descritta nel *Paragrafo 2.2.2*), in cui emergeva l'omogeneità dell'ARV e la maggior variabilità in termini di spessore e densità tra gli individui nel PRV, per l'analisi del porcino, vengono prelevati campioni da tutte e quattro le zone (ARV, ALV, PRV e PLV). Negli istogrammi (Fig. 3.15 e Fig. 3.16) vengono riportati il valore medio di spessore e di densità per ogni zona ventricolare.



**Fig. 3.15 – Spessore medio dei campioni di pericardio porcino nativo nelle diverse camere cardiache. \* indica la valutazione di tre campioni.**

L'asterisco \* della barra del PLV dell'istogramma indica il numero minore di campioni, in questo caso  $n = 3$ , rispetto a tutte le altre barre che presentano un numero di campioni ( $n$ ) pari a 12. Dal grafico è possibile notare che il PLV presenta un valore di spessore

significativamente maggiore rispetto a tutte le altre zone che ne assumono uno molto simile tra loro.

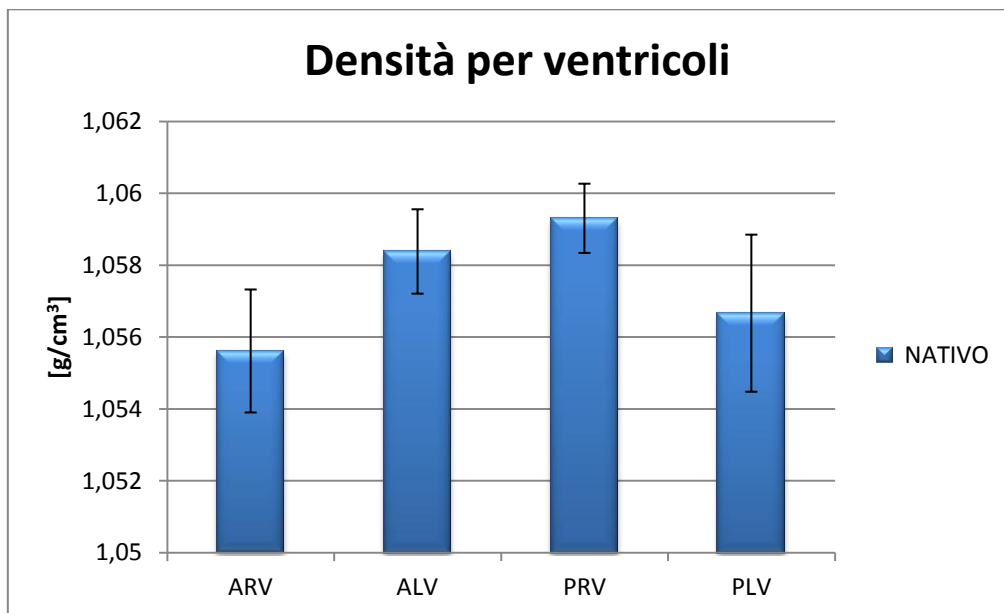


Fig. 3.16 – Densità media dei campioni di pericardio porcino nativo nelle diverse camere cardiache.

La zona del pericardio porcino che possiede un valore maggiore di densità rispetto a tutte le altre è il PRV, quella meno densa appare la zona ARV.

In Tabella 3.14 e 3.15 vengono riportati i valori di spessore e densità dei campioni di pericardio porcino, eliminando la suddivisione in zone.

Tabella 3.14 – Valori medi dello spessore del pericardio porcino.

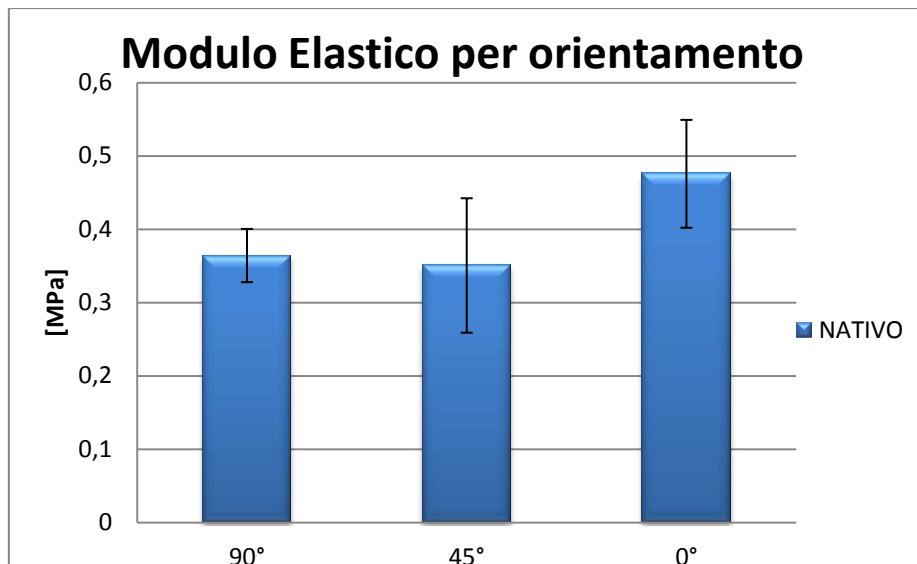
trattamento	Spessore [cm]	errore standard
NATIVO	0.022455	0.001202

Tabella 3.15 – Valori medi della densità del pericardio porcino.

trattamento	Densità [g/cm <sup>3</sup> ]	errore standard
NATIVO	1.05769	0.001508

### 3.3.2 Modulo Elastico

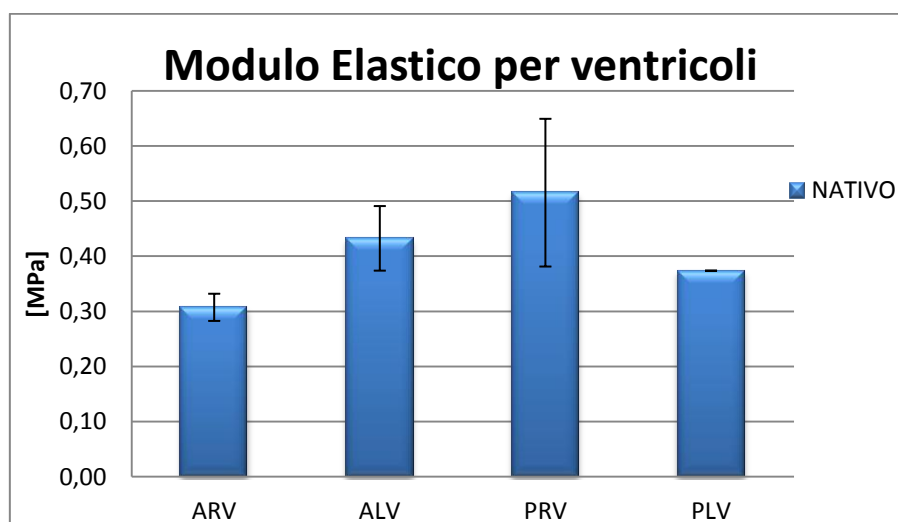
Negli istogrammi successivi (Fig. 3.17 e 3.18) vengono riportati gli andamenti del modulo elastico in base all'orientamento del taglio dei campioni, in base alle camere cardiache ed un unico istogramma unendo orientamento e zona ventricolare.



**Fig. 3.17 – Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio porcino suddivisi in base all'orientamento.**

Dalla Fig. 3.17 si può notare che l'orientamento preferenziale per il taglio dei campioni risulta essere quello a 0°, in quanto presenta un valore di modulo elastico maggiore rispetto all'orientamento a 90° e a 45°. È possibile quindi affermare che il campione tagliato in direzione parallela all'asse interventricolare possiede una maggior resistenza a trazione.

Nella Fig. 3.18 viene rappresentato il modulo elastico in base alle zone ventricolari da cui vengono prelevati i campioni.

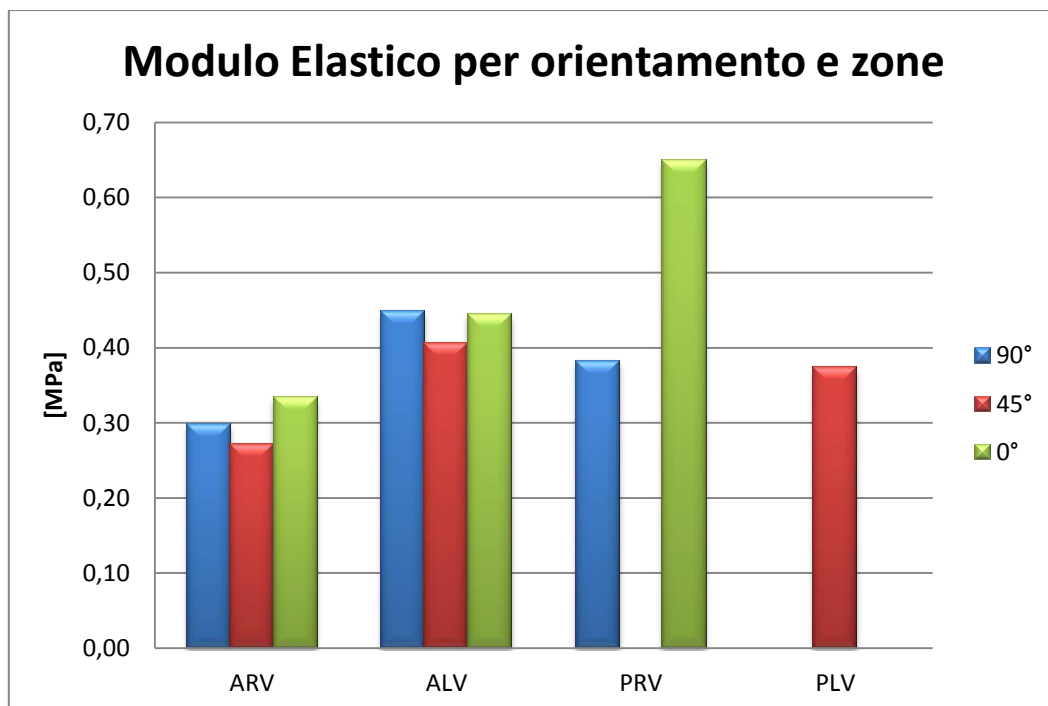


**Fig. 3.18 – Istogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio porcino suddivisi in base ai ventricoli.**

Dall'analisi della luce polarizzata sul pericardio porcino (*Paragrafo 2.2.2*) veniva scelta l'ARV come zona "migliore" e il PRV come quella "peggiore". Dai risultati del modulo elastico nelle quattro zone del pericardio questo andamento non viene confermato.

Nel PLV non è presente la barra di errore proprio perché i campioni prelevati da quella zona si rompevano durante la prova.

In Fig. 3.19 viene riportato l'istogramma del modulo elastico raggruppando i campioni sia in base all' orientamento sia in base alle zone ventricolari da cui vengono prelevati.



**Fig. 3.19 – Iistogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio porcino suddivisi in base ai ventricoli e all'orientamento.**

Non è stato possibile calcolare le deviazioni e gli errori standard a causa dei pochi campioni che resistevano alla sollecitazione imposta. Per lo stesso motivo non sono presenti alcune barre nella Fig. 3.19.

Tutta l'analisi del porcino include infatti pochi dati rispetto all'analisi del pericardio bovino, in quanto la maggior parte di essi si rompevano al primo ciclo di carico o cedevano prima che la prova di trazione si concludesse.

Proprio per il fatto che i campioni di dimensione  $20 \times 3 \text{ mm}^2$  non resistono alla trazione imposta, vengono prelevati da pericardi porcini nativi dei campioni di dimensione maggiore, in particolare più larghi ( $20 \times 5 \text{ mm}^2$ ). I campioni però vengono tagliati con un orientamento

di 90° rispetto al setto; questa analisi era stata effettuata prima di ricavare che l'orientamento a 0° era quello preferenziale al taglio. L'idea di aumentare la dimensione del campione proviene da altri studi effettuati in letteratura [38], i quali sostengono che aumentando la dimensione del campione "circonferenziale" (ovvero quello tagliato a 90°), la rigidità del campione aumenta.

I campioni più grandi vengono quindi prelevati dalle zone del pericardio porcino (ARV, ALV, PRV), tranne dal PLV, e per ognuno di esse vengono tagliati 3 campioni. I valori di modulo elastico vengono calcolati più facilmente in quanto i tessuti più larghi resistono meglio alla trazione. Infatti solo un campione sui nove analizzati si rompe alla sollecitazione.

In Fig. 3.20 viene riportato l'istogramma che rappresenta i valori di modulo elastico per i campioni più larghi.

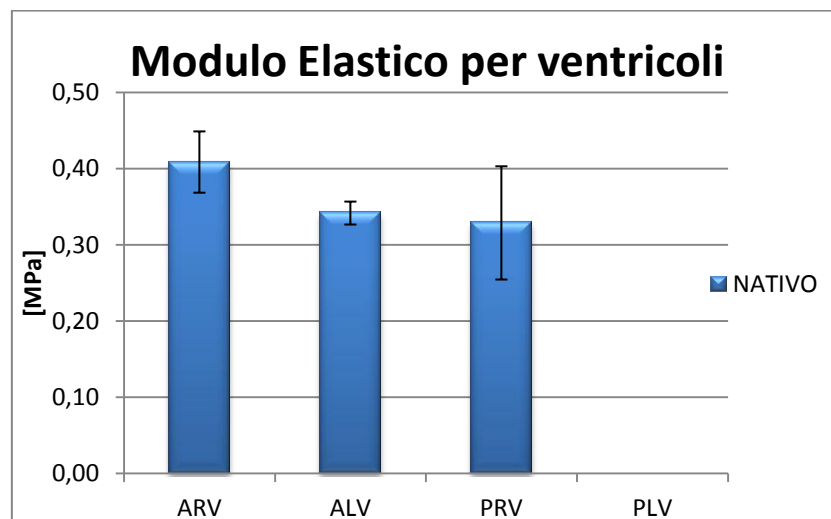


Fig. 3.20 – Iistogramma del modulo elastico dei campioni di pericardio porcino di dimensioni 20 x 5 mm<sup>2</sup>.

Il PLV non possiede la barra perché non sono stati prelevati campioni da questa zona. Dall'analisi è possibile affermare che la zona ARV possiede una resistenza alla trazione maggiore, il PRV una resistenza minore e l'ALV un valore intermedio. Questo andamento del modulo elastico è conforme con le proprietà fisiche del pericardio porcino, che prevedeva l'ARV come zona più omogenea e il PRV come zona più variabile.

Tutta l'analisi del pericardio porcino ovviamente risulta preliminare ed è necessario integrare i risultati con altri campioni nativi per avere un'analisi più accurata.

### 3.4 Bovino vs porcino

In questo paragrafo vengono riportati i confronti tra pericardio bovino e pericardio porcino sia delle caratteristiche fisiche (spessore e densità) che di quelle biomeccaniche (modulo elastico).

Lo spessore medio dei campioni nativi porcini risulta minore rispetto a quello bovino nativo. Al contrario, la sua densità media presenta un valore maggiore rispetto al bovino. Negli istogrammi successivi (Fig.3.21 e 3.22) vengono riportati i confronti dello spessore e della densità tra pericardio bovino e porcino.

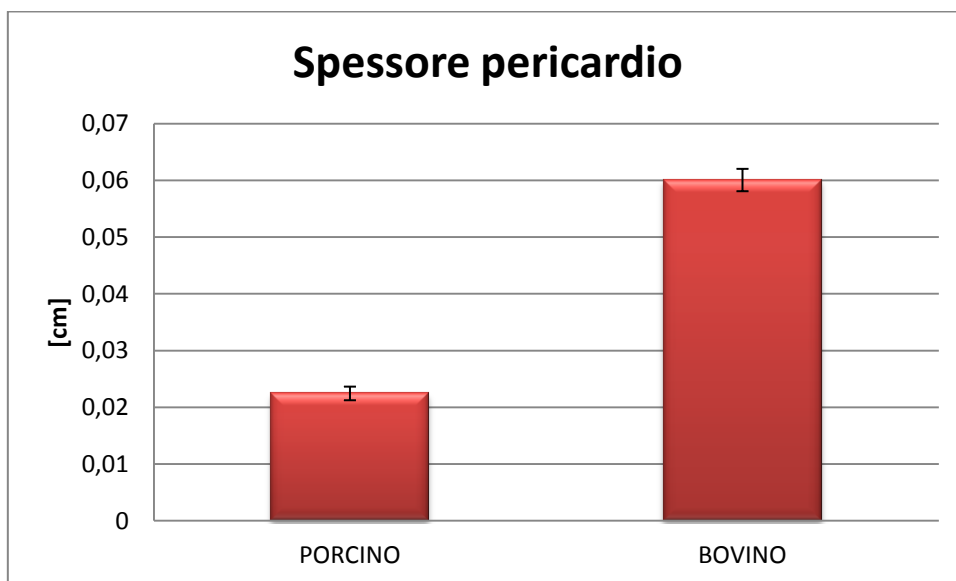


Fig. 3.21 – Spessore medio dei campioni di pericardio porcino e bovino nativi.

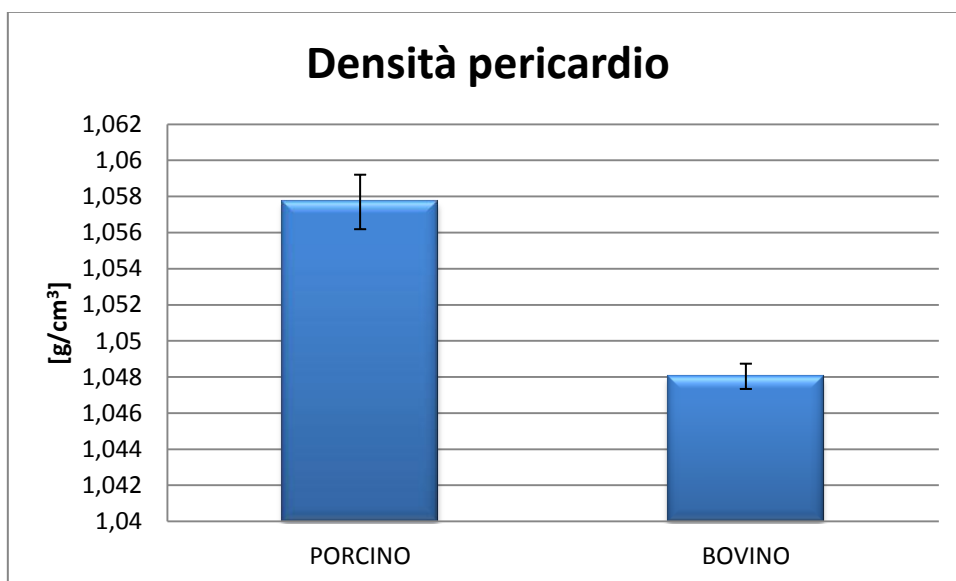


Fig. 3.22 – Densità media dei campioni di pericardio porcino e bovino nativi.

Dall'esperienza con pericardio porcino si è visto che quasi tutti i campioni si sono rotti durante la prova e così è possibile affermare che il pericardio porcino non resiste alla stessa sollecitazione del pericardio bovino, anche se i valori del modulo elastico trovati sono quasi identici. In Tabella 3.16 vengono riportati i valori medi del bovino e del porcino, eliminando la suddivisione per zone ventricolari.

**Tabella 3.16 – Valori medi del modulo elastico del pericardio bovino e porcino.**

<b>Pericardio nativo</b>	<b>Modulo Elastico [MPa]</b>	<b>errore standard</b>
BOVINO	0.356180	0.045943
PORCINO	0.388556	0.084356

Un fattore importante è la differenza nel numero di campioni tra i due pericardi in cui è stato possibile calcolare il modulo elastico. Nel bovino il numero di campioni è pari a 58, mentre nel porcino solo 19 di essi sono riusciti a resistere alla trazione.



## CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi propone un metodo per la caratterizzazione di un materiale biologico, il pericardio, sfruttando le potenzialità del Sistema Bose Electroforce. Il Sistema Bose è capace di eseguire una vasta gamma di test su diversi materiali; in particolare nel presente lavoro vengono presi in considerazione pericardi bovini e porcini. Per caratterizzare il tessuto viene calcolato il modulo elastico come pendenza della curva sperimentale acquisita nel corso di prove di trazione monoassiale.

Gli obiettivi sviluppati durante le prove sperimentali sono molteplici: dal confronto tra i pericardi bovini nativi e decellularizzati a quello tra nativi bovini e porcini; interessante appare il confronto tra le varie zone all'interno del pericardio stesso.

Nella prima configurazione del sistema (quella in cui il tessuto subisce il pre-tensionamento) il pericardio bovino nativo offre resistenza alla trazione minore rispetto al tessuto trattato TRITDOC, sia nella zona ventricolare anteriore sinistra che in quella posteriore destra. Il trattamento TRITDOC determina quindi un incremento delle proprietà biomeccaniche del tessuto. Dai risultati ottenuti (Capitolo 3) la zona del pericardio che appare più resistente alla trazione è l'ALV, eventuale settore di prelievo del tessuto per la produzione di lembi valvolari protesici.

Nella seconda configurazione (senza pre-tensionamento), il tessuto trattato TRICOL possiede un valore di modulo elastico maggiore rispetto al TRITDOC e al nativo. Anche in questo caso la zona migliore per il prelievo del tessuto appare l'ALV, rispetto al PRV.

In entrambi i casi, per la produzione di valvole cardiache sembra più opportuno utilizzare il tessuto trattato rispetto a quello nativo, in quanto più resistente dal punto di vista meccanico.

Dalle prove sperimentali effettuate su tessuto pericardico porcino, sembrerebbe possibile dedurre che esso non rappresenta un potenziale supporto per la produzione di bioprotesi cardiache. Il tessuto porcino, infatti, se sottoposto alla stessa sollecitazione del bovino, non resiste durante la prova: la trazione fa sì che si arrivi alla rottura del provino.

Durante le prove sperimentali però sono emersi vari problemi riguardanti la strumentazione in uso, i campioni e la possibilità di calcolare la curva sforzo-deformazione.

In particolare, il Sistema Bose prevede un limite principale: il massimo spostamento che è possibile imporre al tessuto è di circa 6.5 mm. Per questo motivo è stato difficile portare a

rottura il tessuto bovino, mentre per quello porcino non è stato un problema, in quanto più sottile e meno resistente. Altro problema emerso è la mancata possibilità di monitorare la temperatura della soluzione fisiologica utilizzata per idratare il tessuto pericardico. Questo limite però può essere risolto inserendo un sistema di controllo della temperatura per mantenere quella desiderata; si può inoltre inserire il coperchio del bagno salino in modo da evitare dispersioni di calore.

Altro problema riscontrato ma risolvibile riguarda il taglio dei provini. Per creare i campioni di dimensione  $20 \times 3 \text{ mm}^2$  è stato utilizzato un bisturi e, a mano, essi sono stati tagliati in forma rettangolare, provocando però delle piccole differenze di dimensione.

Per evitare imprecisioni ed errori, sarebbe più comodo utilizzare un sistema speciale per il taglio dei campioni, di dimensioni opportune; la forma del provino, ove possibile potrebbe essere a 'manubrio' (detto anche a "osso di cane"), in modo da migliorare la tenuta del campione e preservare il provino nelle zone di estremità, dove si potrebbero avere danneggiamenti dovuti all'azione delle pinze [29,33].

Il calcolo, inoltre, del modulo elastico appare abbastanza preciso e minuzioso: il limite più evidente sta nel calcolo della reale curva sforzo-deformazione. Nel lavoro è stata calcolata la curva "ingegneristica", in realtà si dovrebbe cercare un modo per calcolare la curva tenendo in considerazione la variazione della sezione nel corso dell'esperimento.

Sviluppi futuri dello studio prevedono la possibilità di sottoporre anche il pericardio porcino a trattamenti di decellularizzazione TRICOL e TRITDOC, in modo da poter valutare se il tessuto trattato abbia resistenza alla trazione superiore rispetto al tessuto nativo.

## APPENDICE

In questa sezione vengono descritti i dettagli delle procedure che conducono all'eliminazione delle cellule e dei residui cellulari dalla matrice extracellulare del tessuto pericardico. In particolare vengono esposti i due trattamenti utilizzati nel lavoro di tesi denominati rispettivamente TRICOL e TRITDOC.

### **Protocollo TRICOL**

I tessuti pericardici vengono prelevati dal macello e vengono posti in tubi con soluzione fisiologica. Il metodo prevede una serie di steps:

- STEP I con inibitori di proteasi: il tessuto viene posto in una soluzione composta da tampone madre "A" (T.m.A.) al 10%, costituita da ascorbato di sodio o acido ascorbico ed EDTA sciolti in PBS, dal 10% di dimetilsolfossido (DMSO) e due tipi di inibitori di proteasi:
  - Tipo A: fenilmetilsulfonil (P.M.S.F.) e N-etilmaleimide (N.E.M.) le quali agiscono a livello del gruppo serinico inibendo la proteasi;
  - TIPO B: benzamidina (B.A.) e iodoacetammide (I.A.).

Gli inibitori di tipo A vengono inseriti in un tubo piccolo con volume di circa 330 ml, nell'altro tubo da 400 ml invece vengono inseriti gli inibitori di tipo B; vengono posti successivamente in agitazione per 8 ore a +4°C.

- LAVAGGIO con soluzione ipotonica: questo lavaggio è effettuato per eliminare gli inibitori e il DMSO. La soluzione, costituita da 10% di T.m.A. e 0.04% di  $\text{NaN}_3$ , viene posta nuovamente in agitazione a +4°C per 8 ore.
- STEP II con inibitori di proteasi: è utilizzata una nuova soluzione costituita da 10% di T.m.A. e 1% di TRITON X-100 e a seconda dei tubi vengono inseriti i due inibitori. Il tutto è posto in agitazione per 8 ore a +4°C.
- LAVAGGIO con soluzione ipertonica: il lavaggio viene effettuato due volte, ogni volta per 8 ore ad una temperatura di +4°C. La soluzione ipertonica è costituita da T.m.A. al 10%, NaCl 0,5 M, 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 0.1% di TRITON X-100.
- LAVAGGIO: esso viene eseguito due volte ed è necessario per eliminare i sali. Viene effettuato utilizzando una soluzione costituita da 10% di T.m.A., 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 0.1%

di TRITON X-100. La soluzione del primo lavaggio viene preparata in acqua MilliQ, invece, quella del secondo lavaggio in PBS. I tubi vengono posti in agitazione per 1 ora e 30 minuti a +4°C per il primo lavaggio e a temperatura ambiente per il secondo lavaggio.

- STEP III con aggiunta del colato di sodio: viene utilizzata una soluzione costituita da 10% di T.m.A., 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 10 mM di colato di sodio o acido colico 10 mM. La soluzione deve risultare a pH fisiologico di 7.4. I tubi vengono posti sotto agitazione per 8 ore a temperatura ambiente in quanto il colato a +4°C tende a gelificare e a variare il pH. Il trattamento viene eseguito due volte.
- LAVAGGI FINALI: vengono effettuati per eliminare i residui di matrice e i detergenti e viene utilizzato PBS isotonico a pH fisiologico 7.4 e 0.04% di  $\text{NaN}_3$ . I tubi vengono posti sotto agitazione per 1 ora e 30 minuti per due lavaggi. Il primo viene mantenuto a temperatura ambiente, per eliminare i residui di colato, il secondo lavaggio viene effettuato a +4°C.
- LAVAGGIO in fisiologica: per 30 minuti viene effettuato un lavaggio con 0.9% di NaCl e 0.04% di  $\text{NaN}_3$ .
- PASSAGGIO in soluzione fisiologica: vengono effettuati due lavaggi in soluzione costituita da 0.9% di NaCl , 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 10% di isopropanolo, utile per eliminare il colato di sodio e il TRITON. I tubi vengono posti sotto agitazione per 1 ora a +4°C.
- DIGESTIONE degli ACIDI NUCLEICI: viene eseguita utilizzando Benzonase, una endonucleasi aspecifica ricombinante senza proteasi che digerisce appunto gli acidi nucleici. L'enzima viene prelevato con una siringa sterile e iniettato all'interno dei tubi sotto condizioni di sterilità. La digestione avviene per 24 ore a 37°C sotto costante agitazione ed in un bioreattore. Alla fine vengono effettuati altri lavaggi.
- CONSERVAZIONE dei campioni in PBS o in soluzione fisiologica.

## **Protocollo TRITDOC**

Il pericardio viene immerso in soluzione fisiologica o PBS per tutto il tempo relativo al trasporto in laboratorio. I campioni vengono poi inseriti in tubi con soluzione fisiologica fresca e lasciati equilibrare sotto agitazione a +4°C per 4 ore. Anche per questo tipo di trattamento sono necessarie varie fasi:

- STEP I con inibitori di proteasi: il tessuto viene posto in una soluzione composta da tampone madre "A" (T.m.A.) al 10%, costituita da ascorbato di sodio o acido ascorbico ed EDTA sciolti in PBS, dal 10% di dimetilsolfossido (DMSO) puro e due tipi di inibitori di proteasi:
  - Tipo A: fenilmetilsulfonil (P.M.S.F.) e N-etilmaleimide (N.E.M.) le quali agiscono a livello del gruppo serinico inibendo la proteasi;
  - TIPO B: benzamidina (B.A.) e iodoacetammide (I.A.).

Gli inibitori di tipo A vengono inseriti in un tubo piccolo con volume di circa 330 ml, nell'altro tubo da 400 ml invece vengono inseriti gli inibitori di tipo B; vengono posti successivamente in agitazione per 8 ore a +4°C.

- LAVAGGIO con soluzione ipotonica: questo lavaggio viene effettuato per eliminare gli inibitori e il DMSO. La soluzione, costituita da 10% di T.m.A. e 0.04% di NaN<sub>3</sub>, viene posta nuovamente in agitazione a +4°C per 8 ore.
- STEP II con inibitori di proteasi: viene utilizzata una nuova soluzione costituita da 10% di T.m.A. e 1% di TRITON X-100 e a seconda dei tubi vengono inseriti i due inibitori. Il tutto viene posto in agitazione per 8 ore a +4°C.
- LAVAGGIO: viene effettuato con una soluzione costituita da T.m.A. al 10%, 0.04% di NaN<sub>3</sub> e 0.1% di TRITON X-100, in assenza di inibitori. I tubi vengono posti sotto agitazione per 8 ore a +4°C.
- LAVAGGIO con soluzione ipertonica: il lavaggio viene effettuato due volte, ciascuno di 8 ore ad una temperatura di +4°C. La soluzione ipertonica è costituita da T.m.A. al 10%, NaCl 0,5 M, 0.04% di NaN<sub>3</sub> e 0.1% di TRITON X-100.
- LAVAGGIO: viene eseguito due volte ed è necessario per eliminare i sali. Viene effettuato utilizzando una soluzione costituita da 10% di T.m.A., 0.04% di NaN<sub>3</sub> e 0.1% di TRITON X-100. La soluzione del primo lavaggio viene preparata in acqua MilliQ, invece quella del secondo lavaggio in PBS. I tubi vengono posti in agitazione per 1 ora e

30 minuti a +4°C per il primo lavaggio e a temperatura ambiente per il secondo lavaggio.

- STEP III con aggiunta del TAURODEOSSICOLATO di SODIO: viene utilizzata una soluzione costituita da 10% di T.m.A., 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 4 mM di taurodeossicolato. La soluzione deve risultare a pH fisiologico di 7.4. I tubi vengono posti sotto agitazione per 8 ore a temperatura ambiente in quanto il colato a +4°C tende a gelificare e a variare il proprio pH. Il trattamento viene eseguito due volte.
- LAVAGGI FINALI: vengono effettuati per eliminare i residui di matrice e i detergenti e viene utilizzato PBS isotonic a pH fisiologico 7.4 e 0.04% di  $\text{NaN}_3$ . I tubi vengono posti sotto agitazione per 1 ora e 30 minuti per due lavaggi. Il primo viene mantenuto a temperatura ambiente, per eliminare i residui di colato, il secondo lavaggio viene effettuato a +4°C.
- LAVAGGIO in fisiologica: per 30 minuti viene effettuato un lavaggio con 0.9% di NaCl e 0.04% di  $\text{NaN}_3$ .
- PASSAGGIO in soluzione fisiologica: vengono effettuati due lavaggi in soluzione costituita da 0.9% di NaCl, 0.04% di  $\text{NaN}_3$  e 10% di isopropanolo, utile per eliminare il colato di sodio e il TRITON. I tubi vengono posti sotto agitazione per 1 ora a +4°C.
- CONSERVAZIONE dei campioni in PBS o in soluzione fisiologica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Bagno, C. Di Bello. *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna, 2009
- [2] A.C. Guyton, J.E. Hall, L. Zocchi. *Fisiologia medica*. Elsevier, 11th edizione, 2010
- [3] *Grande Dizionario Enciclopedico UTET*. Quarta edizione, Editrice Torinese, 1994
- [4] E. Filova, F. Straka, T. Mirejovsky, J. Masin, L. Bacakova. *Tissue-Engineered Heart Valves*. *Physiol Res.*, 58: S141 – S158, 2009
- [5] E. Manzan. *Valutazione di biomateriali per la creazione di scaffolds da utilizzare nell'Ingegneria Tissutale: caratterizzazione delle proprietà fisiche e degli aspetti morfo – strutturali del pericardio bovino e porcino, prima e dopo decellularizzazione*. Tesi di Laurea, Università di Padova, 2011
- [6] <http://www.medicitalia.it>
- [7] <http://www.santannahospital.it>
- [8] <http://www.aggiornamentocritico.com>
- [9] F. Maisano, I. Michev, P. Denti, O. Alfieri, A. Colombo. *Transfemoral Transcatheter aortic valve implantation using the ballon expandable sapien transcatheter heart valve device*. *Multimedial manual of cardiothoracic surgery*, 2007
- [10] C. Agnoletto. *Valvole transcutanee: limiti e prospettive*. Tesi di Laurea, Università di Padova, 2010
- [11] G. Anastasi, S. Capitani, M.L. Carnazza, S. Cinti et all. *Trattato di anatomia umana*. Vol. 1, Edi. Ermes, 2006
- [12] R. Pignatello. *Biomaterials Science and Engineering*, cap. 22, In Tech, settembre 2011
- [13] ED. Heister, MS. Sacks. *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic Analysis*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(2): 215-21, 1998
- [14] ED. Heister, MS. Sacks. *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(2):207-14, 1998
- [15] <http://www.synovissurgical.com/>
- [16] <http://www.neovasc.com>
- [17] <http://www.tutogen.de/home.html>
- [18] <http://www.sorin.com>
- [19] <http://www.edwards.com>

- [20] M. Spina, F. Ortolani, A. El Messlemani, A. Gandaglia, J. Bujan, N. Garcia-Honduvilla, I. Vesely, G. Gerosa, D. Casarotto, L. Petrelli, M. Marchini. *Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprosthesis: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features*. Journal of Biomedical Materials Research, 67(4):1338-50, 2003
- [21] L. Iop, V. Renier, F. Naso, M. Piccoli, A. Bonetti, A. Gandaglia, M. Pozzobon, A. Paolin, F. Ortolani, M. Marchini, M. Spina, P. De Coppi, S. Sartore, G. Gerosa. *The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds*. Biomaterials, vol. 30; p. 4104-4116, 2009
- [22] D. Oswal, S. Korossis, S. Mirsadraee, H. Wilcox, K. Watterson, J. Fisher, E. Ingham. *Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium*. The Journal of Heart Valve Disease, 16(2):165-74, 2007
- [23] A. Cigliano, A. Gandaglia, A.J. Lepedda, E. Zinellu, F. Naso, A. Gastaldello, P. Aguiari, P. De Muro, G. Gerosa, M. Spina, M. Formato. *Fine structure of glycosaminoglycans from fresh and decellularized porcine cardiac valves and pericardium*. Biochem. Res. Int., 2012
- [24] J.M. Garcia-Paez, E. Jorge Herrero, A. Carrera Sanmartin, L. Millan, A. Cordon, M. Martin Maestro. *Comparison of the mechanical behaviors of biological tissue subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex*. Biomaterials, 2, 1671-1679, 2003
- [25] [worldwide.bose.com/electroforce](http://worldwide.bose.com/electroforce)
- [26] *WinTest Software Reference Manual*, Document Number 710285-410, Revision 4.1, 2009
- [27] G.S. Montes, L.C.U. Junqueira. *The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 86, Suppl. III, 1-11, 1991
- [28] A. Gastaldello. *Ingegneria tessutale delle valvole cardiache: valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su pericardio bovino e porcino*. Tesi di dottorato di ricerca in scienze mediche, cliniche e sperimentali, Università di Padova, 2012
- [29] F.M. Sanchez-Arevalo, M. Farfan, D. Covarrubias, R. Zenit, G. Pulos. *The micromechanical behaviour of lyophilized glutaraldehyde-treated bovine pericardium under uniaxial tension*. Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials, 3(8): 640-646, 2010



- [30] Z. Liu, K. Yeung. *The preconditioning and stress relaxation of skin tissue*. Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering, 2(1): 22-28, 2008
- [31] S. Cheng, E.C. Clarke, L. E. Bilston. *The effects of preconditioning strain on measured tissues properties*. Journal of Biomechanics, 42(9): 1360-1362, 2009
- [32] E.O. Carew, J. E. Barber, I. Vesely. *Role of preconditioning and recovery time in repeated testing of aortic valve tissues: validation through quasilinear viscoelastic theory*. Annals of Biomedical Engineering, 28(9): 1093-1100, 2000
- [33] A. Natali. Dispense del corso di Meccanica dei tessuti biologici
- [34] B. Mendoza-Novelo, E. Avila, J.V. Cauich-Rodriguez, E. Jorge-Herrero, F.J. Rojo, G.V. Guinea, J.L. Mata-Mata. *Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticità and glycosaminoglycan content*. Acta Biomaterialia 7, 1241-1248, 2007
- [35] F.J. Rojo, G.V. Guinea, E. Jorge-Herrero, J.M. Atienza, J.M. Garcia-Paez. *Resistencia a tracción de membranas de pericardio para válvulas cardiacas biológicas*. Anales de Mecánica de la Fractura 26, Vol. 1, 2009
- [36] F. Pellizzaro. *Il Sistema BoseElectroForce per la caratterizzazione meccanica e il condizionamento di tessuti biologici*. Tesi di laurea, Università di Padova, 2011
- [37] J.L.M. Costa, P.M.A. Pomerantzeff, D.M. Braile, V.A. Ramirez, G. Goissis, N.A.G. Stolf. *Comparison between the decellularized bovine pericardium and the conventional bovine pericardium used in the manufacture of cardiac bioprotheses*. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, 20(1): 14-22, 2005
- [38] E.O. Carew, J. Patel, A. Garg, P. Houghtaling, E. Blackstone and I. Vesely. *Effect of Specimen Size and Aspect Ratio on the Tensile Properties of Porcine Aortic Valve Tissues*. Annals Of Biomedical Engineering, 31(5): 526-535, 2003

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il mio relatore prof. Andrea Bagno per la professionalità dimostrata e la puntualità con cui svolge il suo lavoro, esempio da seguire per noi studenti.

Ringrazio la dott.ssa Paola Aguiari per la completa disponibilità nei miei confronti durante tutto il periodo di tesi e oltre.

Ringrazio la mia famiglia per avermi dato la possibilità di raggiungere questo traguardo e per aver sempre creduto in me.

Ringrazio, infine, tutte le persone che mi sono state vicine in tutto il mio percorso universitario.