



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

Tesi di Laurea Magistrale

**ANALISI DEL COMPORTAMENTO
MECCANICO DEL TESSUTO
DIAFRAMMATICO UMANO**

Relatore:

Prof.ssa Silvia Todros

Laureanda:

Margherita Pelosin

ANNO ACCADEMICO: *2021/2022*

Data di laurea: *4 Aprile 2022*

INDICE

Introduzione.....	1
1. Diaframma: anatomia, fisiologia e caratteristiche meccaniche.....	5
1.1 Anatomia e funzioni del diaframma.....	5
1.2 Il muscolo diaframma: aspetti istologici e biomeccanici.....	7
1.2.1 Il tessuto muscolare.....	7
1.2.2 Il tessuto muscolare striato scheletrico.....	8
1.2.3 Biomeccanica della contrazione muscolare.....	9
1.2.4 Il tessuto connettivo che avvolge il muscolo striato scheletrico.....	10
1.3 Analisi microstrutturale e biomeccanica dei tessuti connettivi intramuscolari.....	11
1.3.1 Il collagene.....	12
1.3.2 L'elastina.....	14
1.3.3 La sostanza di fondo.....	16
1.3.4 Comportamento meccanico dei tessuti connettivi molli.....	17
1.4 Comportamento viscoelastico dei tessuti biologici.....	18
1.4.1 Prove meccaniche per la caratterizzazione del comportamento viscoelastico.....	19
1.4.2 Viscoelasticità lineare.....	20
1.4.3 Viscoelasticità lineare generalizzata.....	23
1.5 Stato dell'arte sul comportamento meccanico del tessuto diaframmatico umano.....	24
2. L'ingegneria dei tessuti per il trattamento di difetti diaframmatici.....	29
2.1 Patologie del muscolo diaframma.....	29
2.1.1 Ernia diaframmatica congenita.....	29
2.1.2 Ernia diaframmatica traumatica.....	31
2.1.3 Paralisi diaframmatica.....	31
2.1.4 <i>Eventratio</i> congenita.....	32
2.1.5 Tecniche di trattamento convenzionali.....	33
2.2 Ingegneria dei tessuti.....	34
2.2.1 Approccio generale.....	34

2.2.2	La componente cellulare.....	35
2.2.3	Cellule staminali adulte per la rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico.....	36
2.2.4	Scaffold e matrice extra-cellulare.....	38
2.2.5	Decellularizzazione.....	40
2.2.6	Valutazione dell'efficacia della decellularizzazione.....	42
2.2.7	Proprietà meccaniche dello scaffold decellularizzato.....	43
3.	Materiali e metodi.....	47
3.1	Decellularizzazione del tessuto diaframmatico.....	47
3.2	Prove meccaniche.....	48
3.2.1	La macchina di prova Bose® ElectroForce.....	48
3.2.2	Il software <i>WinTest</i>	49
3.3	Preparazione dei campioni.....	50
3.4	Set up sperimentale.....	51
3.5	Protocollo di carico.....	52
3.5.1	Prove di trazione.....	52
3.5.2	Prove di rilassamento delle tensioni.....	53
3.6	Elaborazione dei dati.....	54
3.6.1	Elaborazione dei risultati delle prove di trazione.....	54
3.6.2	Elaborazione dei risultati delle prove di rilassamento delle tensioni.....	56
4.	Risultati e discussione.....	59
4.1	Risultati delle prove di trazione.....	59
4.1.1	Tessuto diaframmatico nativo.....	59
4.1.2	Confronto tra tessuto diaframmatico nativo e decellularizzato.....	64
4.2	Risultati delle prove di rilassamento delle tensioni.....	69
4.2.1	Tessuto diaframmatico nativo.....	69
4.2.2	Confronto tra tessuto diaframmatico nativo e decellularizzato.....	72
	Conclusioni.....	81
	Bibliografia.....	85

INTRODUZIONE

Il diaframma è uno dei più importanti muscoli scheletrici del corpo umano. Infatti, oltre a svolgere un ruolo vitale nella respirazione, consentendo il fisiologico funzionamento dei polmoni durante l'atto respiratorio, il muscolo diaframmatico risulta fondamentale anche in attività non respiratorie, tra cui l'orinazione, la defecazione, l'emesi, e in tutte quelle azioni che richiedono l'espulsione violenta di aria dalle vie aeree. L'espletamento di tali funzioni è reso possibile dalla complessa organizzazione gerarchica del tessuto muscolare scheletrico, supportata dalla presenza di una fitta rete di setti connettivali, la cui composizione microstrutturale riflette di fatto quella della matrice extra-cellulare (ECM) di tutti i tessuti biologici.

Allo stesso tempo, le patologie che possono interessare il muscolo diaframma, compromettendone l'integrità e la funzionalità, sono svariate: difetti congeniti o eventi traumatici possono essere la causa di ernie diaframmatiche, le quali prevedono l'erniazione di organi addominali all'interno della cavità toracica; danni a carico del diaframma o del nervo frenico possono portare alla cosiddetta paralisi diaframmatica, una disfunzione transitoria o permanente caratterizzata da una ridotta o assente forza di contrazione muscolare che interessa tutto il diaframma o una porzione di esso, pur mantenendo intatte le sue inserzioni; caratteristiche fisiopatologiche analoghe sono associate all'*eventratio* diaframmatica, la quale rappresenta, invece, un disturbo congenito dovuto ad anomalie di sviluppo del muscolo.

L'interruzione della fisiologica attività di contrazione del diaframma a causa di un trauma o di un difetto congenito provoca delle gravi disfunzioni a livello respiratorio. In riferimento alle ernie diaframmatiche congenite, ad esempio, il tasso di mortalità ad esse associate risulta pari al 50-60%, mentre si aggira attorno al 31% nel caso delle ernie traumatiche. Tali decessi sono dovuti solitamente a manifestazioni di ipoplasia o di ipertensione polmonare legate al fatto che i contenuti addominali erniati vanno ad ostacolare il corretto sviluppo e/o il funzionamento dei polmoni e dell'albero tracheobronchiale. Non meno rilevante è l'elevato grado di morbilità causato dallo sviluppo di complicazioni, oltre che a livello respiratorio, anche a livello gastrointestinale, scheletrico e psicomotorio.

Ad oggi, lo standard chirurgico per la riparazione di ernie e difetti diaframmatici prevede l'utilizzo di *patch* di materiale sintetico non biorassorbibile, tipicamente in politetrafluoroetilene espanso (ePTFE). Tuttavia, sebbene questa soluzione superi molti dei limiti associati alla tecnica del trapianto autologo, eliminando la morbilità del sito donatore e diminuendo il tempo di convalescenza dopo l'impianto, l'utilizzo di innesti sintetici risulta associata al rischio di una severa risposta immunitaria da parte dell'organismo ospite, alla trasmissione di malattie infettive oltre che ad una scarsa

integrazione dell'innesto con il tessuto nativo. Nei pazienti pediatrici, inoltre, l'eccessiva rigidità del materiale ne impedisce la compatibilità con il progredire della crescita del soggetto, costringendo quest'ultimo a subire numerosi interventi chirurgici per la sostituzione dell'innesto.

La scarsa integrazione dei *patch* di materiale sintetico con i tessuti biologici circostanti è peraltro la principale causa dell'elevato tasso di recidiva delle ernie diaframmatiche: la ri-erniazione si verifica, infatti, nel 28-50% dei casi, generalmente attorno ai 12 mesi dopo l'impianto.

In questo contesto, l'ingegneria dei tessuti può rappresentare una valida alternativa nel trattamento dei difetti che possono compromettere il tessuto muscolare scheletrico del diaframma. I costrutti bioingegnerizzati, infatti, in caso di successo, sono in grado di integrarsi al meglio con i tessuti dell'organismo ospite, diminuendo la possibilità di infezioni o di reazioni immunitarie contro l'innesto impiantato e, soprattutto, minimizzando la probabilità di re-intervento finalizzato alla sostituzione del costrutto per adattarlo alla crescita del paziente.

In quest'ottica, negli ultimi anni, la ricerca nell'ambito della rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico ha focalizzato la propria attenzione nello sviluppo di costrutti bioingegnerizzati ottenuti direttamente dalla decellularizzazione di tessuti nativi. È noto, infatti, che la matrice extracellulare del muscolo scheletrico svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella rigenerazione del muscolo, fornendo stimoli di tipo chimico, fisico e meccanico, che nel complesso guidano e regolano tutti gli aspetti della vita cellulare. Riguardo gli stimoli meccanici della matrice extra-cellulare, in particolare, diversi studi hanno dimostrato che le cellule dei mammiferi, comprese quelle del tessuto muscolare scheletrico, sono capaci di mecano-trasduzione, intendendo con questo termine la peculiare capacità, da parte delle cellule, di percepire le complessive caratteristiche meccaniche del substrato a cui sono adese, con una risposta che è fortemente dipendente dallo specifico tipo cellulare. Questa proprietà contribuisce a regolare la maggior parte degli aspetti della vita cellulare, tra cui l'adesione, la proliferazione, la migrazione e l'eventuale differenziazione.

Si può dunque comprendere che, ai fini dell'utilizzo di scaffold decellularizzati per la riparazione di difetti del muscolo diaframmatico, il mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto nativo dopo il trattamento di decellularizzazione è di primaria importanza per assicurare la corretta funzionalità del costrutto.

Allo stesso tempo, benché in letteratura siano reperibili diversi studi riguardanti lo sviluppo e l'analisi biomeccanica di costrutti decellularizzati derivanti da diaframma animale (di ratto e topo, in particolare), ad oggi mancano lavori sperimentali di questo tipo eseguiti a partire dal tessuto diaframmatico umano.

È in tale contesto che si inserisce il seguente lavoro di tesi sperimentale: quest'ultimo, svolto a supporto di un progetto più ampio, condotto in collaborazione con la Sezione di Anatomia Umana

del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova, si pone come primo obiettivo quello di eseguire un'analisi del comportamento meccanico del tessuto diaframmatico umano, focalizzando l'attenzione sulla risposta meccanica a trazione e sulle proprietà viscoelastiche. Successivamente, le proprietà meccaniche del muscolo diaframmatico umano allo stato nativo sono state messe a confronto con quelle dello stesso tessuto trattato secondo quattro protocolli di decellularizzazione distinti. L'analisi, nello specifico, è volta a valutare possibili variazioni nel comportamento meccanico del tessuto indotte dall'utilizzo, per la decellularizzazione, dei seguenti quattro detergenti: sodio dodecilsolfato (SDS) (1), SDS + TergitolTM (2), sodio desossicolato (SDC) (3) e TergitolTM (4). Nel primo capitolo dell'elaborato, dopo una breve descrizione degli aspetti anatomici e funzionali del diaframma, vengono presentate le caratteristiche istologiche, microstrutturali e biomeccaniche del tessuto muscolare scheletrico e delle strutture connettivali intramuscolari, concludendo con un'analisi dello stato dell'arte sul comportamento meccanico del tessuto diaframmatico umano.

Il secondo capitolo, invece, verte sulle possibili patologie che possono interessare il muscolo diaframma, presentando l'approccio innovativo dell'ingegneria dei tessuti come una valida alternativa alle attuali strategie di trattamento ad oggi in uso nella pratica clinica. Particolare attenzione viene posta sulle procedure di decellularizzazione e sulla valutazione dell'efficacia del processo, soprattutto in relazione alle proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato.

Nel terzo capitolo sono descritti i materiali e i metodi utilizzati nello studio sperimentale, nello specifico i campioni di tessuto diaframmatico analizzati e la preparazione dei provini, la strumentazione utilizzata, le prove meccaniche svolte e la procedura seguita per l'elaborazione dei dati raccolti.

Infine, il capitolo quarto espone i risultati complessivamente ottenuti e una discussione relativa ai dati sperimentali, al raggiungimento degli obiettivi di questa attività di tesi e ai possibili sviluppi futuri.

CAPITOLO 1

DIAFRAMMA: ANATOMIA, FISIOLOGIA E CARATTERISTICHE MECCANICHE

1.1 Anatomia e funzioni del diaframma

Da un punto di vista anatomico, il diaframma è una sottile struttura muscolo-tendinea che separa la cavità toracica, chiudendola inferiormente, dalla cavità addominale ¹.

Al suo interno si possono distinguere due domini: una parte crurale e una parte costale (Figura 1.2). Il diaframma costale è una sottile lamina a forma di cupola composta da fibre muscolari disposte radialmente: esse originano dal processo xifoideo dello sterno, dal margine costale della parete toracica, dalle estremità delle costole XI e XII, dai legamenti che attraversano le strutture della parete addominale posteriore e dalle vertebre della regione lombare.

Il diaframma crurale, invece, è più spesso ed è situato posteriormente, dove si lega alle vertebre circondando l'esofago e l'aorta.

Medialmente, le fibre muscolari dei due domini si congiungono inserendosi in un unico tendine centrale, posizionato all'apice della cupola diaframmatica (Figura 1.1).

Il tendine centrale è una lamina di tessuto connettivo composto da matrice extra-cellulare e dalle cellule tendinee che la secernono ².

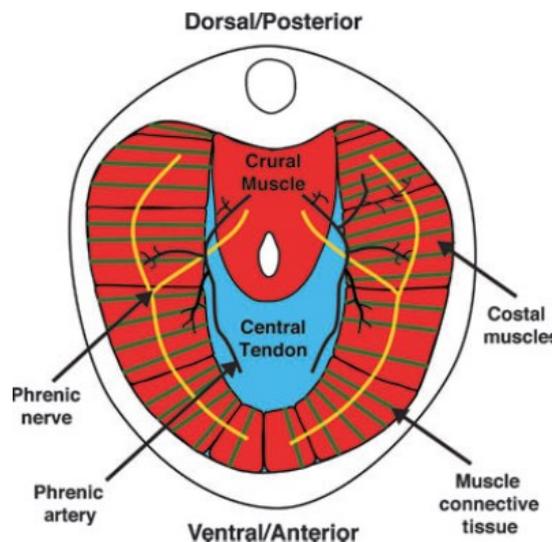


Figura 1.1 – Principali componenti del diaframma umano ².

Il supporto arterioso al diaframma proviene in parte da vasi sanguigni che nascono superiormente rispetto ad esso. Tra questi ci sono: le arterie pericardio-freniche e muscolo-freniche (rami delle

arterie toraciche interne), le arterie freniche superiori (che nascono direttamente dall'aorta toracica) e piccoli rami delle arterie intercostali. Tuttavia, le più grandi arterie che alimentano il diaframma provengono da sotto di esso: queste sono le arterie freniche inferiori, che si diramano direttamente dall'aorta addominale (Figura 1.2) ².

Per quanto riguarda il supporto venoso, invece, questo avviene tramite vene che generalmente sono disposte parallelamente alle arterie.

Le metà destra e sinistra del diaframma sono innervate rispettivamente dai nervi motori frenici destro e sinistro. Questi nervi hanno origine dai nervi cervicali (C3-C5), scendono lungo le vertebre e penetrano il diaframma diffondendosi posteriormente e anteriormente per innervare le fibre muscolari costali e crurali (Figura 1.2) ².

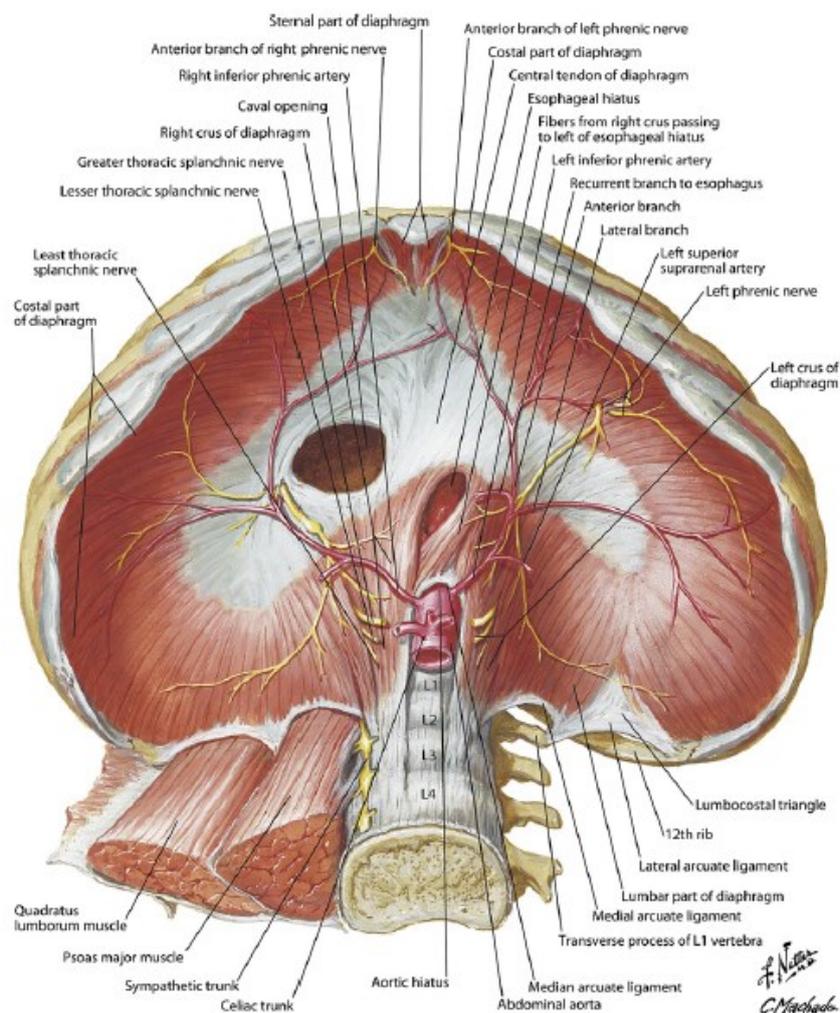


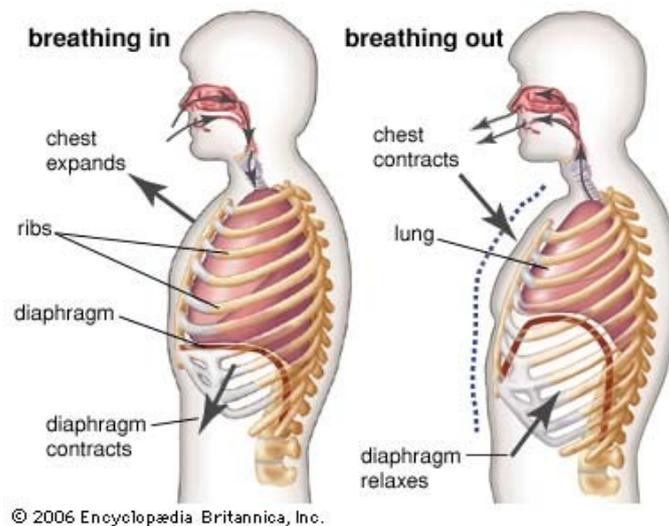
Figura 1.2 – Diaframma umano: orifizi, innervazione e vascolarizzazione ¹.

Il diaframma presenta numerosi orifizi, attraverso i quali avviene il passaggio di strutture anatomiche, nervi e vasi sanguigni e linfatici. In particolare, l'orifizio esofageo permette il passaggio dell'esofago, il canale aortico-diaframmatico quello dell'aorta, del dotto toracico e dei nervi splanchnici, mentre

l'orifizio quadrilatero permette il passaggio della vena cava inferiore. Ci sono inoltre altre aperture di diametro minore (Figura 1.2) ¹.

La funzione principale del diaframma riguarda la respirazione. Durante la fase di inspirazione, infatti, il diaframma, contraendosi, si abbassa, inducendo l'espansione della cavità toracica e quindi la diminuzione della pressione intratoracica, permettendo in tal modo all'aria di fluire nei polmoni.

Con la successiva espirazione, invece, il diaframma si rilassa tornando nella sua posizione originaria, gli organi addominali risalgono e i polmoni si svuotano dell'aria precedentemente incamerata (Figura 1.3) ³.



© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 1.3 – Fasi della respirazione ⁵⁷.

Inoltre, il diaframma è coinvolto anche in funzioni non respiratorie. Infatti, la contrazione del muscolo diaframmatico, assistita dall'azione dei muscoli addominali e intercostali, permette un aumento di pressione nella cavità addominale. Ciò risulta fondamentale per tutte quelle azioni che richiedono un'espulsione di aria violenta (come starnutire e tossire) ma anche per quelle attività fisiologiche che comportano una compressione addominale (come urinare, defecare, vomitare e partorire) ³.

1.2 Il muscolo diaframma: aspetti istologici e biomeccanici

1.2.1 Il tessuto muscolare

I diversi tipi di muscolo presenti nei vertebrati possiedono un parenchima costitutivo rappresentato dal tessuto muscolare, con caratteristiche contrattili responsabili delle funzioni svolte ⁴.

In base alle caratteristiche morfologiche delle sue fibre, il tessuto muscolare dei vertebrati viene suddiviso in tessuto muscolare liscio e tessuto muscolare striato. Quest'ultimo, a sua volta, si può classificare in tessuto muscolare scheletrico, di cui è costituito anche il muscolo diaframmatico, e

tessuto muscolare cardiaco, che costituisce il miocardio. Il muscolo liscio, invece, circonda gli organi interni cavi come lo stomaco, la vescica e i vasi sanguigni.

I tessuti muscolari liscio e cardiaco sono caratteristici della muscolatura involontaria, mentre quello scheletrico è tipico dei muscoli volontari ⁵.

1.2.2 Il tessuto muscolare striato scheletrico

Il tessuto muscolare striato scheletrico (Figura 1.4) costituisce uno dei tessuti più abbondanti nel corpo umano, rappresentando circa il 40%-45% della massa muscolare, ed è essenziale nella generazione di forze per il movimento ⁵.

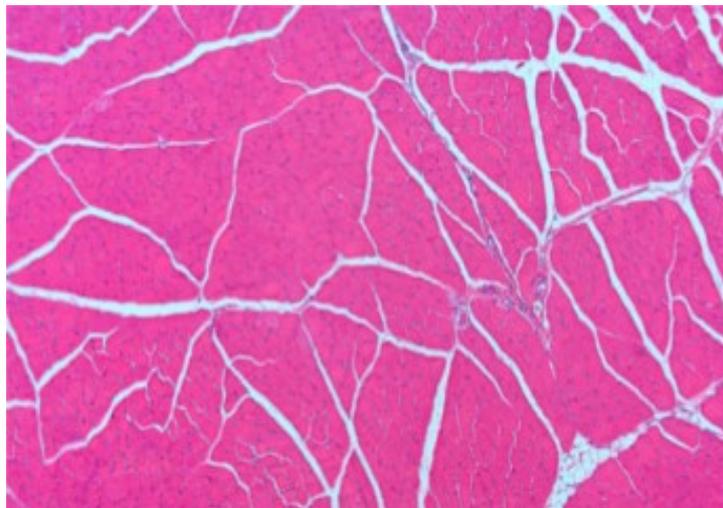


Figura 1.4 – Microfotografia elettronica di tessuto muscolare scheletrico umano sezionato trasversalmente ⁶.

Tale tessuto è costituito da grossi aggregati cellulari cilindrici polinucleati che prendono il nome di fibre muscolari, associate tra loro tramite del tessuto connettivo a formare fasci di fibre. Ciascuna fibra è composta da centinaia di miofibrille. La miofibrilla è la struttura di base del tessuto muscolare scheletrico: ha un diametro di circa 1 μm e lunghezza variabile da 10 a 100 μm ed è responsabile della contrazione. La miofibrilla, a sua volta, è composta da unità elementari, denominate sarcomeri (anche detti miofilamenti), che si ripetono regolarmente lungo l'asse della fibrilla. L'analisi al microscopio di sezioni trasversali ha rivelato che il sarcomero è formato da due tipi diversi di filamenti proteici che interagiscono tra loro: i filamenti più spessi sono costituiti da miosina ed hanno un diametro di circa 15 nm, mentre i filamenti più sottili hanno un diametro di circa 7 nm e sono formati prevalentemente da actina.

Poiché le fibre proteiche che costituiscono il sarcomero hanno densità diversa, l'osservazione al microscopio permette di rilevare delle caratteristiche bande chiare e scure che si alternano regolarmente lungo le fibrille muscolari (da qui deriva la denominazione "striato" del tessuto) ⁴ (Figura 1.5).

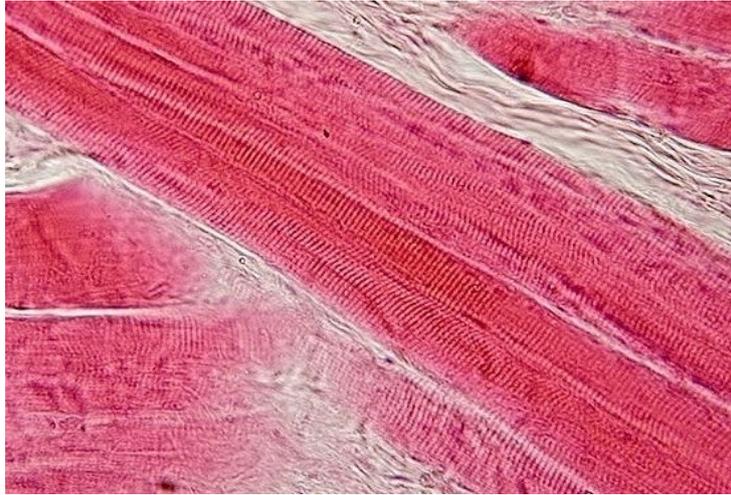


Figura 1.5 – Tessuto muscolare scheletrico in sezione longitudinale; è visibile la striatura trasversale delle fibre, composta dall'alternanza di bande chiare e scure ⁵⁸.

In Figura 1.6 viene riportato uno schema che illustra la struttura gerarchica del tessuto muscolare scheletrico.

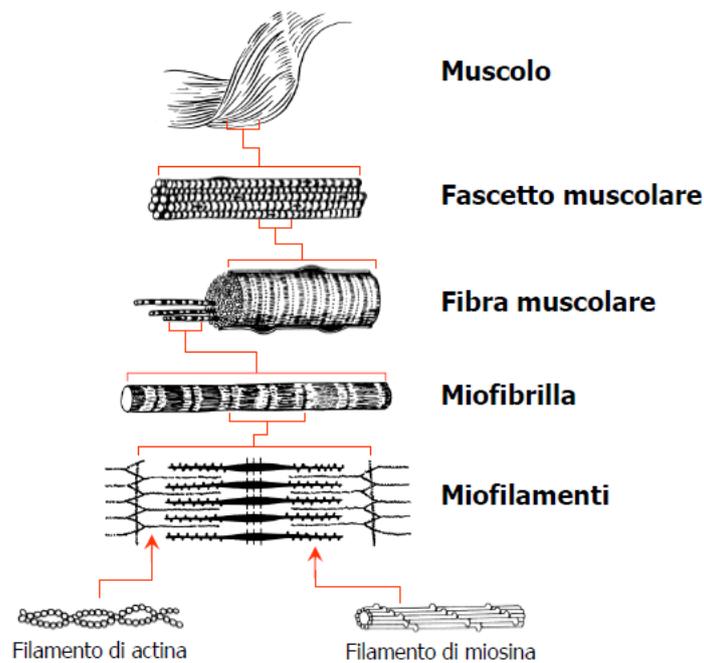


Figura 1.6 – Rappresentazione schematica della struttura del tessuto muscolare stirato scheletrico ⁴.

1.2.3 Biomeccanica della contrazione muscolare

L'unità strutturale responsabile della contrazione del muscolo scheletrico è il sarcomero.

Per comprendere il meccanismo di contrazione dei sarcomeri si fa riferimento alla teoria dello scorrimento dei filamenti: la contrazione ha inizio con la formazione di ponti trasversali (*crossbridges*) tra le teste globulari della miosina e gli appositi siti presenti sulle molecole di actina. La formazione di tali legami è mediata dal rilascio nel sarcomero di ioni Ca^{2+} , ed è resa possibile grazie all'idrolisi dell'ATP, in quanto l'energia liberata dal processo induce una rotazione della testa

della miosina verso il filamento di actina corrispondente. A questo punto, il rilascio del fosfato inorganico causa un cambiamento conformazionale della testa della miosina, consentendo ad essa di spingere il filamento di actina verso il centro del sarcomero: l'accorciamento di quest'ultimo provoca la contrazione della miofibrilla.

La contrazione del muscolo scheletrico avviene sotto il controllo dei motoneuroni del sistema nervoso volontario o, in alternativa, può essere indotta artificialmente da stimoli elettrici o chimici.

La durata media di un singolo evento contrattile, detto anche *twitch*, è di circa 150 ms: esso termina con il rilascio della molecola di ADP dalla testa della miosina e con l'ancoraggio dell'ATP, che induce il distacco della miosina dal filamento di actina.

La forza sviluppata da una fibra muscolare è data dalla somma delle singole forze prodotte dalle miofibrille che la compongono, disposte in parallelo tra loro. Di conseguenza, la forza che il muscolo produce attraverso la contrazione non dipende dalla lunghezza della fibra in sé, ma è direttamente proporzionale alla sezione trasversale del muscolo stesso e al numero di sarcomeri in parallelo.

Inoltre, la tensione generata da un unico evento contrattile non rappresenta la massima tensione che una fibra può generare: la forza generata da una singola fibra muscolare può aumentare incrementando la frequenza dei potenziali d'azione che la stimolano.

In particolare, se una fibra è sottoposta a stimolazioni elettriche ripetute, tra loro separate da intervalli di tempo sufficientemente lunghi, essa ha il tempo di rilassarsi completamente tra uno stimolo e l'altro, producendo una serie di *twitch* identici. Se invece gli stimoli sono ravvicinati, la fibra non ha il tempo di rilassarsi completamente tra stimoli successivi, generando una tensione maggiore per effetto della sommazione delle risposte. Infine, se i potenziali d'azione si susseguono con una frequenza che supera i 60 Hz circa, il rilassamento tra le contrazioni si riduce fino a scomparire e la fibra muscolare arriva ad uno stato di contrazione chiamato tetano: in questa condizione si sviluppa la massima tensione possibile per quella fibra ⁵.

1.2.4 Il tessuto connettivo che avvolge il muscolo striato scheletrico

A livello macroscopico, il muscolo striato scheletrico risulta avvolto da una guaina di tessuto connettivo propriamente detto, denominata epimisio. Dall'epimisio partono setti connettivali che penetrano all'interno del muscolo suddividendolo in fasci di fibre e che costituiscono il cosiddetto perimisio. Dal perimisio, infine, partono ulteriori setti connettivali, più sottili, che avvolgono le singole fibre muscolari e che costituiscono l'endomisio (Figura 1.7) ⁷.

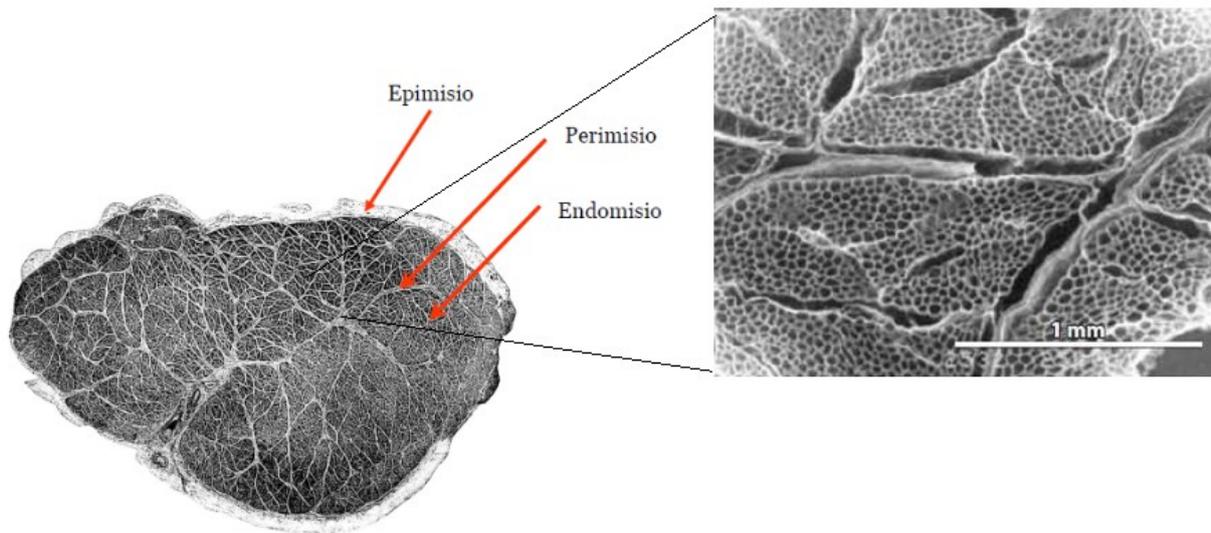


Figura 1.7 – A sinistra: sezione trasversale di muscolo sartorio umano che mostra la distribuzione del tessuto connettivo interstiziale ⁴. A destra: micrografia elettronica a basso ingrandimento dei tessuti connettivali dopo il trattamento del tessuto muscolare con NaOH per rimuovere le proteine miofibrillari e i proteoglicani: si può notare il perimisio, più spesso, che circonda la rete endomisiale a nido d’ape all’interno di un fascio di fibre ⁷.

Nel loro insieme, tali strutture tissutali ospitano i nervi e i vasi sanguigni, e fungono da base per lo sviluppo e la crescita delle fibre muscolari ⁷.

1.3 Analisi microstrutturale e biomeccanica dei tessuti connettivi intramuscolari

Nonostante l’approfondita conoscenza delle proprietà attive del tessuto muscolare scheletrico, che comprendono le caratteristiche microstrutturali delle fibre muscolari e la biomeccanica del sistema contrattile, molto meno è noto a riguardo della microstruttura e delle proprietà meccaniche passive di questo tessuto, intendendo con tale termine le caratteristiche biomeccaniche non direttamente legate alla contrazione muscolare, attribuibili principalmente alle parti connettivali del muscolo stesso ⁸.

Allo stesso tempo, è stato dimostrato che le proprietà passive del tessuto muscolare hanno un ruolo centrale in una vasta gamma di processi fisiologici e fisiopatologici ⁹. Per citarne solo alcuni:

- la tensione muscolare passiva resiste al movimento delle articolazioni, per cui pone dei vincoli fondamentali al movimento e ai sistemi di controllo motorio;
- la capacità dei muscoli di generare forze attive è modulata dalle forze muscolari passive;
- le forze muscolari passive influenzano il comportamento delle cellule mecano-sensibili che regolano la crescita muscolare;
- la contrattura muscolare – un aumento anormale della rigidità passiva dei muscoli – è una delle principali cause di disabilità fisica in persone affette da ictus, lesioni del midollo spinale e paralisi cerebrale.

L'interesse per questi ed altri fenomeni motiva la ricerca sulle proprietà meccaniche passive dei muscoli scheletrici, e dunque, per comprenderne il significato fisiologico, rende necessaria una prima analisi dei tessuti connettivi a cui si attribuiscono tali proprietà ⁹.

Come accennato precedentemente, tutte le strutture connettivi intramuscolari, dal perimisio all'endomisio, sono costituite da tessuto connettivo propriamente detto. Un tessuto di questo tipo è composto da poche cellule, per lo più fibroblasti, separate tra loro e immerse in abbondante matrice extracellulare (ECM, *Extra-Cellular Matrix*), la quale, di conseguenza, determina le proprietà meccaniche del tessuto stesso.

La ECM rappresenta un'entità strutturale complessa, in cui si possono riconoscere due componenti principali: le proteine fibrose (collagene ed elastina), le quali nel complesso formano un reticolo di legami trasversali che conferisce consistenza e resistenza al tessuto, e la matrice amorfa, o sostanza di fondo, in cui le fibre sono immerse, costituita da una sostanza gelatinosa composta in prevalenza da acqua, glicosamminoglicani e altri eteropolisaccaridi ⁴.

1.3.1 Il collagene

Il collagene costituisce circa il 25% di tutte le proteine del corpo umano, nel quale svolge funzioni di supporto e di collegamento.

L'unità di base del collagene è il tropocollagene (Figura 1.8c). Quest'ultimo è dato da una molecola e super-elica destrorsa, formata dall'avvolgimento di tre filamenti a super-elica sinistrorsi, detti catene α (Figure 1.8a e 1.8b). Ciascun filamento è composto da oltre mille amminoacidi ed è caratterizzato dalla frequente ripetizione di triplette di sequenza: *Gly-Pro-Hyp*.

La glicina (*Gly*), date le sue piccole dimensioni, si colloca all'interno della tripla elica, mentre prolina (*Pro*) e idrossiprolina (*Hyp*) favoriscono l'avvolgimento a spirale delle catene, contribuendo a rendere compatta la struttura del tropocollagene. La molecola di tropocollagene è inoltre stabilizzata da interazioni tra le tre eliche costituenti la super-elica, date da legami ad idrogeno, legami ionici e reticolazioni intercatena ⁴.

A livello submicroscopico, le molecole di tropocollagene si dispongono a formare file parallele sfalsate che costituiscono le microfibrille submicroscopiche. All'interno delle microfibrille, la presenza di legami crociati (forti) tra molecole di tropocollagene adiacenti fa sì che, lungo ogni fila, la distanza tra la testa di una molecola e la coda della successiva (detta *gap zone*) sia costante, e che file adiacenti siano tra loro sfalsate sempre di una stessa quantità (Figura 1.8d). La formazione di legami crociati impedisce quindi lo scorrimento relativo tra le molecole di tropocollagene, conferendo alle fibrille doti di inestensibilità e di resistenza alla trazione. Questa particolare disposizione, inoltre, spiega le striature orizzontali visibili osservando il collagene al microscopio elettronico: le *gap zones*

sono visualizzate mediante bande scure, mentre le bande chiare sono caratterizzate da una sovrapposizione completa delle molecole e vengono dette *overlap zones* (Figura 1.8e).

Infine, le microfibrille si associano tra loro lungo una direzione per formare fibrille microscopiche (Figura 1.8f)¹⁰.

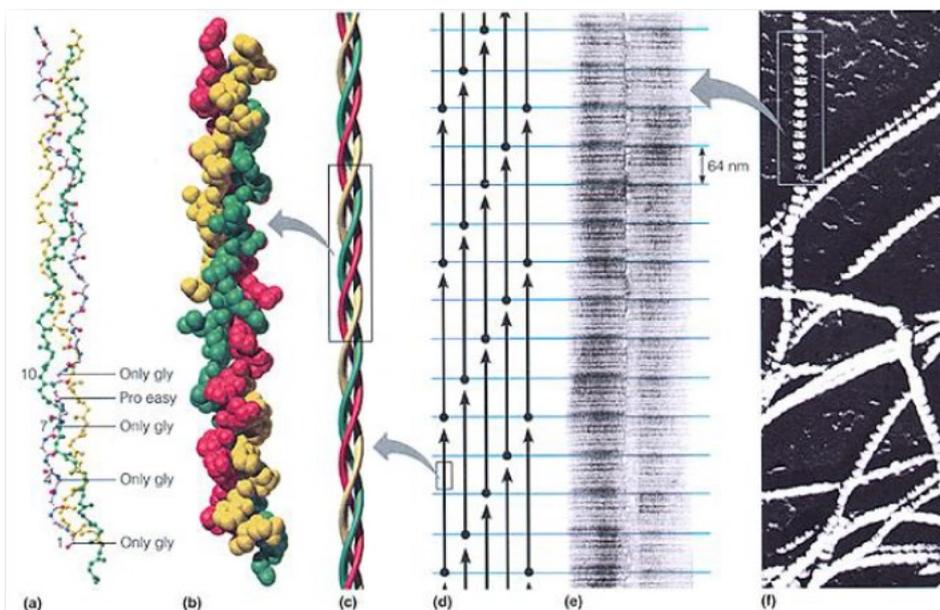


Figura 1.8 – Struttura del collagene: dalle singole catene polipeptidiche (a) alle fibrille microscopiche (f)⁴.

In natura esistono oltre 20 tipi di collagene, tutti caratterizzati dalla presenza di triple eliche, che sono però collegate tra loro in modi diversi. Nel collagene di tipo I, ad esempio, il più abbondante nel corpo umano e predominante nei tessuti connettivi intramuscolari⁷, sulla superficie delle fibrille è possibile individuare elementi di collagene filamentoso i quali, per mezzo di altri componenti presenti entro la ECM (proteoglicani), collegano tra di loro le fibrille instaurando legami interfibrillari (deboli). Le fibrille sono così in grado di organizzarsi in fibre, che reticolano gli spazi intercellulari¹¹.

In generale, le fibre di collagene conferiscono ai tessuti rigidità e resistenza alla trazione.

Più nello specifico, se si sottopone una fibra di collagene ad una prova di carico nella direzione predominante di sviluppo della fibra stessa, è possibile osservare una risposta meccanica, in termini di curva tensione-deformazione, elastica non lineare, qualitativamente descritta nella Figura 1.9. L'andamento della curva permette di riconoscere tre regioni distinte: una regione iniziale a bassa capacità resistente, detta *toe region* (1), una zona di progressivo aumento della rigidità (2), ed infine una regione ad elevata capacità resistente, chiamata "*quasi-linear*" region (3)¹¹.

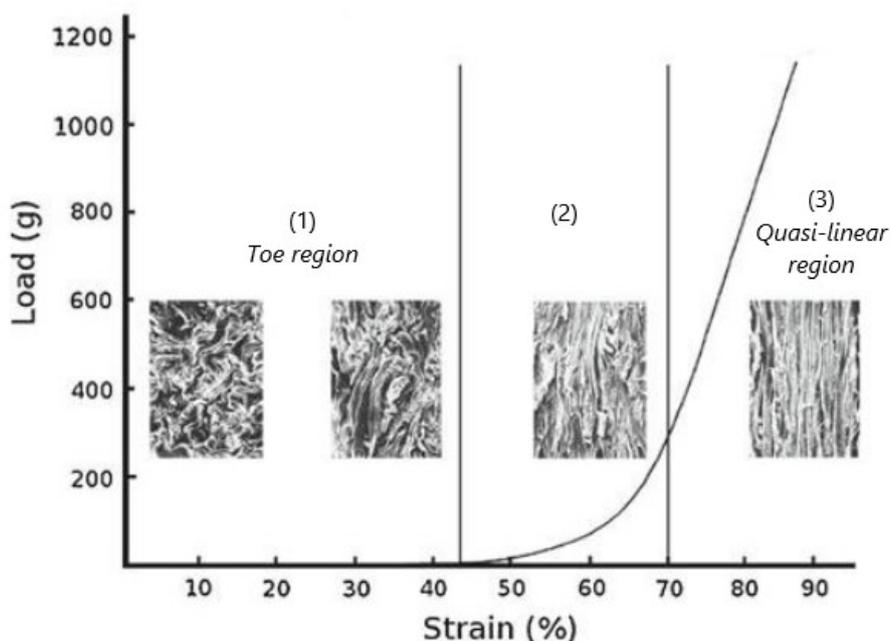


Figura 1.9 – Comportamento meccanico a trazione caratteristico delle fibre di collagene di tipo I ¹¹.

Tale comportamento può essere giustificato se si considera la risposta microstrutturale progressivamente esibita dalle fibrille di collagene durante il processo di carico. Le fibrille presenti nei tessuti connettivi quali quelli intramuscolari assumono, in assenza di sollecitazione esterna, una tipica conformazione ondulata (detta anche *crimped*), in cui i legami tra le fibrille non sono tensionati. Dunque, il primo meccanismo di deformazione che si attiva con l'applicazione di una sollecitazione è proprio l'*uncrimping* delle fibrille, nonché un progressivo tensionamento dei legami intrafibrillari: le fibrille si distendono perdendo la loro conformazione ondulata, mostrando in tal modo un'elevata deformabilità. Quando le catene molecolari risultano distese, si attivano anche i legami interfibrillari, i quali entrano in tensione al fine di mantenere unite le fibrille e per consentire loro di resistere alla sollecitazione. Ciò determina un progressivo aumento della rigidità fino al raggiungimento di un valore massimo, che si mantiene pressoché costante in corrispondenza di un ben definito intervallo deformativo (fino a quando la tensione applicata provoca la rottura dei legami interfibrillari) ¹².

1.3.2 L'elastina

L'altra proteina fibrosa che costituisce la ECM è l'elastina.

Nella sua struttura primaria sono presenti, oltre alla prolina e alla glicina, anche diversi amminoacidi idrofobici, tra cui alanina, valina e leucina, e soltanto poche molecole di idrossiprolina. Amminoacidi come la desmosina, la iso-desmosina e la lisino-norleucina servono invece per la reticolazione. L'elastina assume una configurazione *random coil* caratterizzata da catene con avvolgimento

disordinato collegate tra loro da legami di natura covalente detti reticolazioni chimiche (*chemical cross-links*)^{4,10}.

Questa particolare conformazione è alla base del comportamento elastico di questa proteina. Infatti, in una prova di trazione uniassiale, durante la fase di applicazione del carico si assiste ad una modifica nella conformazione delle catene macromolecolari, con un progressivo allineamento secondo la direzione di sollecitazione: ciò determina un'elevata deformabilità delle fibre di elastina, le quali sono in grado di estendersi fino a una volta e mezza rispetto alla loro lunghezza iniziale, sotto l'azione di forze di trazione anche relativamente modeste¹¹. La presenza delle reticolazioni chimiche, però, impedisce, durante la fase di applicazione del carico, i processi di scorrimento reciproco e irreversibile delle catene macromolecolari. In questo modo, alla rimozione della sollecitazione, le catene ritornano nelle loro posizioni originarie, impedendo così lo sviluppo di fenomeni deformativi permanenti¹² (Figura 1.10).

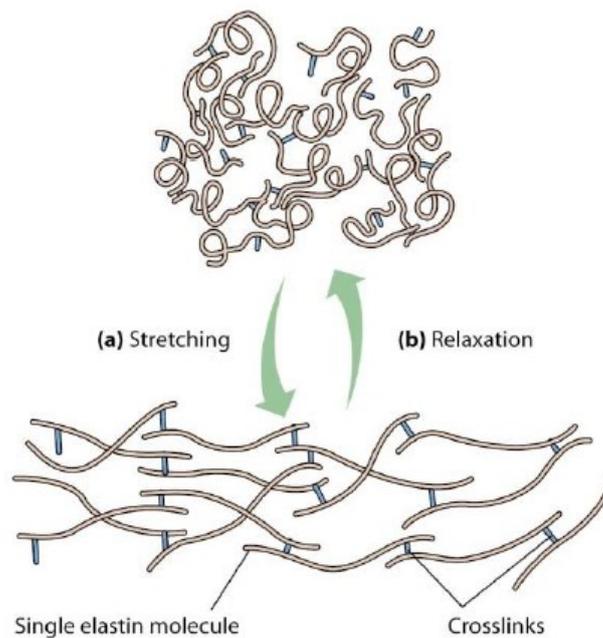


Figura 1.10 – Rappresentazione schematica delle fibre di elastina che evidenzia il ruolo delle reticolazioni (*crosslinks*) nell'impedire lo scorrimento reciproco delle catene macromolecolari durante l'applicazione di un carico monoassiale¹¹.

Le fibre di elastina sono più sottili delle fibre di collagene, e sono organizzate in modo da formare estesi reticoli. In natura, esse sono intrecciate alle fibrille di collagene: infatti, mentre l'elastina conferisce ai tessuti elevata deformabilità, il collagene, essendo dotato di elevata resistenza alla trazione, interviene limitando l'entità della deformazione, evitando così la lacerazione dei tessuti⁴.

1.3.3 La sostanza di fondo

La sostanza di fondo è un gel viscoso consistente in una soluzione acquosa composta principalmente da proteoglicani, che riempie lo spazio tra le cellule e il reticolo fibroso dei tessuti biologici.

I proteoglicani sono grandi strutture molecolari che si sviluppano lungo un asse costituito da una lunga catena di ialuronato (un sale derivante dall'acido ialuronico). Ad essa sono legate, in modo non covalente, altre proteine. Infine, lungo l'asse di ciascuna proteina sono legate covalentemente molecole di glicosamminoglicani (GAGs) (Figura 1.11)⁴.

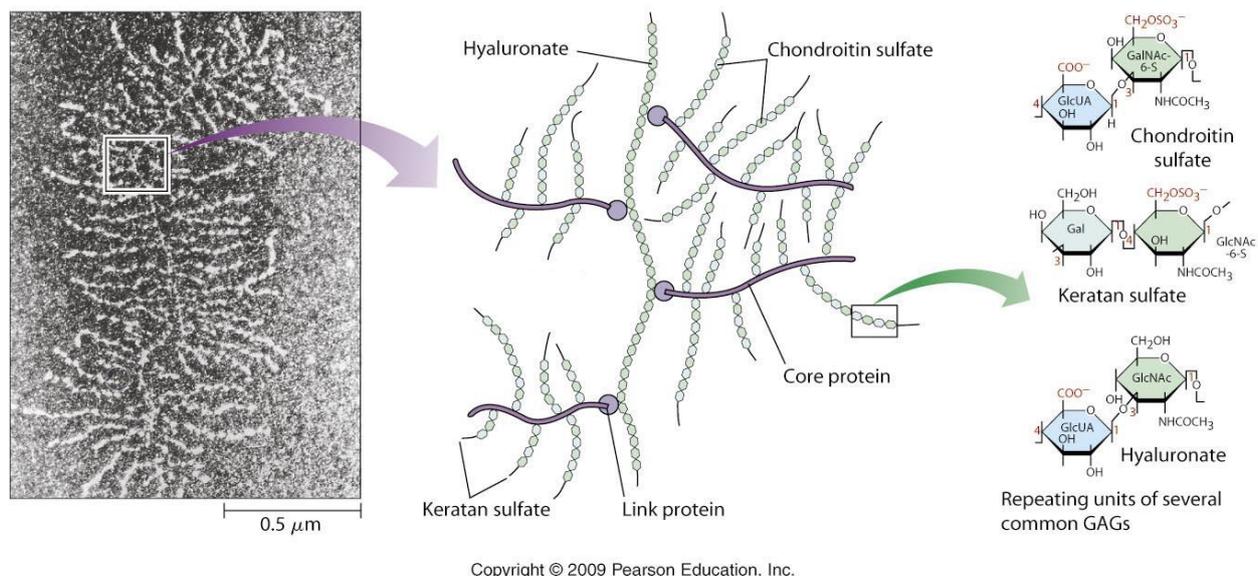


Figura 1.11 – Immagine SEM e rappresentazione schematica della struttura dei proteoglicani¹².

I GAGs sono una famiglia di polisaccaridi lineari costituiti dal ripetersi di unità disaccaridiche, formate da una molecola di acido uronico e da un aminoglicano. La combinazione di gruppi solfato e dei gruppi carbossilici presenti nelle molecole dei GAGs determina lungo la struttura molecolare dei proteoglicani una elevata densità di cariche negative¹¹.

Grazie alle sue caratteristiche microstrutturali, la sostanza di fondo contribuisce significativamente alla rigidità a compressione dei tessuti connettivi quali quelli intramuscolari. Infatti, sottoponendo un campione di questo tessuto ad una prova di compressione monoassiale, il primo meccanismo deformativo che tende a svilupparsi è la redistribuzione della sostanza di fondo all'interno del reticolo fibroso. Questo processo, tuttavia, risulta ostacolato, oltre che dalle intrinseche caratteristiche di incomprimibilità dei fluidi, anche da fenomeni di interazione elettrostatica che si verificano all'interno della sostanza di fondo: mentre in assenza di sollecitazioni le cariche negative presenti nei GAGs sono separate da un'abbondante quantità di acqua, garantendo una condizione di equilibrio elettrochimico, quando si esercita una pressione le catene di GAGs tendono ad avvicinarsi tra loro espellendo l'acqua; l'avvicinamento risulta quindi contrastato dalla forza di repulsione tra le cariche

negative dei GAGs contrapposti, e tale processo contribuisce ad aumentare in modo significativo la resistenza a compressione del tessuto ¹².

1.3.4 Comportamento meccanico dei tessuti connettivi molli

L'analisi microstrutturale e biomeccanica dei tessuti connettivi molli (categoria in cui sono inclusi anche i tessuti connettivi intramuscolari) rende possibile considerare questi tessuti, nell'ottica di analizzarne il comportamento meccanico, come materiali compositi fibro-rinforzati. Nello specifico, le proteine fibrose (con particolare riferimento al collagene) rappresentano le fibre di rinforzo, e la loro orientazione lungo direzioni preferenziali determina l'anisotropia del comportamento meccanico del tessuto; la sostanza di fondo, invece, rappresenta la matrice isotropa ¹³.

Le fibre di collagene, essendo caratterizzate da una rigidità significativamente maggiore rispetto alla sostanza di fondo, sono in gran parte responsabili del comportamento a trazione dei tessuti connettivi molli. Di conseguenza, i fenomeni microstrutturali che si sviluppano quando un tessuto di questo tipo viene sottoposto ad un carico di trazione uniassiale sono principalmente quelli associati agli elementi di collagene: le fibre di collagene si riorganizzano spazialmente, subendo fenomeni di *uncrimping* e determinando un progressivo incremento della rigidità del tessuto. Da ciò deriva una curva tensione-deformazione a trazione di tipo elastico non lineare, qualitativamente molto simile a quella mostrata dalle singole fibre di collagene (Figura 1.12) ¹¹.

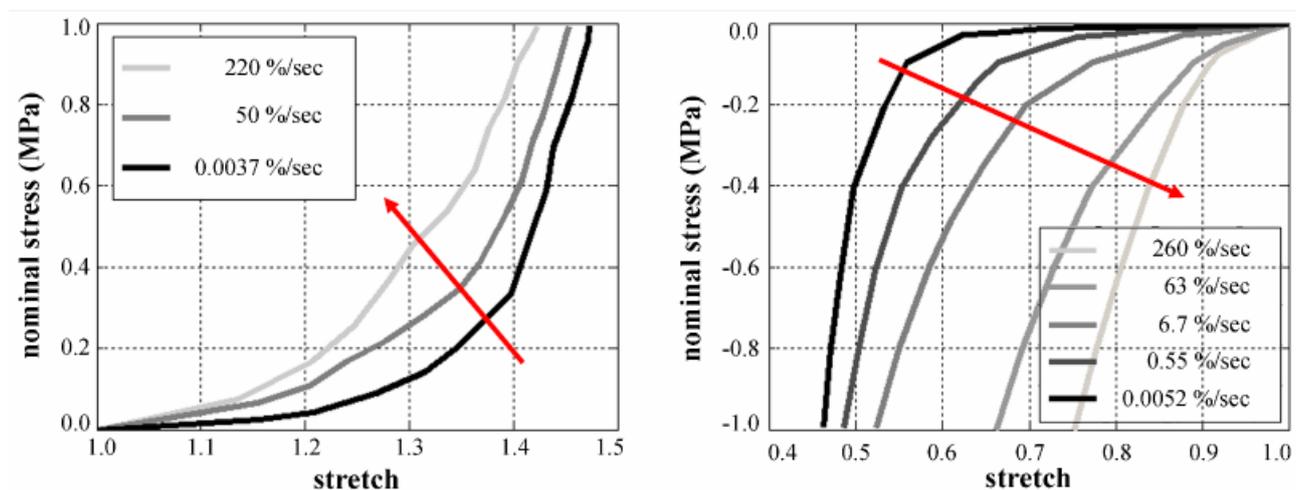


Figura 1.12 – Curve tensione-deformazione ottenute da prove di tensione monoassiale eseguite su campioni di legamento parodontale di gatto a diverse velocità di deformazione. I test sono stati eseguiti lungo la direzione delle fibre di collagene ¹¹.

Quando invece vengono applicati carichi di compressione ad un tessuto connettivo molle, le fibre di collagene, a causa dell'elevato rapporto lunghezza-volume, vanno incontro a delle microflessioni lungo la loro struttura, per cui la resistenza a compressione del tessuto è determinata principalmente dalla sostanza di fondo e dalla sua interazione con le proteine fibrose. Come descritto nel paragrafo

1.3.3, quando al tessuto vengono applicati carichi di compressione, si verificano due fenomeni principali: la sostanza di fondo fluisce all'interno dello scheletro solido e lo spazio tra i proteoglicani si riduce. La rigidità a compressione è quindi determinata dal comportamento incomprimibile della sostanza di fondo, dalla sua capacità di muoversi all'interno dello scheletro fibroso e dall'interazione elettrostatica tra i glicosamminoglicani ¹².

Come mostra la Figura 1.12, la sostanza di fondo ha il comportamento di un gel viscoso, in quanto i processi di riorganizzazione della sua struttura interna, che si verificano sotto l'azione di una sollecitazione meccanica, richiedono tempo per potersi sviluppare. Dunque, condizioni di elevata velocità di deformazione impediscono il flusso della sostanza di fondo all'interno del reticolo, per cui il tessuto mostra fin da subito un'elevata rigidità a causa del comportamento incomprimibile della fase liquida. Riducendo la velocità di deformazione, la sostanza di fondo è invece in grado di fluire entro lo scheletro fibroso, mostrando quindi una bassa rigidità iniziale seguita da un drastico incremento quando i processi di flusso sono terminati. Anche i fenomeni microstrutturali che si sviluppano nei tessuti molli durante carichi di trazione richiedono tempo per raggiungere una condizione di equilibrio termodinamico. In questo caso, però, la dipendenza dal tempo è meno evidente poiché i riarrangiamenti microstrutturali all'interno delle fibre di collagene si sviluppano più rapidamente ¹².

Queste considerazioni mostrano che una descrizione completa del comportamento meccanico di un qualsiasi tessuto connettivo molle non deve prescindere dal tenere in conto, tra gli altri aspetti, anche delle caratteristiche viscoelastiche del tessuto stesso.

1.4 Comportamento viscoelastico dei tessuti biologici

Un materiale si dice viscoelastico se lo stato tensionale su di esso agente dipende non soltanto dal livello deformativo corrente, ma anche dalla pregressa storia di carico che ha portato il materiale in quello stato ¹². La viscoelasticità è una caratteristica che regola il comportamento meccanico di molti dei biomateriali, tra cui la maggior parte dei polimeri, e che contraddistingue, in diversa misura, tutti i tessuti biologici, tra cui i tessuti connettivi molli. Infatti, il comportamento viscoelastico è tipico di quei materiali che, sotto l'azione di un carico, mostrano un comportamento intermedio tra quello dei solidi e quello dei fluidi, poiché la loro risposta ad uno sforzo è in parte di tipo elastico ed in parte di tipo viscoso ¹⁰.

La dipendenza temporale delle proprietà meccaniche è inoltre generalmente associata ad una scala dei tempi caratteristica dello specifico materiale, indicata dal cosiddetto tempo di rilassamento.

Dunque, se il carico è applicato ad un materiale viscoelastico per tempi molto maggiori o molto minori del tempo di rilassamento, questo può non mostrare caratteristiche viscoelastiche ¹⁰.

1.4.1 Prove meccaniche per la caratterizzazione del comportamento viscoelastico

Le caratteristiche viscoelastiche di un materiale si manifestano principalmente in tre fenomeni denominati rilassamento delle tensioni, creep e isteresi. Da un punto di vista sperimentale tali proprietà possono essere caratterizzate rispettivamente tramite prove di rilassamento delle tensioni, prove di creep e prove di carico-scarico ¹⁴ (Figura 1.13).

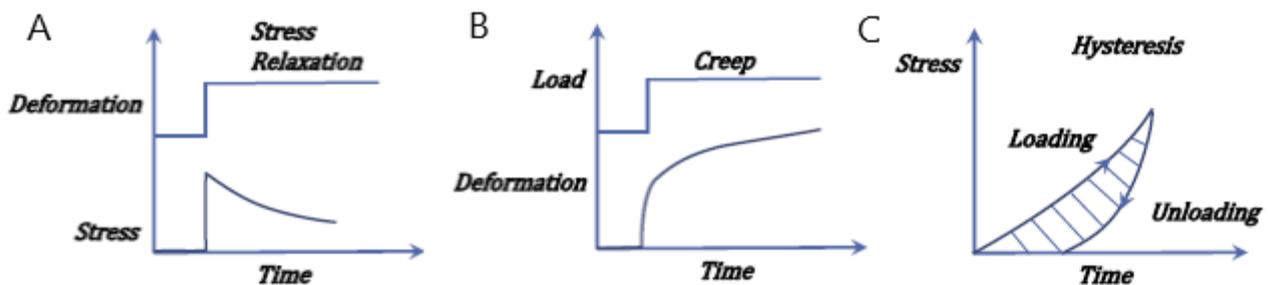


Figura 1.13 – Rappresentazione schematica di: (A) prova di rilassamento delle tensioni, (B) prova di creep e (C) prova di carico-scarico eseguite su un materiale con comportamento viscoelastico ¹⁴.

Prove di rilassamento delle tensioni

Le prove di rilassamento delle tensioni servono a valutare l'effetto dei fenomeni viscosi risultanti nel materiale quando sottoposto all'applicazione di una deformazione che poi viene mantenuta costante nel tempo. Se il materiale è viscoelastico, sperimentalmente si verifica che la tensione necessaria a mantenere il materiale deformato al livello imposto si riduce progressivamente nel tempo, seguendo una legge esponenziale, sino a raggiungere un valore asintotico definito come tensione all'equilibrio termodinamico (Figura 1.13A).

Nei tessuti biologici, tale fenomeno è determinato da processi di riorganizzazione microstrutturale: mentre inizialmente l'imposizione di uno stato deformativo determina l'insorgere improvviso di tensionamenti dei sub-componenti del tessuto, da cui consegue il valore di tensione iniziale, successivamente nel tempo tali componenti hanno la possibilità di riorganizzarsi adeguandosi allo stato deformativo imposto, riducendo quindi la tensione necessaria per mantenere quella deformazione¹¹.

Prove di creep

Come le prove di rilassamento, anche quelle di creep sono utili a mettere in evidenza i fenomeni viscosi dei materiali. Nelle prove di creep, il provino testato viene sottoposto ad uno sforzo nominale costante, e si misura la deformazione risultante in funzione del tempo di applicazione dello sforzo.

Sperimentalmente, se il materiale è viscoelastico, si osserva un aumento della deformazione nel tempo sino al raggiungimento di un livello di soglia, raggiunto all'equilibrio termodinamico (Figura 1.13B).

Nei tessuti biologici questo incremento nel tempo è dovuto, come nel caso del rilassamento, a fenomeni di riarrangiamento microstrutturale: inizialmente, l'applicazione della forza determina una certa deformazione, come effetto di processi di parziale riorganizzazione della microstruttura in campo elastico. Successivamente, le componenti del tessuto si adattano a livello microstrutturale in funzione del tempo di applicazione della forza, determinando un progressivo incremento della deformazione ¹¹.

Prove di carico-scarico: cicli di isteresi

Un ciclo di isteresi, mostrato nella Figura 1.13C, è dato dall'area sottesa dalla curva tensione-deformazione che si ottiene da una prova di carico-scarico eseguita su un materiale viscoelastico, e rappresenta l'energia dissipata dal materiale durante il processo ¹⁴.

Più specificamente, nel caso dei tessuti biologici, l'applicazione di carichi ciclici a velocità di deformazione costante tra limiti deformativi fissi mostra tipicamente cicli di isteresi tempo-dipendenti, che si spostano ad ogni ciclo verso un ciclo di isteresi di stato stazionario: la curva tensione-deformazione mostra una progressiva diminuzione dei valori di tensione durante le fasi di carico e scarico successive a quella iniziale, fino ad una stabilizzazione della risposta meccanica dopo un certo numero di cicli. Anche in questo caso, il comportamento meccanico è dovuto a processi di adattamento alla sollecitazione in seguito ad un riarrangiamento microstrutturale, che si verifica nei tessuti biologici sottoposti a carichi ciclici ¹⁵. Il ciclo di isteresi allo stato stazionario caratterizza quello stato meccanico del materiale detto anche "precondizionato". Il processo transitorio verso tale stato è invece chiamato "precondizionamento" ¹⁵.

1.4.2 Viscoelasticità lineare

Al fine di caratterizzare da un punto di vista matematico il comportamento viscoelastico dei tessuti biologici si fa spesso ricorso a modelli di viscoelasticità lineari. Questi modelli, sfruttando il principio di sovrapposizione degli effetti, permettono di descrivere la risposta complessiva di un sistema sottoposto a un carico o a una deformazione, suddividendola in singole componenti che vengono successivamente sommate. Dunque, la risposta tensionale complessiva (σ), ad esempio, può essere descritta dalla combinazione di singole funzioni lineari, ossia da un'espressione del tipo:

$$\sigma(t) = f_1(A\varepsilon_1 + B\varepsilon_2, t) + f_2 \dots = Af_1(\varepsilon_1, t) + Bf_1(\varepsilon_2, t) + f_2 \dots$$

(1.1)

dove t è il tempo, A e B sono delle costanti, mentre ogni termine della sommatoria (f_1, f_2, \dots) rappresenta una funzione di rilassamento viscoelastico corrispondente ad un distinto processo deformativo nel materiale ($\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots$)¹⁰.

In particolare, al fine di descrivere le due tipologie di comportamento meccanico (elastico e viscoso) che contraddistinguono un materiale viscoelastico, tipicamente in un contesto di viscoelasticità lineare il sistema viene descritto mediante due tipologie di elementi: quello lineare elastico e quello lineare viscoso, la cui combinazione permette la costruzione di un modello che descrive la risposta meccanica complessiva del materiale¹⁶.

A livello matematico, il comportamento di ciascun elemento lineare elastico segue la cosiddetta legge di Hooke, equazione (1.2), secondo cui lo sforzo σ è proporzionale alla deformazione applicata ε secondo il modulo di Young E :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \tag{1.2}$$

La risposta di un elemento lineare viscoso corrisponde invece a quella di un fluido newtoniano, descrivibile attraverso l'equazione (1.3):

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \tag{1.3}$$

la quale lega lo sforzo alla velocità di deformazione attraverso la viscosità η ¹⁰.

Generalmente, questi due elementi lineari fondamentali vengono rappresentati rispettivamente da una molla e da uno smorzatore (detto anche pistone)¹⁶.

Due modelli viscoelastici lineari ampiamente utilizzati in letteratura per descrivere il comportamento viscoelastico dei materiali biologici sono il modello di Maxwell e quello di Kelvin-Voigt. Essi sono composti da una singola molla elastica di modulo E e da un singolo dissipatore di viscosità η , posti in serie nel modello di Maxwell, o in parallelo nel caso del modello di Kelvin-Voigt (Figura 1.14).

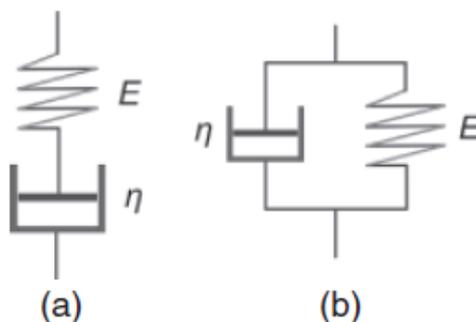


Figura 1.14 – Rappresentazione schematica dei due modelli di base utilizzati in viscoelasticità lineare: (a) modello di Maxwell, con molla e smorzatore connessi in serie, e (b) modello di Kelvin-Voigt, con molla e smorzatore in parallelo¹⁰.

Nel modello di Kelvin-Voigt la sollecitazione applicata viene ripartita tra la molla (m) e il pistone (p). Vale cioè la relazione:

$$\sigma = \sigma_m + \sigma_p \quad (1.4)$$

Utilizzando le equazioni costitutive (1.2) e (1.3) si ottiene:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon + \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (1.5)$$

Considerando una prova di rilassamento delle tensioni, durante la quale la deformazione viene mantenuta ad un livello costante pari a ε_0 , l'equazione del modello diventa:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon_0 \quad (1.6)$$

Ciò permette di comprendere che il modello di Kelvin-Voigt è intrinsecamente incapace di predire il comportamento viscoelastico dei materiali durante una prova di rilassamento delle tensioni ¹⁰.

Al contrario, nel modello di Maxwell, ogni singolo elemento subisce tutto il carico applicato, allo stesso modo e per tutta la sua durata (equazione 1.7). La deformazione totale è invece data dalla somma delle deformazioni nella molla e nello smorzatore (equazione 1.8):

$$\sigma = \sigma_m = \sigma_p \quad (1.7)$$

$$\varepsilon = \varepsilon_m + \varepsilon_p \quad (1.8)$$

Nel caso di un processo di rilassamento, quindi, considerando una deformazione costante $\varepsilon = \varepsilon_0$, attraverso opportuni calcoli matematici è possibile ottenere la seguente equazione:

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.9)$$

dove σ_0 è la tensione iniziale, mentre $\tau = \eta/E$ è una costante di tempo detta appunto tempo di rilassamento. In questo caso, si può dimostrare che τ rappresenta l'istante in corrispondenza del quale il modulo elastico del materiale si è ridotto di circa il 63% rispetto al modulo istantaneo E mostrato all'istante iniziale della prova. Dunque, apparentemente il modello di Maxwell permette di descrivere in maniera abbastanza realistica il fenomeno del rilassamento delle tensioni che esibisce un materiale con comportamento viscoelastico ¹⁰.

1.4.3 Viscoelasticità lineare generalizzata

Prendendo in considerazione i risultati che si ottengono interpretando prove di rilassamento e prove di creep tramite un modello di Maxwell o un modello di Kelvin-Voigt, e confrontandoli con i dati reali derivanti da tali prove, si può constatare che i due modelli non permettono di descrivere l'andamento della tensione o quello della deformazione in maniera del tutto corretta ¹⁷.

Sia il modello di Maxwell che quello di Kelvin-Voigt, infatti, comprendendo una sola componente elastica e una sola componente viscosa, ipotizzano che il materiale presenti un solo processo di rilassamento, descritto da un certo tempo di rilassamento τ . Questa ipotesi, tuttavia, rappresenta un'idealizzazione di un comportamento ben più complesso esibito dai materiali: nei tessuti biologici, ad esempio, si possono riconoscere generalmente fino a cinque transizioni viscoelastiche distinte, che si sviluppano su scale temporali tra loro anche molto diverse ¹⁰.

Per tale motivo, sono stati introdotti ulteriori modelli, detti modelli viscoelastici generalizzati ¹⁵. Il modello di Maxwell generalizzato, in particolare, consente di descrivere in modo più realistico il processo di rilassamento delle tensioni. Esso consiste in N differenti unità di Maxwell combinate in parallelo, ciascuna con differenti parametri caratteristici E_i e η_i , alle quali viene combinata in parallelo una singola componente elastica con modulo E_R (Figura 1.15).

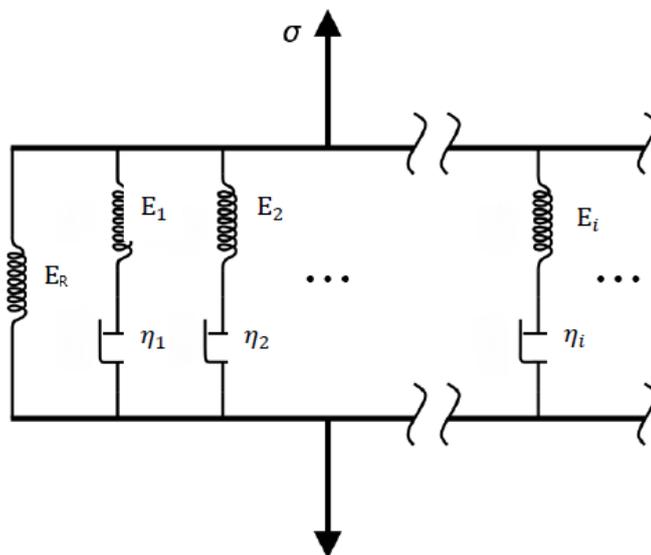


Figura 1.15 – Modello di Maxwell generalizzato ⁵⁹.

La componente elastica viene detta ramo puramente elastico, mentre ogni singola unità di Maxwell viene chiamata ramo viscoso.

Se si prende in esame un processo di rilassamento, considerando dunque la deformazione applicata costante (ϵ_0), la tensione $\sigma(t)$ percepita complessivamente dal modello risulta data dalla somma delle tensioni applicate ai diversi rami. L'equazione matematica che ne descrive l'andamento in funzione del tempo t è detta serie di Prony, ed ha espressione:

$$\sigma(t) = \sigma_R + \sum_{i=1}^N \sigma_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1.10)$$

dove $\sigma_R = E_R \cdot \varepsilon_0$ è la tensione percepita dal ramo puramente elastico, mentre $\tau_i = \eta_i/E_i$ è detto tempo di rilassamento relativo al ramo viscoso i -esimo ¹⁷.

1.5 Stato dell'arte sul comportamento meccanico del tessuto diaframmatico umano

Negli ultimi decenni, molti studi sono stati riportati in letteratura sul comportamento meccanico di svariati muscoli scheletrici del corpo umano. Tuttavia, sebbene il diaframma rappresenti uno dei muscoli scheletrici funzionalmente più importanti (basti considerare il suo ruolo fondamentale durante la respirazione), le proprietà meccaniche di questo tessuto non sono ancora state del tutto investigate.

L'unico riferimento trovato in letteratura sulla caratterizzazione meccanica di tessuto diaframmatico umano consiste in uno studio condotto nel 2016 da Gaur e colleghi ¹⁸, avente come scopo quello di valutare le proprietà meccaniche del diaframma umano a diverse velocità di deformazione. A tal fine, 18 provini rettangolari sono stati ricavati dai diaframmi di sei soggetti *post-mortem*, ed in particolare dalla regione del muscolo prossima alla porzione anteriore destra del fegato, tagliando tutti i campioni lungo la direzione longitudinale alle fibre muscolari.

Su ciascuno dei provini ottenuti è stata eseguita una prova di trazione monoassiale fino a rottura, a una delle seguenti velocità di deformazione: 0.0015 s^{-1} , 65 s^{-1} , 130 s^{-1} o 190 s^{-1} . La lunghezza utile dei provini testati varia tra 29 mm e 46 mm, mentre video ad alta risoluzione e marcatori posti sulle *grip* sono stati utilizzati per misurare lo spostamento imposto al provino dalla macchina di prova.

Dai dati forza-spostamento raccolti, sono stati ricavati i valori di tensione dal rapporto tra la forza misurata e l'area della sezione trasversale iniziale del provino, mentre la deformazione ingegneristica è stata calcolata dal rapporto tra l'allungamento e la lunghezza iniziale del provino.

Le curve tensione-deformazione ricavate mostrano un comportamento meccanico fortemente non lineare, che varia a seconda della velocità di deformazione considerata. In Figura 1.16 vengono riportate, a titolo di esempio, le curve sperimentali ottenute per i provini testati a velocità di deformazione di 0.0015 s^{-1} .

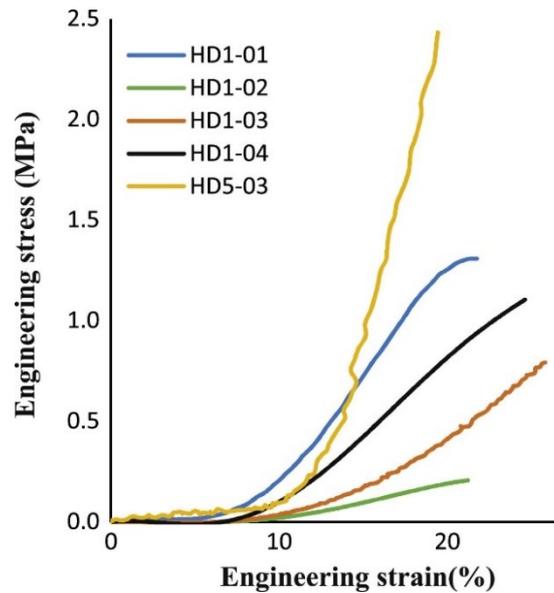


Figura 1.16 – Curve sperimentali ottenute dalle prove condotte a velocità deformazione di 0.0015 s^{-1} ¹⁸.

Nello specifico, una funzione bilineare è stata utilizzata dagli autori per descrivere tramite modello l'andamento di ciascuna risposta meccanica ottenuta dalle prove (Figura 1.17). Tali curve risultano caratterizzate da una prima regione approssimativamente lineare a bassa rigidità, detta *toe region*, che si estende fino a livelli deformativi compresi tra l'8.5% e il 14%, a seconda del provino considerato. A livelli deformativi maggiori, la rigidità aumenta, per effetto del progressivo reclutamento delle fibre di collagene presenti nelle parti connettivali del tessuto muscolare. Una volta che le fibre sono state reclutate e allineate lungo la direzione di sollecitazione, la curva diventa nuovamente lineare, e tale comportamento continua fino a poco prima la rottura del tessuto.

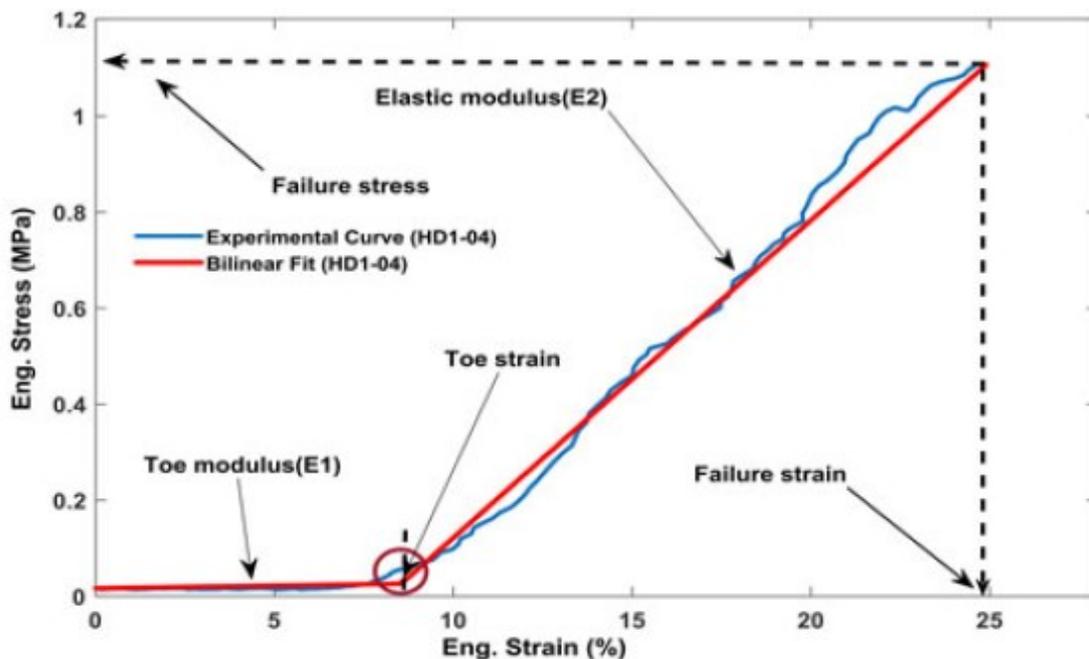


Figura 1.17 – Curva tensione-deformazione rappresentativa del provino HD1-04: andamento sperimentale (in blu) e fitting bilineare (in rosso). Viene inoltre indicato il significato grafico dei vari indici meccanici calcolati a partire dalla curva estrapolata¹⁸.

Come mostra la Figura 1.17, da ciascuna curva ottenuta dal fitting sono poi stati calcolati i valori dei seguenti parametri caratteristici: il modulo elastico relativo alla *toe region*, anche detto *toe modulus* (E_1); il modulo elastico relativo alla seconda regione lineare (E_2); la tensione a rottura (σ_f); la deformazione a rottura (ε_f); il livello deformativo massimo della *toe region* (ε_t).

Nella Tabella 1.1 vengono riportati i valori dei vari indici ricavati dalle prove eseguite a velocità di deformazione di 0.0015 s^{-1} .

Nome provino	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]	ε_t [%]	ε_f [%]	σ_f [MPa]
HD1-01	0.82	9.4	8.13	21.77	1.35
HD1-02	0.069	1.79	9.86	21.04	0.21
HD1-03	0.38	5.71	12.83	25.85	0.8
HD1-04	0.111	6.79	8.71	24.64	1.09
HD5-03	1.27	33.88	12.74	19.45	2.43
Media \pm SD	0.53 ± 0.46	11.51 ± 11.44	10.45 ± 1.98	22.55 ± 2.35	1.17 ± 0.73

Tabella 1.1 – Proprietà meccaniche di provini di diaframma umano, testato in prove di trazione monoassiale fino a rottura ad una velocità di deformazione di 0.0015 s^{-1} ¹⁸.

Dalla tabella si può anche notare che il provino HD5-03 mostra, rispetto agli altri, valori dei moduli elastici e della tensione a rottura significativamente più elevati (mentre non sono state osservate differenze significative per quanto riguarda ε_f e ε_t). Considerando che, ad eccezione di HD5-03, tutti gli altri provini sono stati estratti dal medesimo soggetto (HD1), queste differenze sono state attribuite da Gaur all'intrinseca variabilità delle proprietà meccaniche dei tessuti biologici tra soggetti diversi.

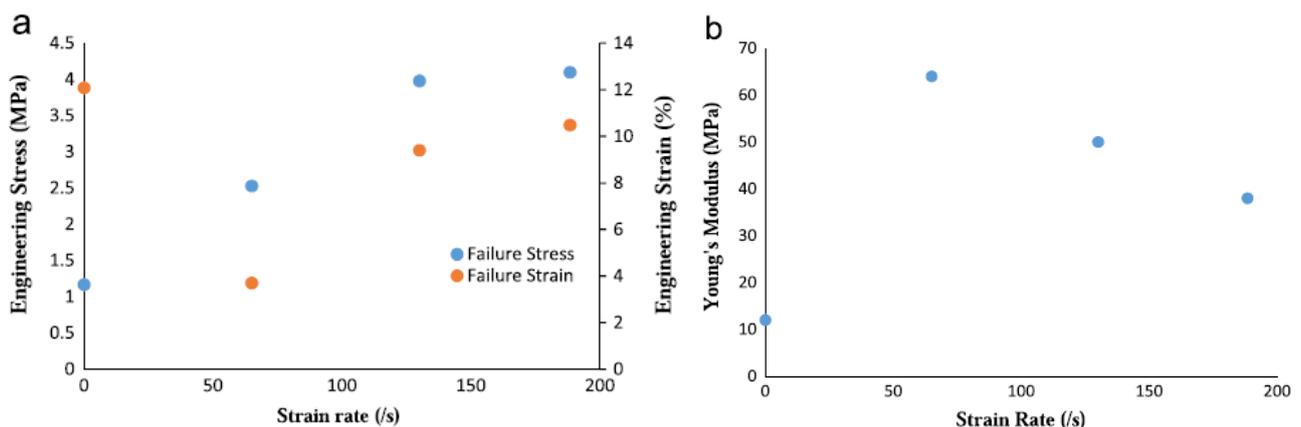


Figura 1.18 – Tensione a rottura, deformazione a rottura (a), e modulo di Young (b) al variare della velocità di deformazione (0.0015 s^{-1} , 65 s^{-1} , 130 s^{-1} e 190 s^{-1}) ¹⁸.

Infine, la Figura 1.18 mostra che la risposta meccanica esibita dal tessuto diaframmatico varia a seconda della velocità di deformazione considerata. Nello specifico, è stato osservato un incremento della tensione a rottura con l'aumentare della velocità di deformazione, e ciò è in accordo con le

proprietà dei materiali viscoelastici. La deformazione a rottura media mostra invece una prima diminuzione all'aumentare della velocità di deformazione fino a 65 s^{-1} , e un successivo incremento fino alla velocità massima di 190 s^{-1} . Tuttavia, differenze significative non sono state osservate per velocità di deformazione elevate (130 s^{-1} e 190 s^{-1}), sia per la tensione a rottura che per la deformazione a rottura. Per quanto riguarda invece il modulo elastico E_2 , quest'ultimo varia da 11 MPa a circa 65 MPa da 0.0015 s^{-1} a 65 s^{-1} , per poi diminuire fino a 38 MPa a 190 s^{-1} .

CAPITOLO 2

L'INGEGNERIA DEI TESSUTI PER IL TRATTAMENTO DI DIFETTI DIAFRAMMATICI

2.1 Patologie del muscolo diaframma

Le patologie che possono interessare il diaframma vengono solitamente raggruppate in due ampie categorie: difetti congeniti ed acquisiti. Difetti congeniti sono causati da malattie genetiche che interessano lo sviluppo delle corrette funzioni del diaframma. In generale, qualsiasi miopatia che coinvolga il muscolo scheletrico può comportare una diminuzione della funzionalità diaframmatica. Per difetti acquisiti si intendono, invece, lesioni derivanti da traumi d'impatto oppure vere e proprie lacerazioni del muscolo. Le cause più comuni sono incidenti stradali, esplosioni, ferite di guerra, interventi chirurgici (ad esempio, operazioni di resezione tumorale), o traumi sportivi ¹⁹.

Quando la fisiologica attività di contrazione del diaframma viene interrotta, a causa di un trauma o di un difetto congenito, insorgono delle disfunzioni a livello respiratorio. Sebbene il corpo umano sia capace di compensare in parte una riduzione dell'attività diaframmatica, quando l'escursione del diaframma risulta significativamente ridotta o assente, l'attività respiratoria compromessa non può essere ripristinata con successo. In questo caso si generano difetti funzionali permanenti per il muscolo ¹⁹.

Nel seguito verranno presentate le patologie più comunemente associate al muscolo diaframma, descrivendo inoltre le soluzioni adottate, in passato e ad oggi, per affrontarne la cura.

2.1.1 Ernia diaframmatica congenita

Normalmente, la morfogenesi del diaframma ha inizio con la formazione del setto trasverso, una massa di tessuto mesodermico che va a separare il cuore e i polmoni dal fegato e dal resto del contenuto addominale tra la sesta e l'ottava settimana di gestazione. Nel frattempo, le pieghe pleuroperitoneali, due strutture transitorie a forma di mezzaluna che sporgono dalla parete del corpo tra le cavità pleurica e peritoneale, si estendono e, alla settima settimana, si fondono con il mesentere dell'esofago e il setto trasverso. Infine, l'espansione delle cavità pleuriche aggiunge un bordo periferico alle pieghe pleuroperitoneali; i mioblasti della parete del corpo migrano su questo bordo, dove proliferano e si differenziano, formando le fibre muscolari del diaframma entro l'undicesima settimana di gestazione ².

L'ernia diaframmatica congenita (*Congenital Diaphragmatic Hernia*, CDH) è un difetto congenito del diaframma derivante da uno sviluppo anomalo del setto trasverso e da un'incompleta chiusura delle pieghe pleuroperitoneali. Ciò induce la presenza di zone in cui il muscolo diaframmatico risulta debole o incompleto, attraverso le quali alcuni visceri addominali erniano nella cavità toracica ²⁰.

Nel mondo occidentale, più del 60% dei casi di CDH vengono diagnosticati nel periodo prenatale tramite screening ad ultrasuoni ²⁰. Se la diagnosi non avviene nel periodo prenatale, la patologia si manifesta subito dopo la nascita tramite ipossia (difficoltà respiratorie più o meno gravi) ²¹. La CDH può manifestarsi come difetto isolato (circa nel 60% dei casi), mentre in altri casi è associata ad altre anomalie genetiche o cromosomiche. Si tratta di un difetto congenito abbastanza comune: l'incidenza è di un caso ogni 2500-3000 nati, con un tasso di mortalità attorno al 50-60% (considerando anche i decessi prenatali) ². Tali decessi sono legati solitamente al fatto che i contenuti addominali erniati vanno ad ostacolare il corretto sviluppo dell'albero tracheobronchiale e dei polmoni (che inizia entro le 16 settimane di gestazione), portando a manifestazioni di ipoplasia dei polmoni e ipertensione polmonare ²⁰.

Le ernie diaframmatiche variano molto sia in termini di dimensioni che di regione del diaframma in cui si formano. Nella maggior parte dei casi (85-90%), tali lesioni si formano nella parte posteriore e laterale del diaframma, prevalentemente nel lato sinistro; sono dette "Ernie di Bochdalek" (Figura 2.1A) e sono il tipo di CDH più frequentemente associato ad ipoplasia polmonare, in quanto in questo caso il contenuto addominale ernia nella cavità pleurica posteriore, dove si stanno formando i polmoni. In altri casi le ernie si formano nelle regioni anteriori del diaframma (chiamate "Ernie di Morgagni") (Figura 2.1B) o in corrispondenza del tendine centrale (chiamate "Ernie centrali") (Figura 2.1C); le CDH anteriori e centrali rappresentano il 15-20% dei casi e generalmente hanno conseguenze meno severe rispetto alle Ernie di Bochdalek ².

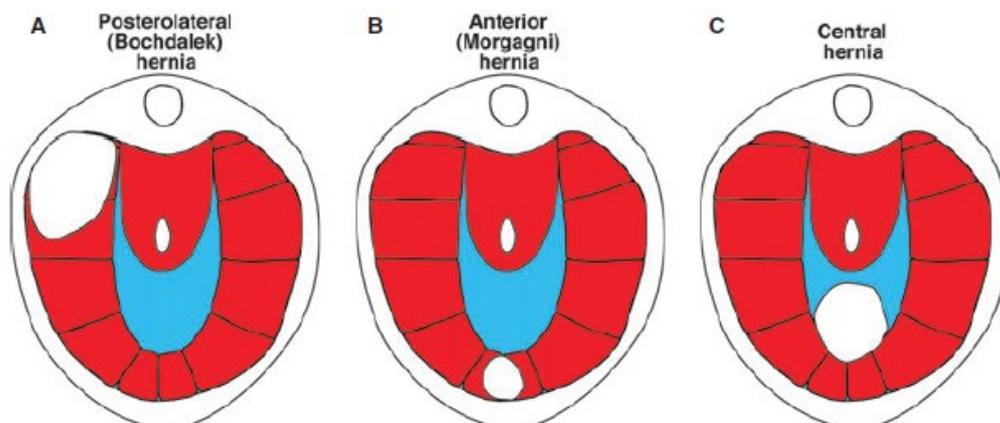


Figura 2.1 – Principali tipi di ernie diaframmatiche congenite: A) ernia postero-laterale (“di Bochdalek”); B) ernia anteriore (“di Morgagni”); C) ernia centrale ².

2.1.2 Ernia diaframmatica traumatica

L'ernia diaframmatica traumatica (*Traumatic Diaphragmatic Hernia*, TDH) è una particolare forma di ernia caratterizzata dal passaggio diretto di visceri addominali nella cavità toracica attraverso una soluzione di continuo prodottasi nel diaframma, secondariamente ad un evento traumatico²². Tra i pazienti ricoverati in ospedale per traumi, il tasso di incidenza della TDH è compreso tra il 3% ed il 5%²³. Il picco di incidenza è attorno alla terza decade di vita con un rapporto maschi/femmine di 4:1²². Solitamente questo tipo di lesione è dovuta a traumi toraco-addominali contudenti o penetranti. Il trauma toraco-addominale contudente rappresenta, nello specifico, dal 75% all'81% di tutti i casi di trauma diaframmatico; gli incidenti stradali ne sono la causa più comune²⁴. La maggior parte di queste lesioni si localizza nella parte sinistra del diaframma (69%), mentre in un 15% dei casi sono bilaterali²².

I meccanismi patogenetici che portano alla formazione di TDH si ipotizzano essere due: nei traumi frontali la causa più importante è il repentino e marcato aumento della pressione addominale concomitante con una vigorosa contrazione addominale; nei traumi laterali, invece, è più probabile un effetto dovuto alla deformazione della parete toracica soprattutto a carico dell'area di inserzione del diaframma, che è la parte più mobile²².

Nonostante le TDH siano poco comuni, esse rappresentano ancora oggi una sfida sia diagnostica che terapeutica, a cui è associato un tasso di mortalità attorno al 31%²⁴.

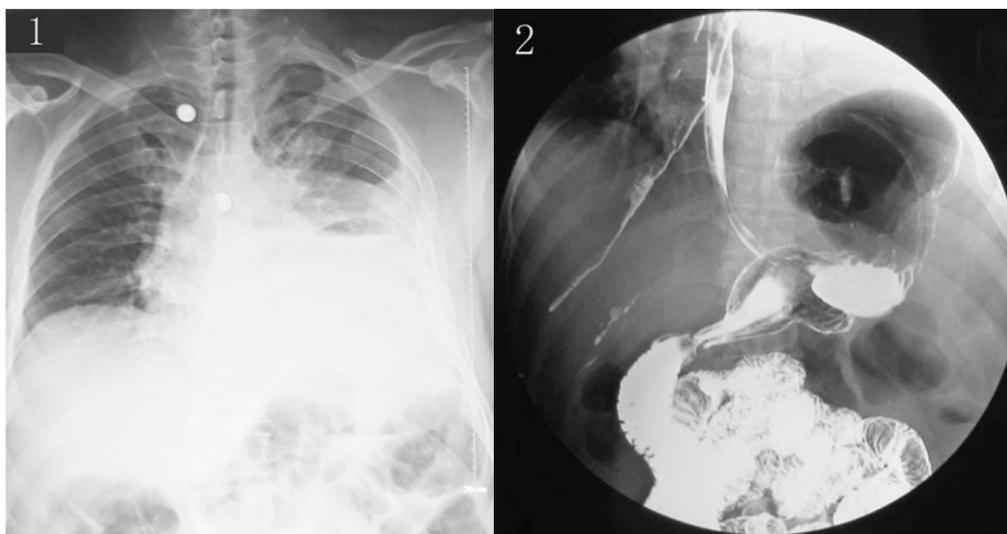


Figura 2.2 – Raggi X (1) e radiografia (2) del torace dopo la somministrazione di *Gastrografin* come mezzo di contrasto. Le immagini mostrano lo stomaco erniato entro l'emitorace sinistro a seguito di un trauma toraco-addominale (incidente stradale)²⁴.

2.1.3 Paralisi diaframmatica

La paralisi diaframmatica è una disfunzione temporanea o permanente in cui la forza di contrazione muscolare del diaframma è ridotta o assente, ma senza necessariamente variazioni nella posizione o

nella struttura del muscolo ²². Questa patologia è dovuta ad un danno a carico del diaframma o ad un qualsiasi livello del nervo frenico (principale fonte di innervazione del muscolo diaframmatico). Gli interventi di chirurgia cardiaca e toracica ne rappresentano la causa più frequente, con un'incidenza del 0.3-12.8%: la lesione in questi casi può derivare dalla transezione completa del nervo frenico (accidentale o di necessità, ad esempio negli interventi oncologici), da uno stiramento o da stress termici ²⁵. La paralisi idiopatica, invece, riguarda più frequentemente la parte destra del diaframma e può essere associata a disturbi neuromuscolari, parti difficili, osteoartrite cervicale, tiroide substernale, aneurismi aortici oppure a infezioni virali non diagnosticate. Un'altra rara causa di lesione del nervo frenico è il trauma toracico ²³.

Nei neonati la paralisi diaframmatica, anche unilaterale, è quasi sempre sintomatica, dal momento che i muscoli intercostali e quelli inspiratori accessori non contribuiscono per più del 50% alla meccanica respiratoria. Inoltre, il ridotto calibro delle vie aeree, la mancanza di tosse e di meccanismi efficaci di clearance muco-ciliare predispongono all'ostruzione bronchiale. Negli adulti, in caso di paralisi diaframmatica, il sintomo più frequente è la dispnea per insufficienza di ventilazione polmonare: solitamente si riscontra, infatti, in questi soggetti, un decremento pari al 20-30% della Massima Ventilazione Volontaria (MVV, una misura della quantità massima di aria che può essere inspirata ed espirata nell'arco temporale di un minuto) ²².

2.1.4 *Eventratio* congenita

L'*eventratio* diaframmatica congenita è una condizione di flaccidità e di ipotrofia che interessa una porzione del diaframma o la sua totalità, pur conservando intatte tutte le sue inserzioni. Si differenzia dall'ernia per l'assenza di soluzioni di continuo lungo tutta la sua superficie ²².

Nonostante l'*eventratio* si manifesti con caratteristiche radiologiche ed alterazioni fisiopatologiche simili a quelle della paralisi diaframmatica, l'eziologia delle due patologie è diversa. L'*eventratio* è infatti un disturbo congenito dovuto ad anomalie di sviluppo della muscolatura di una porzione (solitamente quella centrale) o di tutto il diaframma ²². In uno studio condotto da McNamara *et al.* ²⁶ viene ipotizzato che il difetto derivi da un'alterazione simile a quella che si realizza nell'ernia di Bochdaleck, ma in uno stadio di sviluppo dell'embrione più tardivo.

Dal punto di vista istologico, nell'*eventratio* la porzione di diaframma interessata è costituita da tessuto fibroelastico con fibre muscolari e fasci nervosi raramente presenti in piccoli gruppi e dispersi in varie direzioni. Alterazioni del tutto simili si riscontrano nel caso di paralisi diaframmatica; tuttavia, nell'*eventratio* il nervo frenico risulta anatomicamente integro, anche se la sua effettiva funzionalità è difficilmente dimostrabile *in vivo* a causa della scarsa risposta del muscolo ²².

2.1.5 Tecniche di trattamento convenzionali

Di prassi, nel caso venga diagnosticata la presenza di un difetto diaframmatico, il soggetto viene sottoposto ad un intervento chirurgico subito dopo la diagnosi per riparare il difetto (e, nel caso di un'ernia, per riposizionare gli organi addominali nella loro sede anatomica).

Per la riparazione del difetto si può ricorrere a tecniche diverse. Nel caso il problema sia di piccola entità si utilizzano tecniche di sutura diretta, le quali prevedono la riparazione diretta del difetto tramite punti di sutura. Questo tipo di intervento, se impiegato nel trattamento di ernie o di ampi difetti, comporta, oltre che un forte dolore post-operatorio e discomfort per il paziente, una percentuale di recidive variabile dal 20 al 30%. La causa della recidiva andrebbe ricercata nell'eccessiva tensione cui è sottoposta la sutura e nelle conseguenti alterazioni trofiche dei tessuti muscolo-aponeurotici circostanti la zona danneggiata ²⁷.

Nel caso l'ernia o il difetto non sia di piccole dimensioni, le tecniche ricostruttive convenzionali sono quelle basate sul trapianto autologo, ovvero sul trapianto di tessuti estratti da una zona non danneggiata del corpo del paziente. Possibili opzioni per la riparazione del muscolo diaframmatico sono i foglietti sierosi del complesso fasciale renale, oppure lembi muscolari della parete toracica o addominale. Tuttavia, sebbene questo metodo sia ancora utilizzato in ambito clinico, esso presenta uno svantaggio non indifferente. Questo è dato dal sacrificio di un tessuto precedentemente sano, con un conseguente deficit volumetrico nella zona donatrice e un aumento dei tempi di convalescenza per il paziente.

Per superare tali limiti, negli ultimi anni nelle procedure chirurgiche per la riparazione di lesioni e difetti diaframmatici di grandi dimensioni è stato introdotto l'utilizzo di innesti di materiale sintetico non riassorbibile, nell'ottica di sostituire la tecnica del trapianto di tessuti autologhi. Attualmente, gli innesti sintetici più utilizzati in questo ambito sono *patch* in politetrafluoroetilene espanso (ePTFE, *expanded Polytetrafluoroethylene*), foglietti in silicone rinforzato e mesh in polipropilene (PP). Questi materiali polimerici sono ampiamente utilizzati soprattutto perché godono di buona biocompatibilità e stabilità meccanica anche sul lungo termine ma, essendo sintetici, non sono capaci di adattarsi alla crescita del soggetto pediatrico, per cui possono portare ad una mancata corrispondenza anatomica con il tessuto nativo, limitazione del movimento della parete toracica e ricorrenza del difetto, oltre che possibile infezione e reazione allergica ²⁸.

A titolo di esempio, la morbilità a lungo termine associata agli interventi chirurgici per la riparazione delle ernie diaframmatiche tramite *patch* sintetici rimane significativa, ed include deformità della parete toracica (nel 67% dei pazienti), scoliosi (13%), nonché ostruzione dell'intestino tenue (13%) e deficit di crescita (78%) ²⁹.

In questo contesto, la ricerca nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale ha l'obiettivo di fornire delle valide alternative alle tecniche chirurgiche tradizionali, per mezzo dello sviluppo di innesti di natura biologica che siano in grado di garantire una completa rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico, nell'ottica di ottenere una soluzione definitiva per la riparazione dei difetti e delle lesioni del diaframma.

2.2 Ingegneria dei tessuti

2.2.1 Approccio generale

Per ingegneria tissutale (TE, *Tissue Engineering*) si intende quel settore multidisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o addirittura migliorare le funzioni di un tessuto o di un organo³⁰.

Il processo che sta alla base di un qualsiasi tessuto o organo prodotto ad oggi con le tecniche dell'ingegneria tissutale ha come punto di partenza il prelievo dal paziente (a cui il costrutto è destinato) di un campione di tessuto sano mediante biopsia; da tale campione la componente cellulare viene separata dalla matrice extra-cellulare e, dopo aver isolato la linea cellulare di interesse, quest'ultima viene espansa *in vitro*, in condizioni e ambiente strettamente controllati, in modo tale da permettere alle cellule di sopravvivere e proliferare con successo. Quando risultano in quantità sufficiente, le cellule vengono poi seminate su uno "scaffold", una struttura di supporto che sia in grado di guidarne l'organizzazione, la crescita e l'eventuale differenziazione.

D'altra parte si tenga presente che, in coltura, le cellule di per sé non sarebbero in grado di organizzarsi spontaneamente in strutture tridimensionali (tipiche dei tessuti e degli organi biologici): esse possono dar origine soltanto a monostrati. Risulta quindi necessario fornire alle cellule un "impalcatura" che consenta loro di organizzarsi a formare un costrutto 3D, il quale riproduca il tessuto o l'organo della forma e dimensione desiderate.

Infine, l'ultima fase del processo, detta condizionamento, prevede che lo scaffold su cui sono seminate le cellule venga inserito all'interno di un bioreattore. Si tratta di un apparato in grado di garantire un ambiente sterile, controllato (nella composizione e nella temperatura) e dinamico, capace di applicare al costrutto in crescita sollecitazioni di ordine bio-chimico, meccanico, idraulico e talvolta elettrico, tali da permettergli di maturare in condizioni il più possibile simili a quelle che poi l'innesto conoscerà una volta impiantato *in vivo*.

Questa fase dovrebbe permettere di ottenere un costrutto bioingegnerizzato completamente funzionale, pronto per essere innestato chirurgicamente nel paziente, dove andrà a riparare o a sostituire il tessuto o l'organo danneggiato ⁴ (Figura 2.3).

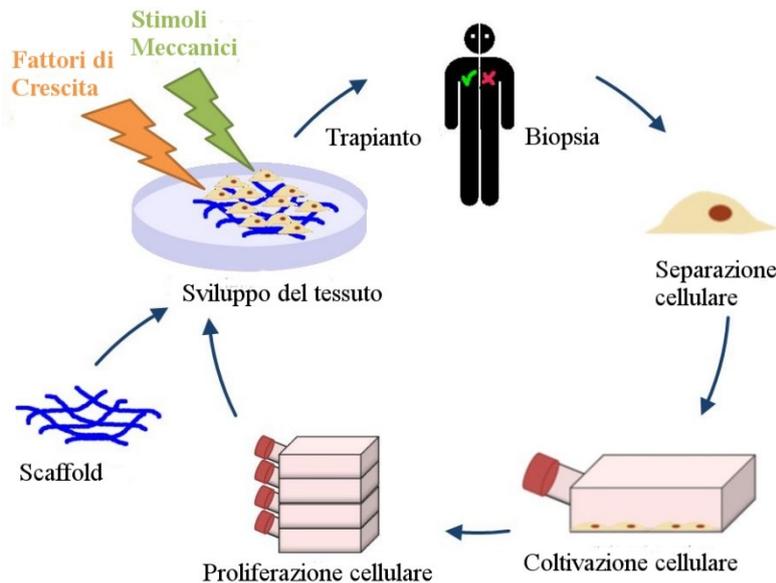


Figura 2.3 – Fasi caratteristiche dell'ingegneria tissutale ⁶⁰.

2.2.2 La componente cellulare

Nel ricreare *in vitro* un tessuto ingegnerizzato, la scelta della fonte cellulare più appropriata è di fondamentale importanza. La popolazione cellulare ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: derivare da una fonte facilmente accessibile; essere capace di proliferazione e di auto-rinnovamento (*self-renewal*), al fine di garantire un completo ripopolamento dello scaffold; essere in grado di differenziarsi dando origine a linee cellulari specializzate in funzioni specifiche del tessuto o dell'organo che si vuole ottenere ³².

In generale, due diverse categorie di cellule possono essere utilizzate per questi scopi: cellule differenziate adulte (anche dette “cellule somatiche”) o cellule staminali.

Le cellule somatiche sono presenti in tutti i tessuti adulti, sono specializzate nello svolgere esclusivamente determinate funzioni, e hanno la capacità di replicarsi, tramite mitosi, per un numero limitato di volte, generando soltanto cellule dello stesso tipo. Nonostante alcune popolazioni di cellule somatiche possano essere facilmente propagate in coltura in condizioni controllate, la loro limitata capacità di replicazione e l'incapacità di differenziarsi in altri tipi cellulari le rende poco adatte ad essere impiegate in applicazioni di ingegneria tissutale ⁴. Invece, importanti sviluppi nell'ambito della medicina rigenerativa sono stati raggiunti grazie alla scoperta delle cellule staminali. Queste cellule si trovano in tutti gli organismi pluricellulari e sono caratterizzate da due fondamentali proprietà:

- La capacità di rinnovarsi tramite divisione cellulare mitotica per un numero indefinito di volte, mantenendo il proprio stato indifferenziato (*self-renewal*).
- La capacità di differenziarsi in un certo numero di tipi cellulari completamente differenziati (*potency*)³¹.

Nei mammiferi si possono distinguere due categorie di cellule staminali: le cellule staminali embrionali (ESCs, *Embriotic Stem Cells*) e le cellule staminali adulte. Le prime derivano dalla cosiddetta “massa cellulare interna”, un ammasso di cellule presente all’interno della blastocisti, lo stadio embrionale che si sviluppa durante i primi giorni di gravidanza. Si tratta di cellule staminali pluripotenti, per cui esse possono differenziarsi, in risposta a stimoli specifici e controllati, in uno qualsiasi dei più di 200 diversi tipi cellulari presenti in un individuo umano adulto. Tuttavia, poiché il prelievo di queste cellule implica la distruzione di embrioni, problematiche di ordine etico e religioso ne impediscono l’utilizzo nella maggior parte dei Paesi Occidentali. Nonostante ciò, è indubbio che le ESCs presenterebbero caratteristiche fortemente promettenti per il settore della medicina rigenerativa⁴.

Le cellule staminali adulte, invece, si trovano in quasi tutti i tessuti adulti. Qui tali cellule risiedono in specifici microambienti chiamati “nicchie”, dove possono sopravvivere mantenendo il proprio stato indifferenziato fintanto che, sotto opportuni stimoli, non comincino un processo di differenziazione che le porti a diventare cellule somatiche, in grado di sostituire le cellule di quel tessuto danneggiate; risultano quindi necessarie al normale processo di mantenimento dei tessuti e alla riparazione di eventuali danni⁴.

A differenza delle cellule staminali embrionali, l’utilizzo di cellule staminali adulte non è associato ad alcuna problematica di ordine etico, motivo per cui la ricerca si è incentrata maggiormente sull’uso di queste cellule piuttosto che sulle ESCs. Inoltre, trattandosi di cellule staminali, possono andare incontro ad un numero illimitato di divisioni cellulari, per cui risultano disponibili in abbondante quantità, hanno la capacità di differenziarsi in tipi cellulari diversi, e hanno un potenziale immunogenico quasi nullo, in quanto non esprimono ancora quei recettori di membrana che permettono di farsi riconoscere come potenziali antigeni nell’organismo ospite⁴.

2.2.3 Cellule staminali adulte per la rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico

Per quanto riguarda le applicazioni di ingegneria tissutale finalizzate alla rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico, la popolazione cellulare ideale dovrebbe provenire da una fonte accessibile, avere un elevato potenziale rigenerativo allo scopo di generare un volume di tessuto muscolare clinicamente utile, pur mantenendo anche la capacità di differenziarsi efficientemente in miofibre

mature. Dati questi requisiti, la ricerca ha focalizzato l'attenzione in particolare sulle cellule staminali adulte ³³.

Le cellule satellite (cellule precursori del tessuto muscolare scheletrico), localizzate alla periferia delle fibre muscolari, rappresentano una popolazione di cellule staminali normalmente presenti nell'adulto. Queste ultime sono in grado di differenziarsi in mioblasti, che a loro volta si possono fondere per formare nuove cellule muscolari scheletriche multinucleate, oppure possono fondere con miofibre già esistenti nel tessuto danneggiato ³². Cellule precursori del tessuto muscolare scheletrico sono state scelte in numerosi studi di ingegneria tissutale in quanto, dopo essere isolate (ad esempio tramite biopsia), conservano *in vitro* le proprietà di *self-renewal* e di proliferazione, oltre a mantenere il loro potenziale miogenico ³².

Oltre alle cellule satellite, sono state testate in alcuni studi anche altre popolazioni di cellule staminali adulte.

Un esempio sono le cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo (BM-MSCs, *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*). Nonostante sia stato mostrato che l'unico contributo che tali cellule danno alla rigenerazione del muscolo scheletrico è dato dall'attivazione delle cellule satellite residenti ³⁴, uno studio condotto su modello murino ha dimostrato che tessuto diaframmatico decellularizzato ripopolato da BM-MSCs facilita la rigenerazione *in situ* di tessuto funzionale. In particolare, il costrutto è stato utilizzato per sostituire l'80% dell'emidiaframma sinistro di alcuni ratti: a tre settimane dal trapianto, gli animali hanno mostrato attività miografica, parametri di spirometria e valutazioni istologiche simili ai ratti nativi ³¹. Nonostante questi risultati siano stati ottenuti in un modello animale molto più semplice di quello umano, sono comunque incoraggianti, e suggeriscono la potenziale applicazione di costrutti di questo tipo per la riparazione di diaframma umano.

Un'altra valida alternativa sono le cellule staminali mesenchimali del liquido amniotico (AF-MSCs, *Amniotic Fluid-derived Mesenchymal Stem Cells*) che hanno caratteristiche miste tra quelle delle cellule staminali embrionali e delle staminali adulte. Presentano ottime proprietà, come il fatto di essere molto resistenti all'ipossia, rispondere meglio a segnali provenienti dall'ambiente circostante rispetto a cellule più mature, e produrre livelli elevati di fattori angiogenici, che aumentano la loro abilità di sopravvivere e crescere *in vivo*. Inoltre, possono essere prelevate facilmente per esempio tramite amniocentesi, un esame di norma prescritto alle gestanti nel cui feto sia stata diagnosticata una anomalia strutturale quale l'ernia diaframmatica congenita (*Congenital Diaphragmatic Hernia*, CDH) ³⁵.

Nel caso di feto affetto da CDH, cellule staminali del liquido amniotico possono essere prelevate durante la gestazione ed insemiante *in vitro* su tessuto diaframmatico decellularizzato, in modo tale

da ottenere un costrutto ingegnerizzato pronto per essere impiantato chirurgicamente alla nascita, permettendo così la riparazione del difetto congenito mediante tessuto autologo ³⁵.

Per queste ragioni, le AF-MSCs sono ad oggi tra le fonti cellulari più interessanti da una prospettiva traslazionale.

Un'altra promettente alternativa è data dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs, *induced Pluripotent Stem Cells*), cellule staminali pluripotenti che si ottengono tramite riprogrammazione genica di cellule somatiche adulte ⁴. In uno studio condotto da Rao *et al.* ³³, iPSCs umane sono state utilizzate per derivare cellule progenitrici miogeniche, successivamente differenziate in miofibre contrattili. Nello studio è stato dimostrato che tali miofibre possono maturare *in vitro*, con una crescente produzione di forza contrattile, e che, una volta impiantate *in vivo*, sono in grado di integrarsi efficientemente con il muscolo esistente.

Le iPSCs possono quindi essere una valida alternativa alle cellule satellite; tuttavia, essendo ottenute mediante manipolazione genica, servono ulteriori e approfondite ricerche per testare i metodi di riprogrammazione genica più appropriati e per identificare protocolli che permettano di ottenere una loro differenziazione efficiente e controllata ³³.

2.2.4 Scaffold e matrice extra-cellulare

La maggior parte delle cellule di mammifero sono ancoraggio-dipendenti, ossia sono in grado di sopravvivere e di mantenere le proprie funzioni vitali soltanto se adese ad un particolare substrato: la matrice extra-cellulare (ECM).

La ECM svolge diverse importanti funzioni, che possono essere così riassunte:

- Grazie alla sua struttura, fornisce supporto fisico e protezione alle cellule.
- Contribuisce a definire le proprietà strutturali e quindi meccaniche del tessuto, a loro volta associate alle funzioni che quel tessuto svolge. Per esempio, fasci di collagene di tipo I spessi e tra loro allineati nel tendine sono responsabili dell'elevata resistenza a trazione di quel tessuto; d'altra parte, la presenza di fibrille di collagene e fibre di elastina distribuite senza un'orientazione preferenziale nella cute conferisce ad essa particolare elasticità e tenacità.
- Grazie alla presenza di molecole proteiche con la funzione di segnali biochimici, regola lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la morfologia e la funzione delle cellule in contatto con essa.
- Funge da riserva di fattori di crescita e ne potenzia la loro bioattività.
- Fornisce un ambiente fisico mutevole che consente il rimodellamento durante processi dinamici dei tessuti quali la morfogenesi, l'omeostasi e la guarigione delle ferite ³⁶.

Risulta dunque intuitivo dedurre che ad uno scaffold utilizzabile per la realizzazione di costrutti di ingegneria tissutale siano richieste caratteristiche di fatto analoghe a quelle proprie della ECM dei tessuti o degli organi nativi, ovvero:

- Biocompatibilità: una volta impiantato, lo scaffold deve limitare (per quanto possibile) la reazione infiammatoria e non deve causare effetti immunogenici che portino al rigetto. Al contrario, lo scaffold dovrebbe supportare l'adesione cellulare, la crescita e la differenziazione, sia durante la coltura *in vitro* che dopo l'impianto *in vivo*.
- Biorisorbibilità: infatti, dopo che il costrutto è stato innestato *in vivo* al posto di un tessuto o di un organo danneggiato, ci si aspetta che le cellule aventi colonizzato quel costrutto inizino a formare la nuova ECM di quel tessuto o di quell'organo; contestualmente, lo scaffold deve quindi degradarsi, con una cinetica di degradazione che deve essere strettamente controllata e coordinata rispetto alla formazione di nuovo tessuto. Inoltre, i prodotti della degradazione devono risultare non tossici per l'organismo ospite ma, anzi, devono essere da esso facilmente metabolizzati.
- Una porosità interconnessa di dimensioni appropriate, tale da permettere alle cellule non solo di aderire alla superficie dello scaffold, ma anche di collocarsi all'interno di esso, colonizzandolo completamente; i pori consentono inoltre lo scambio di sostanze e di gas respiratori tra le cellule e l'ambiente esterno.
- Bioattività: lo scaffold dovrebbe interagire attivamente con le cellule seminate, regolando correttamente la loro attività.
- Adeguate proprietà biomeccaniche: in particolare, le proprietà meccaniche intrinseche dei biomateriali usati per lo scaffold dovrebbero corrispondere a quelle del tessuto ospite.
- Lavorabilità in una varietà di forme e dimensioni diverse ^{4,37}.

Avendo in mente questi requisiti, nel corso degli anni numerosi studi hanno testato una vasta gamma di biomateriali, di natura sintetica o biologica, da utilizzare come scaffold per l'ingegneria tissutale. Altrettanto diversificate sono le tecniche a cui si è fatto ricorso per la produzione degli scaffold. Tra queste si possono citare l'*elettrospinning*, la stampa 3D, l'elettrofilatura, la liofilizzazione, la separazione di fase e il *gas foaming* ²⁸.

Tuttavia, le molteplici funzioni, la complessa composizione e la natura dinamica della ECM nei tessuti nativi rendono molto difficile il tentativo di riprodurla esattamente mediante qualsiasi biomateriale (di natura sintetica o biologica) ottenibile tramite i metodi fisico-chimici attualmente a disposizione ³⁷. A ciò vi è da aggiungere il fatto che, nonostante i numerosi studi a riguardo, ad oggi rimangono ancora un certo numero di proteine della ECM non del tutto identificate ³⁸.

Ecco perché negli ultimi anni, data l'importanza del ruolo e delle interazioni svolte dalla ECM nell'indirizzare la differenziazione cellulare e i fenomeni meccanici e molecolari ad essa associati, i ricercatori sono giunti alla convinzione che risulta molto più conveniente ricorrere a scaffold costituiti direttamente da tessuti biologici (e quindi da ECM intatta), o addirittura da organi interi.

Questo approccio risulta però possibile soltanto se si riescono a eliminare dal tessuto del donatore tutti i determinanti antigenici ivi presenti, che potrebbero provocare nell'organismo del ricevente una reazione immunitaria anche forte, causando il rigetto dell'innesto impiantato ³⁹.

L'idea è quindi quella di ricavare da un donatore (della stessa specie del ricevente oppure di specie diversa) il tessuto o l'organo di interesse, rimuovere da esso tutti i possibili determinanti antigenici mediante un opportuno protocollo di decellularizzazione, ed utilizzare la ECM decellularizzata che si ottiene (sperabilmente intatta) come struttura a cui fornire cellule autologhe del ricevente al fine di ricreare l'architettura e la funzionalità del tessuto o dell'organo nativo ⁴⁰.

2.2.5 Decellularizzazione

La decellularizzazione è quel processo che permette di eliminare tutte le componenti cellulari del tessuto o dell'organo di interesse, mantenendo però intatta l'impalcatura tissutale, costituita dalla matrice extra-cellulare (ECM).

Ciò ha come scopo primario quello di eliminare qualsiasi elemento che possa essere riconosciuto come *non-self* dal ricevente e che, di conseguenza, possa essere rigettato ⁴⁰. D'altra parte, però, data la presenza all'interno della ECM di segnali biochimici che influenzano e regolano ogni aspetto della vita cellulare, risulta altrettanto importante che il protocollo di decellularizzazione preservi per quanto possibile l'ultrastruttura, la composizione, nonché le proprietà meccaniche della ECM nativa. Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che, se nella ECM dopo la decellularizzazione permane del materiale cellulare, il vantaggio della ECM nel guidare il comportamento delle cellule seminate potrebbe risultare fundamentalmente compromesso ^{40,41}.

L'efficacia degli agenti di decellularizzazione dipende da molti fattori, tra cui la cellularità del tessuto (ossia il numero e il tipo di cellule in esso contenute), la densità, il contenuto lipidico e lo spessore. Si deve inoltre tener presente che qualunque metodo e qualunque agente per la rimozione cellulare altera la composizione della ECM e causa un certo grado di danno alla sua ultrastruttura ⁴¹.

In generale si possono distinguere agenti chimici, agenti biologici e metodi di tipo fisico.

Agenti chimici

Tra i reagenti chimici vi sono acidi e basi, soluzioni ipotoniche e ipertoniche, detergenti, alcoli e altri solventi.

Acidi e basi causano o catalizzano la degradazione idrolitica delle biomolecole, per cui permettono di degradare gli acidi nucleici (DNA e RNA) e di solubilizzare le componenti citoplasmatiche delle cellule.

Soluzioni ipotoniche e ipertoniche causano la lisi cellulare per effetto osmotico. Esse inducono un danno minimo alla ECM e alla sua architettura, ma non sono efficaci nella rimozione della componente cellulare. Per ottenere il massimo effetto decellularizzante si è soliti immergere il tessuto in soluzioni ipertoniche e ipotoniche alternativamente per diversi cicli. Questo metodo facilita anche il risciacquo del tessuto da residui cellulari rimasti negli spazi intercellulari dopo la lisi.

Tra i detergenti utilizzabili come agenti di decellularizzazione si possono distinguere detergenti ionici, non ionici e zwitterionici. Queste sostanze sono molto efficaci nella rimozione di tutto il materiale cellulare, dato che solubilizzano le membrane cellulari e nucleari, e dissociano il DNA dalle proteine. Tuttavia, i detergenti possono anche danneggiare e dissociare le proteine della ECM (sia quelle strutturali, sia quelle che fungono da segnali biochimici).

Inoltre, grande attenzione deve essere posta nella rimozione di tutti i reagenti chimici utilizzati nel tessuto per la decellularizzazione, e dei detergenti in modo particolare. Infatti, concentrazioni anche molto ridotte di queste sostanze possono avere effetti citotossici per le cellule che verranno poi seminate sulla ECM decellularizzata, inibendo così la capacità rigenerativa del costrutto ottenuto.

Infine, alcoli come il glicerolo hanno l'effetto di danneggiare le componenti fosfolipidiche delle membrane cellulari, provocando quindi la lisi delle cellule per deidratazione^{41,42}.

Agenti biologici

Gli agenti biologici possono classificarsi in enzimatici e non enzimatici.

Enzimi utilizzati nei protocolli di decellularizzazione includono le nucleasi, la tripsina, la collagenasi e le lipasi. Questi enzimi possono fornire un'elevata specificità nell'eliminazione dei residui cellulari, ma la rimozione completa delle cellule tramite il solo trattamento enzimatico risulta difficile da ottenere, oltre al fatto che i residui dell'enzima possono compromettere la successiva ricellularizzazione o provocare una risposta immunitaria avversa *in vivo*.

La tripsina, ad esempio, è una serin-proteasi, un enzima capace di recidere il legame tra le cellule e le proteine della ECM a cui sono adese.

La collagenasi invece può essere usata per la decellularizzazione, ma soltanto nei casi in cui le proprietà legate al mantenimento dell'integrità del collagene non siano critiche nell'applicazione clinica prevista per la ECM risultante.

Le lipasi facilitano la delipidazione del tessuto, ma da sole spesso non sono sufficienti.

Tra gli agenti non enzimatici si possono citare l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e l'acido etilenglicole-tetraacetico (EGTA). Si tratta di agenti chelanti in quanto legano ioni metallici, tipicamente lo ione Ca^{2+} , il quale è necessario per conservare la struttura e la conformazione delle integrine, proteine di membrana che consentono l'adesione delle cellule alla matrice extra-cellulare. Gli agenti chelanti da soli non sono però sufficienti per la rimozione completa delle cellule, per cui vengono tipicamente utilizzati in combinazione con enzimi come la tripsina, o con detergenti ^{37,38}.

Metodi di tipo fisico

I metodi di tipo fisico inducono tutti un danno meccanico alle cellule, risultante nella lisi cellulare. Uno dei metodi più comuni consiste nell'applicazione di cicli di congelamento-scongelo ripetuti. Un altro approccio prevede di esporre il tessuto a pressioni idrostatiche non fisiologiche oppure ad abrasione meccanica, in combinazione con l'esposizione ad altri reagenti. In alternativa, l'elettroporazione è una tecnica avente l'effetto di produrre dei micropori sulla membrana cellulare a causa dell'applicazione di brevissimi impulsi elettrici; in questo modo la cellula perde la sua omeostasi, morendo ⁴¹.

Tutti questi metodi presentano dei vantaggi ma anche dei limiti. Generalmente, essi sono utilizzati in combinazione tra loro, per massimizzare l'effetto della decellularizzazione, minimizzando allo stesso tempo gli effetti negativi sulla composizione, sull'architettura, sull'attività biologica e sulle proprietà meccaniche della ECM risultante ³⁷.

Solitamente il protocollo di decellularizzazione prevede una fase iniziale di lisi della membrana cellulare attraverso metodi fisici o cicli di soluzioni ipertoniche e ipotoniche, seguita dalla separazione delle componenti cellulari dalla ECM mediante trattamenti enzimatici, dalla solubilizzazione delle componenti cellulari citoplasmatiche e nucleari per mezzo di detergenti, ed infine dalla rimozione dei residui cellulari dal tessuto ⁴².

2.2.6 Valutazione dell'efficacia della decellularizzazione

Una volta completato il protocollo di decellularizzazione, risulta fondamentale procedere ad un'attenta analisi dello scaffold ottenuto, finalizzata ad una valutazione quantitativa dell'efficacia del processo.

Ridurre l'immunogenicità dello scaffold è di certo uno dei requisiti più critici. Infatti, se il potenziale immunogenico non viene sufficientemente attenuato, una volta che l'innesto viene impiantato *in vivo*, questo può esser rigettato, inducendo così il fallimento funzionale dell'impianto e la necessità della sua immediata sostituzione o rimozione ³⁹. Tenendo presente che nessuna tecnica di

decellularizzazione è in grado di rimuovere il 100% del materiale cellulare, in uno studio condotto da Crapo *et al.*⁴¹ nel 2011 sono state fissate alcune soglie, tuttora prese come riferimento dalla comunità scientifica internazionale, per valutare la quantità di DNA residuo da ritenersi accettabile dopo la decellularizzazione. Secondo questo studio, un metodo di decellularizzazione può essere considerato efficace in termini di rimozione del materiale cellulare solamente quando:

- Il contenuto di DNA a doppio filamento che rimane all'interno del tessuto è inferiore a 50 ng su mg di ECM disidratata (1).
- La lunghezza di ciascun frammento di DNA è inferiore a 200 paia di basi (2).
- Non è presente materiale nucleare residuo nelle sezioni di tessuto (3).

L'attenzione sul materiale nucleico, e sul DNA in particolare, è giustificata dal fatto che la presenza di DNA non autologo è direttamente correlato a reazioni avverse da parte dell'organismo ospite, è ubiquitario nei tessuti e nelle cellule, è facilmente quantificabile e fornisce un indice generale anche per gli altri residui cellulari all'interno della ECM.

Il primo e il secondo criterio sono facilmente verificabili utilizzando kit commerciali. Il terzo criterio viene valutato tramite saggi istologici o tramite metodi di immunofluorescenza e serve come verifica qualitativa dei primi due criteri⁴¹.

Una volta verificata l'efficacia della rimozione cellulare, risulta altrettanto importante, anche in relazione all'applicazione prevista per il costrutto in esame, eseguire delle analisi strutturali sulla ECM decellularizzata che si ottiene. Infatti, nonostante il processo di decellularizzazione modifichi inevitabilmente la struttura e la composizione della matrice extra-cellulare, è fondamentale che queste caratteristiche rimangano il più possibile simili a quelle dell'ECM nativa. Per fare queste valutazioni, si può ricorrere a diverse tecniche, tra cui analisi istologiche o di immunofluorescenza, spettroscopie ad infrarossi o tecniche di estrazione, che permettano di evidenziare componenti specifiche della ECM, nel tessuto nativo e in quello decellularizzato⁴³.

2.2.7 Proprietà meccaniche dello scaffold decellularizzato

Nell'ottica della rigenerazione di un tessuto o di un organo tramite scaffold decellularizzati, il mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto nativo è di vitale importanza per assicurare una corretta funzionalità del costrutto ingegnerizzato⁴¹.

Negli ultimi due decenni diversi studi hanno dimostrato, infatti, che le cellule percepiscono, nel loro insieme, le proprietà meccaniche del substrato a cui sono adese, con una risposta che è fortemente dipendente dallo specifico tipo cellulare. Questa proprietà viene detta "meccano-trasduzione", e contribuisce a regolare la maggior parte degli aspetti della vita cellulare, tra cui l'adesione, la proliferazione, la migrazione e l'eventuale differenziazione⁴⁴.

Le cellule del tessuto muscolare forniscono una chiara prova di questo fenomeno. In uno studio condotto da Engler *et al.*⁴⁵, ad esempio, mioblasti estratti da tessuto muscolare scheletrico di ratto sono stati seminati su supporti in gel di poliammide (PA) di rigidità diversa, tutti ricoperti da uno strato di collagene di tipo I.

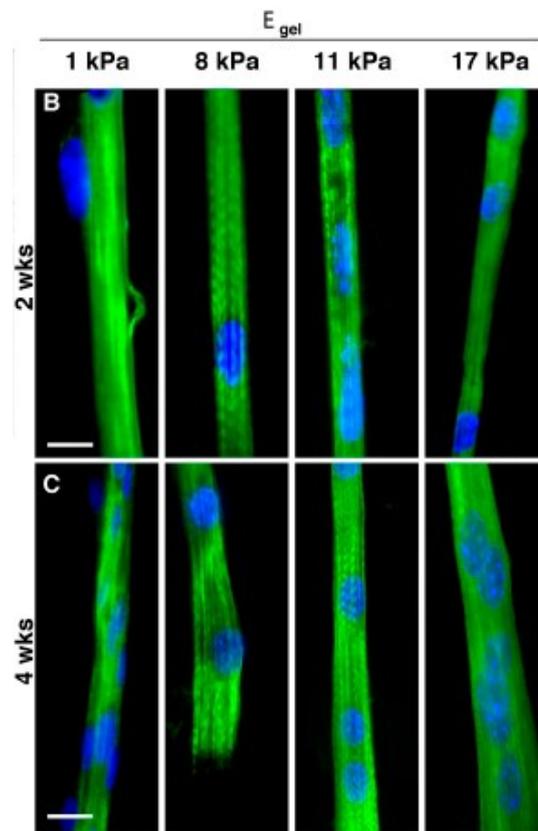


Figura 2.4 – Miofibre multinucleate coltivate su gel di poliammide rivestiti di collagene di tipo I di diversa rigidità, A) dopo 2 settimane di coltura, B) dopo 4 settimane di coltura. In blu sono evidenziati i nuclei, in verde i filamenti di miosina⁴⁵.

Come mostra la Figura 2.4, nonostante la fusione delle cellule a formare miofibre multinucleate avvenga indipendentemente dalla rigidità del substrato, le striature di actina e miosina, tipiche del muscolo scheletrico striato, emergono, dopo due settimane di coltura, soltanto su quei gel aventi modulo di Young (E) assimilabile a quello del tessuto muscolare sano ($E \cong 12$ kPa). Invece, sia sui gel con rigidità molto più bassa che su quelli molto più rigidi, le striature sono significativamente meno marcate. Inoltre, dopo quattro settimane si osserva che sui gel di rigidità intermedia le miofibre striate raddoppiano in percentuale, mentre i gel molto morbidi e molto rigidi mostrano soltanto una piccola sottopopolazione di miofibre striate (5%).

Riguardo l'influenza della rigidità del substrato sulla differenziazione cellulare, un altro studio condotto sempre da Engler e collaboratori ⁴⁶ ha considerato, ad esempio, cellule staminali mesenchimali umane, coltivate per diverse settimane su gel di PA ricoperti di collagene di rigidità diversa. L'esperimento ha mostrato che il processo di differenziazione di tali cellule è fortemente dipendente dalle proprietà meccaniche del substrato, portando ad ottenere neuroni sui supporti più morbidi ($E \cong 1$ kPa), mioblasti su quelli intermedi ($E \cong 11$ kPa) e osteoblasti su quelli più rigidi ($E \cong 34$ kPa) (Figura 2.5).

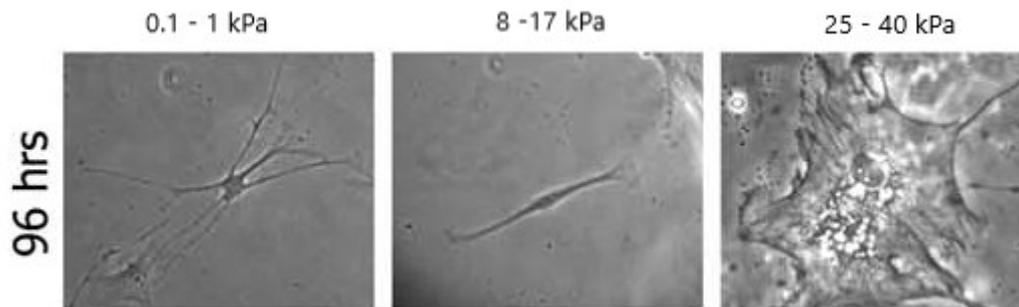


Figura 2.5 – A sinistra: neuroni derivanti da cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs, *human Mesenchymal Stem Cells*) coltivate su gel di poliacrilammide (PA) con moduli elastici nel range: 0.1- 1 kPa. In centro: mioblasti derivanti da hMSCs coltivate su gel di PA con moduli elastici nel range: 8 - 17 kPa. A destra: osteoblasti derivanti da hMSCs coltivate su gel di PA con moduli elastici nel range: 25 – 40 kPa ⁴⁶.

Da ciò si può dunque capire che risulta di primaria importanza verificare che le caratteristiche meccaniche della ECM ottenuta da un processo di decellularizzazione si mantengano simili a quelle del tessuto nativo. Parametri meccanici critici includono il modulo elastico, il modulo viscoso e la resistenza a trazione, tenendo presente, comunque, che il grado di importanza di ciascun parametro è fortemente dipendente dalla specifica applicazione prevista per il tessuto o l'organo in esame. Per questo, la tecnica di decellularizzazione da utilizzare deve essere scelta anche in base alle caratteristiche biomeccaniche che sono richieste al tessuto nell'applicazione prevista ⁴⁷.

Queste proprietà sono a loro volta determinate *in primis* dalle proteine strutturali presenti nella ECM, collagene ed elastina innanzitutto. Tuttavia, è stato di recente dimostrato che alcuni agenti chimici comunemente utilizzati nei protocolli di decellularizzazione causano danni a collagene ed elastina. In particolare, è stato mostrato che il sodio dodecilsolfato (SDS), utilizzato come detergente nella decellularizzazione, sia in grado di alterare la microstruttura della ECM facendo compattare il collagene e producendo una matrice più fibrosa; inoltre, cambiamenti più pronunciati nella struttura e nelle proprietà meccaniche tendono ad essere correlati a concentrazioni maggiori del detergente ⁴⁶. Invece, altri detersivi quali Triton X e CHAPS, preservano sufficientemente le proteine chiave della ECM e dunque anche le sue caratteristiche meccaniche.

Reagenti chimici basici quali l'idrossido di sodio (NaOH) sono più potenti rispetto agli acidi, ma possono eliminare completamente i fattori di crescita dalla ECM e compromettere le sue proprietà. Il meccanismo principale per cui le basi riducono le proprietà meccaniche della ECM è la rottura dei legami intrafibrillari e dei *crosslinks*, ovvero di quei legami che tengono associate le fibrille collageniche in fibre, e le fibre in matasse ⁴¹.

La tripsina, invece, data la sua azione decellularizzante, può causare la scissione di sequenze collageniche o quelle di altre proteine della ECM. Per questo, il danneggiamento della ECM da parte di tale enzima è spesso correlato a variazioni delle sue proprietà meccaniche. Rispetto ai detergenti, la tripsina risulta più distruttiva nei confronti di elastina e collagene, è più lenta nel rimuovere le cellule, ma dimostra di conservare meglio i glicosamminoglicani (GAGs) ⁴⁷.

Anche la quantità di tempo in cui il tessuto rimane esposto all'agente decellularizzante gioca un ruolo importante nel danneggiare le proteine strutturali. Ad esempio, valvole polmonari suine trattate con EDTA e tripsina hanno mostrato una diminuzione della resistenza meccanica all'aumentare dei tempi di trattamento, tempi tuttavia necessari per ottenere una completa rimozione del materiale cellulare. Questo effetto è probabilmente il risultato di cambiamenti in termini di contenuto di collagene ed orientazione delle fibre, indotti dall'azione chelante dell'EDTA ⁴¹.

I metodi di tipo meccanico sono in generale meno aggressivi rispetto a quelli chimici; nonostante ciò, i parametri con cui tali trattamenti vengono effettuati devono essere ottimizzati di volta in volta. In particolare, i trattamenti di congelamento-scongelo conservano sufficientemente la resistenza meccanica del tessuto nativo, ma questa può venir compromessa se il numero di cicli diventa troppo elevato. L'applicazione di una pressione idrostatica elevata comporta il rischio di denaturare le proteine; inoltre, se il trattamento è effettuato a temperature troppo basse, la formazione di cristalli per effetto barico può danneggiare la struttura della ECM ⁴⁸.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Decellularizzazione del tessuto diaframmatico

I campioni di tessuto diaframmatico umano testati nel presente studio sono stati forniti dal gruppo di ricerca della Sezione di Anatomia Umana del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova. Le porzioni di tessuto sono state estratte da diaframmi di cadaveri umani, gestiti dal Programma di Donazione del Corpo della Sezione di Anatomia Umana dell'Università di Padova, secondo le linee guida europee, italiane e regionali^{49,50}. Ai fini dello studio, dopo l'estrazione in blocco dell'intero muscolo diaframmatico, sono stati ricavati campioni di tessuto di circa 2.5 x 2.5 cm², i quali sono stati poi conservati in freezer ad una temperatura di -20°C fino ad ulteriore lavorazione.

Per la decellularizzazione, in particolare, i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente, e manipolati in condizioni sterili per evitare la contaminazione da parte di microrganismi. Successivamente, i campioni sono stati puliti dai residui di tessuto circostante, specialmente dal tessuto adiposo, e lavati abbondantemente con una soluzione antibiotica al 3% in tampone fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), al fine di rimuovere qualsiasi contaminante. Ulteriori lavaggi sono stati effettuati con soluzione antibiotica a concentrazione decrescente, fino all'ultimo lavaggio solamente con PBS per eliminare ogni residuo antibiotico.

Dopodiché sui campioni a disposizione sono stati testati quattro protocolli di decellularizzazione diversi al fine di confrontare l'efficacia, nella decellularizzazione del muscolo diaframmatico umano, dei seguenti detergenti: sodio dodecilsolfato (SDS) (1), SDS + TergitolTM (2), sodio desossicolato (SDC) (3) e TergitolTM (4).

Ciascun protocollo prevede un lavaggio iniziale del tessuto in acqua distillata (dH₂O) per 24 ore a 4°C, a cui segue il trattamento con DNasi in soluzione di cloruro di sodio (NaCl) 1 molare per altre tre ore a temperatura ambiente; successivamente, il tessuto viene prima immerso in una soluzione di PBS con Tripsina ed EDTA (per un'ora a 37°C), e poi trattato con il detergente specifico, in combinazione con idrossido d'ammonio (NH₄OH); infine, il tessuto viene immerso nuovamente in dH₂O per 48 ore a 4°C.

La descrizione dettagliata dei diversi protocolli è riportata nella Tabella 3.1.

Protocollo n.	1	2	3	4
	dH ₂ O (24 h a 4°C)	dH ₂ O (24 h a 4°C)	dH ₂ O (24 h a 4°C)	dH ₂ O (24 h a 4°C)
	DNasi in NaCl 1 M (3 h a temperatura ambiente)	DNasi in NaCl 1 M (3 h a temperatura ambiente)	DNasi in NaCl 1 M (3 h a temperatura ambiente)	DNasi in NaCl 1 M (3 h a temperatura ambiente)
	0.05% Tripsina + 0.02% EDTA in PBS (1 h a 37°C)	0.05% Tripsina + 0.02% EDTA in PBS (1 h a 37°C)	0.05% Tripsina + 0.02% EDTA in PBS (1 h a 37°C)	0.05% Tripsina + 0.02% EDTA in PBS (1 h a 37°C)
Metodo	0.5% SDS + 0.8% NH ₄ OH in PBS (72 h a 4°C)	0.5% SDS + 0.8% NH ₄ OH in PBS (48 h a 4°C)	0.5% SDC + 0.8% NH ₄ OH in PBS (72 h a 4°C)	0.5% Tergitol™ + 0.8% NH ₄ OH in PBS (72 h a 4°C)
	dH ₂ O (48 h a 4°C)	0.5% Tergitol™ + 0.8% NH ₄ OH in PBS (24 h a 4°C)	dH ₂ O (48 h a 4°C)	dH ₂ O (48 h a 4°C)
		dH ₂ O (48 h a 4°C)		

Tabella 3.1 – Descrizione dei protocolli di decellularizzazione utilizzati sui campioni di tessuto diaframmatico testati.

3.2 Prove meccaniche

3.2.1 La macchina di prova Bose® ElectroForce

Le prove per la caratterizzazione meccanica dei campioni di tessuto diaframmatico a disposizione sono state eseguite tramite l'ausilio dell'*ElectroForce Planar Biaxial TestBench Instrument*, presente nel Laboratorio di Meccanica dei Materiali Biologici, presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova (Figura 3.1). Si tratta di un sistema appositamente progettato dalla Bose® per l'analisi del comportamento meccanico di biomateriali e di tessuti biologici: la macchina dispone infatti anche di un bioreattore integrato per il mantenimento dei tessuti in un ambiente sterile e controllato durante le prove^{61,62}.

La strumentazione si compone di una piastra metallica quadrangolare traforata su cui poggiano quattro motori elettromagnetici disposti a croce, capaci di imporre una forza massima di 400 N in

trazione e di 200 N in compressione, e uno spostamento massimo di circa 6.5 mm. Tale configurazione consente di eseguire sia prove di trazione monoassiali, utilizzando soltanto due dei quattro motori, sia prove biassiali, mediante l'utilizzo di tutti i motori. Il sistema dispone anche di quattro celle di carico monoassiali (Figura 3.2A), una per ogni attuatore, e di pinze (*grip*) con viti di serraggio (Figura 3.2B) tramite le quali i provini possono essere ancorati ai motori per i test di trazione.

Sia le celle che i motori fungono da sensori per rilevare, rispettivamente, la forza sviluppata sul provino durante la prova e i relativi spostamenti, e sono controllabili via software.

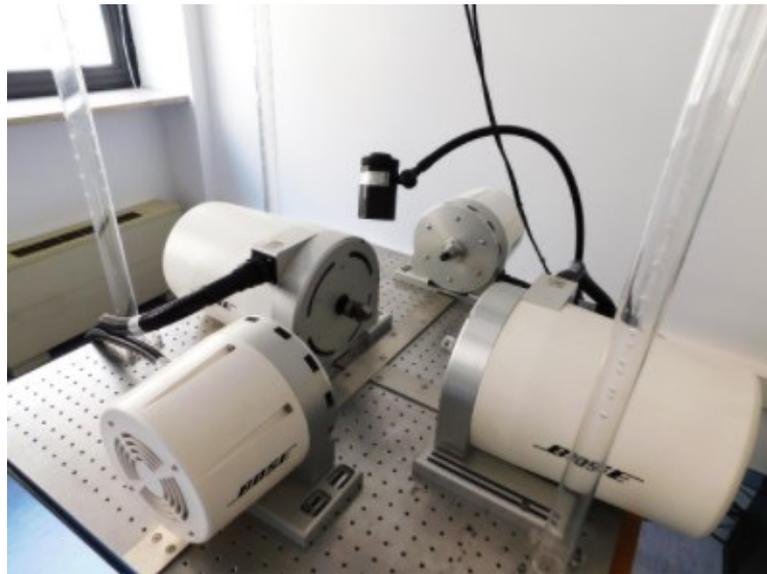


Figura 3.1 – Sistema *Bose ElectroForce Planar Biaxial TestBench Instrument*.

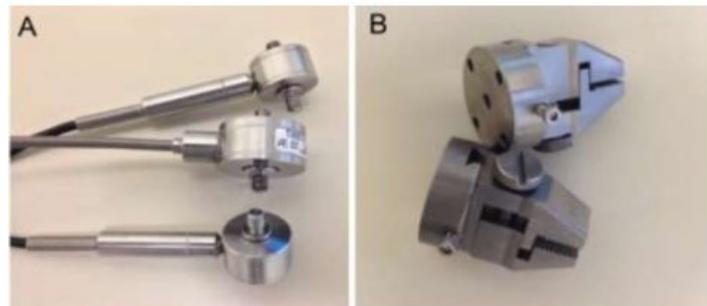


Figura 3.2 – Componenti del sistema *Bose ElectroForce Planar Biaxial TestBench Instrument*: A) celle di carico; B) *grip*.

3.2.2 Il software *WinTest*

Attuatori e celle di carico sono interfacciati con il PC mediante un sistema di controllo chiamato *WinTest*. Esso include un software ed un controllore PCI elettronico, il quale consente di acquisire in sincrono da più canali e di generare le forme d'onda desiderate da far eseguire ai motori.

Il software è installato su un PC con sistema operativo *Windows* ed è dotato di un'interfaccia utente che consente allo sperimentatore di configurare il protocollo di carico della prova, tramite il settaggio di parametri quali lo spostamento e la velocità dei motori; permette inoltre di definire le impostazioni di acquisizione, mentre la finestra grafica dell'interfaccia riporta in tempo reale gli andamenti delle grandezze misurate durante la prova ^{61,62}.

3.3 Preparazione dei campioni

I campioni di tessuto diaframmatico umano sono stati forniti sotto forma di porzioni tissutali quadrangolari di circa 2.5 x 2.5 cm² (due porzioni per ogni tipologia di campione), conservati in congelatore ad una temperatura di -20°C.

Nello specifico, al fine di valutare il comportamento meccanico del tessuto diaframmatico nativo sono stati testati provini provenienti dai diaframmi di due soggetti diversi (denominati in seguito DN1 e DN2). Successivamente, nell'ottica di eseguire un'analisi comparativa sulle proprietà meccaniche del tessuto diaframmatico risultante dalla decellularizzazione tramite i diversi trattamenti in esame, sono stati testati, secondo il medesimo protocollo di carico utilizzato per il tessuto nativo (vedi paragrafo 3.5), ulteriori provini, tutti ricavati dal diaframma dello stesso soggetto (in precedenza denominato DN1).

Poco prima dell'esperimento, ciascun campione è stato lasciato scongelare a temperatura ambiente immerso in soluzione fisiologica, in modo da mantenere il tessuto idratato.

A partire da ogni porzione di tessuto sono stati ricavati, tramite taglio col bisturi, diversi provini rettangolari, aventi una larghezza media di circa 5 mm, e una lunghezza complessiva di circa 20 mm.

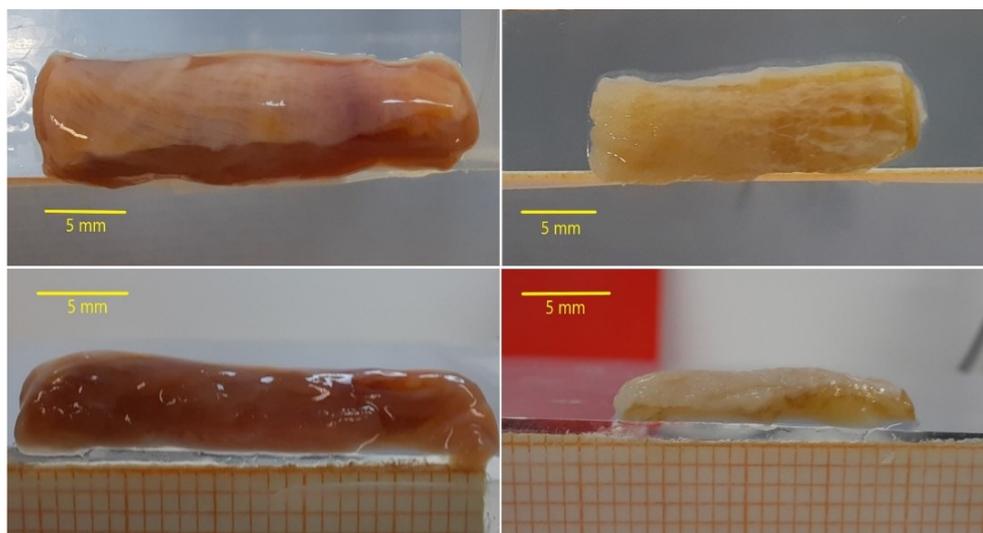


Figura 3.3 – Foto di provini di diaframma nativo (a sinistra) e decellularizzato (a destra) utilizzate per il calcolo della larghezza (in alto) e dello spessore (in basso) di tali provini.

La larghezza e lo spessore effettivi di ciascun provino sono stati calcolati sulla base di foto ricavate da viste dall'alto e di lato del provino posizionato su una superficie piana (Figura 3.3), poi analizzate mediante l'ausilio del software di elaborazione digitale delle immagini *ImageJ* (versione 1.53k, *National Institutes of Health*, Bethesda, Rockville, USA) ⁵¹.

Al fine di valutare le proprietà di isotropia del tessuto diaframmatico, da ciascun tipo di campione a disposizione sono stati ricavati due diversi gruppi di provini: quelli ottenuti tagliando il tessuto lungo la direzione parallela alle fibre muscolari (provini longitudinali, identificati con la lettera L), e quelli ottenuti tagliando lungo la direzione ortogonale alle fibre (provini trasversali, identificati con la lettera T) ⁵².

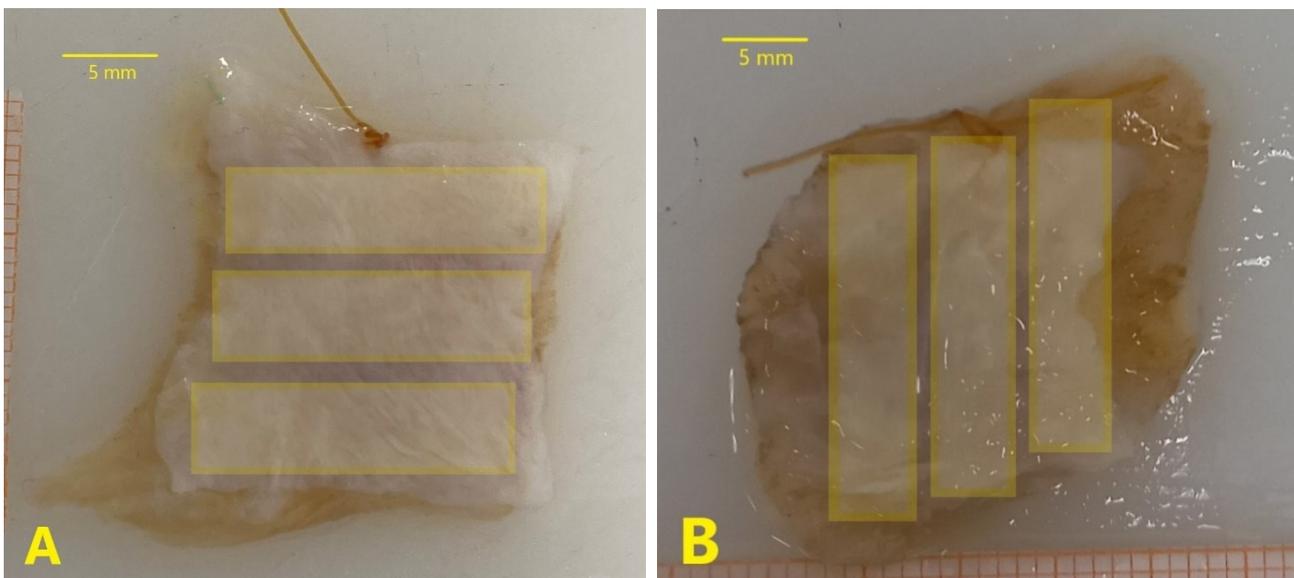


Figura 3.4 – Mappatura dei campioni di tessuto diaframmatico decellularizzati secondo il protocollo numero 2 per il taglio dei provini: A) lungo la direzione longitudinale alle fibre muscolari del tessuto e B) lungo la direzione trasversale. Il filo da sutura presente su entrambi i campioni è stato inserito per mostrare la direzione delle fibre, ed è stato rimosso prima del taglio dei provini.

Per esempio, come mostra la Figura 3.4, dai due campioni di tessuto diaframmatico decellularizzato seguendo il protocollo numero 2 (SDS + TergitolTM) sono stati ricavati complessivamente sei provini: tre di essi orientati secondo la direzione longitudinale (Figura 3.4A), e altri tre orientati secondo la direzione trasversale (Figura 3.4B).

3.4 Set up sperimentale

Per l'analisi del comportamento meccanico del tessuto diaframmatico, sono state svolte su ciascun provino due diverse tipologie di prove in configurazione di carico monoassiale: prove cicliche di trazione, mediante l'applicazione di rampe di carico e scarico ripetute, e prove di rilassamento delle tensioni. Trattandosi di test monoassiali, per la loro esecuzione sono stati utilizzati soltanto due

motori, contrapposti tra loro. Le prove sono state eseguite a controllo di spostamento, con una precisione di ± 0.001 mm. La forza sviluppata in seguito ad uno spostamento imposto è stata misurata posizionando in corrispondenza di uno dei due motori una cella di carico monoassiale, in grado di rilevare una forza massima di 22 N, con una precisione di ± 0.022 N.

Per tutte le prove eseguite è stata scelta una lunghezza utile di 15 mm, in modo tale da garantire un rapporto tra lunghezza e larghezza del provino (detto anche *aspect ratio* – AR) pari a circa 3. Per evitare che il campione scivoli durante la prova⁵³, le estremità del provino sono state incollate tra due pezzi di legno di balsa ciascuna, mediante colla cianacrilica. Dunque, tramite viti di serraggio, le estremità del provino sono state bloccate tra due *grip* poste ad una distanza di 15 mm una dall'altra (Figura 3.5A).

Per evitare la disidratazione del tessuto durante le prove, il provino è stato sottoposto a costante idratazione per mezzo di una soluzione fisiologica (Figura 3.5B).

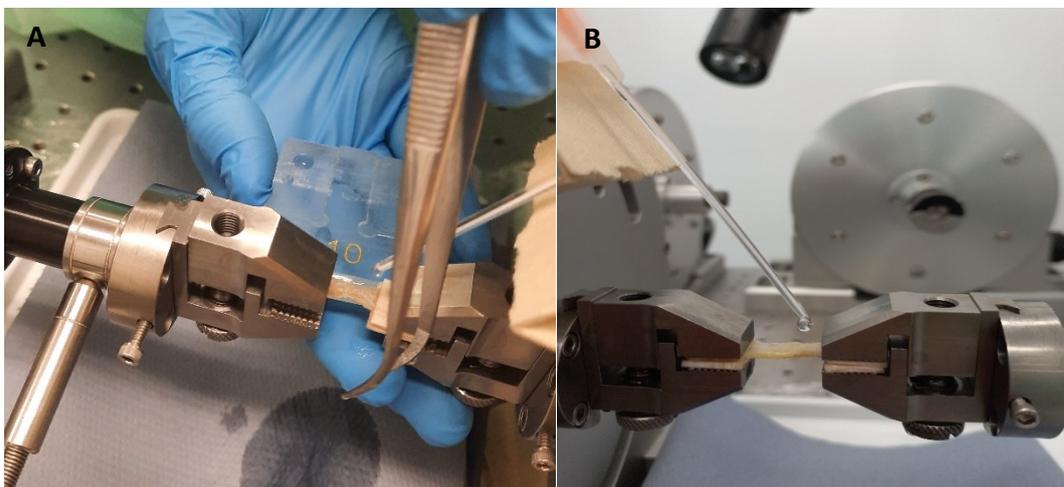


Figura 3.5 – A) Posizionamento di un provino di tessuto diaframmatico decellularizzato tra le *grip* della macchina di prova. B) Stesso provino durante lo svolgimento di una prova meccanica.

3.5 Protocollo di carico

3.5.1 Prove di trazione

Al fine di valutare la risposta meccanica del tessuto in condizioni di tensione monoassiale, sono stati applicati su ciascun provino cinque cicli di carico-scarico in successione, con una velocità di deformazione costante pari a 0.15 mm/s (1 %/s). Ogni ciclo prevede lo spostamento di uno dei due motori dalla posizione iniziale fino a quella corrispondente ad una deformazione complessiva del 20%; dopodiché il motore ritorna nella posizione iniziale con la medesima velocità.

Il protocollo di carico della prova, in termini di deformazione applicata in funzione del tempo, è mostrato graficamente nella Figura 3.6.

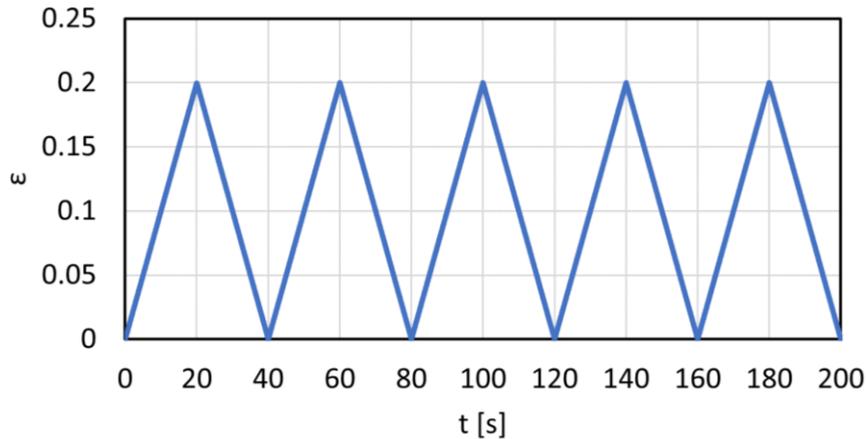


Figura 3.6 – Protocollo di carico della prova ciclica di carico-scarico in termini di deformazione (ϵ) in funzione del tempo (t).

3.5.2 Prove di rilassamento delle tensioni

Al termine dell'ultimo ciclo di carico-scarico, ogni provino è stato lasciato in condizioni di riposo per un tempo di 300 s in modo da consentire l'esaurirsi di eventuali tensioni residue accumulate nel tessuto, prima di eseguire una prova di rilassamento delle tensioni. Per realizzarla è stato imposto al provino, tramite lo spostamento di uno dei due motori, un allungamento del 20%, con una velocità di deformazione di 30 mm/s (200 %/s). L'applicazione della deformazione deve infatti avvenire nel minor tempo possibile, in modo tale da poter essere considerata istantanea, per evitare che si sviluppino fenomeni di tipo viscoso durante la fase di trazione. Dopodiché, la deformazione è stata mantenuta costante per 600 secondi, al termine dei quali il provino è stato riportato alla sua lunghezza iniziale. Nella Figura 3.7 viene mostrato graficamente il protocollo di carico adottato, in termini di deformazione applicata in funzione del tempo di prova.

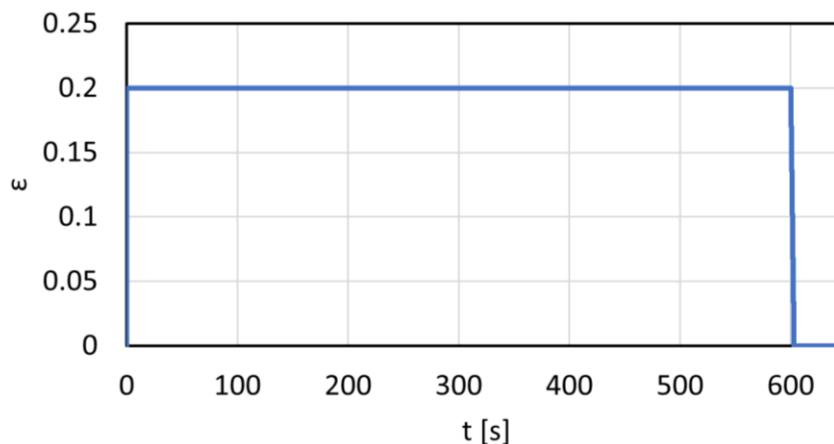


Figura 3.7 – Protocollo di carico della prova di rilassamento delle tensioni in termini di deformazione (ϵ) in funzione del tempo (t).

3.6 Elaborazione dei dati

Al termine di ciascuna prova sono stati automaticamente salvati in un file in formato CSV (*Comma-Separated Values*) i parametri relativi alla prova. La descrizione delle grandezze fisiche memorizzate è riportata nella Tabella 3.2.

Il campionamento dei dati è stato svolto non ad intervalli di tempo costanti, bensì appena venisse registrata una variazione dello spostamento imposto di ± 0.001 mm, e/o una variazione della forza pari a ± 0.022 N.

Grandezza fisica	Simbolo	Unità di misura
Tempo	t	[s]
Forza percepita dal provino (misurata dalla cella di carico n. 3)	F	[N]
Spostamento del motore 4	ΔL	[mm]

Tabella 3.2 – Descrizione delle grandezze fisiche memorizzate dal sistema *WinTest* durante le prove.

3.6.1 Elaborazione dei risultati delle prove di trazione

Le operazioni di elaborazione dei dati relativi a tali prove sono state interamente eseguite mediante l'utilizzo del programma *Microsoft Excel*.

Innanzitutto, dai dati sperimentali a disposizione sono stati calcolati i valori della deformazione nominale imposta al provino durante la prova (ε), applicando la formula:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad [\text{adimensionale}] \quad (3.1)$$

ovvero dividendo il valore dello spostamento del motore per la lunghezza utile iniziale del provino (L_0), in millimetri.

La tensione nominale (P) sviluppata nel provino in seguito alla deformazione imposta è stata invece ricavata dalla relazione:

$$P = \frac{(F - F_0)}{A_0} \quad [kPa] \quad (3.2)$$

ossia come la forza esercitata sul provino, a cui si sottrae la forza all'istante iniziale della prova (F_0), in Newton (valore pari a zero in assenza di pretensionamento del tessuto) divisa per l'area della

sezione trasversale iniziale del provino stesso, data da $A_0 = w \cdot t$, in mm^2 , dove w è la larghezza iniziale, mentre t è lo spessore.

In questo modo è stato possibile ricavare, per ciascun provino testato, le curve tenso-deformative relative alle cinque rampe di carico e scarico imposte durante la prova.

Successivamente, la curva (P, ε) relativa alla quinta rampa di trazione, considerata rappresentativa della risposta meccanica del tessuto in condizioni di stabilità, è stata considerata per ulteriori elaborazioni: su ciascuna curva, è stata eseguita un'operazione di sogliatura per escludere oscillazioni spurie dovute al rumore di misura, scartando tutti i dati sperimentali corrispondenti a valori di P inferiori a 1 kPa, valore corrispondente alla minima tensione rilevabile dalla cella di carico. Dopodiché, allo scopo di valutare la risposta meccanica dei provini testati sino al livello deformativo imposto nelle prove ($\varepsilon = 0.2$), è stata eseguita su ciascuna curva un'operazione di fitting utilizzando una funzione polinomiale di ordine appropriato, descritta da un'equazione del tipo:

$$P(\varepsilon) = a_1 \varepsilon^n + a_2 \varepsilon^{n-1} + \dots + a_n \varepsilon \quad (3.3)$$

dove i coefficienti (a_1, a_2, \dots, a_n) rappresentano dei valori numerici determinati automaticamente dall'algoritmo di interpolazione implementato all'interno di *Excel*.

L'ordine n della funzione è stato scelto di volta in volta per ciascun provino sulla base dei dati; nello specifico, per la scelta di n si è tenuto conto dell'indice statistico R^2 : il suo valore, compreso tra 0 e 1, misura la forza della relazione tra le variabili indipendenti inserite nel modello (in questo caso soltanto ε) e la variabile dipendente P : relazioni più forti (ossia per cui R^2 è prossimo a 1) indicano una minore dispersione dei dati attorno alla funzione di regressione, e dunque una migliore capacità da parte della funzione di predire il valore di P conoscendo il valore della variabile indipendente ε ⁵⁴. Quindi, per ciascuna curva, l'ordine n del polinomio è stato scelto in modo tale da garantire un valore di R^2 molto prossimo ad 1. Dal momento che l'acquisizione dei dati sperimentali avviene a frequenza di campionamento costante dei valori di forza, lo scopo di tale procedura è esclusivamente il ricampionamento dei dati sperimentali agli stessi valori di deformazione per tutti i provini. Di conseguenza, ciascuna funzione di regressione è stata poi valutata rispetto a nuovi valori di deformazione, comuni a tutti i provini: in particolare, è stato scelto un asse delle deformazioni che va da 0 a 0.2 con passo di campionamento pari a 10^{-4} .

Infine, da ciascuna curva di trazione è stato calcolato il valore del modulo secante al 20% di deformazione (E_s), inteso come la pendenza della retta passante per l'origine del diagramma tensione-deformazione e che interseca la curva (P, ε) in corrispondenza $\varepsilon = 0.2$.

In pratica per il calcolo è stata utilizzata la seguente relazione:

$$E_s = \frac{P(\varepsilon = 0.2)}{0.2} \quad [kPa] \quad (3.4)$$

3.6.2 Elaborazione dei risultati delle prove di rilassamento delle tensioni

Per quanto riguarda i dati relativi alle prove di rilassamento delle tensioni, le prime operazioni di elaborazione sono state eseguite in *Excel*.

Innanzitutto, per ogni prova è stata calcolata la tensione normalizzata (P_{norm}) come il rapporto tra la tensione al tempo t corrente e la tensione massima (P_{max}) misurata al tempo iniziale del processo di rilassamento, ovvero dalla relazione:

$$P_{norm} = \frac{P}{P_{max}} \quad [adimensionale] \quad (3.5)$$

In questo modo, è stato possibile riportare graficamente, per ciascun provino testato, l'andamento della tensione normalizzata in funzione del tempo. In particolare, nei grafici è stata riportata la sola parte della curva relativa alla fase di rilassamento delle tensioni, considerando la deformazione istantanea.

Successivamente, al fine di caratterizzare matematicamente il comportamento viscoelastico del tessuto diaframmatico in esame durante una prova di rilassamento delle tensioni, i dati sperimentali sono stati interpretati utilizzando un modello di Maxwell generalizzato (descritto nel paragrafo 1.4.3). Nello specifico, i dati sono stati raggruppati per tipologia di tessuto (nativo, protocollo 1, protocollo 2, protocollo 3, protocollo 4) e per direzione (longitudinale, trasversale), per un totale di 3 o 4 curve sperimentali per ogni gruppo. Ogni gruppo di curve è stato interpolato mediante una serie di Prony secondo un modello di Maxwell con cinque rami viscosi; l'andamento della tensione normalizzata in funzione del tempo di rilassamento risulta, quindi, descritto dalla seguente espressione:

$$P_{norm}(t) = 1 - \sum_{i=1}^5 \gamma_i (1 - e^{-\frac{t}{\tau_i}}) \quad (3.6)$$

dove τ_i rappresenta il tempo di rilassamento relativo al ramo viscoso i -esimo (con $i = 1, \dots, 5$), mentre γ_i rappresenta la rigidità relativa allo stesso ramo.

Per il fitting, i dati sperimentali (P_{norm}, t) ricavati da ciascuna curva sono stati riportati in *SciLab*⁶³, un programma di calcolo numerico in cui è stato possibile implementare un algoritmo iterativo per l'identificazione dei parametri τ_i e γ_i della serie di Prony. Una volta determinati i valori di tali parametri, l'equazione che descrive l'andamento di P_{norm} è stata valutata secondo un campionamento

nel tempo comune a tutte le prove. Nello specifico, nell'intervallo $[0,600]$ secondi, il campionamento è reso più fitto nei primi secondi, laddove P_{norm} varia più velocemente, e si dirada gradualmente col progredire della prova.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Risultati delle prove di trazione

4.1.1 Tessuto diaframmatico nativo

La tipica risposta meccanica esibita da un campione di tessuto diaframmatico durante cinque cicli di carico-scarico è mostrata nella Figura 4.1, in termini di tensione nominale (P) in funzione della deformazione nominale imposta (ε).

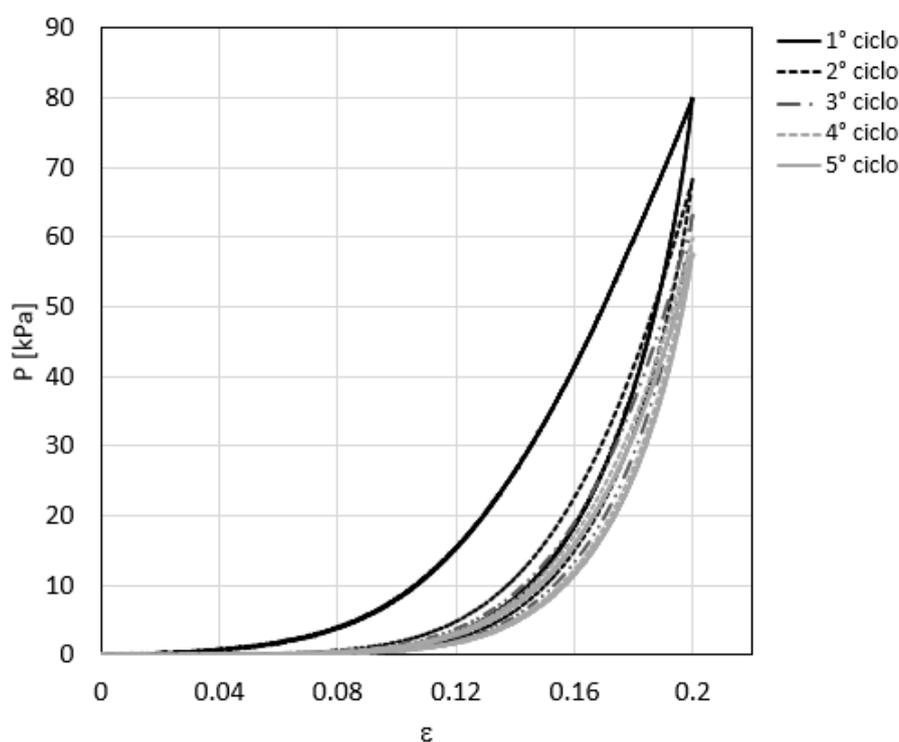


Figura 4.1 – Risposta meccanica di un provino di tessuto diaframmatico nativo, in termini di tensione nominale P in funzione della deformazione nominale ε , durante cinque cicli di carico scarico fino al 20% di deformazione.

Mettendo a confronto cicli di carico-scarico consecutivi si può osservare una progressiva diminuzione dei valori di tensione con l'aumento del numero di cicli, fino alla stabilizzazione della risposta meccanica al raggiungimento del quinto ed ultimo ciclo. Nello specifico, dal 1° al 2° ciclo di carico si riscontra una riduzione della tensione massima di circa il 14%. Dopodiché, la riduzione percentuale diminuisce progressivamente, fino a diventare inferiore al 4% dal 4° al 5° ciclo; da qui in poi la risposta meccanica viene considerata stabile.

Sulla base di tali valutazioni, la curva (P, ε) relativa alla quinta rampa di carico è stata considerata per descrivere le proprietà meccaniche del tessuto diaframmatico in condizioni di trazione monoassiale, e per dedurne ulteriori parametri.

Di seguito vengono riportate le curve di trazione ottenute da ciascun provino di tessuto diaframmatico nativo testato: la Figura 4.2A è relativa ai campioni longitudinali, mentre la Figura 4.2B rappresenta i campioni in direzione trasversale.

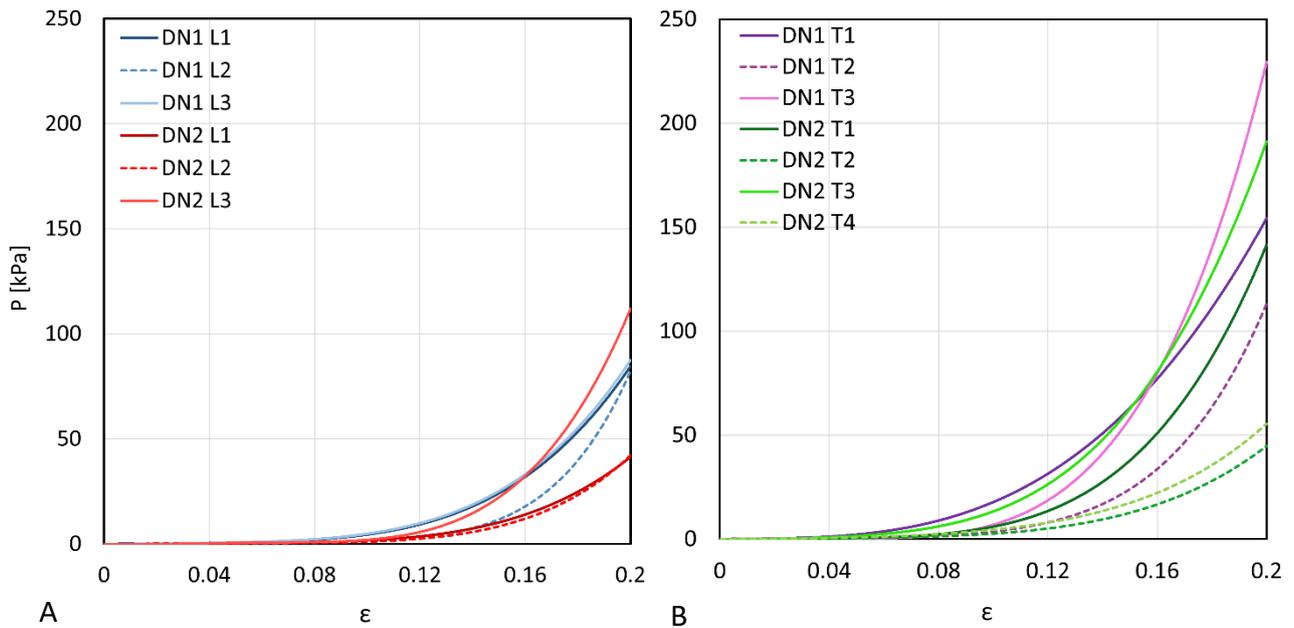


Figura 4.2 – Risposta meccanica in condizioni di trazione monoassiale dei provini di tessuto diaframmatico nativo testato (A) in direzione longitudinale e (B) in direzione trasversale alle fibre muscolari. I risultati sono riportati in termini di tensione nominale P in funzione della deformazione nominale imposta ε , fino al 20% di deformazione.

Come atteso analizzando un tessuto biologico, le curve mostrano innanzitutto una certa variabilità delle risposte meccaniche, sia a livello interindividuale, sia considerando provini provenienti dallo stesso soggetto. Nonostante ciò, si può osservare un andamento delle curve tenso-deformative di tipo non lineare, con una rigidità crescente all'aumentare della deformazione imposta. In particolare, è possibile individuare per ogni curva una prima regione a bassa rigidità, che si estende fino a livelli deformativi attorno al 10%; per deformazioni maggiori, la rigidità del tessuto cresce, per poi stabilizzarsi a valori all'incirca costanti prima di raggiungere il 20% di deformazione.

Tali risultati sono in accordo con quanto evinto in un precedente studio condotto da Gaur e colleghi¹⁸ sul comportamento meccanico a trazione del tessuto diaframmatico umano (descritto dettagliatamente nel paragrafo 1.5): anche in quel caso, infatti, le curve tensione-deformazione ricavate dalle prove, riportate nella Figura 1.16, mostrano un comportamento fortemente non lineare, in cui si può riconoscere una prima regione a bassa rigidità (detta *toe region*) che si estende fino a

livelli deformativi compresi tra l'8.5% e il 14%, seguita da una seconda regione in cui la rigidità diventa molto più elevata, e che si mantiene tale sino alla rottura del tessuto.

Inoltre, già da un'analisi qualitativa delle risposte meccaniche, si può osservare che tale aumento di rigidità risulta maggiore lungo la direzione trasversale alle fibre muscolari (Figura 4.2B), rispetto a ciò che accade in direzione longitudinale (Figura 4.2A). Queste considerazioni sulle caratteristiche di anisotropia del tessuto diaframmatico trovano conferma nella Tabella 4.1, dove vengono riportati i valori del modulo secante E_s al 20% di deformazione, calcolato per ciascuna delle curve tenso-deformative considerate.

Modulo secante E_s [kPa]			
Longitudinali		Trasversali	
DN1 L1	423	DN1 T1	772
DN1 L2	411	DN1 T2	566
DN1 L3	438	DN1 T3	1147
DN2 L1	207	DN2 T1	708
DN2 L2	211	DN2 T2	224
DN2 L3	559	DN2 T3	956
		DN2 T4	278
Media ± SD	375 ± 139	Media ± SD	664 ± 338

Tabella 4.1 – Modulo secante E_s valutato al 20% di deformazione, per ciascun provino di diaframma nativo testato, in direzione longitudinale e in quella trasversale alle miofibre. Viene inoltre riportato, per ogni direzione, il valore medio di E_s con la relativa deviazione standard.

La Tabella 4.1 mostra, infatti, valori di E_s compresi tra circa 207 kPa e 559 kPa per quanto riguarda i provini longitudinali, mentre lo stesso parametro varia tra circa 224 kPa e 1147 kPa nel caso dei provini trasversali.

Dunque, come mostra anche la Figura 4.3, il valore del modulo secante al 20% di deformazione risulta maggiore in direzione trasversale alle fibre muscolari, rispetto a quello esibito longitudinalmente alle fibre stesse, per la maggior parte dei provini considerati.

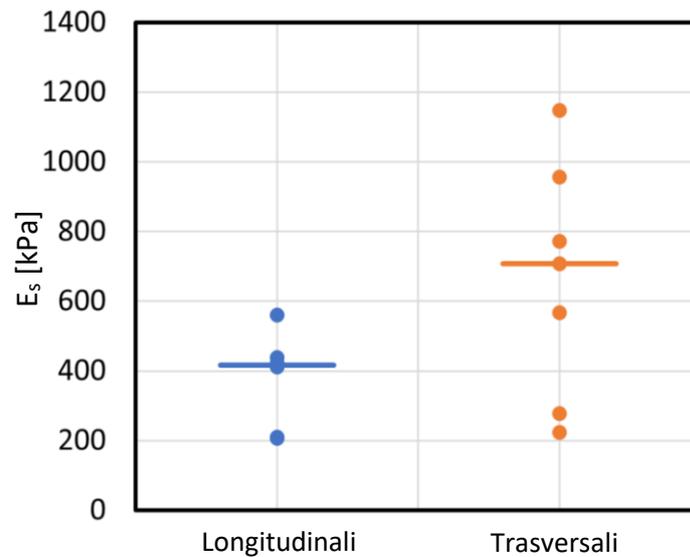


Figura 4.3 – Confronto tra i moduli secanti E_s al 20% di deformazione per i provini estratti dal tessuto diaframmatico nativo, in direzione longitudinale (in blu) e in quella trasversale (in arancione). Le linee continue orizzontali rappresentano le mediane tra i valori di E_s relativi a ciascun gruppo di provini.

Queste considerazioni non sono supportate, tuttavia, da un confronto significativo risultante da un'analisi statistica. In particolare, con lo scopo di individuare una differenza statisticamente significativa tra i valori di rigidità mostrati dal tessuto nelle due direzioni, è stato eseguito sui dati il test statistico U non parametrico di Mann-Whitney ad una coda (significatività con $p\text{-value} < 0.05$). I risultati del test indicano un $p\text{-value}$ pari a 0.063. Questo valore, pur non essendo statisticamente significativo, è comunque molto prossimo a 0.05, soglia al di sotto della quale si sarebbe ottenuta, invece, la significatività. Inoltre, è da considerare a tal riguardo il ridotto numero di provini sulla base dei quali è stato applicato il test: si può dunque ragionevolmente supporre che, avendo a disposizione un numero di campioni maggiore, si sarebbe osservata lungo le due direzioni una differenza statisticamente significativa nei valori di E_s .

Peraltro, è interessante notare che le evidenze sperimentali ottenute nel presente studio sulla maggiore rigidità a trazione del tessuto diaframmatico in direzione trasversale alle miofibre risultano in accordo con quanto osservato in un altro lavoro sperimentale, condotto da Hwang e colleghi⁵⁵, sul comportamento meccanico passivo del muscolo diaframmatico canino. L'esperimento era finalizzato, in modo particolare, a valutare le proprietà di isotropia del tessuto, tramite lo svolgimento di prove di trazione uniassiali e biassiali in direzione longitudinale e/o trasversale alle fibre muscolari, usando la stessa velocità di deformazione (1.5 mm/s) per entrambe le direzioni di prova, durante tutti i test. I risultati, riassunti nella Figura 4.4, mostrano, sia per i test uniassiali che per quelli biassiali, che nella direzione longitudinale alle fibre la tensione aumenta progressivamente entro il range di deformazioni

imposte, mentre lungo la direzione trasversale, dopo una regione iniziale a bassa rigidità, la tensione aumenta bruscamente, e il tessuto diventa quasi inestensibile per deformazioni imposte più elevate.

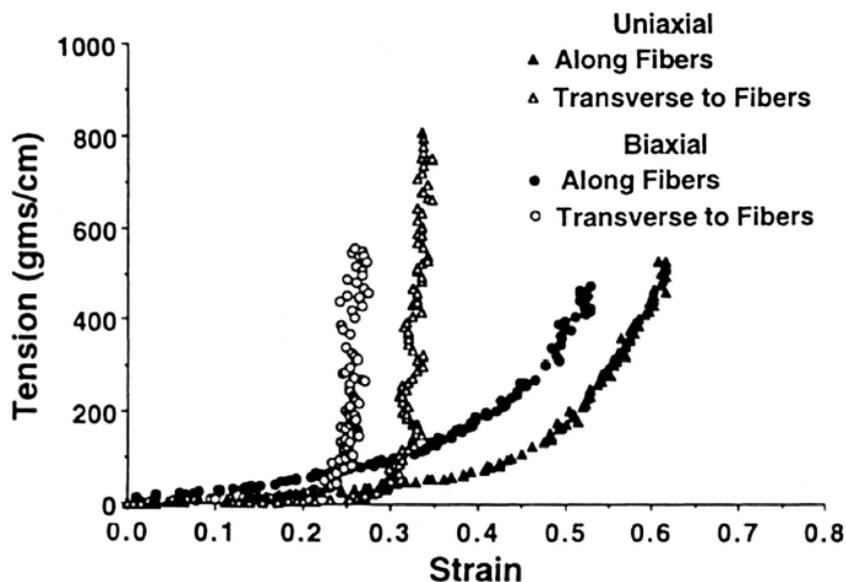


Figura 4.4 – Curve tensione-deformazione rappresentative della risposta meccanica esibita da provini di tessuto diaframmatico canino durante prove di trazione uniassiali e biassiali, nelle direzioni longitudinale e trasversale rispetto alle fibre muscolari ⁵⁵.

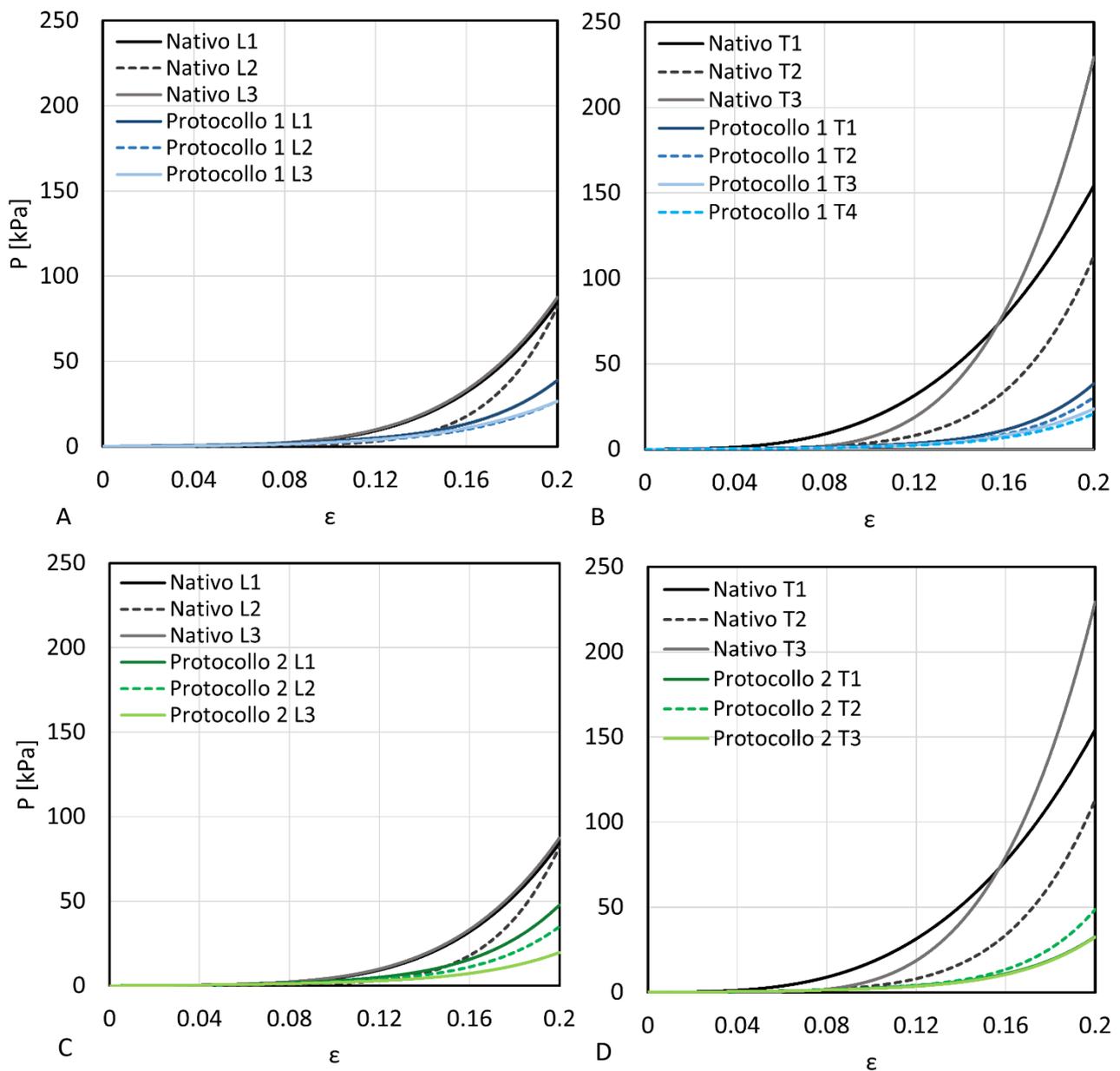
Dunque, considerando che valutazioni di tipo istologico hanno dimostrato che la disposizione delle fibre muscolari del tessuto diaframmatico canino è coerente con quella caratterizzante il diaframma umano (sebbene le scale dimensionali siano differenti) ⁵⁶, questi dati supportano e confermano l'ipotesi di anisotropia del muscolo diaframmatico, con una maggiore rigidità nella direzione trasversale rispetto a quella esibita in direzione longitudinale alle miofibre.

Tornando invece allo studio condotto da Gaur *et al.* ¹⁸ citato precedentemente, avendo preso in esame, in quel caso, soltanto provini estratti in direzione parallela alle fibre muscolari, non viene fatta alcuna osservazione in merito alle caratteristiche di isotropia del tessuto diaframmatico. In ogni caso, confrontando i valori del modulo elastico E_2 , relativo alla seconda fase lineare delle curve estrapolate da tali prove (riportati nella Tabella 1.1), con quelli del modulo secante E_s riportati nella Tabella 4.1, si può notare che E_s assume valori inferiori per tutti i provini longitudinali analizzati in questo lavoro di tesi. Inoltre, si osserva che tale differenza, sebbene sia dovuta in parte alla diversa modalità con cui sono stati calcolati i parametri analizzati (E_s ed E_2), rimane elevata quand'anche si consideri per il confronto, anziché E_2 , il valore del modulo secante valutato secondo la convenzione adottata nel presente studio. Tali valori risultano, invece, più simili a quelli assunti da E_s nel caso dei provini trasversali considerati nelle prove in esame (valori riportati nella Tabella 4.1). Ciò farebbe supporre, tenendo presente anche l'elevata dispersione associata ai valori di E_2 ($SD = \pm 11$ MPa) rispetto a quella ottenuta per E_s in direzione longitudinale ($SD = \pm 139$ kPa), che le differenze osservate siano in parte attribuibili a qualche imprecisione nella fase di estrazione dei provini testati nello studio di

Gaur (in particolare si potrebbe pensare ad una mancata corrispondenza tra la direzione di estrazione del provino e quella delle miofibre).

4.1.2 Confronto tra tessuto diaframmatico nativo e decellularizzato

Di seguito, nella Figura 4.5, vengono riportate graficamente le risposte meccaniche relative alla quinta rampa di trazione, ottenute da ogni provino di diaframma decellularizzato testato, rappresentando sovrapposte le curve relative ad ogni singolo protocollo e quelle ottenute per i provini di diaframma nativo, al fine di mettere in evidenza possibili variazioni nelle proprietà meccaniche del tessuto indotte dagli agenti di decellularizzazione considerati. Le risposte meccaniche vengono valutate separatamente lungo la direzione longitudinale e in quella trasversale alle fibre muscolari.



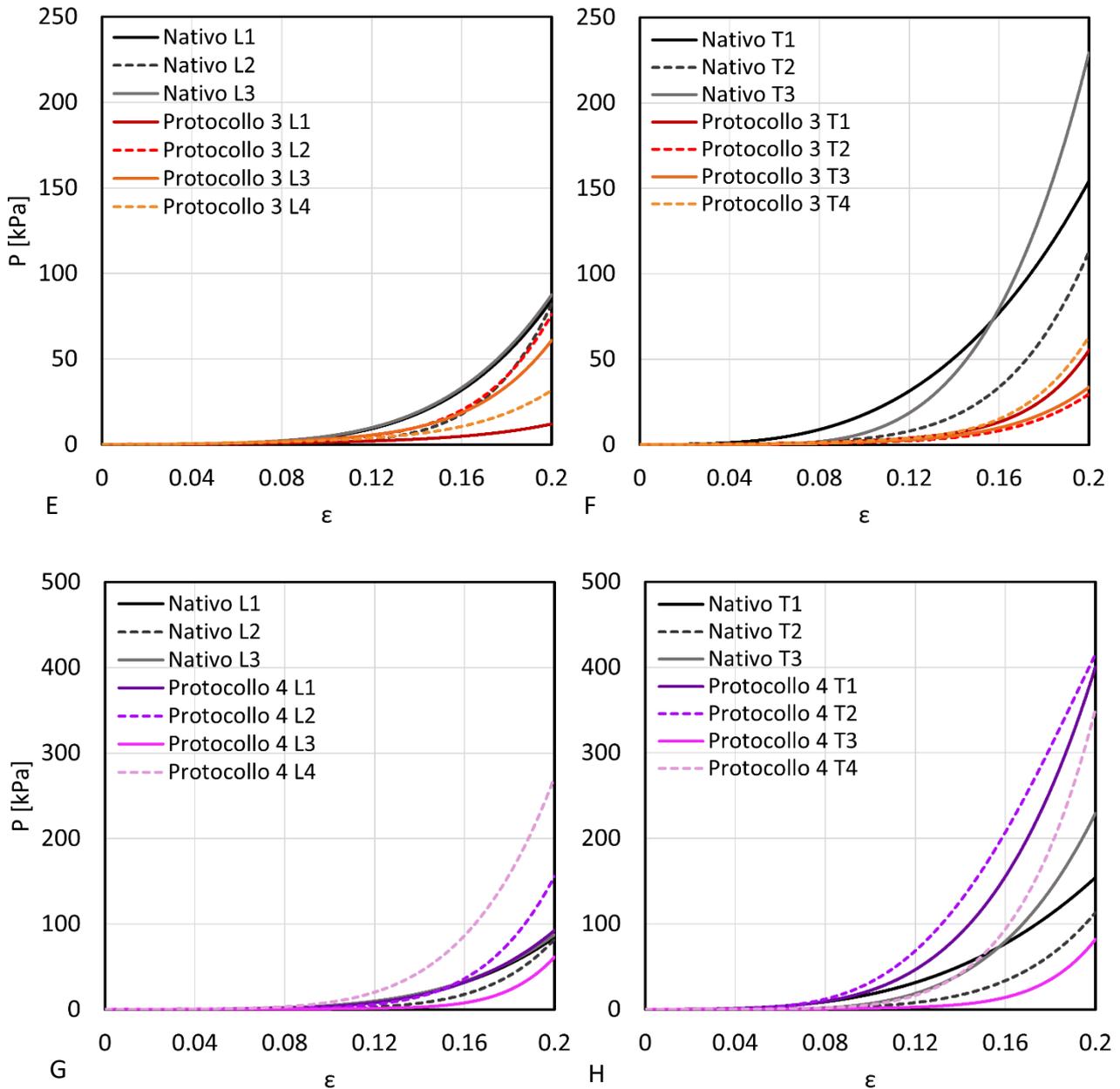


Figura 4.5 – Risposta meccanica in condizioni di trazione monoassiale del tessuto diaframmatico nativo e di quello decellularizzato. Nello specifico il tessuto nativo viene confrontato con quello decellularizzato secondo ciascuno dei quattro protocolli testati, considerando separatamente i provini longitudinali e quelli trasversali. I risultati sono riportati in termini di tensione nominale P in funzione della deformazione nominale imposta ε , fino al 20% di deformazione.

Una preliminare analisi qualitativa delle curve ottenute permette di osservare che il tessuto diaframmatico risultante dall'applicazione di ciascuno dei protocolli di decellularizzazione considerati conserva un comportamento a trazione di tipo non lineare, con una rigidità crescente all'aumentare del livello deformativo imposto. Tuttavia, si può notare che i provini decellularizzati secondo i protocolli 1, 2, e 3 presentano, rispetto al tessuto nativo, una rigidità alla trazione mediamente inferiore, sia in direzione longitudinale che in quella trasversale alle fibre muscolari (Figure 4.5A – 4.5F). Un comportamento diverso, invece, si può osservare considerando il tessuto

derivante dalla decellularizzazione tramite il protocollo 4, facente uso del Tergitol TM come detergente: le Figure 4.5G e 4.5H mostrano, infatti, lungo entrambe le direzioni considerate, delle curve tenso-deformative tendenzialmente più rigide nel caso dei provini decellularizzati, per cui i livelli di tensione raggiunti risultano mediamente superiori rispetto a quelli percepiti dai provini di tessuto nativo, a parità di deformazione applicata.

Allo scopo di ottenere dei parametri quantitativi in base ai quali poter confrontare gli effetti dei vari trattamenti di decellularizzazione sulla rigidità a trazione del tessuto che si ottiene, è stato calcolato, sia per i provini di diaframma nativo che per quelli decellularizzati, il valore del modulo secante E_s al 20% di deformazione (Tabella 4.2).

Modulo secante E_s [kPa]									
Nativo		Protocollo 1		Protocollo 2		Protocollo 3		Protocollo 4	
L1	423	L1	195	L1	239	L1	60	L1	463
L2	411	L2	134	L2	175	L2	381	L2	780
L3	438	L3	133	L3	98	L3	305	L3	307
						L4	159	L4	1360
Media	424	Media	154	Media	171	Media	226	Media	727
± SD	± 14	± SD	± 35	± SD	± 71	± SD	± 144	± SD	± 465
T1	772	T1	192	T1	164	T1	276	T1	2003
T2	566	T2	152	T2	243	T2	149	T2	2077
T3	1147	T3	118	T3	162	T3	168	T3	410
		T4	104			T4	316	T4	1756
Media	828	Media	142	Media	190	Media	227	Media	1562
± SD	± 295	± SD	± 39	± SD	± 46	± SD	± 82	± SD	± 780

Tabella 4.2 – Modulo secante E_s valutato al 20% di deformazione per ciascun provino testato: confronto tra tessuto diaframmatico nativo e quello decellularizzato secondo i protocolli di decellularizzazione 1, 2, 3 e 4. Viene inoltre riportato, per ogni direzione, il valore medio di E_s con la relativa deviazione standard.

Come mostra la Figura 4.6, confrontando i valori di E_s ottenuti per i provini decellularizzati con quelli del tessuto diaframmatico nativo preso come riferimento, si osserva che i trattamenti 1, 2 e 3 provocano, sia in direzione longitudinale che in quella trasversale alle miofibre, una riduzione della rigidità del tessuto. I provini di diaframma decellularizzati tramite il protocollo 4 mostrano, invece, una rigidità a trazione mediamente superiore rispetto a quella esibita dai provini di diaframma nativo.

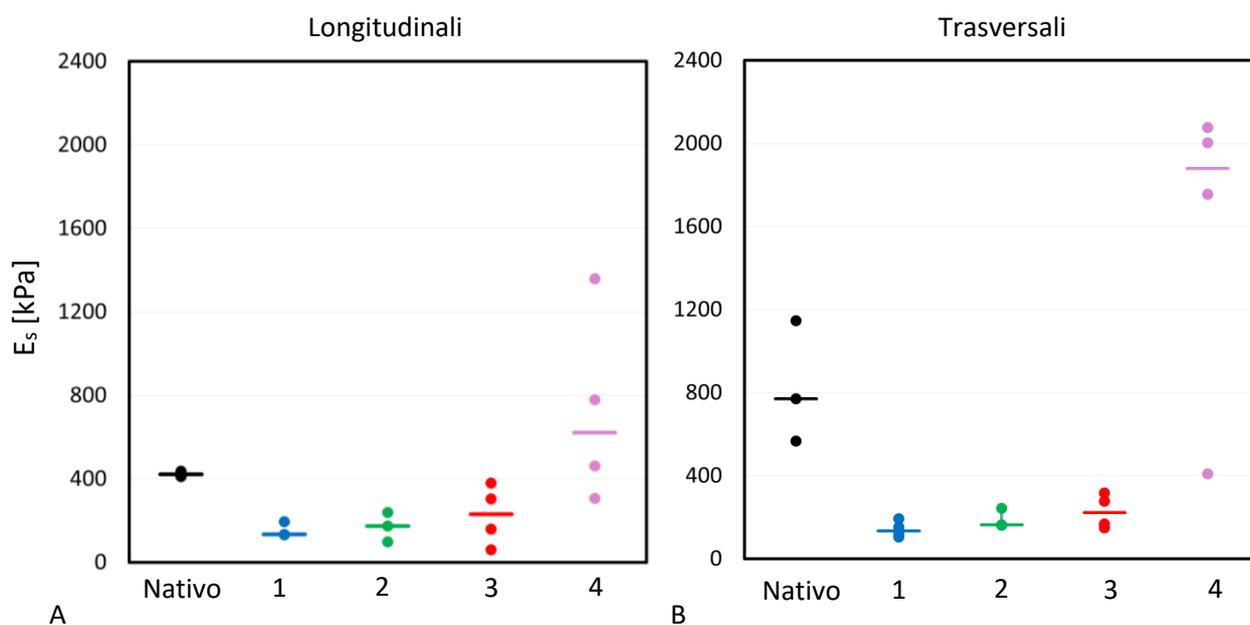


Figura 4.6 – Confronto tra i moduli secanti E_s al 20% di deformazione per i provini estratti dal tessuto diaframmatico nativo (in nero) e da quello decellularizzato secondo i protocolli 1 (in blu), 2 (in verde), 3 (in rosso) e 4 (in rosa). (A) Provini longitudinali e (B) provini trasversali.

A supporto di queste valutazioni è stata effettuata, separatamente per i provini longitudinali e per quelli trasversali, un'analisi di varianza mediante il test di Kruskal-Wallis (significatività con $p\text{-value} < 0.05$), finalizzato a valutare le differenze tra i valori del modulo secante tra i cinque diversi gruppi di provini in esame (tessuto nativo e tessuti decellularizzati mediante i protocolli 1, 2, 3 e 4 rispettivamente). I $p\text{-values}$ restituiti da ciascun test sono 0.022 nel caso dei provini longitudinali, 0.009 per i provini trasversali; quindi, la differenza tra i moduli secanti risulta effettivamente significativa tra i diversi gruppi. Ulteriori analisi a posteriori, invece, non hanno permesso di evidenziare differenze statisticamente significative, a causa del numero limitato di dati a disposizione. Infine, allo scopo di valutare se i trattamenti in esame abbiano indotto o meno delle variazioni sulle proprietà di isotropia del tessuto diaframmatico testato, dai moduli secanti ricavati per il tessuto nativo e per quello decellularizzato secondo i diversi protocolli sono stati calcolati i valori medi corrispondenti, separatamente per i provini longitudinali e per quelli trasversali: rappresentando graficamente, nella Figura 4.7, il valor medio ottenuto per ciascuna tipologia di campioni in direzione trasversale (asse delle ordinate), in funzione del valore corrispondente in direzione longitudinale (asse delle ascisse), è interessante osservare che il trattamento tramite il protocollo 4 (TergitolTM) altera soltanto lievemente la caratteristica di anisotropia del tessuto diaframmatico, conservando una rigidità maggiore lungo la direzione trasversale alle fibre muscolari. Ciò non si può dire, invece, per il tessuto decellularizzato secondo i protocolli 1, 2 e 3, il quale mostra un comportamento pressoché isotropo lungo le due direzioni.

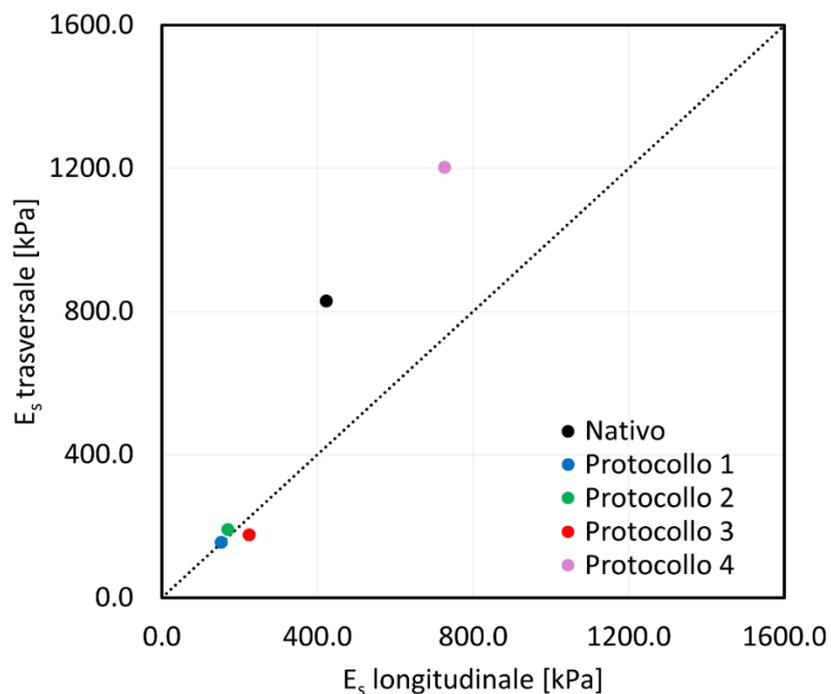


Figura 4.7 – Modulo secante al 20% di deformazione in direzione trasversale (E_s trasversale) in funzione del valore corrispondente in direzione longitudinale (E_s longitudinale). In particolare, i valori riportati sono quelli mediati su tutti i provini dello stesso tipo (di tessuto nativo o decellularizzato secondo i protocolli 1, 2, 3 o 4, longitudinali o trasversali). La linea tratteggiata è rappresentativa del comportamento isotropo (E_s trasversale = E_s longitudinale).

4.2 Risultati delle prove di rilassamento delle tensioni

4.2.1 Tessuto diaframmatico nativo

Di seguito vengono presentati i risultati delle prove di rilassamento delle tensioni per ciascun provino di diaframma nativo testato: la Figura 4.8A rappresenta tutti i campioni in direzione longitudinale, mentre la Figura 4.8B è relativa ai provini trasversali.

In particolare, nei grafici viene riportata la sola parte della prova relativa all'effettiva fase di rilassamento delle tensioni (considerando la deformazione applicata istantanea), mostrando per ogni provino l'andamento della tensione normalizzata P_{norm} in funzione del tempo t .

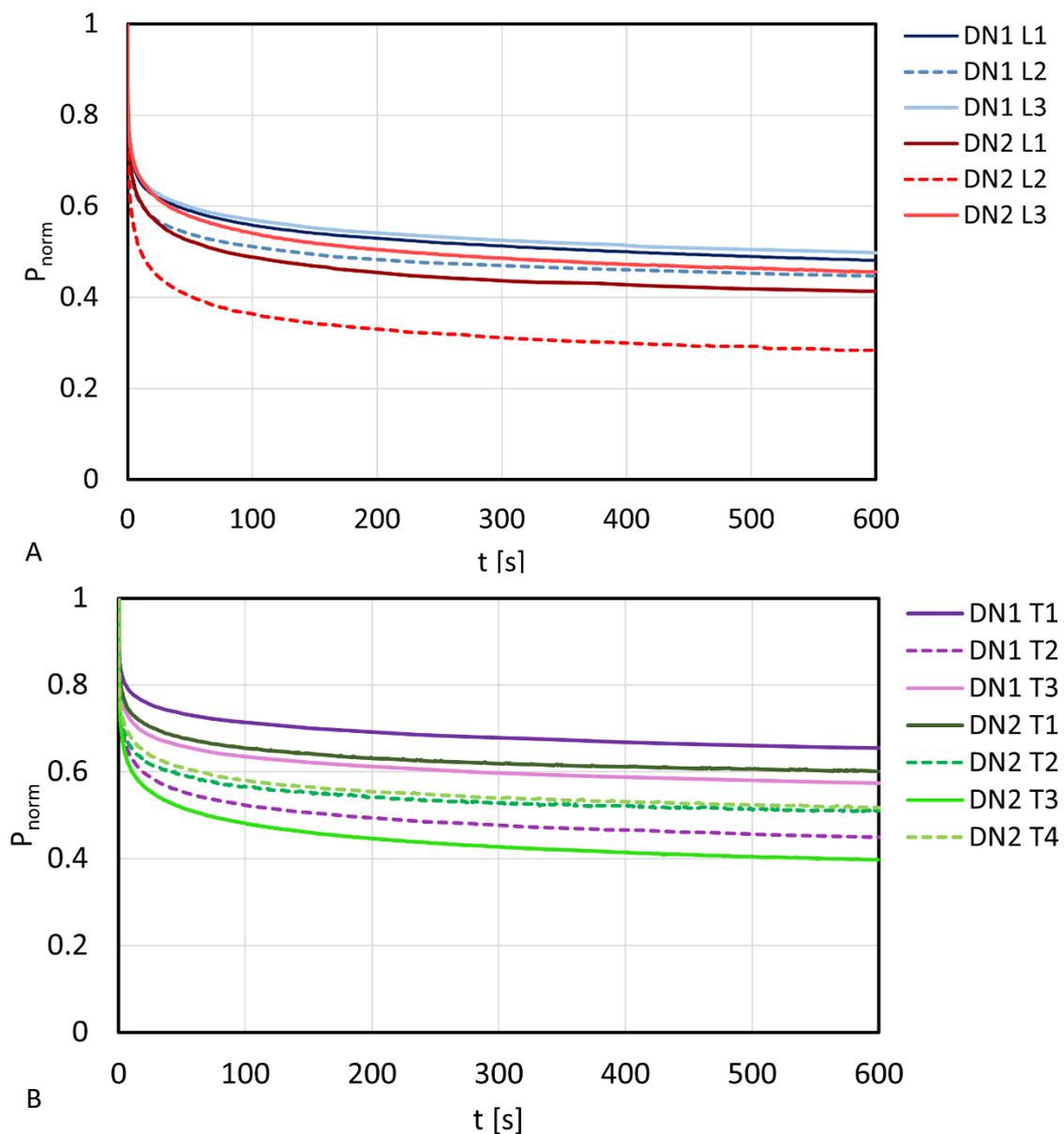


Figura 4.8 – Curve sperimentali relative alle prove di rilassamento delle tensioni, in termini di tensione normalizzata P_{norm} in funzione del tempo t , per i provini di tessuto diaframmatico nativo testato (A) in direzione longitudinale e (B) in direzione trasversale alle fibre muscolari.

Dalle curve mostrate nella Figura 4.8, si può osservare il comportamento viscoelastico del tessuto diaframmatico. Sperimentalmente si verifica, infatti, che la tensione necessaria a mantenere il tessuto deformato al livello imposto si riduce progressivamente nel corso della prova, fino a stabilizzarsi ad un valore asintotico all'incirca costante prima del termine della prova stessa. Questo comportamento è osservabile sia nel caso dei provini longitudinali (Figura 4.8A), sia per quelli trasversali (Figura 4.8B). Nonostante la risposta meccanica del tessuto mostri una certa variabilità tra i provini considerati, l'analisi visiva delle curve permette anche di notare una diversificazione nei fenomeni di rilassamento che avvengono nel tessuto lungo le due direzioni considerate: l'entità del rilassamento appare, infatti, mediamente maggiore lungo la direzione longitudinale rispetto a ciò che accade in direzione trasversale alle fibre muscolari. Al fine di ottenere dei dati quantitativi in merito, sono stati considerati per ogni provino i valori della tensione normalizzata rilevati al termine della prova di rilassamento (ovvero all'istante $t = 600$ secondi). Tali valori vengono riportati di seguito, nella Tabella 4.3.

P_{norm} a $t = 600$ secondi			
Longitudinali		Trasversali	
DN1 L1	0.48	DN1 T1	0.65
DN1 L2	0.45	DN1 T2	0.45
DN1 L3	0.50	DN1 T3	0.57
DN2 L1	0.41	DN2 T1	0.60
DN2 L2	0.28	DN2 T2	0.51
DN2 L3	0.46	DN2 T3	0.40
		DN2 T4	0.52
Media \pm SD	0.43 \pm 0.08	Media \pm SD	0.53 \pm 0.09

Tabella 4.3 – Valore della tensione normalizzata P_{norm} al termine della prova di rilassamento delle tensioni (ossia all'istante $t = 600$ secondi), per ciascun provino di tessuto diaframmatico nativo testato.

Dalla Tabella 4.3 si può notare che, dall'istante $t = 600$ secondi, quando si suppone che i fenomeni viscosi siano giunti a completamento nel tessuto, i provini longitudinali mostrano una riduzione di tensione (rispetto al valore iniziale) che varia dal 50% al 72%, mentre nel caso dei provini trasversali la riduzione percentuale varia dal 35% al 60%. Inoltre, al fine di individuare se la differenza tra i valori delle tensioni rilassate a 600 secondi nelle due direzioni considerate (Figura 4.9) fosse

statisticamente significativa, è stato eseguito sui dati a disposizione il test statistico non parametrico U di Mann-Whitney a due code (significatività con $p\text{-value} < 0.05$).

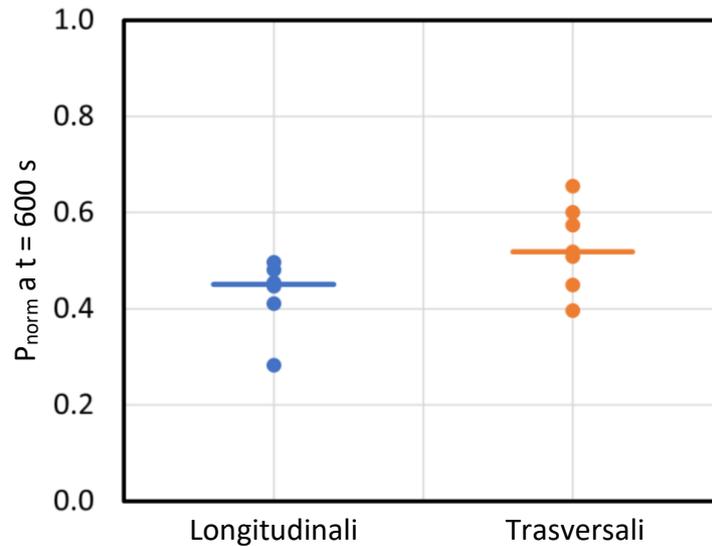


Figura 4.9 – Confronto tra valori della tensione normalizzata P_{norm} al termine della prova di rilassamento delle tensioni (cioè all'istante $t = 600$ secondi) per i provini estratti dal tessuto diaframmatico nativo, in direzione longitudinale (in blu) e in quella trasversale (in arancione). Le linee continue orizzontali rappresentano le mediane tra i valori di P_{norm} relativi a ciascun gruppo di provini.

Il test restituisce un $p\text{-value}$ pari a 0.073, di poco maggiore di 0.05 (valore di soglia per la significatività), Nonostante la differenza non risulti statisticamente significativa, si deve comunque tener conto del limitato numero di dati sulla base dei quali si sono fatte tali considerazioni. Dunque, si può ragionevolmente supporre che anche in questo caso, aumentando la numerosità dei campioni, la significatività del test venga raggiunta.

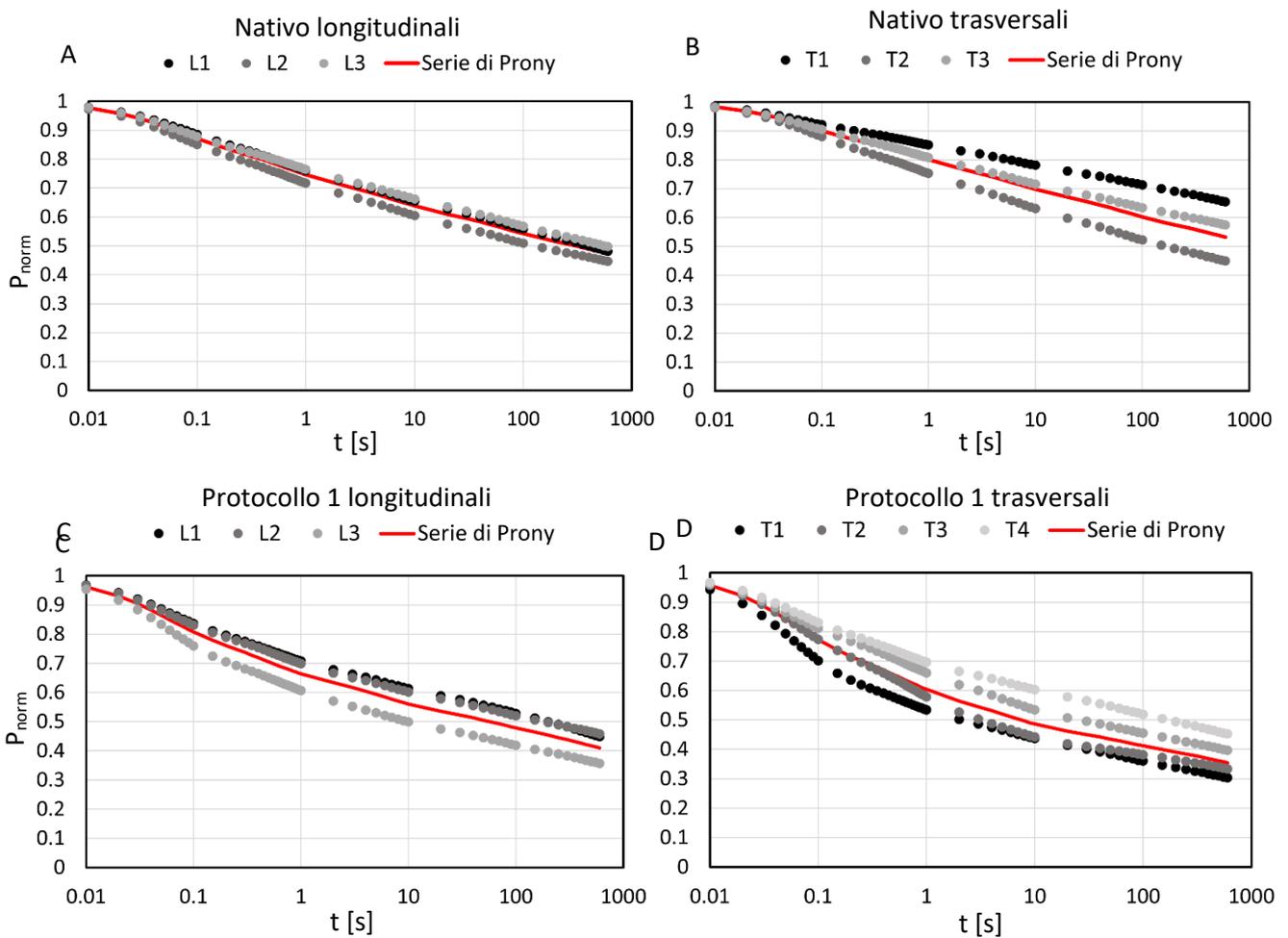
Questi dati supportano, quindi, ciò che si può preliminarmente dedurre dall'ispezione visiva delle curve di rilassamento, ovvero il fatto che il tessuto diaframmatico è in grado di subire fenomeni viscosi di entità maggiore se sottoposto a stati deformativi in direzione longitudinale alle fibre muscolari, rispetto a quello che accadrebbe, invece, se stimolato trasversalmente alle fibre stesse. Tali considerazioni sul comportamento viscoelastico del diaframma sono peraltro coerenti con quanto evinto dai risultati delle prove di trazione, in cui era stata osservata una maggiore rigidità del tessuto in direzione trasversale alle fibre muscolari. Infatti, se un materiale anisotropo esibisce rigidità più elevata lungo una certa direzione preferenziale, è ragionevole supporre che esso opponga una resistenza maggiore allo sviluppo di processi di rilassamento qualora venga sottoposto a stati deformativi non istantanei lungo tale particolare direzione.

È infine da notare che, sebbene nello studio condotto da Gaur e collaboratori¹⁸ sul comportamento a trazione del tessuto diaframmatico umano emerga la dipendenza della risposta meccanica del tessuto dalla velocità di deformazione imposta, ad oggi in letteratura non sono presenti studi che indaghino

il comportamento viscoelastico del muscolo diaframmatico tramite test di rilassamento delle tensioni. Le prove di rilassamento svolte nel presente progetto di tesi forniscono le prime informazioni in merito, motivo per cui mancano di un confronto con risultati analoghi provenienti da altre fonti.

4.2.2 Confronto tra tessuto diaframmatico nativo e decellularizzato

Nel seguente paragrafo vengono riportati i risultati delle prove meccaniche di rilassamento delle tensioni eseguite sui campioni di tessuto diaframmatico decellularizzato secondo i quattro trattamenti testati. Innanzitutto, vengono riportati graficamente, nella Figura 4.10, i risultati delle operazioni di interpolazione eseguite sui dati sperimentali delle prove di rilassamento relative a ciascun gruppo di provini in esame (di tessuto nativo o decellularizzato secondo il protocollo 1, 2, 3 o 4, in direzione longitudinale o trasversale). L'asse dei tempi viene visualizzato su scala logaritmica in tutti i grafici rappresentati.



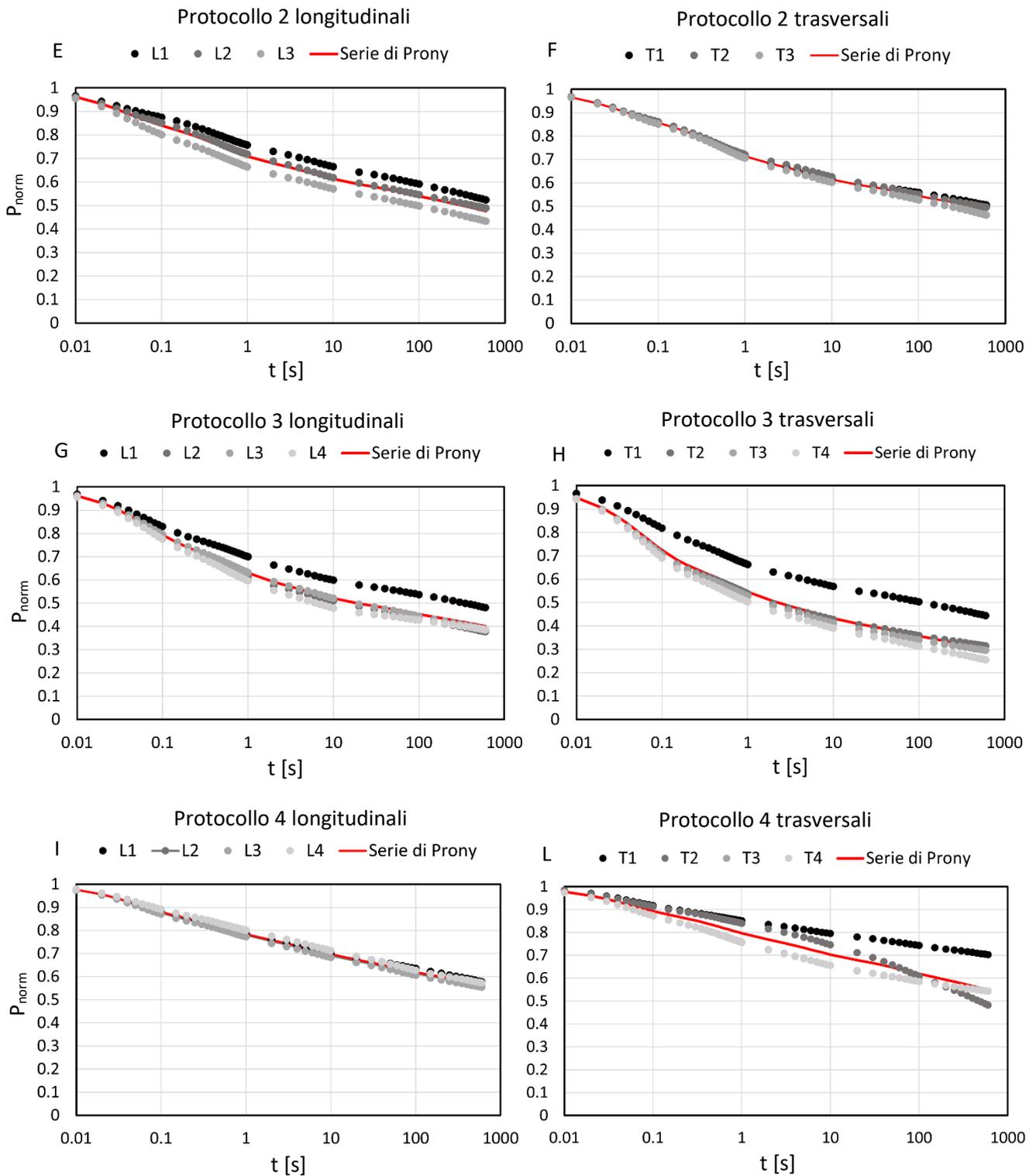


Figura 4.10 – Fitting dei dati sperimentali della tensione normalizzata P_{norm} in funzione del tempo t tramite serie di Prony: confronto tra dati sperimentali e curva di interpolazione (in rosso), per ciascun gruppo di provini in esame (di tessuto nativo o decellularizzato secondo i protocolli 1, 2, 3 o 4, longitudinali o trasversali). L’asse dei tempi viene visualizzato in scala logaritmica.

Dalla Figura 4.10 si può osservare che, per tutti i gruppi di provini considerati, le curve ottenute dalla procedura di interpolazione permettono di descrivere adeguatamente l’andamento medio dei dati

sperimentali corrispondenti. Da ciò si deduce che il comportamento meccanico del tessuto diaframmatico in dipendenza dal tempo può essere interpretato nell'ambito della viscoelasticità lineare e, nello specifico, mediante una serie di Prony, secondo un modello di Maxwell avente cinque rami viscosi (equazione 3.6).

Nella Tabella 4.4 vengono riportati, per ogni gruppo di provini, i valori dei moduli di rilassamento (γ) e dei tempi di rilassamento (τ) per ciascun ramo viscoso.

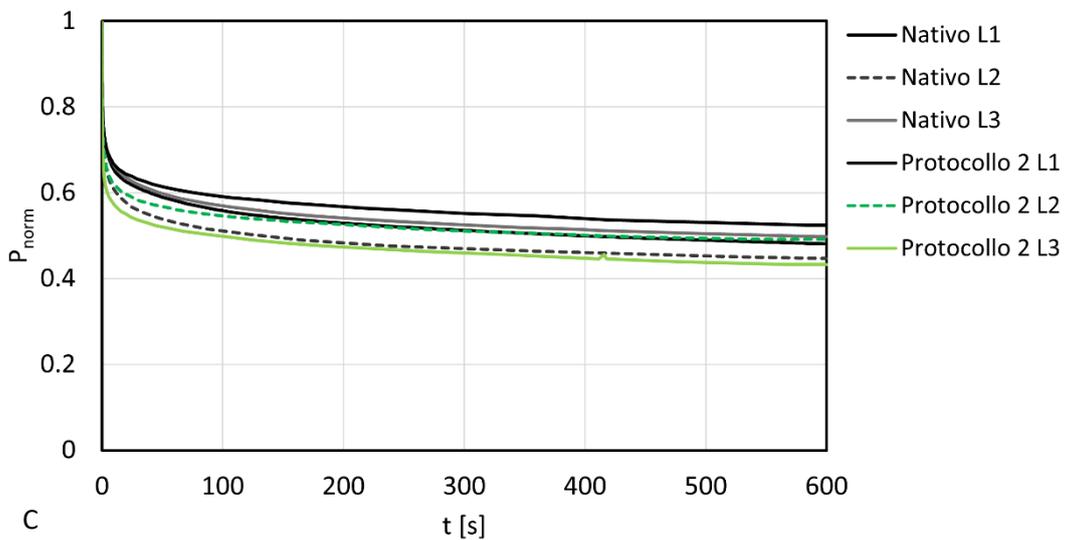
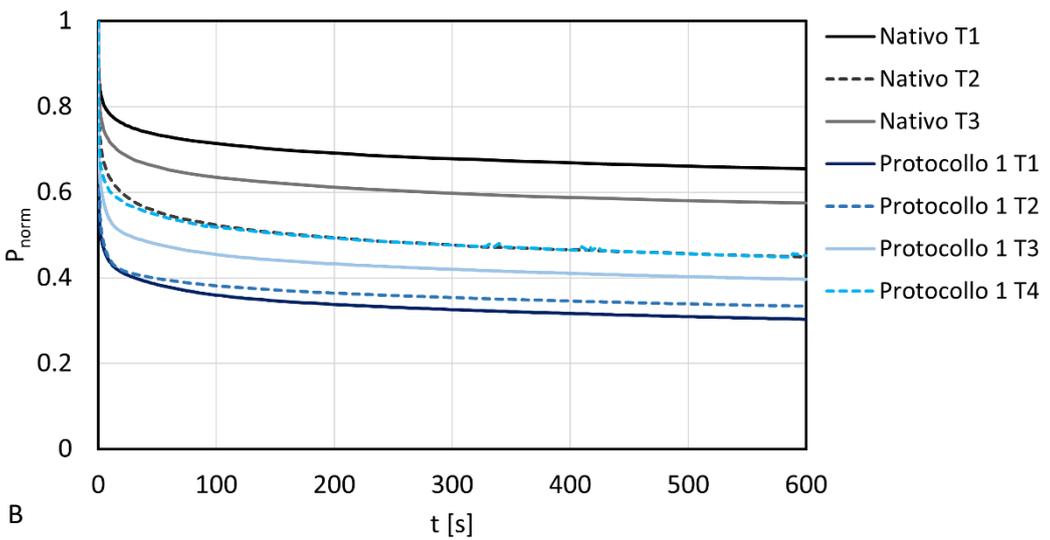
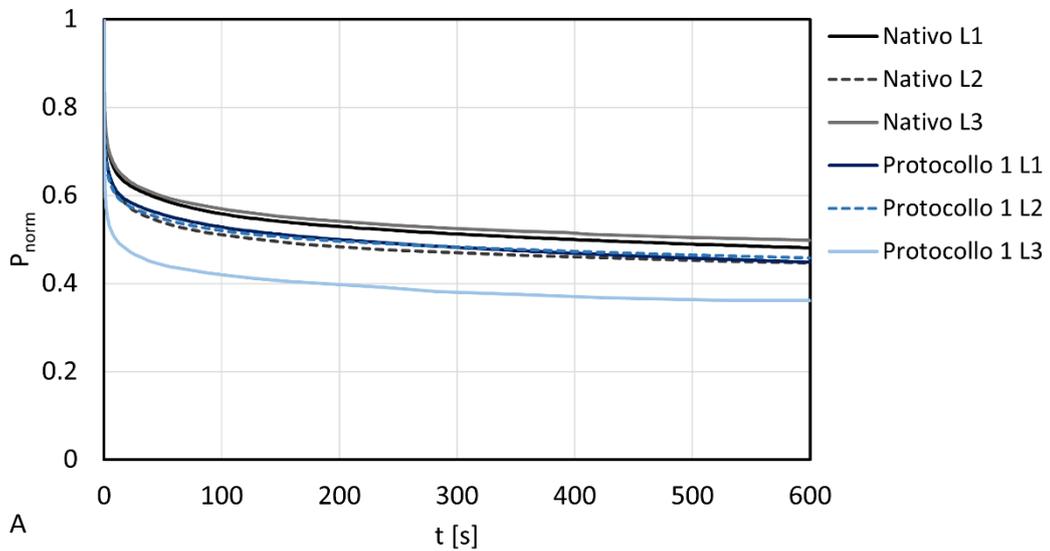
È comunque da notare, osservando la Figura 4.10, una certa variabilità per quanto riguarda la dispersione dei dati sperimentali attorno alla curva media a seconda del gruppo di provini che si considera. Ad esempio, si può notare che, mentre nel caso dei provini trasversali relativi al protocollo 2, o di quelli longitudinali relativi al protocollo 4, la serie di Prony risulta quasi sovrapponibile ai dati sperimentali, la stessa cosa non si può dire per i provini trasversali del tessuto nativo, o per quelli ottenuti dal tessuto decellularizzato secondo il protocollo 1, per i quali l'elevata dispersione dei dati rende l'errore di approssimazione molto maggiore. Questa variabilità dei risultati, d'altronde, non è sorprendente in quanto riflette l'eterogeneità delle proprietà intrinseche dei tessuti biologici, a cui è dovuta la difficoltà di predirne il comportamento meccanico in modo altamente riproducibile.

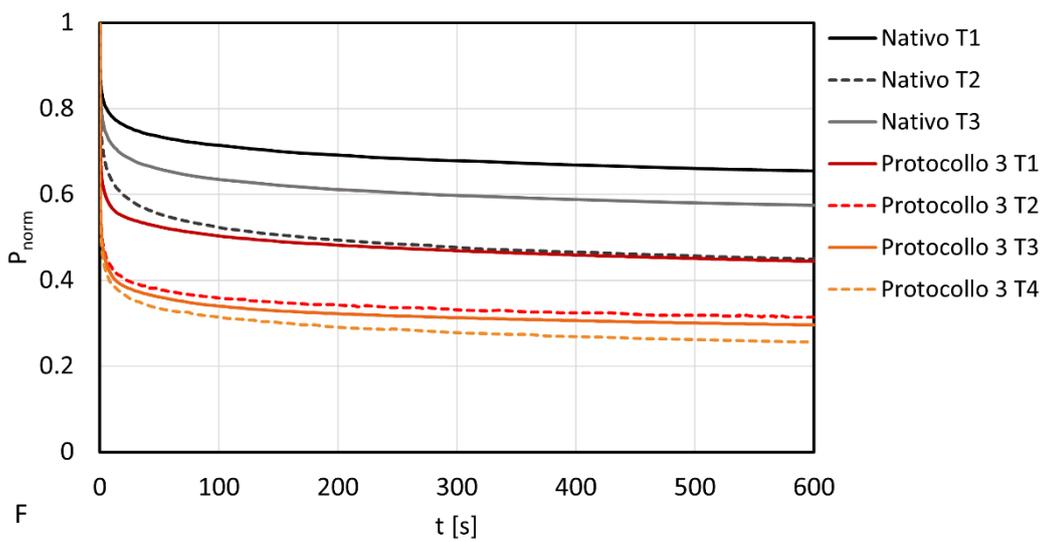
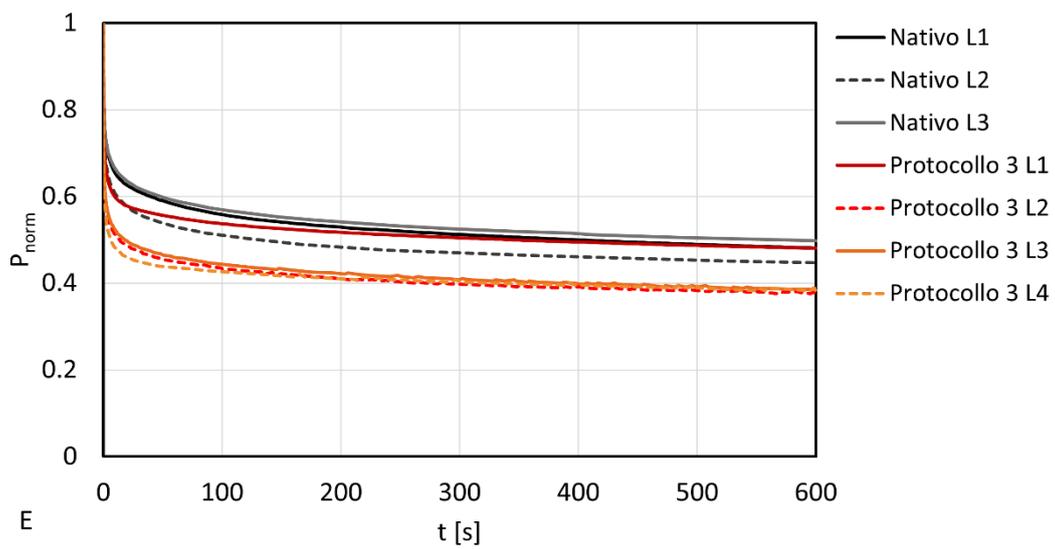
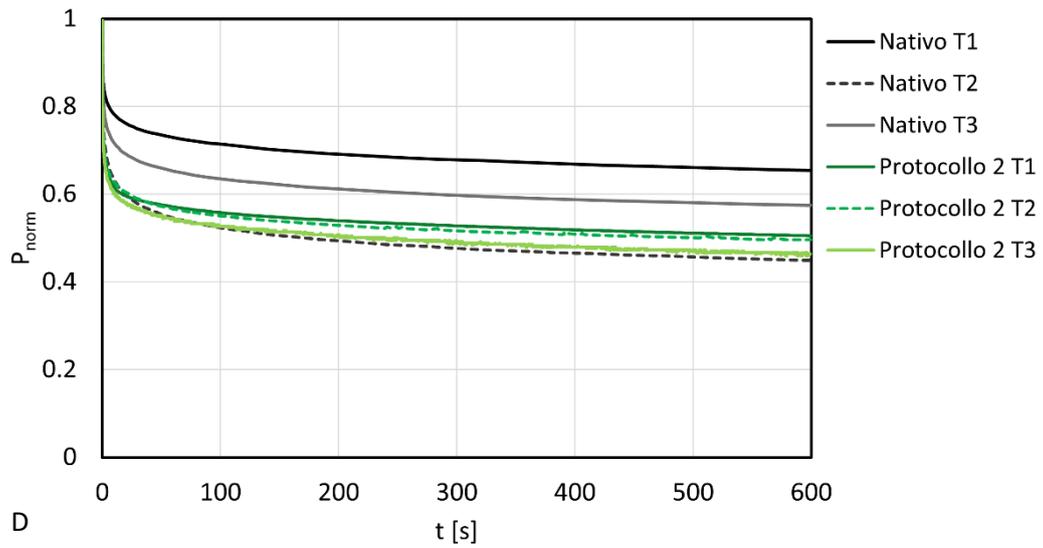
	γ_1	τ_1 [s]	γ_2	τ_2 [s]	γ_3	τ_3 [s]	γ_4	τ_4 [s]	γ_5	τ_5 [s]
Nativo L	0.12	0.056	0.12	0.502	0.11	5.01	0.092	50.0	0.11	500
Nativo T	0.10	0.061	0.096	0.591	0.10	4.99	0.10	50.0	0.11	500
Protocollo 1 L	0.18	0.048	0.15	0.422	0.11	4.95	0.071	49.9	0.11	500
Protocollo 1 T	0.23	0.054	0.17	0.517	0.12	4.94	0.063	50.0	0.090	500
Protocollo 2 L	0.13	0.032	0.15	0.415	0.10	4.85	0.063	50.1	0.11	500
Protocollo 2 T	0.11	0.031	0.17	0.420	0.10	4.82	0.061	49.9	0.10	500
Protocollo 3 L	0.21	0.055	0.16	0.568	0.10	5.07	0.057	50.0	0.087	500
Protocollo 3 T	0.29	0.055	0.17	0.562	0.11	4.98	0.069	50.0	0.086	500
Protocollo 4 L	0.11	0.047	0.10	0.509	0.088	5.02	0.076	50.0	0.081	500
Protocollo 4 T	0.10	0.044	0.10	0.513	0.095	4.98	0.076	50.0	0.12	500

Tabella 4.4 – Moduli di rilassamento (γ) e tempi di rilassamento (τ) ottenuti dal fitting tramite serie di Prony con cinque rami viscosi dei dati sperimentali relativi alle prove di rilassamento delle tensioni, per ciascun gruppo di provini in esame (di tessuto nativo o decellularizzato secondo i protocolli 1, 2, 3 o 4, longitudinali – L – o trasversali – T –).

Di seguito si procede riportando i risultati del confronto tra il tessuto nativo e quello decellularizzato secondo ciascun protocollo di decellularizzazione testato. Nello specifico (Figura 4.11), per ciascun protocollo, vengono riportate nello stesso grafico le curve di rilassamento relative ai provini di tessuto decellularizzato e quelle ricavate per i provini di diaframma nativo corrispondente. Anche in questo

caso le risposte meccaniche vengono valutate separatamente lungo la direzione longitudinale e in quella trasversale alle fibre muscolari.





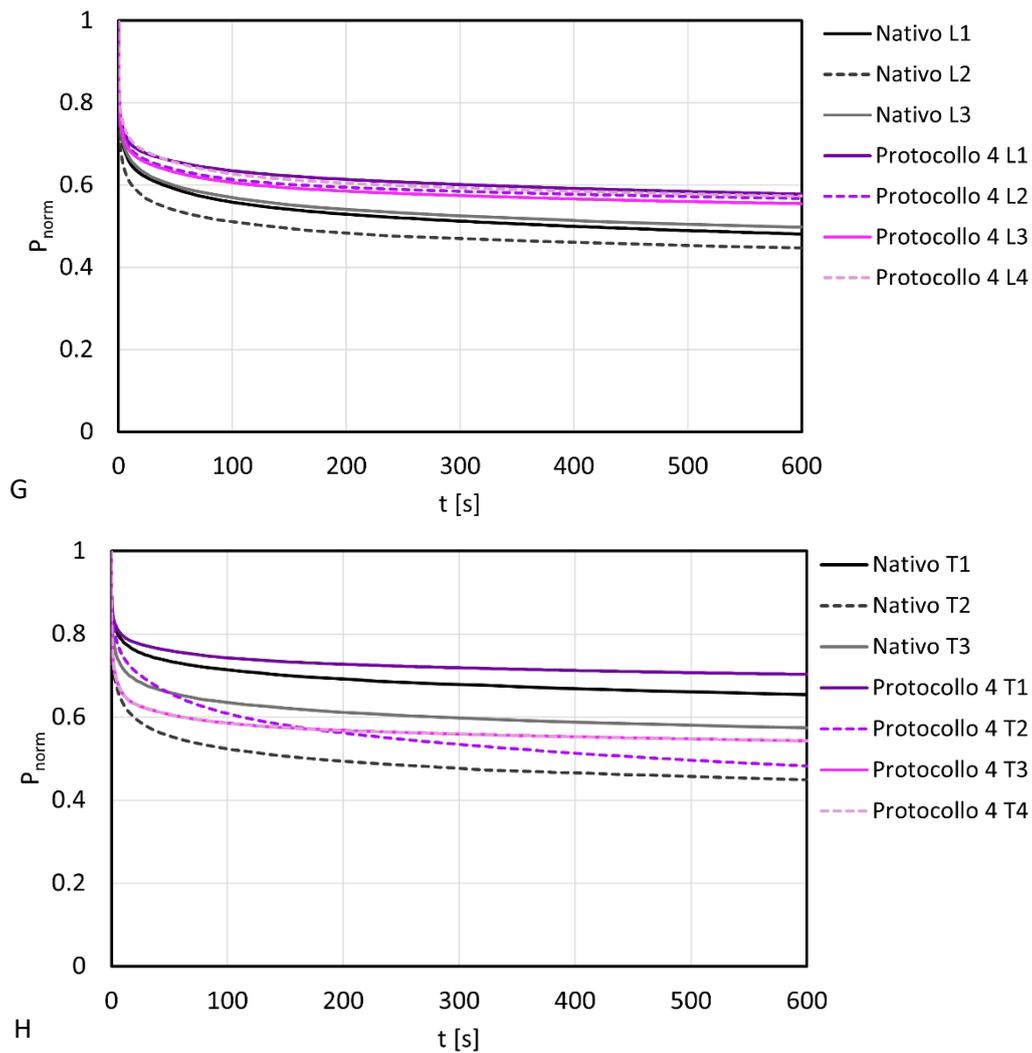


Figura 4.11 – Curve relative alle prove di rilassamento delle tensioni, in termini di tensione normalizzata P_{norm} in funzione del tempo t , del tessuto diaframmatico nativo e di quello decellularizzato. Nello specifico il tessuto nativo viene confrontato con quello decellularizzato secondo ciascuno dei quattro protocolli testati, considerando separatamente i provini longitudinali e quelli trasversali.

Analizzando qualitativamente le curve sperimentali è possibile osservare che, a prescindere dal trattamento utilizzato per la decellularizzazione, il tessuto diaframmatico decellularizzato mantiene caratteristiche di viscoelasticità, andando incontro a fenomeni di rilassamento delle tensioni qualora venga sottoposto a stati deformativi costanti in direzione longitudinale o trasversale alle fibre.

Tuttavia, considerando per ogni provino i valori della tensione normalizzata (P_{norm}) al termine della prova di rilassamento, riportati nella Tabella 4.5 e rappresentati graficamente nella Figura 4.12, si può facilmente osservare una certa diversificazione nell'entità del rilassamento cui va incontro ciascun tipo di tessuto decellularizzato considerato.

P_{norm} a $t = 600$ secondi									
Nativo		Protocollo 1		Protocollo 2		Protocollo 3		Protocollo 4	
L1	0.48	L1	0.45	L1	0.52	L1	0.48	L1	0.58
L2	0.45	L2	0.46	L2	0.49	L2	0.38	L2	0.57
L3	0.50	L3	0.36	L3	0.43	L3	0.39	L3	0.56
						L4	0.39	L4	0.57
Media	0.48	Media	0.42	Media	0.48	Media	0.41	Media	0.57
± SD	± 0.03	± SD	± 0.06	± SD	± 0.05	± SD	± 0.05	± SD	± 0.01
T1	0.65	T1	0.30	T1	0.51	T1	0.44	T1	0.70
T2	0.45	T2	0.33	T2	0.50	T2	0.31	T2	0.48
T3	0.57	T3	0.40	T3	0.46	T3	0.30	T3	0.54
		T4	0.45			T4	0.26	T4	0.54
Media	0.56	Media	0.37	Media	0.49	Media	0.33	Media	0.57
± SD	± 0.10	± SD	± 0.07	± SD	± 0.02	± SD	± 0.08	± SD	± 0.09

Tabella 4.5 – Valore della tensione normalizzata P_{norm} al termine della prova di rilassamento delle tensioni (ossia all'istante $t = 600$ secondi), per ciascun provino testato: confronto tra tessuto diaframmatico nativo e quello decellularizzato secondo i protocolli di decellularizzazione 1, 2, 3 e 4.

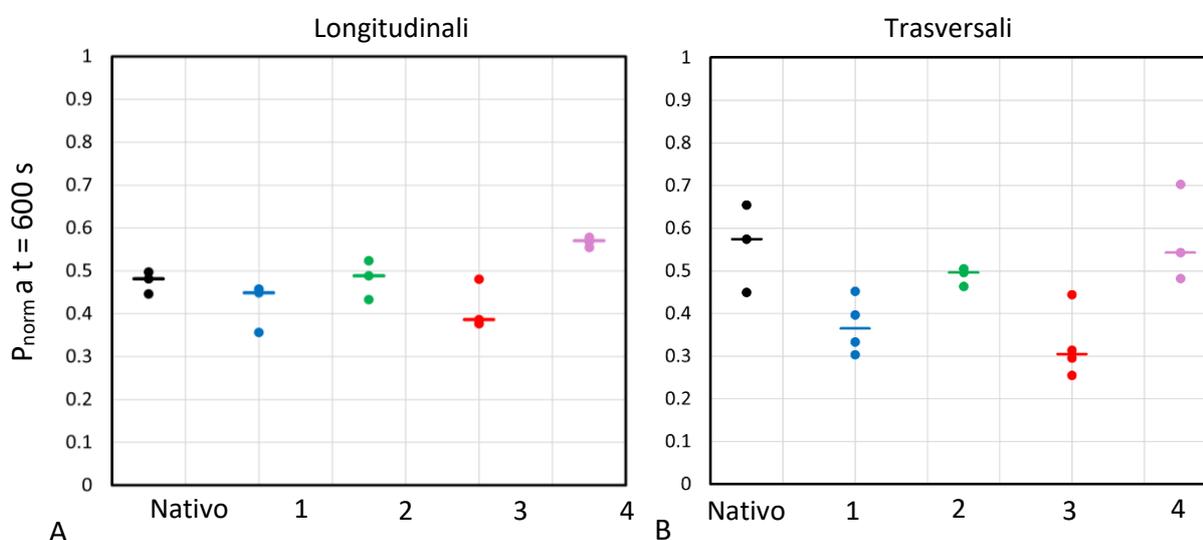


Figura 4.12 – Confronto tra valori della tensione normalizzata P_{norm} al termine della prova di rilassamento delle tensioni (cioè all'istante $t = 600$ secondi) per i provini estratti dal tessuto diaframmatico nativo (in nero) e da quello decellularizzato secondo i protocolli 1 (in blu), 2 (in verde), 3 (in rosso) e 4 (in rosa). (A) Provini longitudinali e (B) provini trasversali. Le linee continue orizzontali rappresentano le mediane tra i valori di P_{norm} relativi a ciascun gruppo di provini.

La variabilità del comportamento viscoelastico esibito dai diversi gruppi di provini durante le prove di rilassamento delle tensioni emerge chiaramente osservando la Figura 4.13, dove vengono rappresentate, sovrapponendole nello stesso grafico, le curve risultanti dall'interpolazione, tramite

serie di Prony con cinque rami viscosi, dei dati sperimentali ricavati da tali prove, per ciascuna tipologia di tessuto considerato (nativo o decellularizzato secondo il protocollo 1, 2, 3 o 4). La Figura 4.13A è relativa ai provini longitudinali, mentre la Figura 4.13B rappresenta i campioni trasversali.

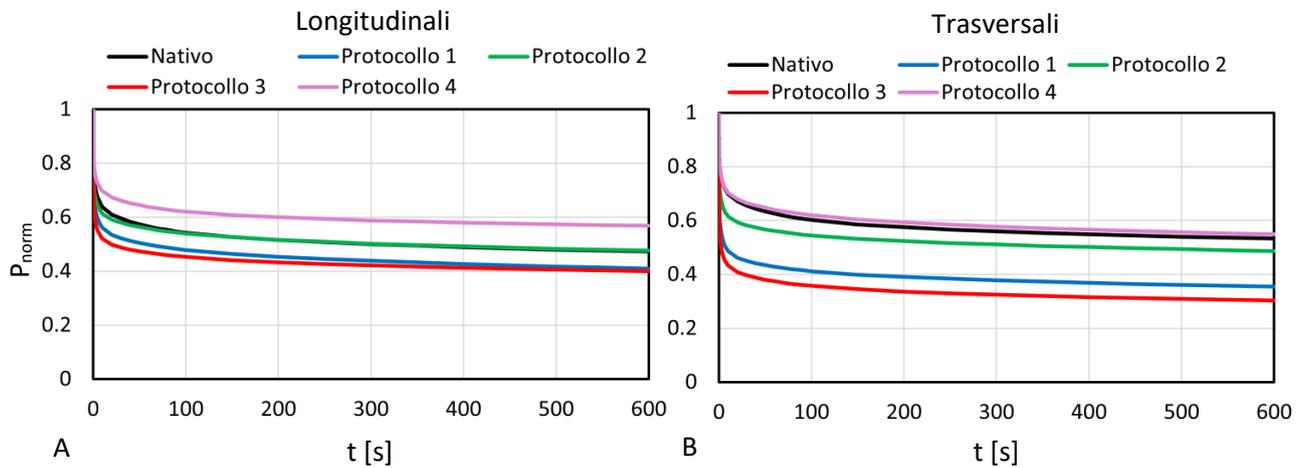


Figura 4.13 – Confronto tra le curve ($P_{norm,t}$) risultanti dall’interpolazione tramite serie di Prony con cinque rami viscosi dei dati sperimentali ottenuti dalle prove di rilassamento delle tensioni, per ciascuna tipologia di tessuto considerato: nativo (in nero) e decellularizzato tramite i protocolli 1 (in blu), 2 (in verde), 3 (in rosso), e 4 (in rosa). (A) Provini longitudinali e (B) provini trasversali.

Allo scopo di valutare la significatività delle differenze nei valori di P_{norm} a $t = 600$ secondi tra i cinque gruppi di provini in esame è stata effettuata un’analisi di varianza tramite il test statistico di Kruskal-Wallis (significatività con $p\text{-value} < 0.05$), separatamente per i provini longitudinali e per quelli trasversali.

I risultati dei test mostrano una differenza statisticamente significativa tra i diversi gruppi, sia nel caso dei provini longitudinali ($p\text{-value} = 0.0219$), sia per quelli trasversali ($p\text{-value} = 0.012$). Tuttavia, l’unico confronto a posteriori per cui sono emerse differenze significative risulta quello tra il protocollo numero 3 (SDC) e il protocollo numero 4 (TergitolTM), sia nel caso dei provini longitudinali ($p\text{-value} = 0.0207$) che per quelli trasversali ($p\text{-value} = 0.036$). Nello specifico, considerando entrambe le direzioni, i valori di P_{norm} al termine delle prove di rilassamento risultano significativamente maggiori nel caso dei provini decellularizzati tramite TergitolTM.

In tutti gli altri casi, le analisi *post-hoc* non hanno permesso di trarre delle conclusioni in merito ai confronti tra i singoli gruppi di provini. Ciò è probabilmente dovuto alla scarsa numerosità dei dati a disposizione, per cui risulta difficile ottenere delle indicazioni chiare su quali siano i trattamenti di decellularizzazione in grado di alterare in maniera significativa i processi di rilassamento che il tessuto diaframmatico può sviluppare.

CONCLUSIONI

Il presente progetto di tesi rappresenta parte di una più ampia attività di ricerca volta allo sviluppo e alla caratterizzazione di innesti biologici derivanti dalla decellularizzazione di tessuto diaframmatico umano, nell'ottica di fornire, tramite il loro utilizzo, una valida alternativa all'applicazione di *patch* di materiale sintetico non riassorbibile per la riparazione di difetti diaframmatici estesi.

Infatti, nonostante l'applicazione degli innesti sintetici costituisca ad oggi lo standard nella pratica clinica, l'utilizzo di scaffold a base di matrice extra-cellulare (ECM) decellularizzata rappresenta un'alternativa terapeutica potenzialmente molto promettente: la capacità di questi costrutti di crescere e di subire rimodellamento *in vivo*, infatti, consente loro di integrarsi al meglio con il tessuto nativo del paziente, superando molte delle limitazioni della controparte sintetica.

Al tempo stesso, la prospettiva di ottenere un miglioramento dei risultati clinici tramite l'applicazione di innesti bioingegnerizzati sussiste soltanto qualora il trattamento di decellularizzazione, eliminando da una parte tutte le componenti cellulari dal tessuto, permetta parallelamente di mantenere integre, per quanto possibile, l'architettura e le proprietà biomeccaniche della ECM del tessuto nativo.

In relazione al comportamento meccanico del tessuto diaframmatico umano, inoltre, è da considerare che, nonostante l'importanza funzionale che questo muscolo riveste, le sue proprietà meccaniche non sono state ancora del tutto investigate.

Tenendo conto di queste considerazioni, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la caratterizzazione del comportamento meccanico elastico e viscoelastico del tessuto diaframmatico umano allo stato nativo. Inoltre, i risultati di questa analisi sono stati utilizzati per eseguire una valutazione comparata degli effetti di quattro diversi trattamenti di decellularizzazione sul comportamento meccanico del tessuto in esame. In particolare, i quattro protocolli di decellularizzazione considerati si differenziano per il tipo di detergente che viene utilizzato: sodio dodecilsolfato (SDS), SDS+TergitolTM, sodio desossicolato (SDC) o TergitolTM rispettivamente.

Il protocollo di carico adottato nelle prove ha previsto una sollecitazione meccanica monoassiale mediante l'applicazione di cinque cicli di carico-scarico consecutivi, dai quali è stato possibile ricavare la risposta a trazione del tessuto diaframmatico, e lo svolgimento di una prova di rilassamento delle tensioni, a deformazione costante, con lo scopo di valutarne le proprietà viscoelastiche.

Inoltre, nell'ottica di indagare le caratteristiche di isotropia del tessuto, da ciascun tipo di campione a disposizione sono stati ricavati due diversi gruppi di provini: quelli ottenuti tagliando il tessuto lungo la direzione parallela alle fibre muscolari, e quelli ottenuti tagliando il campione in direzione ortogonale alle fibre.

Per quanto riguarda la risposta meccanica del tessuto diaframmatico in condizioni di trazione monoassiale, l'andamento qualitativo delle curve, sia in direzione longitudinale che in quella trasversale alle miofibre, è di tipo non lineare, con una rigidità crescente all'aumentare della deformazione imposta. La non linearità della risposta meccanica si mantiene, inoltre, anche nel caso del tessuto diaframmatico decellularizzato, a prescindere dallo specifico trattamento utilizzato. Al contrario, i trattamenti di decellularizzazione risultano avere effetti diversificati in relazione alle caratteristiche di rigidità e di isotropia del tessuto che si ottiene. Relativamente al primo aspetto, un'analisi qualitativa basata sui valori dei moduli secanti delle curve ottenute ha permesso di evidenziare che, mentre i trattamenti 1, 2 e 3 sembrano provocare, indipendentemente dalla direzione considerata, una riduzione di rigidità del tessuto, l'ECM risultante dall'applicazione del protocollo 4, facente uso del TergitolTM come detergente, mostra, al contrario, una rigidità a trazione maggiore rispetto a quella del tessuto nativo. Tuttavia, la scarsa numerosità dei campioni non ha permesso di supportare tali evidenze per mezzo di analisi statistiche sui dati di rigidità a disposizione. Per quanto concerne le caratteristiche di isotropia del tessuto, invece, i risultati delle prove di trazione hanno permesso di evidenziare che, mentre il tessuto diaframmatico allo stato nativo ha un comportamento anisotropo, esibendo una rigidità maggiore in direzione trasversale alle miofibre, il processo di decellularizzazione tramite i protocolli 1, 2 e 3 ha l'effetto di eliminare quasi del tutto tale caratteristica, acquisendo valori di rigidità molto simili nelle due direzioni considerate. Al contrario, il protocollo facente uso del TergitolTM sembra non alterare in modo significativo il comportamento anisotropo del tessuto.

Considerando i risultati delle prove di rilassamento delle tensioni, essi hanno permesso di mostrare il comportamento viscoelastico del tessuto diaframmatico, sia allo stato nativo che in seguito ai trattamenti di decellularizzazione. In entrambi i casi, inoltre, le curve di rilassamento risultano essere interpretabili matematicamente nell'ambito della viscoelasticità lineare e, nello specifico, per mezzo di un modello di Maxwell con cinque rami viscosi. Un'analisi qualitativa dei valori delle tensioni rilassate al termine delle prove ha permesso di evidenziare che i fenomeni di rilassamento delle tensioni a cui va incontro il tessuto diaframmatico nativo sono più intensi nella direzione longitudinale rispetto a ciò che accade trasversalmente alle miofibre, e ciò risulta coerente con quanto evinto dalle prove di trazione sul comportamento anisotropo del tessuto. Infine, benché l'analisi delle curve di rilassamento consenta di osservare una diversificazione nei fenomeni di rilassamento sviluppati dai diversi tipi di tessuto decellularizzato in esame, la scarsa numerosità dei dati a disposizione non permette di trarre conclusioni in merito a quali dei quattro trattamenti siano in grado di alterare significativamente i processi di rilassamento viscoso che il tessuto può sviluppare.

Va in ogni caso considerato che il ridotto numero di provini a disposizione per le prove meccaniche è strettamente legato alle finalità del progetto che i ricercatori della Sezione di Anatomia Umana del Dipartimento di Neuroscienze stanno portando avanti: il lavoro sperimentale si pone, infatti, l'obiettivo di eseguire una preliminare valutazione comparativa sull'efficacia dei quattro detergenti sopra citati nella decellularizzazione del tessuto diaframmatico umano, attraverso lo svolgimento di analisi istologiche, immuno-istochimiche e biomeccaniche. In quest'ottica, per massimizzare la confrontabilità dei dati, i campioni di tessuto considerati per le analisi sono stati estratti dal diaframma del medesimo soggetto.

In ogni caso, i risultati del presente lavoro sperimentale forniscono utili indicazioni su cui basare lo svolgimento di un progetto più ampio ed approfondito, che vedrà il coinvolgimento di più soggetti, da cui si potrà ottenere un set più esteso di dati sperimentali. In base ai risultati preliminari ottenuti in questo lavoro di tesi, supportati anche da analisi istologiche e immunoistochimiche in fase di svolgimento, si può ipotizzare di escludere l'uso del TergitolTM come detergente, dal momento che questo sembra conferire al tessuto diaframmatico umano, diversamente dagli altri trattamenti, effetti irrigidenti che ne peggiorano il comportamento meccanico.

Si deve inoltre osservare che, ai fini delle analisi, sono state svolte soltanto prove di tensione monoassiale (nelle direzioni parallela e trasversale alle miofibre). Potrebbe risultare interessante, per gli sviluppi futuri della ricerca, considerare anche l'esecuzione di prove meccaniche di tipo biassiale, al fine di simulare in modo migliore gli stati di tensione fisiologici a cui è soggetto il muscolo diaframmatico *in vivo*.

In ogni caso, va riconosciuto il fatto che questo lavoro sperimentale, oltre a rappresentare, ad oggi, uno dei primi studi volti alla caratterizzazione del comportamento meccanico passivo del tessuto diaframmatico umano, permette di focalizzare l'attenzione, per la prima volta, sulle proprietà biomeccaniche di scaffold derivanti dalla decellularizzazione di diaframma umano, nell'ottica di valutarne l'utilizzo per la riparazione di difetti e patologie che possono compromettere un muscolo scheletrico di vitale importanza quale quello diaframmatico.

BIBLIOGRAFIA

1. Drake R.L., Wayne Vogl A., Mitchell A. W.M, *Gray's Anatomy for Students*, Churchill Livingstone Elsevier, 4th Edition, 2019; 222-225.
2. Merrell A. J., Kardon G., *Development of the diaphragm, a skeletal muscle essential for mammalian respiration*, FEBS Journal 280, 2013; 4026-4035.
3. Gubareva E.A., Sjöqvist S., Gilevich I.V., Sotnichenko A.S. *et al.*, *Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats*, Biomaterials, 2016; 77:320-335.
4. Di Bello C., Bagno A., *Biomateriali, Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Pàtron Editore, 2016.
5. Silverthorn D.U., *Fisiologia umana, un approccio integrato*, Pearson Editore, 2017; capitolo 12.
6. Porzionato A. *et al.*, *Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery*, International Journal of Molecular Science, 2015; 16:14808-14831.
7. Purslow P.P., *The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function*, Frontiers in Physiology, 2020; volume 11, article 495.
8. Lieber R.L., Binder-Markey B., *Biomechanical and Structural basis of the passive mechanical properties of whole skeletal muscle*, The Journal of Physiology, 2021; 599(16):3809-3823.
9. Herbert R.D., Gandevia S.C., *The passive mechanical properties of muscle*, Journal of Applied Physiology, 2019; 126:1442-1444.
10. Pruitt L., Chakravartula A., *Mechanics of Biomaterials: Fundamental Principles for Implant Design*, Cambridge Texts in Biomedical Engineering, 2011; chapter 5.
11. Fontanella C.G., *Introduzione alla meccanica dei tessuti connettivi molli*, appunti di Meccanica dei Tessuti Biologici, anno accademico 2020-2021.
12. Fontanella C.G., *Conformation of soft biological tissue with regard to investigation of biomechanical behaviour*, appunti di Meccanica dei Tessuti Biologici, anno accademico 2020-2021.
13. Holzapfel G.A., *Biomechanics of Soft Tissue*, Handbook of material behaviour – Nonlinear models and properties, Jean Lemaitre, LMT-Cachan, France, 2000.
14. Yang K.H., *Material Laws and Properties*, Basic Finite Element Method as Applied to Injury Biomechanics, Academic Press, 2018; pages 231-236.
15. Safadi M.M., Rubin M.B., *Modeling rate-independent hysteresis in large deformations of preconditioned soft tissues*, International Journal of Solids and Structures, 2014; 51:3265-3272.

16. Hosford W.F., *Mechanical Behaviour of materials*, New York: Cambridge University Press, 2010; chapter 15.
17. Todros S., *Viscoelasticità lineare generalizzata*, appunti di Meccanica dei Biomateriali, anno accademico 2020-2021.
18. Gaur P., Chawla A., Verma K., Mukherjee S., Lalvani S., Malhotra R., Mayer C., *Characterization of human diaphragm at high strain rate loading*, Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials, 2016; 60:603-616.
19. Liu J., Saul D., Böker K.O., Ernst J., Lehman W., Schilling A.F., *Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration*, BioMed Research International, 2018; volume 2018, 11 pages.
20. Grisaru-Granovsky S., Rabinowitz R., Ioscovich A., Elstein D., Schimmel M.S., *Congenital diaphragmatic hernia: review of literature in reflection of unresolved dilemmas*, Acta Paediatrica, 2009; 98:1874-1881.
21. De Coppi P., Deprest J., *Regenerative medicine solutions in congenital diaphragmatic hernia*, Seminars in Pediatric Surgery 26, 2017; 171-177.
22. Rapicetta C., *Risultati funzionali a lungo termine dopo sutura o plicatura del diaframma*, tesi di dottorato in Scienze pneumo-cardio-toraciche di interesse medico e chirurgico, Università Alma Mater Studiorum di Bologna, 2013.
23. Maish M.S., *The Diaphragm*, Surgical Clinics of North America, 2010; 90:955-968.
24. Lu J. *Et al.*, *Delayed traumatic diaphragmatic hernia*, Medicine, 2016; 95:32
25. Joho-Arreola A.L., Bauersfeld U., Stauffer U.G., Baenziger O., Bernet V., *Incidence and treatment of diaphragmatic paralysis after cardiac surgery in children*, European Journal of Cardiothoracic Surgery, 2005; 27:53-57.
26. McNamara J.J. *et al.*, *Eventration of the diaphragm*, Surgery, 1968; 64:1013-1102.
27. Trevisan C., Maghin E., Dedja A., Caccin P., De Cesare N., Franzin C., Boso D., Pesce P., Cicci F., Boldrin F., Urbani L., De Coppi P., Pozzobon M., Pavan P., Piccoli M., *Allogenic tissue-specific decellularized scaffolds promote long-term muscle innervation and functional recovery in a surgical diaphragmatic hernia model*, Acta Biomaterialia, 2019; 89:115-125.
28. Navaei T., Milan P.B., Davari H.R., Samadikuchaksaraei A., Mozafari M., *Nanoengineered biomaterials for diaphragm regeneration*, Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine, Elsevier, 2019; chapter 15.
29. Piccoli M., Urbani L., Alvarez-Fallas M.E., Franzin C., Dedja A., Bertin E., Zuccolotto G., Rosato A., Pavan P., Elvassore N., De Coppi P., Pozzobon M., *Improvement of diaphragmatic performance*

through orthotopic application of decellularized extracellular matrix patch, *Biomaterials*, 2016; 74:245-255.

30. Langer R., Vacanti J.P., *Tissue Engineering*, Science, 1993; vol. 260.

31. Trevisan C., Fallas M.E.A., Maghin E., Franzin C., Pavan P. *et al.*, *Generation of a functioning and self-renewing diaphragmatic muscle construct*, *Stem Cells Translational Medicine*, 2019; 8:858-869.

32. Langridge B., Griffin M., Butler P.E., *Regenerative medicine for skeletal muscle loss: a review of current tissue engineering approaches*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2021; 32:1-15.

33. Rao L., Qjan Y., Khodabukus A., Ribar T., Bursac N., *Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue*, *Nature Communications*, 2018; 9:1-12.

34. Deprest J., Gucciardo L., Easwood P. *et al.*, *Medical and Regenerative Solutions for Congenital Diaphragmatic Hernia: A Perinatal Perspective*, *European Journal of Pediatric Surgery*, 2014; 24:270-277.

35. Fauza D.O., *Tissue engineering in congenital diaphragmatic ernia*, *Seminars in Pediatric Surgery*, 2014; 23:135-140.

36. Chan B.P., Leong K.W., *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*, *Euro Spine Journal*, 2008, 17 (Suppl 4):S467-S479.

37. Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G., *Decellularized matrices for tissue engineering*, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2010; 10:1-12.

38. Peloso A., Dhal A., Zambon J.P., Li P., Orlando G., Atala A., Soker S., *Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2015; 6:1-11.

39. Ren X., Ott C., *On the road to bioartificial organs*, *European Journal of Physiology*, 2014; 466:1847-1857.

40. Lombardi D., *Decellularizzazione d'organo: matrici fisiologiche per la generazione di organi in vitro*, *Giornale di tecniche nefrologiche e dialitiche*, 2013; 25(3):244-247.

41. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F., *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*, *Biomaterials*, 2011; 32(12):3233-3243.

42. Gilpin A., Yang Y., *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*, *BioMed Research International*, 2017; Vol. 2017.

43. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W., *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*, *Acta Biomaterialia*, 2009, 1-13.

44. Puech P.H. Bongrand P., *Mechanotransduction as a major driver of cell behaviour: mechanisms, and relevance to cell organization and future research*, Open Biology, 2021; 11:210256.
45. Engler A.J., Griffin M.A., Sen S., Bönnemann C.G., Sweeney H.L., Discher D.E., *Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments*, The Journal of Cell Biology, 2004; 166(6):877-887.
46. Engler A.J., Sen S. Sweeney H.L., Discher D.E., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*, Cell, 2006, 126:677-689.
47. Xing Q., Yates K., Tahtinen M., Shearier E., Qian Z., Zhao F., *Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation*, Tissue Engineering: Part C, 2015; 21(1):1-11.
48. Parmaksiz M., Dogan A., Odabas S., Elçin A.E., Elçin Y.M., *Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine*, Biomedical Materials, 2016; Vol. 11, Number 2.
49. De Caro, R.; Macchi, V.; Porzionato, A. *Promotion of body donation and use of cadavers in anatomical education at the University of Padova*, Anatomical Sciences Education, 2009; 2:91-92.
50. Porzionato A., Macchi V., Stecco C., Mazzi A., Rambaldo A., Sarasin G., Parenti A., Scipioni A., de Caro R., *Quality management of Body Donation Program at the University of Padova*, Anatomical Sciences Education, 2012; 5:264-272.
51. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., *NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis*, 2012; 9(7):671-675.
52. Pavan P.G., Pachera, P., Todros S, Tiengo, C, Natali A.N., *Mechanical characterization of animal derived grafts for surgical implantation.*, Journal of Mechanics in Medicine and Biology, 2016; 16, 1650023.
53. Jiang M., Lawson Z.T., Erel V., Pervere S., Nan T., Robbins A.B., Feed A.D., Moreno M.R., Veysel, E., *Clamping soft biologic tissues for uniaxial tensile testing: A brief survey of current methods and development of a novel clamping mechanism.*, Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials., 2020; 103:103503.
54. Kasuya E., *On the use of r and r squared in correlation and regression*, Ecological Research, 2019; 34:235-236.
55. Hwang W., Kelly N.G., Boriek A.M., *Passive mechanics of muscle tendinous junction of canine diaphragm*, Journal of Applied Physiology, 2005; 98:1328-1333.
56. Boriek A.M., Hwang W., Trinh L., Rodarte J.R., *Shape and tension distribution of the active canine diaphragm*, American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005; 288:R1021-R1027.

57. <https://teachmephysiology.com/respiratory-system/ventilation/mechanics-of-breathing/>
58. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Skeletal_muscle_-_longitudinal_section.jpg
59. https://en.wikipedia.org/wiki/Viscoelasticity#Generalized_Maxwell_model
60. https://it.wikipedia.org/wiki/File:Tissue_engineering_italian.jpg
61. <http://www.cmbm.unipd.it/news/bose.html>
62. <https://www.tainstruments.com/planar-biaxial-2-motor/>
63. <https://www.scilab.org/>