



**Università degli Studi di Padova**

Facoltà di Ingegneria  
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Triennale

# **Il Sistema Bose Electroforce per la Caratterizzazione del Comportamento a Trazione di Pericardio Bovino e Porcino**

**Analisi comparata degli effetti dei trattamenti di  
decellularizzazione TriCol e TriTDoc sulla resistenza  
elastica longitudinale del tessuto.**

**Relatore:** Ch.mo Prof. Andrea Bagno  
**Correlatore:** Dott.ssa Paola Aguiari

**Laureando:** Massimo Bellato

24 Luglio 2012 - A.A. 2011/1012

Questo documento è stato scritto in L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X su Windows.  
Tutti i marchi registrati appartengono ai rispettivi proprietari.

*...a Renzo...*



# Indice

<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 Il pericardio . . . . .	1
1.1.1 Collocazione del pericardio . . . . .	2
1.1.2 Istologia del pericardio . . . . .	3
1.1.3 Pericardio come biomateriale . . . . .	6
1.2 Valvole cardiache . . . . .	7
1.2.1 Malattie delle valvole cardiache . . . . .	8
1.3 Protesi valvolari . . . . .	9
1.3.1 Protesi valvolari meccaniche . . . . .	11
1.3.2 Protesi valvolari biologiche . . . . .	12
1.4 Valvole percutanee . . . . .	14
1.4.1 Tecniche di approccio percutaneo . . . . .	16
<b>2 Materiali e metodi</b>	<b>21</b>
2.1 Suddivisione dei campioni . . . . .	21
2.2 Trattamenti di decellularizzazione . . . . .	23
2.2.1 TriTDoc . . . . .	23
2.2.2 Tricol . . . . .	27
2.3 Analisi delle proprietà fisiche . . . . .	31
2.3.1 Analisi delle dimensioni . . . . .	31
2.3.2 Analisi della massa . . . . .	32
2.3.3 Analisi del volume . . . . .	32
2.3.4 Analisi dello spessore . . . . .	32
2.3.5 Analisi delle densità . . . . .	32
2.4 Prova di trazione . . . . .	33
2.4.1 Il sistema Bose electroforce . . . . .	33

2.4.2	Protocollo di prova . . . . .	37
2.4.3	Matlab . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Analisi dei risultati</b>	<b>47</b>
3.1	Calcolo del modulo elastico . . . . .	49
3.2	Effetti dei trattamenti su densità e spessore . . . . .	58
3.3	Effetti dei trattamenti su modulo elastico e rigidità . . . . .	59
3.4	Analisi statistiche . . . . .	61
3.4.1	T-Test . . . . .	61
3.4.2	ANOVA (Kruskall-Wallis) test . . . . .	64
3.5	Analisi preliminare del Pericardio Porcino . . . . .	66
3.5.1	Suddivisione dei campioni . . . . .	66
3.5.2	Confronto per zona ed orientamento . . . . .	67
3.5.3	Analisi su campioni con larghezza maggiore . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Discussione e conclusioni</b>	<b>71</b>
4.1	Confronto tra i campioni . . . . .	72
4.1.1	Pericardio Bovino . . . . .	72
4.1.2	Pericardio Porcino . . . . .	72
4.2	Studi futuri . . . . .	73
	<b>Bibliografia</b>	<b>75</b>

# Elenco delle figure

1.1	Schema degli strati nel pericardio . . . . .	1
1.2	Struttura del collagene . . . . .	5
1.3	Effetto elastico dell’elastina . . . . .	6
1.4	Le valvole cardiache . . . . .	8
1.5	Tipologie di protesi valvolari cardiache . . . . .	11
1.6	Esempio di bioprotesi valvolare percutanea . . . . .	14
1.7	Approcci per la sostituzione percutanea della valvola aortica stenotica. . . . .	17
2.1	Suddivisione dei campioni nel pericardio . . . . .	22
2.2	Esempio di fotografia con campione e righello utilizzata in <i>ImageJ</i> . . . . .	31
2.3	Il sistema Bose Electroforce . . . . .	34
2.4	Celle di carico da 100lb, 50lb, 5lb . . . . .	34
2.5	Configurazione monoassiale con bagno salino . . . . .	35
2.6	DMA grips con “wafer” di balsa . . . . .	36
2.7	Finestra di lavoro di WinTest . . . . .	37
2.8	Finestra di TuneQ con protocollo di prova . . . . .	38
2.9	Esempio di grafico Load/Displacement nella Scope Window . . . . .	39
2.10	Finestra grafica del CurveFit Toolbox . . . . .	41
2.11	Finestra <i>Fitting</i> con impostate polinomiali di primo grado . . . . .	42
2.12	Finestra <i>Exclude</i> . . . . .	43
2.13	Fitting con polinomiali di sesto grado . . . . .	44
2.14	Finestra <i>Analysis</i> . . . . .	45
3.1	Effetti dei trattamenti su <i>densità e spessore</i> . . . . .	59
3.2	Effetti dei trattamenti su <i>modulo elastico e rigidità</i> . . . . .	60
3.3	Modulo elastico del pericardio porcino per zona ed orientamento. . . . .	67
3.4	Modulo elastico pericardio porcino nativo con campioni da 5mm . . . . .	70





# Elenco delle tabelle

3.1	Dati Matlab Nativi . . . . .	52
3.2	Analisi meccanica Nativi . . . . .	53
3.3	Dati Matlab TriCol . . . . .	54
3.4	Analisi meccanica Tricol . . . . .	55
3.5	Dati Matlab TriTDoc . . . . .	56
3.6	Analisi meccanica TriTDoc . . . . .	57
3.7	Densità media dei campioni . . . . .	58
3.8	Spessore medio dei campioni . . . . .	58
3.9	Rigidità media dei campioni . . . . .	60
3.10	Modulo elastico medio dei campioni . . . . .	60
3.11	T-Test spessore . . . . .	62
3.12	T-Test densità . . . . .	63
3.13	T-Test modulo elastico . . . . .	63
3.14	Analisi A-NOVA Kruskal-Wallis modulo elastico . . . . .	64
3.15	Dati Matlab Porcino nativo . . . . .	68
3.16	Analisi meccanica Porcino nativo . . . . .	69
3.17	Dati Matlab Porcino nativo con campioni da 5mm . . . . .	70
3.18	Analisi meccanica Porcino nativo con campioni da 5mm . . . . .	70



# Abstract

I più recenti dispositivi protesici valvolari cardiaci (valvole cardiache percutanee) vengono realizzati sagomando porzioni di pericardio bovino o porcino, ancorate ad uno stent metallico espandibile.

Il pericardio, in quanto tessuto xenogenico, richiede di esser sottoposto a procedimenti di decellularizzazione per evitare problemi di rigetto. Diviene quindi indispensabile valutare come tali procedure alterino non solo le proprietà fisiche del tessuto biologico ma anche e soprattutto le sue proprietà meccaniche. In questa tesi sperimentale sono stati sottoposti a prova di trazione monoassiale campioni di pericardio bovino e porcino, mettendo a confronto la resistenza del tessuto nativo con quella del tessuto trattato con due diversi metodi (TriCol e TriTDoc); per eseguire i test è stato impiegato il sistema Bose Electroforce. I risultati che sono stati raccolti consentono una utile comparazione fra i due metodi di decellularizzazione.



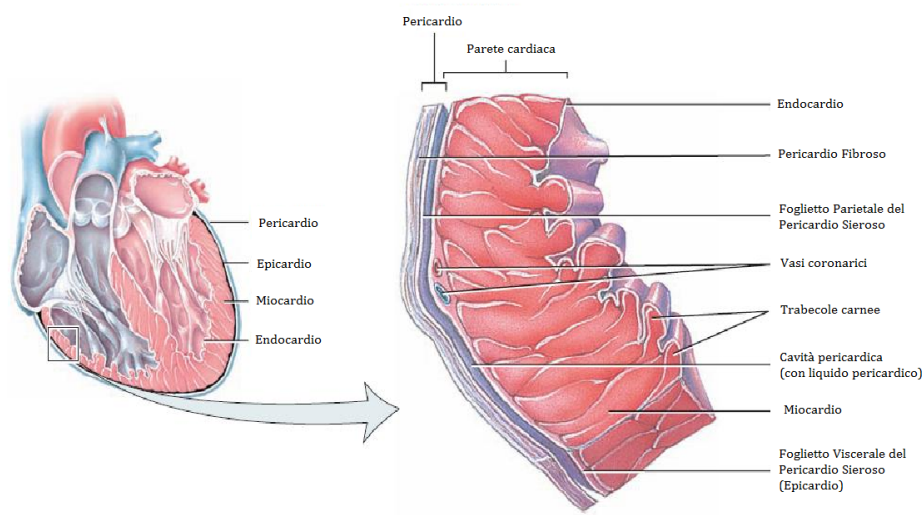
# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Il pericardio

Il pericardio è una sacca fibrosa che avvolge il cuore e lo sostiene all'interno del mediastino, inguainando anche i tratti iniziali del tronco polmonare e dell'aorta, le terminazioni delle vene cave e quelle delle vene polmonari. Forma e dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore, che è libero di muoversi al suo interno in relazione alle variazioni di volume durante il ciclo cardiaco [1].

La sacca pericardica è in realtà composta da 2 membrane, il *pericardio sieroso* ed il *pericardio fibroso*.



**Figura 1.1:** Schema degli strati nel pericardio

**Pericardio sieroso** È un sacco chiuso che circonda il cuore in cui si possono distinguere 2 foglietti, uno parietale ed uno viscerale, contigui solo attorno ai grossi vasi alla base del cuore [Fig 1.1].

Il *foglietto parietale* è molto sottile e tappezza la faccia interna del pericardio fibroso, da cui non può essere staccato. E' costituito da cellule piatte o cubiche, sostenute da un sottile strato di tessuto connettivo ricco di fibre di collagene ed elastina che, direttamente in continuità con il tessuto del pericardio fibroso, rende impossibile la separazione dei due strati.

Il *foglietto viscerale* non è altro che l'epicardio, che riveste esternamente il miocardio [2].

Tra i due foglietti è presente una cavità molto sottile in cui è presente una piccola quantità di liquido pericardico trasparente e leggermente vischioso (nell'uomo è normalmente di 2 o 3 ml), grazie al quale i due foglietti possono scivolare liberamente l'uno sull'altro.

**Pericardio fibroso** È un sacco sottile, ma resistente e inestensibile, la cui forma riproduce praticamente quella del cuore.

Presenta infatti una forma conica, leggermente appiattita da un lato all'altro nei mammiferi domestici, in senso dorso-ventrale nell'uomo. Il suo asse maggiore è orientato come quello del cuore, con l'apice diretto verso l'angolo sterno-diaframmatico e con la base che avvolge i grossi vasi, arteriosi e venosi. Il suo colore è biancastro o madreperlaceo.

La faccia interna di questa lamina fibrosa è a contatto diretto con il foglietto parietale del pericardio sieroso, dal quale non può essere separata.

La sua faccia esterna è rivestita da epipericardio ed è unita alla lamina mediastinica della pleura, mediante un sottile strato di tessuto connettivo lasso, che in certi punti diviene adiposo, permettendone così la separazione tramite dissezione.

Foglietto parietale del pericardio sieroso, pericardio fibroso ed epipericardio, formano il *pericardio parietale* [2].

### 1.1.1 Collocazione del pericardio

Nell'uomo, il pericardio aderisce al diaframma tramite tessuto connettivo lasso a livello periferico mentre, nella zona centrale, l'unione è più intima, con le formazioni fibrose di entrambe i tessuti che si confondono tra loro.

Nei mammiferi domestici, invece, pericardio e diaframma sono separati dal mediastino caudale, dove è presente il legamento freno-pericardico.

Sia nell'uomo che nei ruminanti e nel maiale, il pericardio è unito allo sterno mediante due brevi legamenti sterno-pericardici, rispettivamente superiore ed inferiore [3].

Infine, tralci fibrosi accompagnano i grossi vasi unendo la base del cuore ed il pericardio alle pareti ed agli altri organi toracici; in questo modo il cuore può rimanere sospeso nella regione mediastinica in modo stabile ed al contempo elastico.

### 1.1.2 Istologia del pericardio

Il pericardio parietale, come detto sopra, è costituito da 3 strati:

1. Il foglietto parietale dello strato sieroso, il più interno che guarda la cavità pericardica, formato da cellule mesoteliali.
2. Lo strato fibroso, intermedio, formato da tessuto connettivo.
3. L'epipericardio, il più esterno [4].

Solitamente, con il termine *Pericardio* ci si riferisce implicitamente al solo pericardio parietale, ignorando l'epicardio (foglietto viscerale del pericardio sieroso).

L'epipericardio è formato da uno strato di cellule pavimentose dotate di microvilli.

Lo strato sieroso è tappezzato da cellule mesoteliali organizzate a formare un epitelio pavimentoso semplice.

Lo strato fibroso, infine, è costituito da tessuto connettivo denso in cui si identificano una componente cellulare propria (fibroblasti) e una matrice extracellulare (ECM) [5]. I fibroblasti sono le cellule principali dei tessuti connettivi, di forma allungata e con vari prolungamenti, che sintetizzano e secernono tutti i componenti della ECM: collagene, proteoglicani, glicoproteine ed i componenti macromolecolari delle fibre elastiche.

I fibroblasti del pericardio sintetizzano principalmente collagene di tipo I e III [5]. La ECM, oltre alla funzione di sostegno, svolge anche un ruolo fondamentale nella modulazione della proliferazione, del differenziamento e dell'orientamento cellulare. Nei tessuti connettivi fibrosi densi a funzione meccanica, come il

pericardio, l'estensione della ECM è generalmente più abbondante della componente cellulare e la circonda completamente determinando così le proprietà fisiche del tessuto stesso.

Nella ECM si distinguono 3 componenti principali:

- La *sostanza fondamentale amorfa*, che permette la diffusione delle sostanze nutrienti e dei cataboliti.
- Le *proteine fibrillari* (collagene, elastina), responsabili dell'elasticità e della resistenza meccanica del tessuto [6].
- La *membrana basale*.

**Sostanza Fondamentale Amorfa** È un gel altamente idratato, omogeneo e trasparente, che regola gli scambi di nutrienti e cataboliti tra sangue e tessuto e regola la migrazione cellulare attraverso la ECM. Le 2 classi di macromolecole che la compongono sono i proteoglicani e le glicoproteine.

I *proteoglicani* (PGs) sono complesse strutture molecolari costituite da un asse di ialuronato su cui, ogni 40 nm circa, si inseriscono delle unità proteiche, legate in modo non covalente. Ogni proteina, a sua volta, lega covalentemente a se dei glicosaminoglicani (GAGs), molecole molto lunghe in cui si ripetono delle unità disaccaridiche legate insieme a formare delle macromolecole lineari [7] [8]. I GAGs presentano un'elevata concentrazione di cariche negative e una spiccata idrofilicità; ciò gli consente di assorbire grandi quantità di acqua, assolvendo ad un importante ruolo meccanico e biologico. In soluzione inoltre assumono una conformazione a spirale, conferendo al tessuto caratteristiche di plasticità e resistenza alla compressione [9]. Nel pericardio sono relativamente scarsi e i più rappresentati sono il condroitinsolfato ed il dermatansolfato.

Nella sostanza fondamentale amorfa si trovano anche alcune glicoproteine quali laminina e fibronectina.

La *fibronectina* è una glicoproteina strutturale dimerica, che esiste sia in forma solubile che in forma tissutale, seconda solo al collagene, per quantità, nella ECM, particolarmente rappresentata nella sottomucosa, nella membrana basale e nel tessuto interstiziale. Grazie a specifici domini di legame per gli altri componenti della ECM e per le proteine trans-membrana delle cellule, svolge un ruolo centrale nell'adesione e migrazione cellulare.

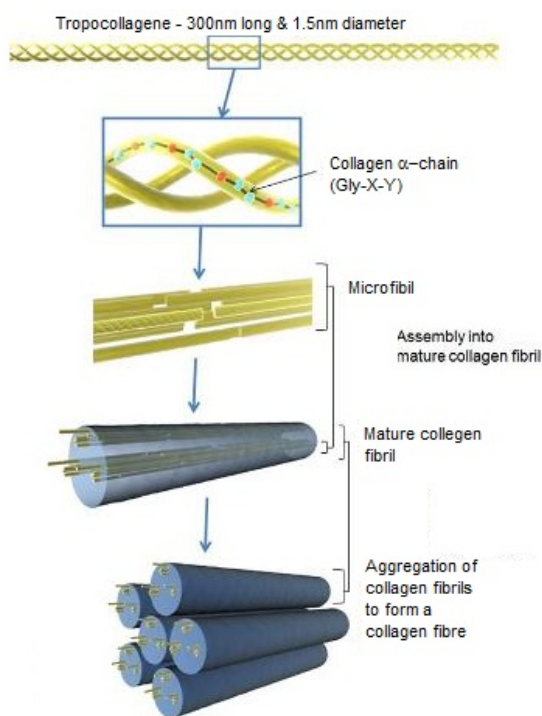
La *laminina* è un'altra proteina strutturale di adesione della ECM, localizzata



soprattutto a livello della membrana basale. È uno dei fattori più importanti nella differenziazione, migrazione, crescita e adesione delle cellule epiteliali alla membrana basale [10].

### Proteine fibrillari

*Collagene*: attualmente si conoscono una ventina di tipi di collagene geneticamente e immunologicamente distinti. I collagene interstiziali di tipo I e III sono presenti nel tessuto pericardico. Il collagene IV assieme alla laminina e ai PGs, contribuisce alla formazione di aggregati laminari quali le membrane basali.



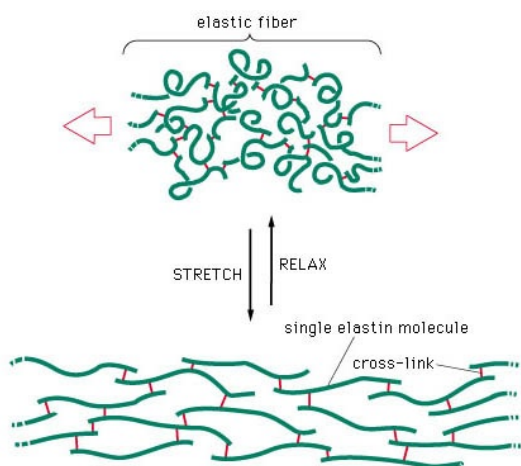
**Figura 1.2:** Struttura del collagene

La caratteristica peculiare di una tipica molecola di collagene è la sua struttura a tripla elica di catene proteiche (catene  $\alpha$ , ognuna composta da circa 1000 amminoacidi) contenenti sequenze regolarmente ripetute di Gly-X-Y, dove X e Y sono solitamente rappresentate da prolina, idrossiprolina, idrossilisina e alanina. La molecola che ne risulta, detta *tropocollagene*, raggiunge una lunghezza di circa 300 nm e un diametro di 1,5 nm [11]. Le unità di tropocollagene si associano testa-coda e parallelamente tra loro a formare *fibrille* di collagene (40-200 nm di diametro e lunghe centinaia di micrometri). Generalmente le fibrille si aggregano lateralmente e longi-

tudinalmente a formare le *fibre collagene* che poi si associano in fasci più o meno ondulati, di spessore variabile. In ogni fascio, le singole fibre collagene sono parallele tra loro [12]. Nel pericardio bovino la componente collagenica è del 90% del tipo I e per il restante 10% del tipo III, mentre nel porcino la concentrazione è rispettivamente 80% e 20% [Fig 1.2][13].

*Elastina*: l'elastina è un componente molto importante del tessuto connettivo e del pericardio nello specifico, dove è presente in quantità pari al 5-6% [14]. È una proteina fibrosa idrofobica e non glicosilata di 830 amminoacidi (72 KDa),

che come il collagene è ricca di prolina e glicina ma, a differenza di quest'ultimo, contiene poca idrossiprolina ed è priva di idrossilisina. Viene sintetizzata e secreta nella ECM dai fibroblasti elastogenici sotto forma di tropoelastina, un precursore che si organizza con legami covalenti (cross-link) in una struttura molecolare altamente polimerizzata e random, dando origine a fibre di elastina.



**Figura 1.3:** Effetto elastico dell'elastina

collagene ed ai PGs, contribuisce all'architettura tissutale e consente ai tessuti, come il pericardio, di recuperare le dimensioni originali dopo l'allungamento [Fig1.3].

Le fibre elastiche sono composte per più del 90% da una porzione apparentemente amorfa costituita da elastina e per il restante 10% da microfibrille (di diametro 10-12 nm), costituite dalla proteina microfibrillina e da una glicoproteina associata, la MAGP (glicoproteina associata alle microfibrille). Le fibre elastiche del tessuto subiscono modificazioni durante la vita dei mammiferi superiori: sono meno densamente distribuite proporzionalmente all'età dell'individuo [15]. La presenza di elastina, assieme alle fibre

**Membrana basale** È una lamina di matrice extracellulare che separa gli epitelii dal tessuto connettivo. Nel caso del pericardio, la membrana basale separa il mesotelio della sierosa parietale dal suo foglietto fibroso. È prodotta dalle stesse cellule che vi risiedono e modula l'adesione, il differenziamento, la morfogenesi, la divisione e la mobilità cellulare nonché lo scambio selettivo di molecole tra le cellule ed il fluido interstiziale [16].

### 1.1.3 Pericardio come biomateriale

Il pericardio di vari mammiferi (bovino, porcino, ovino ed umano) è un tessuto ampiamente utilizzato sia a scopo chirurgico che sperimentale.

In ambito neurochirurgico, per esempio, il pericardio bovino ed ovino sono

impiegati per la riparazione della dura madre in seguito a patologie delle meningi o a traumi di natura chirurgica/meccanica [17], negli interventi di tracheoplastica infantile è utilizzato allo scopo di correggere l'anomala saldatura degli anelli tracheali cartilaginei [18]. Inoltre, nella chirurgia maxillo-facciale, il pericardio bovino consente la ricostruzione del pavimento orbitario nella regione orbito-zigomatica, in seguito a fratture, in virtù del suo buon adattamento al sito di impianto [19]. Altri ambiti chirurgici in cui è utilizzato sono la chirurgia oftalmica e otorinolaringoiatrica.

L'ambito in cui vi è il maggior impiego del tessuto pericardico è però quello cardiocirurgico. Negli interventi su pazienti pediatrici con cardiopatie congenite, il patch pericardico è utilizzato per riparare il setto interventricolare o interatriale, separando così il circolo sistemico (gestito dal ventricolo sinistro) da quello polmonare (gestito dal ventricolo destro)[20]. In modo simile, il patch pericardico consente anche la correzione chirurgica di anomalie delle arterie coronarie [21] e la riparazione del setto interventricolare dopo rottura post-infartuale. Inoltre, in ambito cardiovascolare, il pericardio bovino è il materiale di eccellenza per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee): tali valvole biologiche sono costruite ex-novo utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene e uno spessore tissutale costante [22].

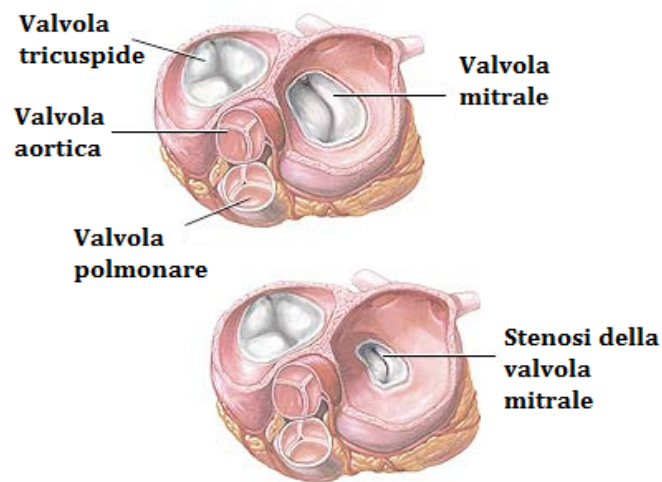
A lungo il pericardio è stato considerato un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle Bioprotesi, tuttavia, le protesi in pericardio bovino hanno dimostrato una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, comporterebbe una maggiore durata della valvola stessa [15].

## 1.2 Valvole cardiache

Le valvole cardiache sono le strutture che regolano il flusso del sangue all'interno del cuore. Sono delle appendici di tessuto fibroso, rivestite da endocardio, che controllano il passaggio del sangue attraverso gli orifizi che collegano gli atri con i ventricoli ed i ventricoli con aorta o arteria polmonare [Fig 1.4].

Le valvole cardiache sono quattro:

- tricuspide;
- mitrale (o bicuspide);
- aortica (con tre cuspidi semilunari);
- polmonare (con tre cuspidi semilunari);



**Figura 1.4:** Le valvole cardiache

L'apertura e la chiusura delle valvole dipende esclusivamente dalle variazioni di pressione interne al cuore durante il ciclo cardiaco, senza alcun tipo di controllo da parte del sistema nervoso e muscolare; in tal modo è il solo flusso sanguigno a muoverle. Il compito principale delle valvole cardiache, infatti, è quello di impedire il riflusso di sangue verso gli atri durante la contrazione ventricolare (sistole) o verso i ventricoli durante la fase di rilascio ventricolare (diastole), garantendo un'ottimale resistenza passiva [23].

### 1.2.1 Malattie delle valvole cardiache

Le disfunzioni delle valvole cardiache stanno attirando una crescente attenzione nella medicina cardiovascolare. Questo a causa del cambiamento nella loro insorgenza, e quindi della loro gestione, avvenuto negli ultimi 60 anni.

Si stima che la prevalenza di queste disfunzioni sia del 2.5% nella popolazione degli USA e sia in netta crescita dopo i 65 anni. Nei paesi industrializzati, infatti, da una eziologia reumatica delle disfunzioni si è passati a un'eziologia prevalentemente degenerativa in seguito, soprattutto, all'invecchiamento della popolazione con una conseguente diversificazione delle caratteristiche dei pazienti e della distribuzione del tipo di lesioni valvolari [24].

In Europa i due tipi più comuni di disfunzioni valvolari sono la stenosi aortica (SA) e l'insufficienza mitralica [25].

Le cause principali della SA possono essere la calcificazione di una valvola aortica bicuspidale, la disfunzione post-infiammatoria fibrocalcifica e la degenerazione senile [26]. Al giorno d'oggi però, a causa dell'allungamento della vita media nei paesi industrializzati e del conseguente invecchiamento della popolazione (oltre che ad una più frequente diagnosi per mezzo dell'uso esteso dell'ecocardiografia), è proprio la disfunzione degenerativa senile ad essere la causa più comune di SA, tanto che risulta essere la lesione più comune per cui viene richiesto un trattamento [27][23].

Nella SA vi è un impedimento allo svuotamento del ventricolo sinistro a causa della degenerazione della valvola [Fig 1.4]. La degenerazione è causata da un attivo rimodellamento valvolare che coinvolge processi infiammatori e di calcificazione simili a quelli dell'aterosclerosi [28]. La SA inizialmente causa un incremento del carico sul ventricolo sinistro compensato con ipertrofia concentrica, ma gradualmente produce una disfunzione ventricolare, sintomi di dispnea, sincope ed angina e anche morte improvvisa [29]. Macroscopicamente la SA degenerativa è caratterizzata da ispessimento e irrigidimento dei lembi associati alla presenza di calcificazioni sul lato aortico.

Il trattamento di questa disfunzione è tipicamente impiegato per i pazienti sintomatici ed è principalmente costituito dalla sostituzione della valvola disfunzionante con una protesi valvolare.

### 1.3 Protesi valvolari

Le protesi valvolari differiscono tra loro per diverse caratteristiche: il profilo emodinamico, la durata, l'area orificiale effettiva e la trombogenicità [Fig 1.5] [16].

Possono essere divise in due grandi gruppi:

- Di tipo meccanico.
- Di tipo biologico: *Autograft* (con tessuto prelevato dall'individuo stesso), *Allograft* (umane, rimosse post mortem) e *Xenograft* (o *Heterograft*) (prelevate da specie non umane).

Le prime sono realizzate interamente con materiali sintetici. Le seconde sono invece valvole realizzate, seppur parzialmente nella maggior parte dei casi, con tessuto biologico; fanno eccezione le valvole *autograft*, integralmente costituite di tessuto vivente [30].

Le valvole meccaniche presentano il vantaggio di avere una durabilità maggiore rispetto a quelle di tipo biologico (20-30 anni contro i 10-15 anni delle biologiche), favorendone l'impianto su quei pazienti che presentano un'aspettativa di vita piuttosto lunga; sono però trombogeniche e costringono il ricevente a terapie anticoagulanti per tutta la vita.

Le bioprotesi presentano invece il vantaggio di avere ottime caratteristiche emodinamiche e, non meno importante, l'esclusione dalla necessità di terapie anticoagulanti a lungo termine. I recenti studi a livello di design e di progettazione stanno inoltre portando questa categoria di valvole ad una maggiore resistenza nei confronti del deterioramento strutturale, incrementandone l'utilizzo sui pazienti più giovani.

Attualmente, nei paesi sviluppati, la percentuale delle valvole biologiche impiantate è del 55% con crescita annua dell'8%, mentre il mercato delle valvole meccaniche ha una crescita del solo 3-5% annuo su scala mondiale [31].

Originariamente nel 1962 il chirurgo Dr. Dwight Harken stilò i criteri essenziali con cui dovevano essere realizzati i sostituti valvolari cardiaci e li estese anche alle protesi derivate dall'ingegneria tissutale:

- Devono essere non ostruttivi e la loro chiusura deve essere tempestiva e completa.
- Devono essere costruiti con tessuto vivente non trombogenico che duri per tutta la vita del paziente.
- Devono essere sottoposti a un processo di rimodellamento che faciliti lo stato funzionale omeostatico e la riparazione di danni accumulati durante la vita del paziente.

- Devono rimodellarsi e crescere con la crescita fisiologica del paziente.

L'ultima caratteristica è particolarmente rilevante nelle sostituzioni valvolari pediatriche. Le esistenti protesi meccaniche e biologiche infatti, non hanno la capacità di crescere, rimodellarsi e ripararsi in risposta soprattutto alla crescita fisiologica dei pazienti pediatrici. Inoltre, in questa fascia della popolazione, la terapia anticoagulante richiesta dalle valvole meccaniche è particolarmente pericolosa e i sostituti valvolari tissutali vanno incontro a un processo di calcificazione molto accelerato. Tutto questo porta alla necessità di continui reinterventi cardiocirurgici. Nonostante i numerosi progressi fatti, attualmente, sia le protesi meccaniche che biologiche non posseggono tutte le caratteristiche di una valvola ottimale, come enunciate dal Dr. Harken [16].

### 1.3.1 Protesi valvolari meccaniche



**Figura 1.5:** Tipologie di protesi valvolari cardiache

Queste protesi hanno tutte una struttura base simile, caratterizzata da tre componenti fondamentali: l'*occlusore*, l'*alloggiamento* e l'*anello di sutura*.

L'occlusore è di solito realizzato grazie ad una o più parti mobili e rigide, di diverso tipo a seconda dei modelli. In alcuni modelli l'occlusore è rappresentato da una pallina, il cui movimento è limitato da una sorta di gabbietta; in altre protesi invece l'occlusore è costituito da un disco libero di "galleggiare" all'interno dell'alloggiamento e da un foglietto incernierato che può essere circolare o semicircolare.

L'alloggiamento include principalmente due elementi: una struttura simile ad una gabbia (*cage*) aiuta l'occlusore a spostarsi, guidandone e limitandone il

movimento, ed un corpo, detto *valve base*; quest'ultimo è costituito da un anello di metallo o di grafite rivestita da carbonio pirolitico, e sostiene i montanti della gabbia, fornendo inoltre lo spazio adeguato al posizionamento dell'occlusore.

L'anello di sutura, o *sewing cuff*, è una sorta di “polsino” di tessuto attaccato tutto intorno all'alloggiamento che, fornendo un sito dove cucire la valvola protesica al muscolo cardiaco, permette l'impianto del dispositivo.

La maggior parte delle valvole meccaniche contemporanee sono realizzate con carbonio pirolitico, materiale emocompatibile e che conferisce buone caratteristiche meccaniche alla protesi. Il *sewing cuff* invece è realizzato in tessuto sintetico (solitamente poliestere o PTFE), con o senza un filler fra le trame.

Le valvole meccaniche possono essere suddivise, a seconda del modello di flusso, in valvole a *flusso laterale* e valvole a *flusso centrale*; in ogni caso, come nelle valvole naturali, tutti i modelli lavorano sul principio del movimento passivo, in funzione della differenza di pressione e del cambiamento dei flussi sanguigni [23][31].

### 1.3.2 Protesi valvolari biologiche

Le prime valvole realizzate con tessuti biologici, sia “freschi” che trattati biologicamente, inizialmente si dimostrarono per lo più inaccettabili, a causa della loro rapida degenerazione. Attualmente le bioprotesi impiegate in cardiocirurgia, sono le così dette bioprotesi “man-made”, ideate da Carpentier e collaboratori e commercializzate a partire dal 1970 dagli Hancock Laboratories. Carpentier fu il primo in assoluto a sfruttare la glutaraldeide per la preservazione delle valvole biologiche, aumentandone l'affidabilità a lungo termine e diminuendone i fenomeni di degenerazione rispetto a quelle non trattate.

La glutaraldeide ha un efficace effetto citotossico che fissa le cellule dei tessuti, rendendo trascurabile la loro immunogenicità. I maggiori rischi legati all'impianto di valvole xenograft, ad esempio, sono dovuti alla tendenza, tipica dell'organismo umano, ad attaccare e rigettare tutto ciò che è “non self”; questo tipo di valvole, prima di essere impiantate, deve perciò subire necessariamente un processo di pre-trattamento, solitamente effettuato proprio con glutaraldeide [23]. Il trattamento con glutaraldeide però, pur prevenendo, anche se solo parzialmente [32], la risposta immunitaria causata dalle cellule xenogeniche, porta alla frammentazione della rete collagene-elastina interna al pericardio ed inoltre è una delle prime cause di calcificazione del tessuto biologico [33][34][23]. Attualmente, per scongiurare questo tipo di rischi, dopo il fissaggio viene effettuata l'estrazione della glutaraldeide residua, seguita da un processo di detossicazione e dall'applicazione di alcuni trattamenti anticalcificanti. Negli



ultimi anni sono state sviluppate diverse nuove tecniche per produrre bioprotesi valvolari, caratterizzate da diversi metodi di fissaggio e preservazione (oltre che da nuove tecniche di montaggio) al fine di rendere il più lento possibile il processo di calcificazione e degenerazione dell'impianto [23].

### **Bioprotesi pericardiche**

In alternativa alle protesi realizzate con valvole porcine, esiste un'altra categoria di valvole biologiche xenograft che utilizzano tessuto tipicamente prelevato da pericardio bovino.

In questo tipo di bioprotesi, in generale, il pericardio bovino ha uno spessore di 0.4 mm ed è suturato esternamente al supporto valvolare; ciò determina un lume valvolare più ampio rispetto a quello delle protesi porcine, offrendo così una performance emodinamica superiore rispetto alle valvole porcine.

La prima generazione di queste bioprotesi (le valvole Ionescu-Shiley) ha dimostrato problemi relativi alla progettazione ed è fallita rapidamente a causa soprattutto di rotture nei lembi valvolari. Per questo fu ritirata dal mercato alla metà degli anni '80. La seconda generazione di bioprotesi pericardiche (le CE Perimount) ha dimostrato un'emodinamica paragonabile alle valvole stentless ed è stata a lungo considerata la migliore, mostrando una durata di oltre 17 anni. Sfortunatamente, anche se più tardivamente, anche questa generazione di protesi va incontro a deterioramento principalmente per mineralizzazione delle cuspidi. Attualmente nella sostituzione valvolare aortica sono utilizzate le bioprotesi Ionescu-Shiley standard e low-profile, le CE Perimount, le Mitroow e le Sorin Pericarbon. Le valvole di I generazione erano in pericardio bovino, mentre quelle di II e III generazione, sono costituite da pericardio porcino [16]. Il trattamento chimico utilizzato nella produzione di queste bioprotesi è simile a quello eseguito per le valvole porcine: il tessuto viene sottoposto ad un processo di sterilizzazione e decellularizzazione, che ha l'obiettivo di rimuovere i marker biologici e minimizzare la risposta immunitaria da parte dell'organismo ricevente. In questo caso, però, durante il fissaggio con glutaraldeide, è necessario deformare il pericardio affinché ottenga e mantenga la geometria finale [23]. Infine, alcuni studi comparativi a distanza di 10 anni dall'operazione, tra xenograft porcini e valvole in pericardio bovino, impiantate in posizione mitralica, hanno dimostrato chiaramente una superiore durabilità delle seconde rispetto alle prime [35].

## 1.4 Valvole percutanee

L'impiego di tecniche percutanee transcateretere per il trattamento delle valvulopatie è rimasto limitato per lunghi anni agli interventi di valvuloplastica con pallone in pazienti selezionati affetti da stenosi mitralica oppure in soggetti con alcune cardiopatie congenite. La grande maggioranza delle malattie valvolari, soprattutto degenerative, è rimasta esclusa da questa modalità di trattamento. Oggi, il miglioramento tecnologico dei materiali e il disegno delle protesi, hanno permesso una relativa miniaturizzazione dei dispositivi. Di pari passo, il miglioramento nella definizione dell'anatomia valvolare, con l'aiuto di nuove tecniche di imaging, quali la tomografia assiale computerizzata multistrato e la risonanza magnetica, ha aperto nuovi orizzonti.

L'invecchiamento della popolazione, con un'aspettativa di vita ormai superiore agli 80 anni, parallelamente al miglioramento delle opzioni terapeutiche mediche e chirurgiche, ha aumentato notevolmente il numero dei pazienti anziani con patologie valvolari degenerative che necessiterebbero di un intervento valvolare riparativo o sostitutivo, ma il cui rischio operatorio è considerato troppo elevato per le patologie associate.

Attualmente l'offerta di nuove tecniche mini-invasive e percutanee di riparazione valvolare è cresciuta in maniera esponenziale determinando l'inizio di una nuova era nel trattamento delle patologie valvolari.



**Figura 1.6:** Esempio di bioprotesi valvolare percutanea

La difficoltà tecnica e la complessità della riparazione valvolare richiedono necessariamente la collaborazione tra cardiocirurghi, cardiologi interventisti, anestesisti ed ecocardiografisti, nonché esperti di imaging.

La decisione di eseguire tali procedure percutanee deve maturare in accordo tra cardiocirurghi e cardiologi interventisti in ogni singolo caso, tenendo in considerazione le spe-

specifiche lesioni anatomiche, il profilo di rischio operatorio del singolo paziente, nonché le aspettative cliniche in termini di miglioramento prognostico e della qualità di vita [23].

Attualmente tutte e 4 le valvole cardiache possono essere potenzialmente trattate, anche se l'utilizzo maggiore di questa tecnica è associato alle disfunzioni della

valvola aortica. Ad oggi, sono stati sviluppati almeno 30 differenti programmi di trattamento percutaneo da 24 differenti società. Almeno due modelli di valvole aortiche percutanee e cinque dei differenti sistemi di correzione percutanei dell'insufficienza mitralica sono attualmente in studio clinico e in uso nell'uomo; studi multicentrici di confronto con la terapia chirurgica tradizionale sono iniziati solo di recente. Il crescente ottimismo per il trattamento percutaneo valvolare, comunque, deve essere temperato dal necessario superamento di alcuni evidenti ostacoli, a causa dei quali, al momento, esso non può ancora considerarsi un accettabile sostituto del trattamento chirurgico. La valvola cardiaca percutanea (PHV) ideale dovrebbe infatti essere disponibile in diverse misure, avere un design biocompatibile, eccellenti proprietà emodinamiche, non interferire con le strutture perivalvolari e poter essere rilasciata attraverso cateteri di lume inferiore.

Allo stato attuale, invece, i dispositivi utilizzabili presentano diversi limiti:

- Limiti di accesso periferico, spesso determinati dalle dimensioni dei sistemi di rilascio: l'accesso venoso femorale richiede la puntura trans-settale e può causare danno funzionale o irreversibile all'apparato valvolare mitralico.
- Limiti di durata: attualmente non esistono dati sul follow-up a medio-lungo termine.
- Difficoltà di posizionamento.
- Rischio di migrazione della valvola: a differenza dei dispositivi convenzionali, le PHV non vengono cucite al tessuto naturale, ma solo posizionate in sede.

I risultati e le osservazioni finora ottenuti, confrontati con i dati dell'esperienza chirurgica, sono la base per delineare le aspettative future. I metodi di PHV attualmente disponibili dovranno essere valutati nell'arco dei prossimi anni per definirne con rigore fattori importanti come sicurezza, fattibilità ed efficacia a distanza. Durante questo periodo la riparazione chirurgica convenzionale resterà probabilmente la terapia prevalente, basandosi su solidi e provati risultati clinici con follow-up fino a 20 anni ed avvalendosi di numerose tecniche e altrettanto numerosi dispositivi, adattabili al singolo paziente, a seconda del tipo di disfunzione valvolare e delle singole caratteristiche anatomico-funzionali.

Un punto da considerare nelle prospettive future è senza dubbio il fatto che una procedura chirurgica molto meno invasiva, come quella offerta dai sistemi percutanei, potrebbe determinare un cambiamento sostanziale nelle indicazioni al trattamento di alcune malattie valvolari. Rimane di importanza cruciale definire quali pazienti possono e potranno beneficiare di un simile approccio; al momento esso è limitato a quelle categorie di soggetti con rischio chirurgico molto elevato o comorbilità significative, generalmente etichettati come “inoperabili”. Un campo di applicazione da tenere presente, inoltre, riguarda l'utilizzo delle PHV in pazienti di età avanzata, che presentano malfunzionamento di una protesi biologica precedentemente impiantata con l'intervento chirurgico standard. Il futuro dovrà svilupparsi sulla base di attenti trial clinici che comparino le procedure percutanee in termini di endpoint di sicurezza e di efficacia, ma anche valutino il miglioramento della classe funzionale, della qualità di vita e l'eventuale necessità di riospedalizzazione, rispetto ai risultati ottenuti con la chirurgia convenzionale e con la terapia farmacologica [36].

#### 1.4.1 Tecniche di approccio percutaneo

Esistono tre modalità di approccio percutaneo alla valvola aortica: l'approccio *anterogrado trans-settale*, l'approccio *retrogrado* e l'approccio *trans-apicale* (Fig 1.7).

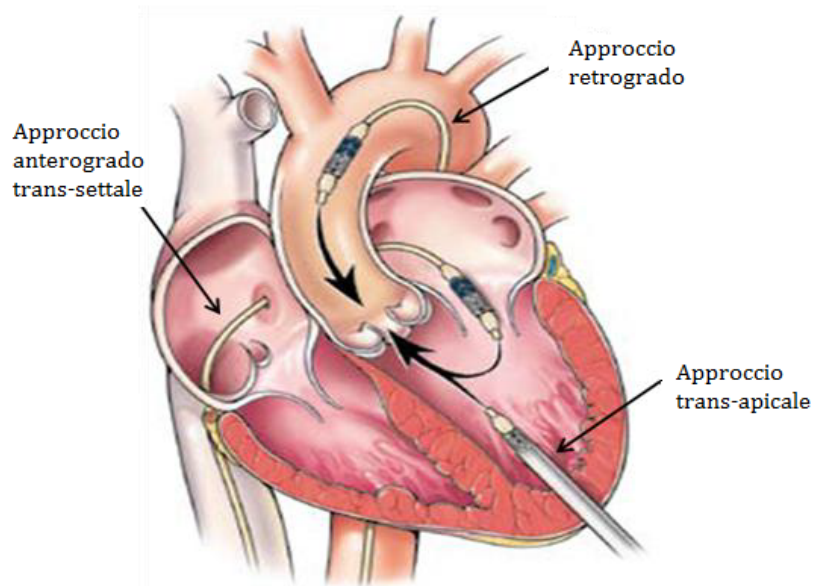
L'approccio anterogrado viene così definito poiché il catetere su cui è montata la valvola è diretto verso il cuore, attraverso il sistema venoso, quindi seguendo lo stesso verso del flusso sanguigno. Per contro, nell'approccio retrogrado, il catetere viene spinto fino al cuore tramite il sistema arterioso, e quindi nel verso opposto a quello del naturale scorrimento del sangue. In tutti e tre i casi, il posizionamento della valvola protesica è determinato dalla struttura e dall'anatomia della valvola nativa del singolo paziente, ed è guidato e monitorato grazie alle seguenti tecniche:

- Fluoroscopia: per stabilire il livello delle calcificazioni valvolari.
- Aortografia in varie proiezioni: eseguita all'inizio della procedura e ripetuta più volte durante il rilascio, per verificare il corretto allineamento rispetto al piano valvolare ed agli osti coronarici.
- Ecocardiografia trans-esofagea: può essere utile per una più accurata misura delle dimensioni dell'annulus aortico e quindi per una corretta

scelta delle dimensioni del dispositivo, oltre che per monitorizzare il posizionamento del dispositivo stesso e l'eventuale insorgenza di complicanze periprocedurali.

Quest'ultima metodica è utile soprattutto nei casi con calcificazioni di grado moderato.

Il valore aggiuntivo dell'ecocardiografia trans-esofagea tridimensionale deve ancora essere validato. Analoga situazione si ha con l'ecocardiografia intracardiaca, con la quale c'è ancora scarsa esperienza e che per il momento non sembra aggiungere informazioni di rilievo rispetto alla metodica trans-esofagea [37].



**Figura 1.7:** Approcci per la sostituzione percutanea della valvola aortica stenotica.

#### **Approccio anterogrado trans-settale**

Quello anterogrado fu l'approccio che venne utilizzato da Cribier e dal suo team per il primo impianto di valvola aortica con tecnica percutanea, nel 2002 (si trattava di una valvola di tipo balloon-expandable) [38].

Tale approccio prevede:

1. L'inserimento della valvola attraverso la vena femorale mediante un introduttore.
2. L'esecuzione di una puntura trans-settale.

3. Il passaggio della valvola protesica, mediante l'utilizzo di una guida di supporto rigida detta stiff, nell'atrio di sinistra attraverso la valvola mitralica e infine attraverso quella nativa stenotica.
4. L'esternalizzazione finale della guida di supporto dall'arteria femorale contro-laterale.

I principali vantaggi di tale metodica consistono nel fatto che il catetere su cui è montata la valvola viene introdotto attraverso la vena femorale, evitando in questo modo le problematiche delle ridotte dimensioni e della particolare tortuosità delle arterie femorali ed iliache, tipiche dei soggetti anziani. Fra gli svantaggi, invece, ci sono la necessità di una puntura trans-settale, possibili danni permanenti o temporanei alla valvola mitrale, causati dalla guida rigida che la attraversa, e la generale complessità della metodica. Allo stato attuale, tale approccio è stato quasi del tutto abbandonato in favore dell'approccio retrogrado.

### **Approccio retrogrado**

È considerato attualmente l'approccio di prima scelta per la maggior parte dei pazienti. In questo approccio si impiegano cateteri a maggior supporto che permettono un migliore allineamento coassiale della valvola percutanea e una maggiore spinta. Questa tecnica richiede l'inserimento di introduttori di calibro crescente nell'arteria femorale che, al termine della procedura, viene chiusa attraverso metodica classica di chirurgia vascolare oppure attraverso l'utilizzo di sistemi di sutura per via non chirurgica.

In alternativa all'accesso femorale, è possibile introdurre il dispositivo per via retrograda tramite l'arteria succlavia o ascellare, previo isolamento chirurgico delle stesse.

Tale approccio evita le eventuali complicanze funzionali o meccaniche sul lembo anteriore della valvola mitrale, non necessita della puntura trans-settale ed è tecnicamente più semplice. D'altra parte, esso può essere associato a lesioni dei vasi aorto-femorali, e a potenziali danni della protesi nell'attraversamento dell'arco aortico e/o della valvola stenotica stessa [39]. A causa di ciò, la procedura retrograda non consente il trattamento di quei pazienti che presentano severe tortuosità o calcificazioni a livello delle arterie iliache oppure di quei pazienti con arterie femorali di ridotto calibro (<6-7 mm).

### **Approccio trans-apicale**

Il posizionamento delle valvole con approccio trans-apicale ventricolare sinistro costituisce forse la terra di passaggio tra l'intervento cardiocirurgico classico di sostituzione valvolare aortica e l'impianto totalmente percutaneo. Questo approccio viene riservato a quei pazienti che presentano controindicazione alla tecnica retrograda ed è eseguito mediante anestesia generale da parte di un team che combina la presenza di cardiologi interventisti e cardiocirurghi.

Il procedimento è il seguente:

1. Esposizione dell'apice cardiaco mediante minitoracotomia antero-laterale (quinto spazio intercostale).
2. Viene eseguita una incisione a livello dell'apice cardiaco.
3. Viene inserito un introduttore emostatico e successivamente introduttori di calibro crescente.
4. La valvola viene posizionata, secondo l'approccio anterogrado, all'interno della valvola stenotica.
5. Al termine della procedura, il ventricolo sinistro viene suturato chirurgicamente ed il paziente monitorato in terapia intensiva post-cardiocirurgica per il tempo necessario ad ottenere una definitiva stabilità emodinamica [40].

Il vantaggio principale di questo tipo di tecnica consiste nel fatto che essa garantisce un accesso più diretto alla valvola aortica ed elimina il bisogno di accessi periferici di grandi dimensioni in tutti quei pazienti che soffrono di vasculopatie periferiche. Potenziali svantaggi, invece, sono collegati alla puntura apicale del ventricolo sinistro e includono: rimodellamenti negativi di tale ventricolo, aneurismi e pseudo-aneurismi ventricolari, complicazioni pericardiche, pneumotorace, aritmia ventricolare maligna, danni alle arterie coronarie e, questione tutt'altro che trascurabile, il bisogno di anestesia generale [39].





# Capitolo 2

## Materiali e metodi

### 2.1 Suddivisione dei campioni

Sono stati analizzati 9 pericardi bovini, prelevati dopo abbattimento al macello locale, ripartiti in 3 gruppi, a seconda del protocollo di decellularizzazione a cui sono stati successivamente sottoposti.

Dopo l'asportazione del cuore e della sacca pericardica annessa, è stato rimosso il grasso pre-pericardico; successivamente il pericardio è stato separato dal cuore, sezionandolo dall'attacco alla base del cuore ed attorno ai grandi vasi.

I pericardi del primo gruppo sono stati decellularizzati con il metodo TriCol (Triton X-100 e Colato di sodio), quelli del secondo gruppo con il metodo TriTDoc (Triton X-100 e TauroDeOssiColato di sodio) e quelli del terzo sono stati lasciati allo stato nativo, cioè non sono stati sottoposti ad alcun protocollo di decellularizzazione.

In accordo con le differenze tessiturali presenti nelle diverse aree del pericardio, è stata poi individuata una suddivisione, secondo le corrispondenze con le camere sottostanti, in pericardio del ventricolo anteriore sinistro (ALV) e pericardio del ventricolo posteriore destro (PRV).

La distinzione tra ventricolo anteriore e posteriore si ha semplicemente osservando il pericardio prima della dissezione dal cuore; quella tra ventricolo destro e sinistro, invece, è ottenuta osservando l'attaccamento dell'arteria coronarica discendente, facilmente distinguibile controluce, che permette d'individuare i due legamenti con lo sterno che indicano la divisione tra i ventricoli.

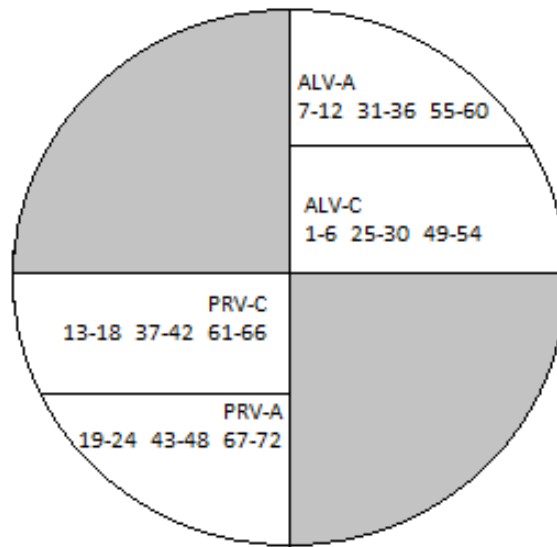
La scelta di queste due aree di pericardio, che sono state successivamente utilizzate per ricavare i campioni su cui effettuare analisi e confronti tra i pericardi

di ogni singolo animale, è stata presa sulla base della disposizione delle fibre di collagene presenti all'interno del tessuto; nell'ALV le fibre collagene hanno una disposizione più ordinata mentre nel PRV le proprietà analizzate presentano una grande variabilità tra gli individui.

Dall'analisi meccanica perciò ci si aspetta di riscontrare un comportamento complessivamente più resistente da parte di ALV rispetto a PRV.[16]

Ogni coppia di ALV e PRV, proveniente da uno stesso pericardio, è stata suddivisa in 4 ulteriori sotto-zone denominate C-ALV, C-PRV ed A-ALV, A-PRV rispettivamente più vicine e più distanti dall'apice del cuore.

Da ogni zona sono stati poi ricavati 6 campioni, per un totale di 24 campioni per pericardio, tagliati parallelamente all'asse di divisione ventricolo-atrio [Fig 2.1]. Tutti i campioni sono stati tagliati delle dimensioni di 20x3 mm<sup>2</sup> [41].



**Figura 2.1:** Suddivisione dei campioni nel pericardio

Riassumendo, i dati ottenuti a fine analisi sono stati ricavati testando:

- 72 campioni per trattamento.
- 18 per sotto-zona C-V per ogni trattamento.
- 36 per zona ALV-PRV per ogni trattamento.

## 2.2 Trattamenti di decellularizzazione

I protocolli di decellularizzazione vengono abitualmente utilizzati per rimuovere le cellule ed i residui cellulari dalla matrice extracellulare di un tessuto, in modo da minimizzare il rischio di eventuali reazioni antigeniche nel ricevente. Vengono in seguito riportate le sostanze ed i passaggi che descrivono i 2 protocolli utilizzati. Sono impiegate soluzioni tampone, inibitori di proteasi e soluzione fisiologica (utilizzata essenzialmente per lavaggi ed agente idratante durante il trasporto dei campioni).

Ogni protocollo è costituito da 3 step e numerosi lavaggi; per entrambe i trattamenti, 1 litro di soluzione fisiologica PBS contiene:

- 8 gr  $NaCl$ ;
- 0.2 gr  $KCl$ ;
- 1.5 gr di sodio idrogeno fosfato di-idrato dibasico  $Na_2HPO_4$ ;
- 0.2 gr fosfato di potassio monobasico  $KH_2PO_4$ ;

**ATTENZIONE:** Se i campioni fossero serviti per successivi esperimenti di semina cellulare, tutte le soluzioni utilizzate non avrebbero contenuto  $NaN_3$ , in quanto composto tossico per le cellule.

### 2.2.1 TriTDoc

#### Soluzioni Principali

**Tampone madre "A" (T.m.A)** Ascorbato di sodio o Acido Ascorbico ed Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) sciolti in PBS.

Viene utilizzata con sali antiox e inibitori di proteasi che necessitano substrati come ioni bivalenti. Per una migliore miscibilità dei soluti, è necessario utilizzare un agitatore con piastra calda, in quanto la reazione è endotermica.

- PBS;
- Ascorbato di sodio 100 mM - 19.8 gr/L; oppure
- Acido Ascorbico 100 mM - 17.61 gr/L;
- EDTA 50 mM - 18.6 gr/L;

pH fisiologico di 7.4 (nel caso va tamponato con  $NaOH$  o  $HCl$ ), filtrato, degasato e flussato ogni volta che è necessario aprire il contenitore (altrimenti l'acido ascorbico si ossida).

**Inibitori di proteasi** Vanno portati a volume con DMSO (dimetilsolfosido). La soluzione non va né filtrata (il DMSO scioglie la nitrocellulosa), né degasata (non è necessario visto che ci sono gli inibitori di proteasi).

Le soluzioni sono due (la ricetta è calcolata per un volume finale di 25 ml):

#### Inibitore A

- Phenylmethylsulfonyl Fluoride (P.M.S.F.) 400 mM, 1.74 gr;
- N-Ethylmaleimide (N.E.M.) 1 M, 3.13 gr;

Agiscono a livello del gruppo serinico inibendo le proteasi (alterano il sito catalitico delle proteasi).

#### Inibitore B

- Benzamidina 1 M, 2.57 gr;
- Iodoacetammide 200 mM, 0.93 gr;

Vengono portati a volume con DMSO e conservati a  $-20^{\circ}C$ .

#### Fisiologica

Viene utilizzata per lavaggi e per il trasposto del campione.

- 0.9 % di  $NaCl$ ;
- 0.04 % di  $NaN_3$ ;

filtrare.

### Protocollo e soluzioni secondarie

Il pericardio una volta prelevato viene posto in fisiologica o  $PBS + NaN_3$  per tutto il tempo relativo al trasporto. Una volta in laboratorio vengono dissezionate le radici aortiche e polmonari o il pericardio e i campioni posti in soluzione fisiologica fresca in tubi, e lasciate equilibrare sotto agitazione per 4 h a  $+4^{\circ}C$ .

I STEP con inibitori di proteasi:

*Nei tubi è stata tolta la fisiologica o il PBS e aggiunta la seguente soluzione contenente gli inibitori di proteasi:*

- 10 % di T.m.A.;
- 10 % di DMSO puro;

*Si porta a volume con acqua mQ e si aggiungono i seguenti volumi di inibitori:*

- 2 ml di inibitore → tubo grande circa 400 ml;
- 1,5 ml di inibitore → tubo piccolo circa 330 ml;

*non filtrare né degassare per i motivi discussi sopra.*

*I tubi vengono posti 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

*Lavaggio con soluzione ipotonica contenente:*

- 10 % di T.m.A.;
- 0.04 % di  $\text{NaN}_3$  in mQ;

*Vengono lavati via gli inibitori e il DMSO.*

*La soluzione va filtrata e degassata.*

*I tubi vengono posti 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

II STEP con inibitori di proteasi:

*Si sostituisce la soluzione dei tubi con una nuova soluzione costituita da:*

- 10 % T.m.A.;
- 1 % v/v TRITON X-100;

*portati a volume con acqua mQ.*

*Sul volume totale poi vanno aggiunti, a seconda dei tubi, 2 ml e 1,5 ml di inibitori. I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C, segue lavaggio con:*

- 10% T.m.A.;
- 0.1 % v/v TRITON X-100;
- 0.04 % di  $\text{NaN}_3$ ;

*portare a volume con acqua mQ.*

*La soluzione va filtrata e degasata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

*Soluzione ipertonica:*

- 10 % T.m.A.;
- 0.5 M NaCl (per 1 litro devono essere pesati 29.22 gr);
- 0.1 % TRITON X-100;
- 0.04 % NaN<sub>3</sub>;

*si porta a volume con PBS isotonico.*

*La soluzione va filtrata e degasata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C. Il lavaggio va effettuato per 2 volte.*

*Lavaggio con una soluzione costituita da:*

- 10 % T.m.A.;
- 0.1 % TRITON X-100;
- 0.04 % NaN<sub>3</sub>;

*il lavaggio va effettuato 2 volte e serve a togliere i sali.*

*Si porta a volume con acqua mQ per il primo lavaggio, con PBS per il secondo; la soluzione va filtrata e degasata.*

*I tubi vanno posti per 1.5 h sotto agitazione a + 4° C per il primo lavaggio, e a temperatura ambiente per il secondo (il colato a + 4° C tende a solidificare).*

### III STEP con aggiunta del TAURODEOSSICOLATO di SODIO:

*Nell'aggiunta del Taurodeossicolato di sodio si utilizza una soluzione costituita da:*

- 10 % T.m.A.;
- 4mM Taurodeossicolato (PM 521,7 gr/mol);
- 0.04 % NaN<sub>3</sub>;

*si porta a volume con PBS.*

*La soluzione deve risultare a pH fisiologico di 7.4, va filtrata e degasata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a temperatura ambiente (il colato a + 4° C varia di pH e gelifica). Il lavaggio va effettuato per 2*

volte.

Si effettuano lavaggi finali per togliere detergenti e residui di matrice, con PBS isotonico a pH fisiologico di 7.4 e 0.04 % di  $\text{NaN}_3$ .

La soluzione va filtrata e degasata.

I tubi vanno posti 1.5 h sotto agitazione.

Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

Il primo lavaggio viene tenuto a temperatura ambiente e serve per asportare residui di colato, il secondo lavaggio va mantenuto a  $+ 4^\circ \text{C}$ .

Lavaggio in fisiologica per 30 minuti.

Passaggio in soluzione fisiologica con aggiunta di 10 % di isopropanolo (toglie il colato di sodio e il TRITON).

La soluzione va filtrata e degasata.

I tubi vanno posti per 1 h sotto agitazione a  $+ 4^\circ \text{C}$ . Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

**ATTENZIONE:** Le soluzioni vanno preparate solo poco prima di essere utilizzate!

Conservazione in PBS o fisiologica +  $\text{NaN}_3$ .

### 2.2.2 Tricol

#### Soluzioni principali

**Tampone madre "A"** (concentrazione 10x):

- Ascorbato di sodio 100 mM - 19.8 gr/L
- EDTA 50 mM - 18.6 gr/L
- PBS come diluente pH fisiologico di 7.4

#### Inibitori di proteasi

Inibitore A

- P.M.S.F. 400 mM, 1.74 gr
- N.E.M. 1 M, 3.13 gr

Agiscono a livello del gruppo serinico inibendo le proteasi (alterano il sito catalitico delle proteasi).

### Inibitore B

- Benzamidina 1 M, 2.57 gr
- Iodoacetammide 200 mM, 0.93 gr

Entrambi vengono portati a volume con DMSO e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Protocollo e soluzioni secondarie

Il pericardio, una volta prelevato, viene posto in fisiologica o  $PBS + NaN_3$  per tutto il tempo relativo al trasporto.

Una volta in laboratorio il pericardio viene dissezionato e i campioni sono successivamente posti in soluzione fisiologica fresca in tubi e lasciati equilibrare sotto agitazione per 4 ore a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

I STEP con inibitori di proteasi:

*Nei tubi è stata tolta la fisiologica o il PBS e aggiunta la seguente soluzione contenente gli inibitori di proteasi:*

- 10% di T.m.A.;
- 10% di DMSO;
- Acqua deionizzata;

*Si porta a volume con acqua mQ e si aggiungono i seguenti volumi di inibitori:*

- 2.0 ml di inibitore  $\rightarrow$  tubo grande circa 400 ml;
- 1.5 ml di inibitore  $\rightarrow$  tubo piccolo circa 330 ml;

*Non filtrare né degassare.*

*I tubi vengono posti 8 ore sotto agitazione a  $+4^{\circ}\text{C}$ .*

*Lavaggio con soluzione ipotonica contenente:*

- 10% di T.m.A.;
- 0.04% di  $NaN_3$  in acqua mQ;

*Vengono lavati via gli inibitori e il DMSO.*

*La soluzione va filtrata e degassata.*



*I tubi vengono posti 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

II STEP con inibitori di proteasi:

*Si sostituisce la soluzione dei tubi con una nuova soluzione costituita da:*

- 10% T.m.A.
- 1% v/v TRITON X-100.

*Portati a volume con acqua mQ.*

*Sul volume totale poi vanno aggiunti, a seconda dei tubi, 2 ml e 1.5 ml di inibitori.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

*Lavaggio con:*

- 10% T.m.A.
- 0.1% v/v TRITON X-100.
- 0.04% di  $\text{NaN}_3$ .

*Portare a volume con acqua mQ.*

*La soluzione va filtrata e degassata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

*Lavaggio con soluzione ipertonica:*

- 10% T.m.A.
- 0.5 M NaCl, per 1 litro devono essere pesati 29.22 gr.
- 0.1% TRITON X-100.
- 0.04%  $\text{NaN}_3$ .

*Si porta a volume con PBS isotonic.*

*La soluzione va filtrata e degassata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4° C.*

*Lavaggio con una soluzione costituita da:*

- 10% T.m.A.
- 0.1% TRITON X-100.
- 0.04%  $\text{NaN}_3$ .

*Effettuato 2 volte, serve a togliere i sali; si porta a volume con acqua acqua mQ per il primo lavaggio, con PBS per il secondo.*

*La soluzione va filtrata e degassata.*

*I tubi vanno posti per 1.5 h sotto agitazione a + 4° C per il primo lavaggio, e a temperatura ambiente per il secondo (il colato a + 4° C tende a solidificare).*

### III STEP con aggiunta del COLATO di SODIO:

*Si utilizza una soluzione costituita da:*

- 10% T.m.A.
- 10 mM di colato di sodio o 10 mM Cholic acid (P.M. 408.58 gr/mol).
- 0.04% NaN<sub>3</sub>.

*Si porta a volume con PBS.*

*La soluzione deve risultare a pH fisiologico di 7.4, va filtrata e degassata.*

*I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a temperatura ambiente (il colato a + 4° C varia di pH e gelifica).*

*Seguono lavaggi finali per togliere detergenti e residui di matrice effettuati con:*

- PBS isotonic a pH fisiologico di 7.4 e 0.04% di NaN<sub>3</sub>.

*La soluzione va filtrata e degassata.*

*I tubi vanno posti 1.5 h sotto agitazione.*

*Il lavaggio va effettuato per 2 volte; il primo lavaggio viene tenuto a temperatura ambiente e serve per asportare residui di colato, il secondo lavaggio va mantenuto a + 4° C.*

*Lavaggio in fisiologica:*

- 0.9% NaCl + 0.04% NaN<sub>3</sub> per 30 minuti.
- Passaggio in soluzione fisiologica.
- 0.9% NaCl + 0.04% NaN<sub>3</sub> + 10% di isopropanolo (toglie il colato di Na e il TRITON).

*La soluzione va filtrata e degassata.*

## 2.3 Analisi delle proprietà fisiche

Per valutare gli effetti dei diversi protocolli di decellularizzazione sul pericardio, sono stati misurati l'area, la massa, la densità, il volume e lo spessore di tutti i campioni successivamente sottoposti all'analisi meccanica.

### 2.3.1 Analisi delle dimensioni

I campioni di tessuto sono stati posizionati in una piastra Petri e coperti con un vetrino porta-oggetto per istologia, in modo da distenderli. È stato aggiunto PBS per mantenere l'idratazione e assicurare la completa distensione dei campioni, sui cui lati è stato posizionato un nonio, in modo da avere un'unità di misura di riferimento.

Tutti i campioni sono stati quindi fotografati con macchina fotografica digitale Canon EOS50D con macro obiettivo Canon EF 100 mm, mantenuta ad una distanza fissa di 20 cm dal piano fotografato.



**Figura 2.2:** Esempio di fotografia con campione e righello utilizzata in *ImageJ*

La misurazione dell'area è stata effettuata utilizzando il programma *Mac-Biophotonics ImageJ 1,42I*.

Questo programma di elaborazione digitale delle immagini, sviluppato dalla N.I.H. degli Stati Uniti e basato su Sun-Java (multi-piattaforma, freeware e con open architecture), permette di tracciare il contorno del campione di pericardio a partire dalle immagini digitali e misurarne l'area, prendendo il righello, fotografato accanto al campione, come riferimento [Fig 2.2].

Come larghezza dei campioni, sono stati invece utilizzati dei valori medi, calcolati su 3 misure al centro di ogni campione.

### 2.3.2 Analisi della massa

I campioni, sospesi in PBS, sono stati asciugati su carta da filtro-assorbente (Whatman, Schelicher & Schuell), posizionati in una piastra Petri, usata come tara, e pesati con una bilancia analitica (Sartorius research).

### 2.3.3 Analisi del volume

Il volume di ogni campione è stato calcolato utilizzando la formula:

$$V = \frac{m}{\rho}$$

dove:

$m$  è la massa in g

$\rho$  è la densità in g/ml

### 2.3.4 Analisi dello spessore

Lo spessore medio di ogni campione è stato calcolato utilizzando la seguente formula:

$$S = \frac{V}{A}$$

dove:

$S$  è lo spessore medio in cm

$V$  è il Volume in  $cm^3$

$A$  è l'area in  $cm^2$

### 2.3.5 Analisi delle densità

L'analisi di densità dei campioni è stata effettuata per via indiretta.

Viene preparata una scala di soluzioni di Percoll (Sigma-Aldrich), disciolto in PBS 10X, di densità diversa nota.

Per consentire una misura precisa della densità, l'esperimento è stato condotto a temperatura costante ( $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) mantenendo le soluzioni sempre ben

miscelate, in modo che le microparticelle di Percoll fossero distribuite uniformemente.

Iniziando dalla densità minore, i singoli campioni vengono immersi in successione, uno alla volta, dentro ad ogni becker contenente le diverse soluzioni di riferimento, osservandone la fluttuazione: se il campione precipita vuol dire che la sua densità è maggiore di quella della soluzione di riferimento utilizzata, quindi si ripete l'operazione passando alla soluzione con densità superiore.

Il procedimento prosegue fino a quando il campione rimane in sospensione nella soluzione (cioè non va in superficie né precipita); al campione viene quindi assegnata la densità della soluzione in cui è immerso.

Nel caso non si riscontri la situazione di galleggiamento per nessuna soluzione di riferimento, si assegna al campione il valore medio delle densità della coppia di soluzioni di riferimento, con densità contigue, tali che in quella a densità minore il campione precipiti, mentre in quella a densità maggiore, galleggi.

## 2.4 Prova di trazione

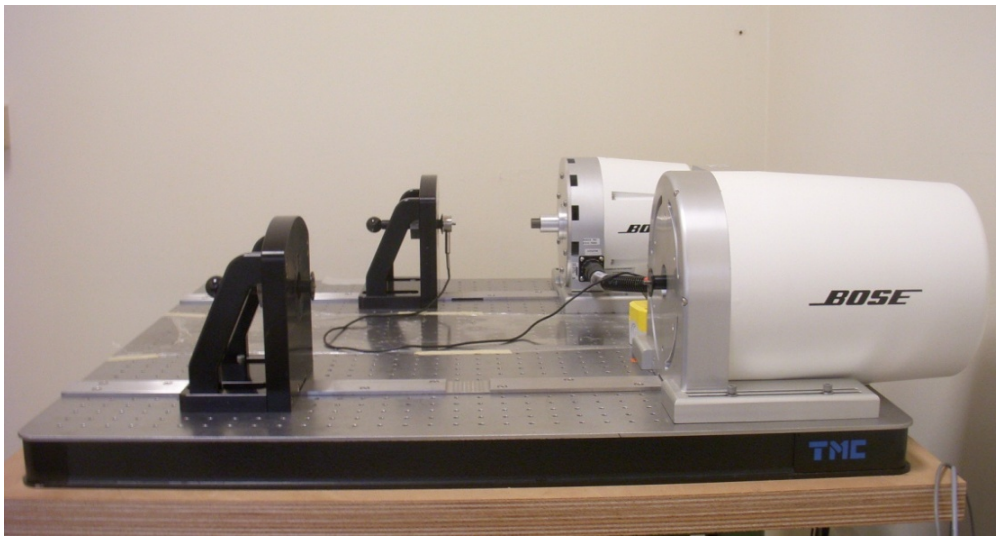
### 2.4.1 Il sistema Bose electroforce

L'*ElectroForce planar biaxial TestBench test instrument* è un sistema appositamente sviluppato dalla Bose per la caratterizzazione e lo sviluppo di modelli costitutivi di materiali, per predirne il comportamento meccanico e poterli comparare ai tessuti biologici. In particolare, l'impiego di questo sistema è finalizzato allo studio di quei materiali definiti "Biological and tissue derived soft biomaterials", utilizzati per le applicazioni mediche e chirurgiche e che, presentando solitamente caratteristiche d'anisotropia, relazioni di sforzo-deformazione non lineari, grandi deformazioni e viscoelasticità, richiedono analisi particolarmente complesse [42].

Il sistema è costituito da un banco di prova metallico traforato su cui poggiano due motori lineari a magnete permanente e due staffe di reazione contrapposte, munite di un perno che le attraversa trasversalmente e che ha la possibilità di scorrere [Fig 2.3].

La presenza dei due motori consente di effettuare prove di tipo monoassiale e biassiale. Motori e staffe possono essere fissati mediante viti lungo tutta la superficie del banco di prova in modo da creare la configurazione desiderata per l'esperimento.

Assieme ai motori ed alle staffe, il sistema è costituito da alcune celle di carico



**Figura 2.3:** Il sistema Bose Electroforce



**Figura 2.4:** Celle di carico da 100lb, 50lb, 5lb

[Fig 2.4] di diversa capacità (100 lb, 50 lb, 5lb) che possono essere montate in vario modo, a seconda della configurazione desiderata, utilizzando i componenti per l'assemblaggio in dotazione del sistema.

Tali celle fungono da sensori, parallelamente ai motori, per la rilevazione delle forze in atto durante le diverse prove. Motori e celle di carico sono interfacciati mediante un software di controllo chiamato WinTest, parte integrante

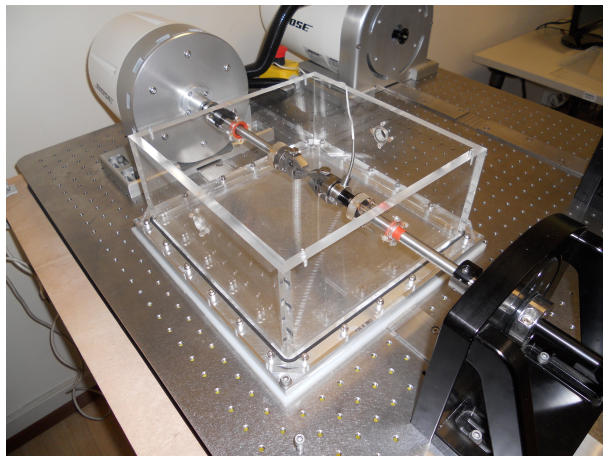
del sistema, che permette il controllo completo dei motori durante la prova, l'acquisizione temporale delle grandezze fisiche di interesse ed il settaggio informatizzato di tutti i parametri e modalità di lavoro dei motori ottimizzandone il funzionamento per eseguire la prova voluta.[bos:bro]

### Configurazione macchina

Per effettuare le misurazioni di interesse, è stata impiegata la configurazione monoassiale della macchina, in cui si utilizza un solo motore con contrapposta una staffa di reazione.

Su entrambe le parti sono montate delle prolunghe metalliche che si inseriscono in una vasca con bagno salino, utile a riprodurre le condizioni ottimali di idratazione del campione [Fig 2.5].

Una cella di carico da 50 lb (225 N) è stata montata in immersione sul braccio



**Figura 2.5:** Configurazione monoassiale con bagno salino

collegato al perno della staffa di reazione. La cella presenta a sua volta una piccola sporgenza su cui può essere avvitata una delle due ganasce tra i cui morsetti verrà posizionato il campione da testare. L'altra ganascia viene fissata, sempre in immersione, al braccio uscente dal motore, sul lato opposto.

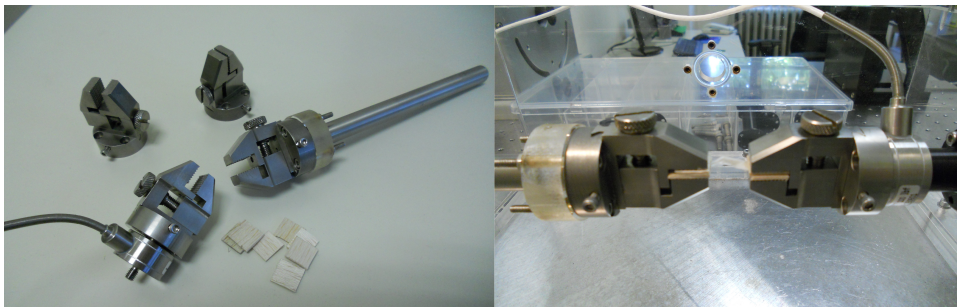
Le due ganasce, chiamate DMA grips [Fig 2.6], sono state montate in modo da esser distanziate di 5 mm l'una dall'altra ed alla stessa altezza.

Queste grips, disegnate specificamente per analisi meccaniche, vengono fornite sempre a coppie e possiedono le seguenti caratteristiche:

- 12.5 mm (0.50 inch) è la massima larghezza consentita al campione.
- 8.4 mm (0.33 inch) è il massimo spessore consentito al campione.
- 450 N (100 lb) di capacità resistente.
- Resistenti alla corrosione.
- Leggere (57 g ciascuna).

Lo spazio lasciato libero fra le grips è facilmente regolabile facendo scorrere la piastra di contenimento sul banco di prova e affinando la regolazione mediante il perno che attraversa la staffa, grazie alla possibilità di scorrimento e successivo fissaggio con viti anche dopo il fissaggio della stessa.

I campioni sono stati montati tra le ganasce utilizzando due pezzetti di balsa,



**Figura 2.6:** DMA grips con “wafer” di balsa

che vanno a formare un “wafer” con il tessuto biologico, utile ad aumentare l’attrito tra grips e campione riducendo così l’effetto di eventuali fenomeni di scivolamento durante la fase di trazione.

In questa configurazione, le sollecitazioni monoassiali esercitate sui campioni dal motore, vengono rilevate dalla cella di carico.

Le prove meccaniche realizzate in questo lavoro sono tutte a spostamento imposto e il sistema misura la forza che si sviluppa in seguito alla trazione del campione.

### **WinTest**

Motore e cella di carico sono interfacciati parallelamente con il calcolatore attraverso il sistema di controllo WinTest [Fig 2.7] che permette di accendere e



spegnere il motore ad ogni prova ed interrompere il test, in caso di problemi, direttamente dal computer.

WinTest include un software ed un controllore PCI elettronico in grado di

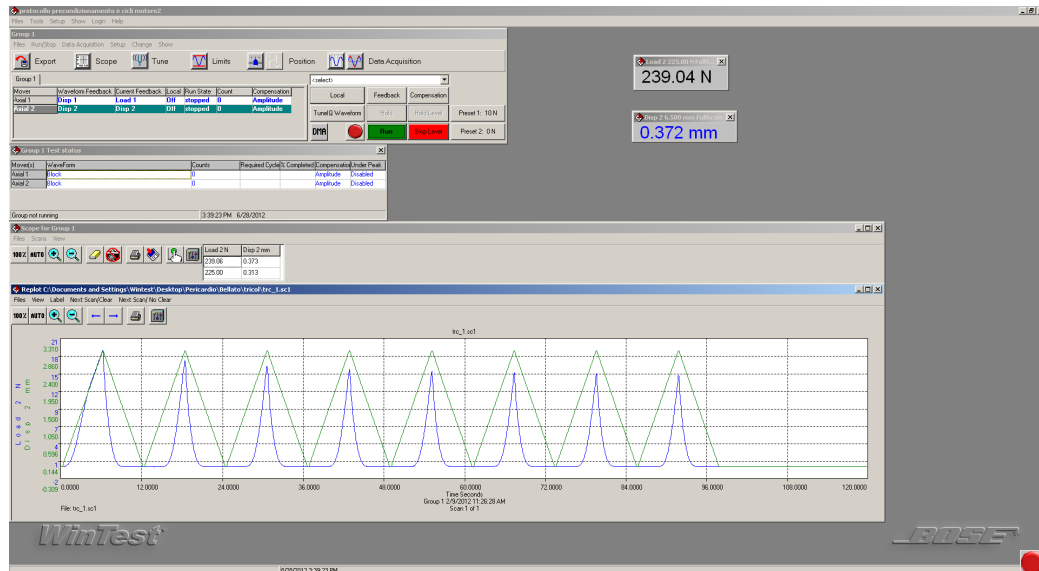


Figura 2.7: Finestra di lavoro di WinTest

fornire l'acquisizione sincronizzata di dati da più canali e la generazione di forme d'onda con cui far lavorare il motore.

Quando si avvia il programma, si apre la cosiddetta *Project Window*, che rappresenta la finestra contenente tutti i menù, attraverso i quali è possibile settare i parametri della prova che si vuole condurre oltre ad impostare tutte le istruzioni da impartire ai motori ed ai trasduttori.

Una volta che il software è stato programmato con le specifiche dell'esperimento, è possibile salvare il tutto in un file di sistema che viene reso disponibile ad ogni successivo utilizzo, senza che sia necessario reinserire tutti i parametri.

### 2.4.2 Protocollo di prova

Mediante il tool integrato *TuneQ* [Fig 2.8] è stato possibile programmare la serie di cicli iterativi che la macchina doveva compiere come prova di stress.

La scelta di effettuare test ciclici senza mai raggiungere il punto di rottura è dovuta al fatto che l'interesse dello studio era di verificare il comportamento del tessuto pericardico trattato nella zona in cui presentasse un comportamento lineare [43]; il raggiungimento del punto di rottura è una condizione che quindi

non è di interesse in questo studio.

Il protocollo impostato è il seguente:

1. Ramp to Level 0.5 mm/sec to 3mm con controllo sul Displacement.
2. Ramp to Level 0.5 mm/sec to 0mm con controllo sul Displacement.
3. Repeat from 1) 8 times.

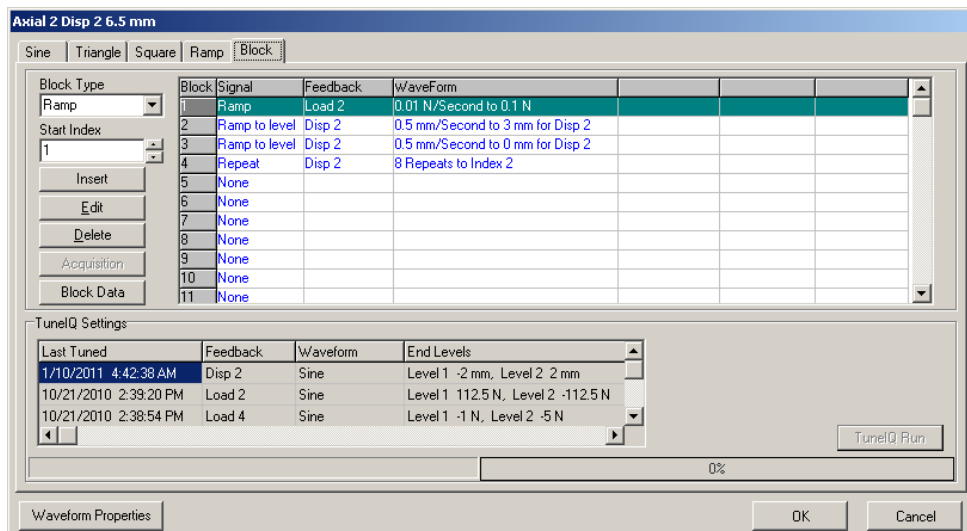
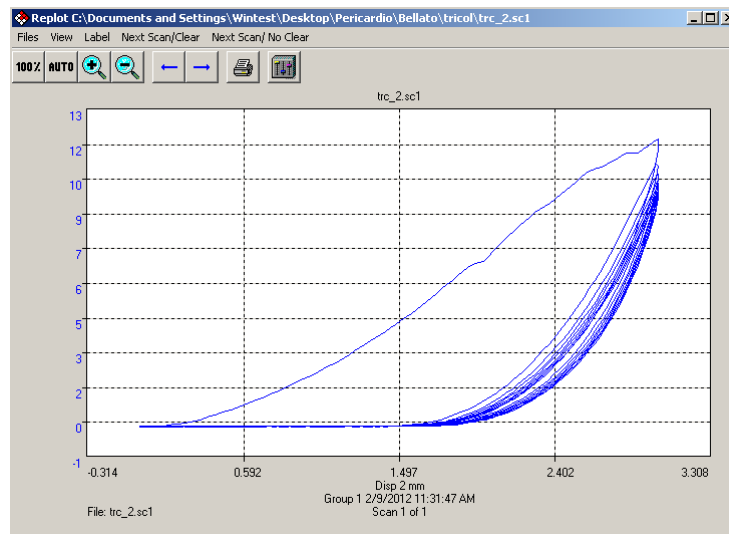


Figura 2.8: Finestra di TuneQ con protocollo di prova

**Ottenimento dei dati** Durante le prove, dai canali di acquisizione, WinTest fornisce in tempo reale, mediante finestra grafica chiamata *Scope Window*, due grafici paralleli, relativi alle due grandezze (Load e Displacement), in funzione nel tempo (Time), come quelli riportati nella parte in basso della [Fig 2.7].

È inoltre possibile graficare un canale contro l'altro (ad esempio rappresentare lo spostamento in ascissa ed il carico esercitato in ordinata), infatti il campionamento nel tempo delle due grandezze Load e Displacement è sincrono (con periodo 0.06 secondi nel caso in esame)[Fig 2.9]. Di questi cicli è stata poi presa in analisi solo l'ottava iterazione poiché le precedenti sono state considerate come un pre-condizionamento del campione; infatti, l'andamento oscillatorio del grafico del carico applicato, inizia a presentare una varianza non significativa tra i valori dei picchi a partire dal 5-6 ciclo, condizione corrispondente alla stabilizzazione delle condizioni del materiale.



**Figura 2.9:** Esempio di grafico Load/Displacement nella Scope Window

WinTest inoltre fornisce, al salvataggio, la possibilità di esportare i dati relativi alle curve di ogni campione in formato .csv e .txt; in particolare sono stati esportati i file in formato .txt per le successive elaborazioni ed analisi effettuate con software *Matlab*.

Un primo criterio di esclusione è stato applicato, già a partire da questa fase di acquisizione dei dati, mediante l'osservazione in tempo reale dei grafici, scartando tutti quei campioni che mostrassero già al secondo picco della curva di sforzo un valore inferiore a 1.5 N. Nei campioni che presentano questa caratteristica nel grafico Load/Time si poteva infatti riscontrare, anche osservandoli direttamente durante la prova, che subivano rotture o scivolavano dalle grips.

### 2.4.3 Matlab

*Matlab* è un ambiente per calcolo numerico ed analisi statistica sviluppato dalla Mathworks che permette di visualizzare funzioni, elaborare dati, realizzare interfacce ed implementare algoritmi con l'omonimo linguaggio di programmazione. Inoltre è possibile sfruttare i numerosissimi tool integrati per ottimizzare il calcolo scientifico.

#### CurveFit Toolbox

Al fine di analizzare i dati acquisiti durante i test, è stato implementato un metodo che permettesse, dando in ingresso i file .txt relativi alle varie prove

(denominati ad esempio *nat\_3.txt* per il campione nativo numero 3), di ricostruire un grafico Sforzo contro Deformazione relativo all'ultima iterazione del ciclo di test di ogni campione, ottenute mediante WinTest.

L'algoritmo permette di convertire le colonne Load e Displacement dei file di testo dei vari campioni in coppie di vettori (Disp,Load) da passare come parametri d'ingresso al tool come coppie di vettori (Disp[],Load[]).

Per ricavare l'ultimo ciclo si trova l'ultimo massimo nella colonna del Load (è introdotta anche la condizione che il valore sia maggiore di 1N per non riconoscere come "falso massimo" un picco del rumore di fondo del segnale). Successivamente si inseriscono nell'array i 100 sample precedenti al picco, così da ricoprire l'arco temporale relativo ad una trazione del campione (100 campioni da 0.06 ricoprono 6 secondi; nella fase di trazione il motore avanza da 0 a 3 mm con passo 0.5mm/sec per un totale appunto di 6 secondi)

Qui in seguito è riportato, come esempio, il frammento di codice che converte i file .txt, relativi ai campioni TriCol (trc\_), nella coppia di vettori relativi a spostamento (Disp) e carico (Load), per poi passarli al CurveFit Toolbox mediante l'istruzione *cftool(Disp,Load)*

```

%funzione che consente di visualizzare la curva relativa all'ultima
%trazione del campione in cftool per poter poi analizzare la zona di
%linearita' mediante fit lineare.
%Lavora su 100 campioni effettivi ovvero quelli che riempiono il tempo di
5 %una trazione partendo dall'ultimo picco di carico e acquisendoli a ritroso
function fit=creafitDvL(inizio , fine)
    for i=inizio : fine
        try
            nomefile=['trc_' int2str(i) '.txt'];
10         a=load (nomefile , 'v1');
            j=2000;
            Disp=zeros(1,100);
            Load=zeros(1,100);
            %ciclo per eliminare i campioni successivi all'ultima trazione
15         while a(j,4) < 1 || a(j,4) < a(j-1,4)
                j=j-1;
            end
            %ciclo per acquisire i campioni dell'ultima trazione
            for k=1:100;
20                 Disp(100-k+1)=a(j,5);
                 Load(100-k+1)=a(j,4);
                 j=j-1;
            end
            %stampa la curva DISPvsLOAD
25         fit=cftool(Disp,Load);
        catch err
            %da informazioni sui file non trovati
    end
end

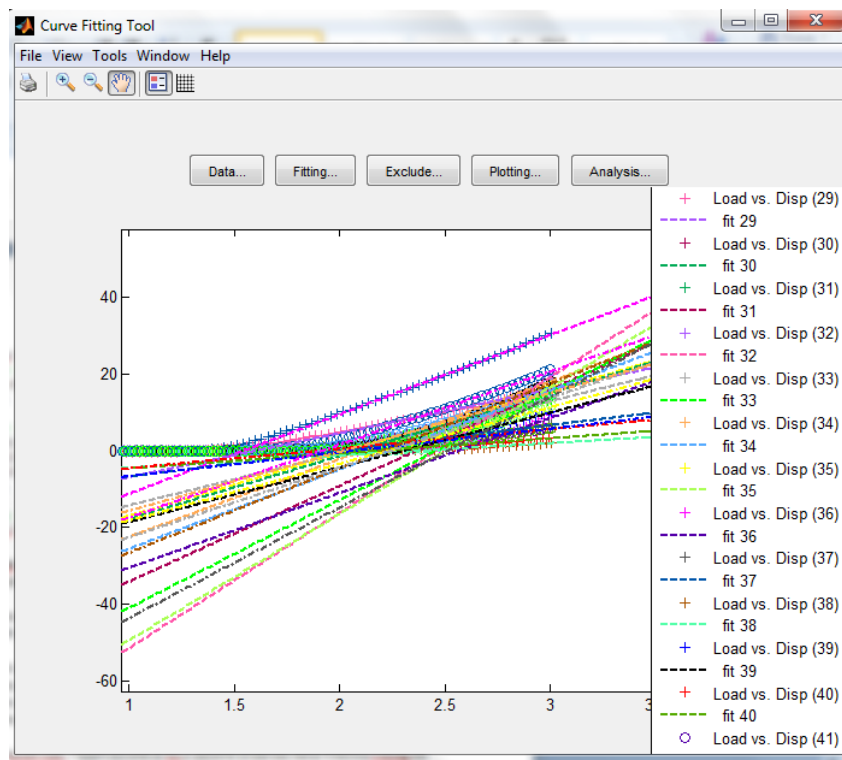
```

```

disp(err.identifier);
if (strcmp(err.identifier, 'MATLAB:load:couldNotReadFile'))
30     strerr=['Il file' int2str(i) '.txt non si trova nella cartella
        '];
    disp(strerr);
    Disp=zeros(1,2);
    Load=zeros(1,2);
    fit=cftool(Disp,Load);
35 else
    rethrow(err);
end
end
end
end

```

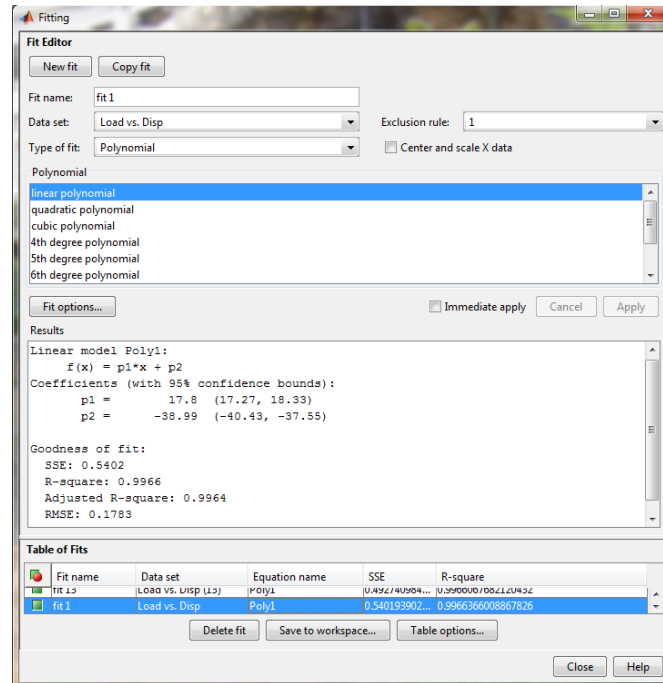
Alla chiamata `cftool(Disp,Load)` Matlab apre la finestra grafica del CurveFit Toolbox già riportante i grafici Load vs Disp di tutte le prove, passate come parametro al Tool.



**Figura 2.10:** Finestra grafica del CurveFit Toolbox

**Determinazione della retta sforzo-deformazione** Ai fini di rilevare il tratto di curva in cui il tessuto mantiene un comportamento a trazione pressoché lineare, dal menù *Fitting* si vanno a creare tanti fit quante sono le curve

di test [Fig 2.11]. Ogni fit viene realizzato con una polinomiale di primo grado.



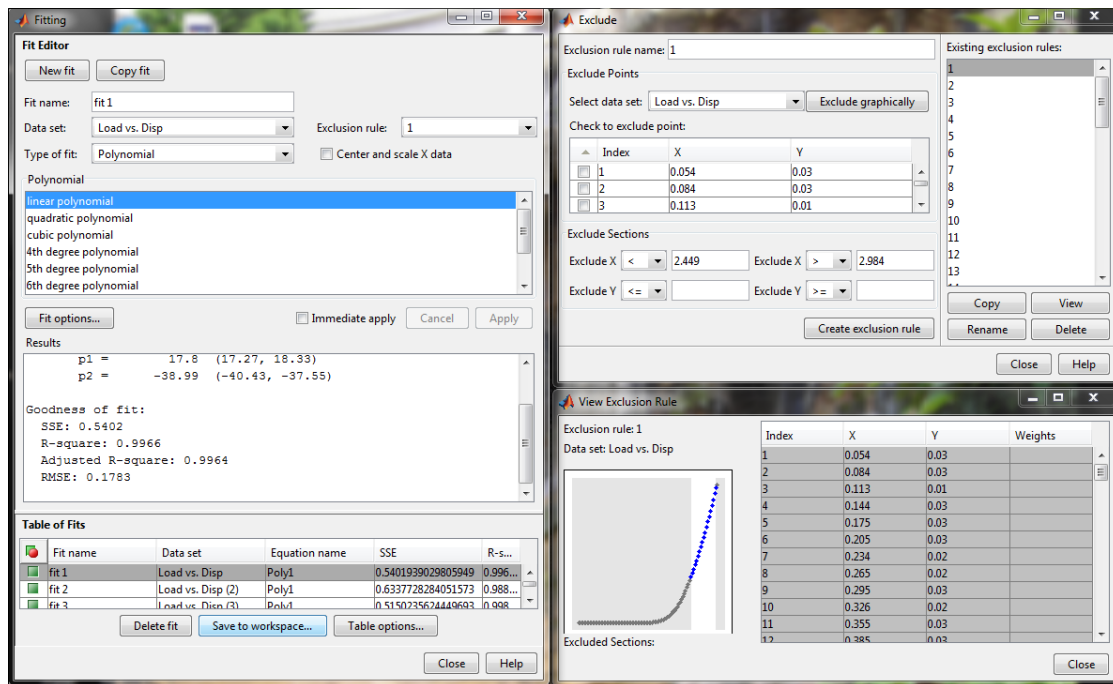
**Figura 2.11:** Finestra *Fitting* con impostate polinomiali di primo grado

Dal menù *Exclude* [Fig 2.12] si va poi a creare un *exclusion rule* per ogni fit; le *exclusion rule* consentono di selezionare un sottogruppo di campioni sui quali elaborare il fit. Dopo la creazione di una regola, la sua applicazione al fit si ottiene andando nella finestra *Fitting* ed impostando l'opportuna regola ora presente nell'apposito menù a tendina.

Tali regole sono state create graficamente, direttamente nella finestra *Exclude* mediante il tasto *Exclude graphically* e selezionando manualmente i campioni secondo il seguente criterio:

*Si tiene il maggior numero di campioni nella zona di salita del grafico tali che, all'applicazione della regola di esclusione al fit, siano  $0.4 < SSE < 0.6$  e  $R^2 > 0.99$*

I valori dei parametri statistici indicanti la bontà del fit, sono leggibili nella parte inferiore della finestra *Fitting*. Per ogni campione, sono stati in fine rilevati e riportati nella tabella excel i valori di p1 (in  $N/mm$ , indicante coefficiente angolare della retta di fit con un 95% di confidence bounds), p2 (in

Figura 2.12: Finestra *Exclude*

$N$ , corrispondente all'intercetta della retta di fit), l'SSE, l'R-square, l'Adjusted R-square e l'RMSE.

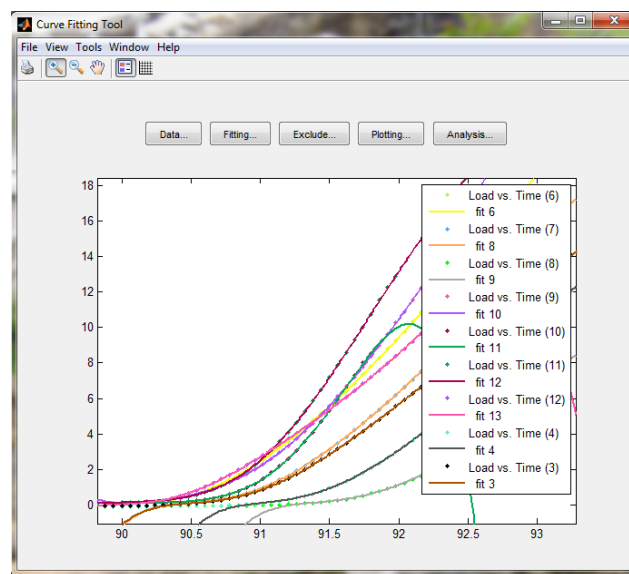
In tabella sono stati inoltre riportati anche i dati  $D\text{-min}[\text{mm}]$ ,  $L\text{-min}[N]$ ,  $D\text{-max}[\text{mm}]$ ,  $L\text{-max}[N]$  ed  $n\text{-camp}$ , cioè gli estremi degli intervalli di Displacement e Load imposti mediante la creazione delle *exclusion rule*, utilizzati per la realizzazione del fit. Grazie a questi valori si ottengono così anche le 2 colonne  $\Delta D = D\text{-max} - D\text{-min}$  e  $\Delta L = L\text{-max} - L\text{-min}$  relative all'ampiezza di tali intervalli. Mediante il rapporto  $\frac{\Delta L}{\Delta D}$  si ottengono le stime dei coefficienti angolari della retta Load/Displacement dai quali, una volta verificato che sino interni all'intervallo di confidenza indicato dal parametro p1 relativo al coefficiente angolare della curva di fit, vengono ricavati i valori medi per area pericardica che saranno successivamente utilizzati per le analisi statistiche.

**Determinazione del punto di flesso** Mediante il CurveFit Toolbox è inoltre possibile ricavare il punto di flesso nella curva di carico, corrispondente al punto in cui termina la fase di “distensione” e riallineamento fibre del campione ed inizia la fase di effettiva trazione. Con un algoritmo simile al precedente, si passano come parametri alla funzione  $cftool(\text{vettore}_a, \text{vettore}_b)$

la coppia di vettori relativi a Load e Time.

All'apertura della finestra grafica del tool, sono presenti le curve relative all'ultimo ciclo di trazione di ogni campione.

Dal menù *Fitting* si vanno nuovamente a creare tanti fit quante sono le curve di test; questi fit vengono però realizzati con una polinomiale di sesto grado senza alcuna *exclusion rule* [Fig 2.13]. Tale scelta è stata presa poiché per rilevare il flesso, è importante osservare il comportamento del fit attorno al punto di flesso e non la bontà del fit lungo tutta la curva, quindi i valori di SSE e R-square non vengono tenuti in considerazione. Dal menù *Analysis* si devono selezionare



**Figura 2.13:** Fitting con polinomiali di sesto grado

le voci *Evaluate fit at Xi For new observation* e *2nd derivate at Xi* ed inserire nella cella *Analyze at Xi* un intervallo temporale del tipo  $T_i:0.06:T_f$  dove  $T_i$  e  $T_f$  sono i valori dei tempi di due campioni tali che dentro all'intervallo sia compresa la zona in cui è presente il flesso e 0.06 è il passo di campionamento con cui sono acquisiti i dati [Fig 2.14].

Applicando il criterio di analisi impostato, nella finestra compare una tabella con 5 colonne indicanti il valori  $X_i$  reali della curva, il valori del fit  $f(X_i)$  corrispondente con margine d'errore del 95% rappresentato dai valore nella lower  $f(X_i)$  e upper  $f(X_i)$  ( $X_i$  deve essere compreso tra i valori in questi due colonne affinché il fit sia affidabile) ed il valore della derivata seconda in quel punto. Dalla tabella si ricava così la coppia di punti della curva in cui la



Xi	lower f(Xi)	f(Xi)	upper f(Xi)	d2f(Xi)/dX2
88.08	-2.30795	-1.03126	0.245417	-12.6759
88.14	-1.80849	-0.790704	0.227086	-11.2717
88.2	-1.39258	-0.59073	0.211122	-9.96114
88.26	-1.05024	-0.426645	0.196951	-8.73949
88.32	-0.772202	-0.29405	0.184101	-7.60199
88.38	-0.550132	-0.188856	0.17242	-6.54405
88.44	-0.376362	-0.107233	0.161896	-5.56124
88.5	-0.244226	-0.0456638	0.152898	-4.64928
88.56	-0.147763	-0.000840187	0.146083	-3.80404
88.62	-0.0815385	0.030261	0.142061	-3.02153
88.68	-0.0401881	0.0504808	0.14115	-2.29792
88.74	-0.0174713	0.0624046	0.142281	-1.62952
88.8	-0.00680924	0.0684395	0.143688	-1.01279
88.86	-0.00256035	0.0708323	0.144225	-0.444385
88.92	-0.000745797	0.0716114	0.143869	0.0790783
88.98	0.00121742	0.0726433	0.144069	0.560545
89.04	0.00523801	0.0756884	0.146139	1.00301
89.1	0.0128208	0.0823393	0.151858	1.40927
89.16	0.0252734	0.0940552	0.162837	1.78197
89.22	0.0438623	0.112167	0.180472	2.12361
89.28	0.0698201	0.137902	0.205984	2.43654
89.34	0.104361	0.17241	0.240459	2.72296
89.4	0.148607	0.216731	0.284856	2.98493
89.46	0.203564	0.271782	0.34	3.22434
89.52	0.270176	0.338437	0.406698	3.44296
89.58	0.349246	0.417471	0.485696	3.64239
89.64	0.4415	0.509625	0.57775	3.82408

Figura 2.14: Finestra *Analysis*

derivata seconda cambia di segno (corrispondenti all'intorno del punto di flesso) e si stima il punto di flesso come media dei due valori dei Load corrispondenti di quei punti, riportandone i valori in tabella excel.



# Capitolo 3

## Analisi dei risultati

Dagli esperimenti effettuati con il sistema Bose Electroforce sono stati ricavati i dati riportati nelle tabelle 3.1-3.2-3.3-3.4-3.5-3.6. In particolare nelle Tabelle 3.1, 3.3, 3.5 (facciate con numerazione pari) sono riportati i valori relativi al calcolo del fit lineare di I grado calcolato sulla fase di trazione dell'ultima iterazione del test meccanico [Paragrafo 2.4.3]; tali dati sono stati poi utilizzati per determinare l'intervallo in cui il pericardio presenta una risposta a trazione lineare e misurare il modulo di elasticità in quella regione.

Nelle Tabelle 3.2-3.4-3.6 (facciate con numerazione dispari) sono riportati i dati risultanti dalle analisi fisiche ed i valori di modulo elastico, calcolati partendo dai risultati dei test meccanici e dalle proprietà fisiche stesse. Le colonne delle tabelle nella facciate di sinistra indicano:

- *campione*: numero progressivo del campione come riportato in Fig.2.1.
- *zona*: zona del pericardio da cui è stato sezionato il campione.
- *D-min[mm]*: estremo inferiore dell'intervallo di *Displacement* su cui è stato calcolato il fit.
- *L-min[N]*: estremo inferiore dell'intervallo di *Load* su cui è stato calcolato il fit.
- *D-max[mm]*: estremo superiore dell'intervallo di *Displacement* su cui è stato calcolato il fit.
- *L-max[N]*: estremo superiore dell'intervallo di *Load* su cui è stato calcolato il fit.

- $n\text{-camp}$ : numero di punti temporali effettivi durante la prova di trazione su cui è stato calcolato il fit.
- $\Delta L[N]$ : variazione di *Load* nel fit.
- $\Delta D[mm]$ : variazione di *Displacement* nel fit.
- $p1[N/mm]$  (95% c.b.): coefficiente angolare della retta di fit ed intervallo del limite di confidenza del 95%.
- $p2[N]$  (95% c.b.): intercetta con l'asse delle ordinate della retta di fit ed intervallo del limite di confidenza del 95%.

Le colonne delle tabelle nelle facciate di destra indicano invece:

- $SSE$ : somma dei quadrati dei residui; un valore vicino allo 0 indica un buon fit.
- $R^2$ : coefficiente di determinazione (quadrato del coefficiente di correlazione); un valore vicino a 1 indica un buon fit.
- $Adj\text{-}R^2$ :  $R^2$  aggiustato; un valore vicino a 1 indica un buon fit.
- $RMSE$ : radice dell'errore quadratico medio. Un valore vicino a 0 indica un buon fit.
- $m[N/mm]$ : rapporto *Load/Displacement* calcolato come  $\Delta L/\Delta D$ , corrispondente alla *rigidezza* del materiale. Deve essere interno all'intervallo di confidenza di  $p1$ .
- $E(m)[N/mm]$ : media delle rigidezze per zona di pericardio.
- $fle[mm]$ : punto di flesso calcolato con Matlab mediante la polinomiale di VI grado [Paragrafo 2.4.3].
- $spe[cm]$ : spessore del campione.
- $lar[cm]$ : larghezza del campione.
- $sez[mm]$ : sezione del campione.
- $coef[MPa]$ : modulo elastico.
- $media[MPa]$ : media dei moduli elastici per zona.

- *dev.st[MPa]*: deviazione standard nel calcolo della media.
- *err[MPa]*: errore standard nel calcolo della media.

Le Tabelle 3.1 e 3.2 contengono le informazioni relative ai 72 campioni di pericardio *nativo* analizzato (provenienti da 3 pericardi, ognuno dei quali diviso in 24 campioni). Analogamente, la stessa struttura vale per le Tabelle 3.3-3.4 e 3.5-3.6 che si riferiscono rispettivamente ai 72 campioni (provenienti sempre da 3 distinti pericardi) trattati con TriCol ed ai 72 campioni (provenienti da ulteriori 3 pericardi) trattati con TritDoc.

### 3.1 Calcolo del modulo elastico

Le misurazioni ottenute con il sistema Bose Electroforce forniscono i dati per ricavare la rigidezza del tessuto pericardico in analisi. È tuttavia utile determinare un valore, almeno approssimato, del modulo di elasticità che il pericardio presenta nella sua zona lineare. In particolare il modulo di elasticità longitudinale (o Modulo di Young) è definito a partire dalla legge di Hooke come:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (3.1)$$

con

- $\sigma$ : sforzo misurato in pascal. Dimensionalmente è  $\sigma = F/A$ , cioè forza su superficie.
- $\epsilon$ : deformazione adimensionale, espressa solitamente in percentuale. Dimensionalmente è  $\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$ , cioè variazione di lunghezza su lunghezza iniziale.

Nel caso in esame, la forza  $F$  corrisponde al carico *Load* ( $L$ ), l'area su cui essa è applicata corrisponde alla *sezione* ( $S$ ) del campione,  $\Delta l$  corrisponde al *Displacement* ( $D$ ) ed  $l_0$  è pari a alla lunghezza iniziale del campione (5 mm, distanza tra le grips all'inizio della prova di trazione [Paragrafo 2.4.1]) sommata al punto di flesso calcolato con Matlab (questo perché l'analisi prende in considerazione il comportamento del campione solo nella zona lineare, successiva per l'appunto al punto di flesso della curva).

Partendo dal rapporto tra *Load* e *Displacement* si ha:

$$L = mD \quad (3.2)$$

Dividendo ora ambo i membri, a destra ed a sinistra dell'uguale della 3.2, per la *sezione* ed unendo la 3.1 si ottiene:

$$\sigma = \frac{mD}{S} \quad (3.3)$$

Dalla definizione di  $\epsilon$  si ha poi:

$$\epsilon = 100 \frac{D}{l_0} \quad (3.4)$$

e, unendo la 3.3 alla 3.4, si ottiene:

$$\frac{100}{l_0} \sigma = \frac{m}{s} \epsilon \quad (3.5)$$

da cui:

$$\sigma = \frac{l_0}{100s} m \epsilon \quad (3.6)$$

Unendo infine l'equazione 3.6 alla 3.1 si arriva ad avere:

$$E = \frac{l_0}{100s} m \quad (3.7)$$

che è il valore considerato come modulo elastico.

**Approssimazione del modulo di Young** Nel calcolo del modulo di Young è stata considerata l'area su cui è applicata la forza come costante e pari alla sezione iniziale del campione. Questa approssimazione sarebbe corretta solo nel caso di deformazioni infinitesime; nel caso di grandi deformazioni sarebbe necessario avere a disposizione anche i valori effettivi della sezione in corrispondenza dei sample (*Load, Disp*) utilizzati nelle analisi. Tuttavia, essendo stata utilizzata tale approssimazione per tutti i campioni di ogni trattamento, i confronti tra zone e trattamenti effettuati si possono comunque considerare affidabili, quantomeno qualitativamente.

A supporto delle informazioni ricavabili dal modulo di elasticità longitudinale, è comunque utile tenere in considerazione anche i dati relativi alla rigidità, forniti dalle curve sforzo/deformazione. Ai fini di stimare la durabilità di un tessuto, la rigidità (*Stiffness*) è considerata infatti un parametro più importante, ad esempio, della resistenza a rottura [44].

campione	zona	D-min [mm]	L-min [N]	D-max [mm]	L-max [N]	n-camp	$\Delta L$ [N]	$\Delta D$ [mm]	p1 [N/mm] (95% c.b.)	p2 [N] (95% c.b.)
1	ALV-C 1	2.467	3.25	2.942	10.55	16	7.30	0.475	15.3 (14.69, 15.92)	-34.8 (-36.48, -33.13)
2		2.104	4.68	2.94	14.19	28	9.51	0.836	11.25 (11.03, 11.48)	-19.21 (-19.78, -18.64)
3		2.451	1.29	2.987	6.15	18	4.86	0.536	9.016 (8.464, 9.568)	-21.13 (-22.64, -19.63)
4		2.231	5.49	2.977	14.28	25	8.79	0.746	11.75 (11.48, 12.03)	-21.02 (-21.74, -20.3)
5		2.292	3.54	2.978	11.36	23	7.82	0.686	11.43 (11.11, 11.76)	-22.98 (-23.84, -22.12)
6		2.370	2.42	2.996	9.81	21	7.39	0.626	11.86 (11.48, 12.25)	-26.02 (-27.06, -24.98)
7	ALV-A 1	2.476	2.28	2.981	8.53	17	6.25	0.505	12.35 (11.77, 12.92)	-28.59 (-30.17, -27.02)
8		2.279	1.33	2.966	5.74	23	4.41	0.687	6.323 (6.011, 6.635)	-13.33 (-14.16, -12.51)
9		2.310	2.07	2.966	8.02	23	5.95	0.656	9.07 (8.725, 9.415)	-19.17 (-20.08, -18.26)
10		2.274	4.46	2.96	10.22	23	5.76	0.686	8.289 (7.962, 8.615)	-14.65 (-15.51, -13.8)
11		2.259	1.52	2.975	7.41	24	5.89	0.716	8.239 (7.937, 8.541)	-17.38 (-18.18, -16.59)
12		2.327	3.41	2.982	11.83	22	8.42	0.655	12.91 (12.56, 13.25)	-26.94 (-27.87, -26.02)
13	RPV-C 1	2.209	0.76	2.986	3.08	26	2.32	0.777	2.937 (2.729, 3.144)	-5.937 (-6.477, -5.397)
14		2.157	1.28	2.964	4.90	27	3.62	0.807	4.462 (4.252, 4.673)	-8.586 (-9.128, -8.044)
15		2.391	0.30	2.989	1.84	20	1.54	0.598	2.567 (2.383, 2.751)	-5.966 (-6.462, -5.469)
16		2.067	0.30	2.965	2.27	30	1.97	0.898	2.119 (1.948, 2.29)	-4.283 (-4.715, -3.85)
17		2.047	0.02	2.975	1.41	31	1.39	0.928	1.421 (1.261, 1.58)	-3.091 (-3.493, -2.689)
18		2.388	0.58	2.986	2.52	20	1.94	0.598	3.252 (3.059, 3.444)	-7.325 (-7.843, -6.807)
19	RPV-A 1	2.274	2.07	2.992	7.72	24	5.65	0.718	7.827 (7.539, 8.114)	-15.99 (-16.75, -15.24)
20		2.429	5.71	2.992	13.07	19	7.36	0.563	13.03 (12.55, 13.52)	-26.26 (-27.58, -24.94)
21		2.412	2.68	2.978	8.18	19	5.50	0.566	9.718 (9.255, 10.18)	-21.07 (-22.32, -19.82)
22		2.505	0.47	3.003	3.58	17	3.11	0.498	6.356 (5.839, 6.873)	-15.74 (-17.17, -14.32)
23		2.395	1.44	2.987	7.77	21	6.33	0.592	10.2 (9.813, 10.58)	-22.95 (-23.98, -21.92)
24		2.406	2.8	2.972	9.16	19	6.36	0.566	11.26 (10.81, 11.72)	-24.61 (-25.83, -23.38)
25	ALV-C 2									
26		2.256	6.15	2.943	13.09	23	6.94	0.687	10.07 (9.767, 10.38)	-16.85 (-17.64, -16.05)
27		2.142	1.86	2.979	10.95	28	9.09	0.837	10.85 (10.64, 11.07)	-21.67 (-22.22, -21.12)
28		2.236	4.44	2.983	12.28	25	7.84	0.747	10.42 (10.15, 10.7)	-19.13 (-19.85, -18.41)
29		2.352	4.57	2.978	12.77	21	8.20	0.626	13.02 (12.63, 13.4)	-26.33 (-27.36, -25.3)
30		2.065	2.26	2.962	7.9	30	5.64	0.897	6.206 (6.015, 6.396)	-10.79 (-11.27, -10.31)
31	ALV-A 2	2.103	1.58	2.969	12.38	29	10.80	0.866	12.58 (12.4, 12.76)	-25.19 (-25.65, -24.73)
32		2.35	1.8	2.977	11.87	21	10.07	0.627	16.25 (15.89, 16.61)	-36.76 (-37.72, -35.8)
33		2.46	2.42	2.996	10.86	18	8.44	0.536	15.91 (15.4, 16.41)	-37.05 (-38.43, -35.67)
34		2.505	0.8	3.005	6.25	17	5.45	0.5	11.14 (10.54, 11.75)	-27.49 (-29.17, -25.81)
35		2.106	2.29	2.974	12.98	29	10.69	0.868	12.39 (12.19, 12.59)	-24.13 (-24.64, -23.61)
36		2.369	1.71	2.996	9.34	21	7.63	0.627	12.27 (11.92, 12.62)	-27.68 (-28.63, -26.73)
37	RPV-C 2									
38		2.106	2.85	2.973	10.35	29	7.50	0.867	8.671 (8.471, 8.872)	-15.67 (-16.19, -15.16)
39		1.99	1.7	2.948	6.46	32	4.76	0.958	4.858 (4.699, 5.017)	-8.17 (-8.566, -7.774)
40										
41										
42										
43	RPV-A 2	1.997	1.35	2.983	9.24	33	7.89	0.986	8.002 (7.851, 8.153)	-14.9 (-15.28, -14.52)
44		1.993	0.89	2.981	6.11	33	5.22	0.988	5.292 (5.146, 5.438)	-9.895 (-10.26, -9.529)
45										
46										
47		2.314	0.43	3.000	3.51	23	3.08	0.686	4.525 (4.219, 4.831)	-10.33 (-11.15, -9.514)
48		2.106	0.87	2.973	4.68	29	3.81	0.867	4.342 (4.138, 4.546)	-8.52 (-9.04, -8)
49	ALV-C 3									
50										
51		2.324	9.24	2.979	19.71	22	10.47	0.655	15.89 (15.54, 16.25)	-27.97 (-28.92, -27.02)
52		2.317	3.55	2.974	10.3	22	6.75	0.657	10.29 (9.959, 10.63)	-20.59 (-21.48, -19.7)
53										
54		2.436	6.52	2.972	17.59	18	11.07	0.536	20.66 (20.12, 21.2)	-44.13 (-45.59, -42.66)
55	ALV-A 3	2.356	6.81	2.953	15.53	20	8.72	0.597	14.56 (14.11, 15.01)	-27.81 (-29, -26.63)
56		2.13	3.48	2.968	12.93	28	9.45	0.838	11.2 (10.98, 11.42)	-20.63 (-21.2, -20.07)
57		2.451	3.71	2.987	11.87	18	8.16	0.536	15.18 (14.69, 15.68)	-33.79 (-35.15, -32.44)
58		2.16	6.04	2.967	15	27	8.96	0.807	10.99 (10.76, 11.21)	-17.9 (-18.48, -17.33)
59		2.42	3.01	2.987	9.44	19	6.43	0.567	11.31 (10.85, 11.77)	-24.66 (-25.89, -23.42)
60		2.303	3.98	2.959	9.26	22	5.28	0.656	8.033 (7.68, 8.386)	-14.81 (-15.74, -13.88)
61	RPV-C 3									
62		2.007	1.25	2.964	7.49	32	6.24	0.957	6.469 (6.312, 6.625)	-11.97 (-12.36, -11.58)
63		2.282	2.14	2.969	9.53	23	7.39	0.592	10.81 (10.5, 11.13)	-22.85 (-23.68, -22.02)
64		2.414	0.65	3.006	4	20	3.35	0.746	5.721 (5.324, 6.119)	-13.45 (-14.53, -12.37)
65		2.227	3.58	2.973	12.28	24	8.70	0.746	11.61 (11.35, 11.87)	-22.54 (-23.22, -21.86)
66										
67	RPV-A 3	2.404	1.5	2.999	8.48	20	6.98	0.595	11.84 (11.45, 12.22)	-27.27 (-28.31, -26.22)
68		2.435	2.52	2.97	10.55	18	8.03	0.535	15.08 (14.54, 15.62)	-34.55 (-36.01, -33.09)
69		2.334	3.86	2.96	11.95	21	8.09	0.626	12.9 (12.52, 13.28)	-26.54 (-27.55, -25.54)
70		2.401	2.37	2.967	7.35	19	4.98	0.566	8.764 (8.311, 9.218)	-18.96 (-20.18, -17.74)
71		2.372	0.24	3.000	2.48	21	2.24	0.628	3.511 (3.173, 3.849)	-8.328 (-9.237, -7.419)
72		2.336	3.48	2.96	10.63	21	7.15	0.624	11.38 (11, 11.76)	-23.38 (-24.39, -22.37)

Tabella 3.1: Dati Matlab Nativi



SSE	R <sup>2</sup>	Adj-R <sup>2</sup>	RMSE	m [N/mm]	E(m) [N/mm]	fle [mm]	spe [cm]	lar [cm]	sez [mm]	coeff [MPa]	media [MPa]	dev.st [MPa]	err [MPa]
0.45410	0.9946	0.9943	0.17400	15.3684	11.79975898	1.4675		0.344			0.48890216	0.133534392	0.059718
0.58920	0.9974	0.9973	0.14770	11.3756		0.8920	0.05532971	0.336	1.859078243	0.360528257			
0.58720	0.9859	0.9851	0.18590	9.0672		1.5690	0.032995797	0.323	1.064334117	0.559619237			
0.55330	0.9969	0.9968	0.15180	11.7828		0.8110	0.051752478	0.330	1.70610668	0.401323637			
0.55870	0.9958	0.9957	0.15940	11.3994		0.9905	0.051719018	0.303	1.567086245	0.435765467			
0.54130	0.9951	0.9949	0.16450	11.8051		1.3995	0.033891791	0.324	1.099223763	0.687274198			
0.50630	0.9923	0.9918	0.17790	12.3762	9.557215637	1.5355	0.047167531	0.359	1.691742111	0.478116023	0.346667049	0.104900317	0.042825
0.51120	0.9877	0.9871	0.15240	6.4192		1.1260	0.043134356	0.347	1.496762151	0.262727814			
0.52130	0.9930	0.9927	0.15760	9.0701		1.1580	0.041233973	0.424	1.749694929	0.319220283			
0.55930	0.9921	0.9918	0.15940	8.3965		0.5225	0.050973242	0.357	1.821443833	0.254576498			
0.56820	0.9928	0.9925	0.15720	8.2263		1.2275	0.049604531	0.362	1.794030531	0.28555264			
0.52640	0.9965	0.9963	0.15830	12.8550		1.1770	0.03778382	0.438	1.654931297	0.479809037			
0.36990	0.9715	0.9704	0.12160	2.9858	2.830433236	0.7245		0.367			0.112248906	0.049198435	0.022002
0.44580	0.9865	0.9859	0.13000	4.4857		0.8240	0.05532971	0.336	1.859078243	0.140526663			
0.10120	0.9782	0.977	0.07298	2.5753		1.4765	0.032995797	0.331	1.092160873	0.152712045			
0.45100	0.9568	0.9553	0.12470	2.1938		0.4020	0.051752478	0.346	1.788910644	0.066245414			
0.44560	0.9172	0.9144	0.12190	1.4978		1.0440	0.051719018	0.340	1.756722644	0.051533315			
0.11050	0.9850	0.9843	0.07625	3.2441		0.4250	0.033891791	0.346	1.171526252	0.150227093			
0.51560	0.9928	0.9925	0.14970	7.8691	9.805586005	1.0325	0.047167531	0.347	1.638285576	0.289755526	0.359251178	0.07809862	0.034927
0.56300	0.9944	0.9941	0.17690	13.0728		0.6480	0.043134356	0.391	1.687991129	0.437415278			
0.51630	0.9908	0.9903	0.16940	9.7173		1.0510	0.041233973	0.369	1.52153361	0.386448709			
0.40360	0.9770	0.9756	0.15880	6.2450		1.7420	0.050973242	0.313	1.59716157	0.2636155			
0.53020	0.9936	0.9932	0.16280	10.6926		1.5380	0.049604531	0.336	1.668365719	0.419020877			
0.49510	0.9934	0.9931	0.16580	11.2367		1.6140	0.03778382	0.362	1.369033729	0.542863606			
10.16881778											0.25506421	0.124011291	0.05546
0.48710	0.9953	0.9951	0.14880	10.1019		0.0565	0.095342033	0.359	3.425957069	0.14909766			
0.53430	0.9975	0.9974	0.14070	10.8602		1.6210	0.06702381	0.347	2.323492063	0.309471614			
0.55370	0.9961	0.9959	0.15190	10.4953		1.5040	0.081586171	0.316	2.578122997	0.264772186			
0.53480	0.9960	0.9958	0.16350	13.0990		1.3220	0.063403585	0.305	1.933809351	0.42823322			
0.55660	0.9935	0.9933	0.13850	6.2876		0.2515	0.080939873	0.330	2.668317821	0.123746372			
0.43730	0.9986	0.9986	0.12500	12.4711	13.27712226	1.8220	0.064264217	0.307	1.970769327	0.431699737	0.498486686	0.102587134	0.041881
0.46540	0.9978	0.9977	0.15250	16.0606		2.0700	0.061980818	0.283	1.754057159	0.647347689			
0.49220	0.9962	0.9959	0.17010	15.7463		2.0885	0.058953581	0.324	1.908130919	0.584956851			
0.55790	0.9895	0.9889	0.18670	10.9000		2.3705	0.05156734	0.300	1.548739107	0.51873456			
0.54720	0.9982	0.9982	0.13980	12.3157		1.3160	0.066962238	0.296	1.984314325	0.392003219			
0.45110	0.9962	0.996	0.15020	12.1691		2.0570	0.067360248	0.306	2.063468944	0.416178056			
6.809601896											0.307318157	0.094871173	0.067084
0.53970	0.9964	0.9963	0.13880	8.6505		1.3435	0.042523933	0.345	1.465658227	0.374402207			
0.50800	0.9921	0.9918	0.12800	4.9687		1.3785	0.04161655	0.317	1.319244637	0.240234107			
0.51600	0.9973	0.9972	0.12700	8.0020	5.542422198	1.4455	0.036143845	0.317	1.144555098	0.450629892	0.309299552	0.10183965	0.05092
0.48210	0.9942	0.994	0.12270	5.2834		1.6500	0.040461025	0.286	1.15718532	0.303621337			
0.49140	0.9771	0.9761	0.14940	4.4898		1.9685	0.048656294	0.305	1.48563885	0.210597231			
0.55580	0.9855	0.985	0.14090	4.3945		1.3120	0.033355824	0.305	1.018464483	0.272349749			
15.63723017											0.48545656	0.069815575	0.040308
0.55910	0.9975	0.9974	0.16320	15.9847		0.7265	0.048571	0.368	1.7874128	0.512117696			
0.49310	0.9949	0.9946	0.15320	10.2740		0.9570	0.045321	0.251	1.1375571	0.538013035			
0.56080	0.9974	0.9972	0.18160	20.6530		1.1990	0.049166	0.641	3.1515406	0.40623895			
0.59000	0.9960	0.9957	0.17620	14.6064	11.93318566	0.9080	0.047441	0.495	2.3483295	0.367471453	0.425820402	0.075692711	0.030901
0.56610	0.9975	0.9974	0.14480	11.2768		1.0410	0.040834	0.322	1.3148548	0.518106248			
0.47700	0.9959	0.9957	0.16750	15.2239		1.4225	0.054636	0.382	2.0870952	0.468475866			
0.50210	0.9975	0.9974	0.13900	11.1029		0.8300	0.036347	0.385	1.3993595	0.462566023			
0.5016	0.9934	0.993	0.16690	11.3404		1.2700	0.036599	0.453	1.6579347	0.428872336			
0.54590	0.9907	0.9903	0.16120	8.0488		0.6715	0.053451	0.276	1.4752476	0.309430488			
8.789074824											0.319720401	0.100978352	0.050489
0.48870	0.9957	0.9955	0.12560	6.5204		1.0360	0.038397	0.292	1.1211924	0.351027982			
0.51980	0.9957	0.9955	0.15370	12.4831		1.2510	0.054113	0.361	1.9534793	0.399450912			
0.46770	0.9957	0.9784	0.15690	4.4906		2.0090	0.051472	0.356	1.8324032	0.171767501			
0.50260	0.9972	0.997	0.14470	11.6622		1.0765	0.054891	0.362	1.9870542	0.356635207			
0.44250	0.9954	0.9952	0.15260	11.7311	10.58125997	1.5830	0.045395	0.354	1.606983	0.480563774	0.304221679	0.134218293	0.054794
0.55910	0.9951	0.9948	0.18140	15.0093		1.5560	0.054839	0.428	2.3471092	0.419244537			
0.51630	0.9961	0.9959	0.16070	12.9233		1.0950	0.066458	0.382	2.5386956	0.310268201			
0.49440	0.9892	0.9886	0.16570	8.7986		1.0390	0.057913	0.384	2.2238592	0.238929984			
0.41400	0.9592	0.9572	0.14390	3.5669		1.4585	0.064831	0.345	2.2366695	0.102995494			
0.52060	0.9949	0.9947	0.16130	11.4583		1.0640	0.057255	0.444	2.542122	0.273328083			

Tabella 3.2: Analisi meccanica Nativi

campione	zona	D-min [mm]	L-min [N]	D-max [mm]	L-max [N]	n-camp	$\Delta L$ [N]	$\Delta D$ [mm]	p1 [N/mm] (95% c.b.)	p2 [N] (95% c.b.)
1	ALV-C 1	2.449	4.92	2.984	14.44	18	9.52	0.535	17.8 (17.27, 18.33)	-38.99 (-40.43, -37.55)
2		2.436	2.88	2.941	8.67	17	5.79	0.505	11.42 (10.77, 12.06)	-25.28 (-27.02, -23.54)
3		2.150	3.16	2.955	13.66	27	10.50	0.805	13.02 (12.79, 13.25)	-25.1 (-25.68, -24.52)
4		2.413	3.30	2.950	11.12	18	7.82	0.537	14.64 (14.21, 15.07)	-32.31 (-33.46, -31.16)
5		2.459	3.11	2.994	10.62	18	7.51	0.535	14.01 (13.54, 14.49)	-31.63 (-32.93, -30.33)
6		2.348	3.97	2.944	13.58	20	9.61	0.596	16.13 (15.72, 16.55)	-34.21 (-35.32, -33.11)
7	ALV-A 1									
8		2.405	3.49	2.970	12.11	19	8.62	0.565	15.2 (14.71, 15.69)	-33.37 (-34.7, -32.04)
9		2.505	1.66	2.979	7.44	16	5.78	0.474	12.26 (11.61, 12.91)	-29.38 (-31.17, -27.6)
10		2.492	3.73	2.967	12.90	16	9.17	0.475	19.44 (18.78, 20.09)	-45.07 (-46.86, -43.28)
11		2.659	1.83	2.982	8.00	11	6.17	0.323	19.26 (18.02, 20.5)	-49.72 (-53.22, -46.22)
12		2.566	3.08	3.006	12.85	15	9.77	0.440	22.58 (21.84, 23.32)	-55.26 (-57.33, -53.19)
13	RPV-C 1	2.327	3.10	2.938	11.44	22	8.34	0.611	12.67 (12.34, 13.01)	-26.66 (-27.56, -25.77)
14		2.315	2.47	2.971	10.20	22	7.73	0.656	11.84 (11.51, 12.18)	-25.25 (-26.14, -24.36)
15		2.286	1.48	3.002	7.33	24	5.85	0.716	8.244 (7.945, 8.544)	-17.68 (-18.48, -16.89)
16		2.091	2.37	2.957	12.55	29	10.18	0.866	11.74 (11.54, 11.94)	-22.44 (-22.95, -21.93)
17		2.005	0.93	2.962	5.10	32	4.17	0.957	4.262 (4.091, 4.432)	-7.831 (-8.257, -7.405)
18		2.397	2.05	2.991	7.66	20	5.61	0.594	9.423 (8.979, 9.868)	-20.85 (-22.05, -19.65)
19	RPV-A 1									
20		2.464	3.82	2.939	13.19	16	9.37	0.475	19.89 (19.22, 20.57)	-45.57 (-47.4, -43.74)
21		2.325	3.29	2.980	13.95	22	10.66	0.655	16.38 (16.05, 16.7)	-35.12 (-35.99, -34.25)
22										
23		2.166	3.97	2.972	17.43	27	13.46	0.806	16.76 (16.53, 16.98)	-32.65 (-33.23, -32.06)
24										
25	ALV-C 2	2.048	10.66	2.915	28.72	29	18.06	0.867	20.71 (20.51, 20.91)	-31.97 (-32.47, -31.47)
26		2.343	5.10	2.938	14.81	20	9.71	0.595	16.26 (15.85, 16.68)	-33.29 (-34.38, -32.2)
27		2.403	6.31	2.94	17.17	18	10.86	0.537	20.29 (19.75, 20.82)	-42.79 (-44.23, -41.35)
28		2.361	4.48	2.958	12.65	20	8.17	0.597	13.6 (13.2, 14.01)	-27.91 (-29, -26.82)
29		2.095	5.84	2.932	15.46	28	9.62	0.837	11.47 (11.27, 11.68)	-18.43 (-18.95, -17.91)
30		2.32	4.17	2.976	14.96	22	10.79	0.656	16.45 (16.08, 16.82)	-34.31 (-35.28, -33.34)
31	ALV-A 2	2.498	3.71	2.943	14.78	15	11.07	0.445	25.04 (24.26, 25.82)	-59.21 (-61.33, -57.09)
32		2.642	6.91	2.965	18.33	11	11.42	0.323	35.37 (34.02, 36.73)	-86.89 (-90.69, -83.09)
33		2.577	3.83	2.96	14.55	13	10.72	0.383	28.2 (27.21, 29.18)	-69.22 (-71.94, -66.49)
34		2.443	4.5	2.948	14.96	17	10.46	0.505	20.65 (20.11, 21.2)	-46.24 (-47.71, -44.77)
35		2.642	5.17	2.965	15.77	11	10.6	0.323	33.03 (31.55, 34.52)	-82.51 (-86.67, -78.34)
36		2.68	2.62	2.971	8.35	10	5.73	0.291	19.57 (17.91, 21.24)	-50.16 (-54.87, -45.46)
37	RPV-C 2	2.244	1.81	3.005	6.80	26	4.99	0.761	6.697 (6.449, 6.945)	-13.49 (-14.15, -12.84)
38										
39		2.455	2.43	2.989	10.01	18	7.58	0.534	14.27 (13.8, 14.74)	-32.9 (-34.18, -31.62)
40		2.307	0.68	2.993	3.38	23	2.7	0.686	3.932 (3.646, 4.218)	-8.637 (-9.398, -7.877)
41		2.147	1.43	2.954	5.58	27	4.15	0.807	5.076 (4.85, 5.302)	-9.714 (-10.29, -9.135)
42		2.366	2.01	2.991	5.94	21	3.93	0.625	6.204 (5.842, 6.567)	-12.93 (-13.9, -11.96)
43	RPV-A 2	2.467	6.02	2.942	16.55	16	10.53	0.475	22.1 (21.5, 22.69)	-48.76 (-50.38, -47.15)
44										
45		2.283	7.26	2.939	19.78	22	12.52	0.656	19.05 (18.7, 19.4)	-36.51 (-37.43, -35.6)
46		2.416	2.99	2.982	11.38	19	8.39	0.566	14.8 (14.36, 15.25)	-33.07 (-34.27, -31.86)
47		2.298	4.53	2.954	14.61	22	10.08	0.656	15.36 (15.02, 15.71)	-31.07 (-31.98, -30.16)
48		2.446	4.04	2.951	13.26	17	9.22	0.505	18.24 (17.68, 18.8)	-40.87 (-42.38, -39.36)
49	ALV-C 3	2.251	3.28	2.966	8.48	24	5.2	0.715	7.198 (6.896, 7.501)	-13.19 (-13.98, -12.39)
50		2.564	3.33	2.979	11.14	14	7.81	0.415	18.95 (18.11, 19.79)	-45.61 (-47.93, -43.29)
51		2.402	3.71	2.968	12.23	19	8.52	0.566	15.06 (14.61, 15.51)	-32.77 (-33.97, -31.56)
52		2.339	1.96	3.005	8.65	23	6.69	0.666	10.3 (10.01, 10.6)	-22.44 (-23.23, -21.64)
53		2.355	6.32	2.921	14.5	19	8.18	0.566	14.37 (13.88, 14.87)	-27.84 (-29.15, -26.52)
54		2.245	5.62	2.991	18.73	25	13.11	0.746	17.51 (17.23, 17.79)	-33.96 (-34.7, -33.22)
55	ALV-A 3	2.451	2.78	2.986	11.6	18	8.82	0.535	16.55 (16.03, 17.06)	-38.12 (-39.52, -36.72)
56		2.41	3.93	2.975	15.15	19	11.22	0.565	20.05 (19.57, 20.53)	-44.76 (-46.05, -43.47)
57		2.349	5.73	2.975	16.12	19	10.39	0.626	16.56 (16.19, 16.94)	-33.46 (-34.46, -32.46)
58		2.481	4.94	2.986	18.97	17	14.03	0.505	27.87 (27.27, 28.48)	-64.59 (-66.25, -62.92)
59		2.319	4.5	2.975	15.06	22	10.56	0.656	16.09 (15.75, 16.43)	-33.1 (-34, -32.19)
60		2.553	5.27	2.966	16.23	14	10.96	0.413	26.54 (25.7, 27.38)	-62.83 (-65.15, -60.51)
61	RPV-C 3	2.184	1.84	2.961	5.84	26	4	0.777	5.087 (4.827, 5.347)	-9.535 (-10.21, -8.863)
62		2.471	2.7	2.977	10.84	17	8.14	0.506	16.2 (15.6, 16.8)	-37.7 (-39.33, -36.06)
63		2.34	1.19	2.995	7.01	22	5.82	0.655	8.926 (8.592, 9.259)	-19.99 (-20.89, -19.1)
64		2.221	2.74	2.967	10.22	25	7.48	0.746	9.971 (9.691, 10.25)	-19.68 (-20.41, -18.95)
65		2.23	4	2.978	12.38	25	8.38	0.748	11.1 (10.84, 11.37)	-21.01 (-21.69, -20.32)
66		2.34	2.22	2.966	7.55	21	5.33	0.626	8.462 (8.063, 8.862)	-17.88 (-18.94, -16.82)
67	RPV-A 3									
68		2.277	1.42	2.995	5.5	24	4.08	0.718	5.623 (5.324, 5.921)	-11.66 (-12.45, -10.87)
69		2.27	1.63	2.987	5.87	24	4.24	0.717	5.816 (5.522, 6.111)	-11.83 (-12.6, -11.05)
70		2.294	1.44	3.004	7.07	24	5.63	0.71	7.952 (7.644, 8.261)	-17.1 (-17.92, -16.28)
71		2.426	2.31	3.005	10.76	20	8.45	0.579	15.1 (14.68, 15.51)	-34.65 (-35.79, -33.52)
72		2.3	2.29	2.986	9.19	23	6.9	0.686	9.966 (9.662, 10.27)	-20.88 (-21.69, -20.08)

Tabella 3.3: Dati Matlab TriCol



campione	zona	D-min [mm]	L-min [N]	D-max [mm]	L-max [N]	n-camp	$\Delta L$ [N]	$\Delta D$ [mm]	p1 [N/mm] (95% c.b.)	p2 [N] (95% c.b.)
1	ALV-C 1	2.318	3.19	2.943	12.44	21	9.25	0.625	14.74 (14.38, 15.11)	-31.25 (-32.22, -30.29)
2		2.451	2.61	2.986	9.59	18	6.98	0.535	13.04 (12.53, 13.55)	-29.65 (-31.03, -28.27)
3		2.406	2.18	2.970	8.93	19	6.75	0.564	11.98 (11.5, 12.46)	-26.96 (-28.26, -25.67)
4		2.295	2.86	2.950	8.96	22	6.10	0.655	9.273 (8.914, 9.631)	-18.69 (-19.63, -17.75)
5										
6		2.262	3.02	2.978	9.48	24	6.46	0.716	8.989 (8.719, 9.259)	-17.57 (-18.28, -16.86)
7	ALV-A 1	1.971	1.81	2.987	10.61	34	8.80	1.016	8.696 (8.552, 8.84)	-15.6 (-15.97, -15.24)
8		2.117	2.40	2.984	9.59	29	7.19	0.867	8.28 (8.088, 8.473)	-15.39 (-15.88, -14.9)
9		2.276	2.21	2.963	7.51	23	5.30	0.687	7.665 (7.367, 7.963)	-15.49 (-16.27, -14.7)
10		1.901	0.90	2.949	5.71	35	4.81	1.048	4.472 (4.334, 4.61)	-7.795 (-8.132, -7.458)
11		2.377	2.66	2.973	8.91	20	6.25	0.596	10.5 (10.07, 10.93)	-22.61 (-23.76, -21.46)
12		2.112	1.87	2.979	7.24	29	5.37	0.867	6.116 (5.917, 6.315)	-11.28 (-11.78, -10.77)
13	RPV-C 1	2.239	4.74	2.984	17.74	25	13.00	0.745	17.52 (17.24, 17.79)	-34.81 (-35.53, -34.09)
14										
15		2.182	3.71	2.990	11.57	27	7.86	0.808	9.736 (9.503, 9.969)	-17.82 (-18.42, -17.21)
16		2.363	4.69	2.989	12.59	21	7.90	0.626	12.62 (12.22, 13.02)	-25.46 (-26.53, -24.38)
17		2.101	0.49	2.968	3.33	29	2.84	0.867	3.203 (2.994, 3.412)	-6.485 (-7.017, -5.953)
18		1.803	0.14	2.941	3.07	38	2.93	1.138	2.469 (2.355, 2.583)	-4.496 (-4.769, -4.223)
19	RPV-A 1	2.313	2.05	2.970	9.50	22	7.45	0.657	11.3 (10.96, 11.64)	-24.35 (-25.25, -23.45)
20		2.402	1.87	2.968	8.46	19	6.59	0.566	11.63 (11.17, 12.09)	-26.37 (-27.6, -25.13)
21		2.088	3.57	2.956	13.47	29	9.90	0.868	11.37 (11.18, 11.57)	-20.42 (-20.92, -19.93)
22		2.071	2.32	2.997	10.66	31	8.34	0.926	8.993 (8.817, 9.169)	-16.58 (-17.02, -16.13)
23		2.399	3.43	2.965	11.55	19	8.12	0.566	14.39 (13.9, 14.88)	-31.42 (-32.73, -30.1)
24		2.224	3.65	3.002	11.56	26	7.91	0.778	10.17 (9.929, 10.42)	-19.25 (-19.89, -18.61)
25	ALV-C 2	2.266	4.32	2.983	14.87	24	10.55	0.717	14.73 (14.44, 15.03)	-29.37 (-30.14, -28.6)
26		1.866	1.37	2.973	9.43	37	8.06	1.107	7.228 (7.105, 7.35)	-12.35 (-12.65, -12.05)
27		1.933	0.22	2.951	1.86	34	1.64	1.018	1.464 (1.328, 1.6)	-2.78 (-3.115, -2.445)
28		2.257	5.76	2.973	13.34	24	7.58	0.716	10.51 (10.21, 10.82)	-18.24 (-19.03, -17.45)
29										
30		2.227	2.87	2.944	8.80	24	5.93	0.717	8.219 (7.928, 8.511)	-15.69 (-16.45, -14.94)
31	ALV-A 2	2.265	1.91	2.982	10.77	24	8.86	0.717	12.46 (12.19, 12.72)	-26.61 (-27.31, -25.91)
32		2.414	1.13	3.005	4.63	20	3.50	0.591	6.006 (5.606, 6.406)	-13.65 (-14.74, -12.57)
33		2.352	2.16	2.978	10.29	21	8.13	0.626	13.06 (12.69, 13.43)	-28.88 (-29.86, -27.9)
34		2.157	3.80	2.965	12.55	27	8.75	0.808	10.8 (10.58, 11.03)	-19.77 (-20.35, -19.18)
35		1.737	1.76	2.993	16.30	42	14.54	1.256	11.59 (11.5, 11.67)	-18.63 (-18.84, -18.43)
36		2.377	3.52	2.974	10.68	20	7.16	0.597	11.96 (11.52, 12.4)	-25.22 (-26.39, -24.05)
37	RPV-C 2	2.405	5.27	2.971	15.31	19	10.04	0.566	17.8 (17.34, 18.25)	-37.86 (-39.08, -36.63)
38		2.245	4.75	2.962	14.78	24	10.03	0.717	14 (13.72, 14.27)	-26.94 (-27.66, -26.22)
39		2.463	2.95	2.967	10.66	17	7.71	0.504	15.38 (14.79, 15.97)	-35.27 (-36.87, -33.67)
40		2.205	4.15	2.982	13.61	26	9.46	0.777	12.21 (11.97, 12.46)	-23.07 (-23.72, -22.43)
41		2.222	2.41	2.969	10.77	25	8.36	0.747	11.22 (10.95, 11.49)	-22.82 (-23.52, -22.11)
42		2.422	1.38	2.989	6.85	19	5.47	0.567	9.699 (9.235, 10.16)	-22.43 (-23.69, -21.17)
43	RPV-A 2	2.282	1.24	3.000	4.81	24	3.57	0.718	4.952 (4.672, 5.232)	-10.32 (-11.06, -9.577)
44		2.542	1.07	3.005	5.46	16	4.39	0.463	9.731 (9.116, 10.35)	-23.99 (-25.7, -22.28)
45		2.405	1.50	3.002	5.47	20	3.97	0.597	6.599 (6.172, 7.026)	-14.66 (-15.82, -13.5)
46		2.374	3.45	2.998	11.03	21	7.58	0.624	12.19 (11.81, 12.56)	-25.8 (-26.81, -24.78)
47		2.316	3.78	2.972	13.52	22	9.74	0.656	14.83 (14.48, 15.19)	-30.88 (-31.82, -29.94)
48		2.52	2.14	2.995	8.90	17	6.76	0.475	14.3 (13.62, 14.97)	-34.23 (-36.09, -32.36)
49	ALV-C 3	2.469	4.63	2.973	14.24	17	9.61	0.504	19.11 (18.51, 19.71)	-42.9 (-44.54, -41.27)
50		2.485	9.39	2.960	21.77	16	12.38	0.475	25.93 (25.27, 26.59)	-55.33 (-57.13, -53.54)
51		2.392	3.52	2.988	14.92	20	11.40	0.596	19.15 (18.74, 19.57)	-42.61 (-43.73, -41.49)
52		2.547	4.03	2.992	13.23	15	9.20	0.445	20.74 (20.05, 21.43)	-49.12 (-51.04, -47.2)
53										
54		2.005	3.72	2.991	15.95	33	12.23	0.986	12.33 (12.18, 12.48)	-21.22 (-21.61, -20.84)
55	ALV-A 3	2.613	1.19	2.996	7.27	14	6.08	0.383	16.02 (15, 17.05)	-41.05 (-43.92, -38.18)
56		2.557	2.99	3.001	9.76	15	6.77	0.444	15.37 (14.61, 16.13)	-36.66 (-38.77, -34.55)
57		2.6	1.39	3.005	7.04	16	5.65	0.405	14.24 (13.31, 15.18)	-36.02 (-38.65, -33.39)
58		2.575	0.89	3.006	6.58	15	5.69	0.431	13.63 (12.98, 14.27)	-34.52 (-36.31, -32.73)
59		2.373	2.11	2.968	9.60	20	7.49	0.595	12.69 (12.24, 13.13)	-28.35 (-29.55, -27.15)
60		2.179	2.93	2.983	19.51	27	16.58	0.804	20.82 (20.6, 21.04)	-42.81 (-43.39, -42.24)
61	RPV-C 3	2.323	4.98	2.979	12.97	22	7.99	0.656	12.18 (11.83, 12.53)	-23.61 (-24.55, -22.68)
62										
63		2.299	1.14	2.985	5.99	23	4.85	0.686	7.003 (6.698, 7.308)	-15.22 (-16.02, -14.41)
64		2.367	1.03	2.992	5.56	21	4.53	0.625	7.254 (6.854, 7.653)	-16.46 (-17.54, -15.39)
65		2.245	2.06	2.991	9.11	25	7.05	0.746	9.507 (9.223, 9.79)	-19.61 (-20.35, -18.87)
66		2.258	1.76	3.003	7.48	25	5.72	0.745	7.683 (7.422, 7.944)	-15.85 (-16.54, -15.16)
67	RPV-A 3									
68		2.424	2.33	2.990	8.47	19	6.14	0.566	10.9 (10.43, 11.37)	-24.41 (-25.69, -23.14)
69		2.543	0.93	2.988	5.91	15	4.98	0.445	11.34 (10.67, 12)	-28.23 (-30.07, -26.39)
70		2.31	1.97	2.965	9.22	22	7.25	0.655	11.05 (10.69, 11.41)	-23.87 (-24.83, -22.91)
71		2.457	2.20	2.992	8.27	18	6.07	0.535	11.39 (10.9, 11.88)	-26.09 (-27.43, -24.75)
72		2.433	1.51	2.966	6.66	18	5.15	0.533	9.637 (9.114, 10.16)	-22.24 (-23.66, -20.83)

Tabella 3.5: Dati Matlab TriTDoc



## 3.2 Effetti dei trattamenti su densità e spessore

Sono stati analizzati gli effetti che i trattamenti di decellularizzazione hanno prodotto sulle caratteristiche fisiche del pericardio. In particolare sono stati confrontati i valori medi di densità e spessore, suddivisi sia per zone che per area ventricolare (tabelle 3.7-3.8).

Density [g/cm <sup>3</sup> ]			
<i>zona</i>	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV-C	1.04864285 ± 0.000758440	1.04938888 ± 0.001048306	1.05006666 ± 0.001131651
ALV-A	1.04933333 ± 0.000560112	1.04705882 ± 0.000871901	1.04866666 ± 0.001296047
PRV-C	1.04860000 ± 0.000423140	1.04533333 ± 0.001167613	1.04950000 ± 0.000790569
PRV-A	1.04988235 ± 0.000352327	1.04729411 ± 0.000989195	1.04964705 ± 0.000492152
<i>ventricolo</i>	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV	1.04903125 ± 0.000452727	1.04825714 ± 0.000711659	1.04930303 ± 0.000869827
PRV	1.04928125 ± 0.000323728	1.04628571 ± 0.000786617	1.04957575 ± 0.000452330

**Tabella 3.7:** Densità media dei campioni

Thickness [cm]			
<i>zona</i>	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV-C	0.05008157 ± 0.002712047	0.05663438 ± 0.002885878	0.05175279 ± 0.003229496
ALV-A	0.04919571 ± 0.002298552	0.06520275 ± 0.001772857	0.05083072 ± 0.002642748
PRV-C	0.05245476 ± 0.002030673	0.05400925 ± 0.002837367	0.05542517 ± 0.001729560
PRV-A	0.06049195 ± 0.004477122	0.06462899 ± 0.003007331	0.06046085 ± 0.003776562
<i>ventricolo</i>	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV	0.04956720 ± 0.001725843	0.06079616 ± 0.001855159	0.05124985 ± 0.002025949
PRV	0.05709160 ± 0.002986921	0.05861114 ± 0.002256905	0.05801931 ± 0.002133410

**Tabella 3.8:** Spessore medio dei campioni

Una prima valutazione è stata fatta mediante rappresentazione grafica con istogrammi.

Osservando i grafici si può notare che la zona del PRV è in generale più spessa e densa della zona dell'ALV.

Analizzando l'effetto dei trattamenti di decellularizzazione si nota poi che i campioni di pericardio trattati con TriCol presentano un aumento di spessore rispetto ai campioni nativi, più accentuato nella regione ALV ed in particolare nell'ALV-A. L'aumento di spessore dato dal trattamento con TriTDoc non sembra invece essere particolarmente significativo.

Per quanto riguarda la densità, invece, si nota che in generale i campioni di

### 3.3. EFFETTI DEI TRATTAMENTI SU MODULO ELASTICO E RIGIDEZZA 59

pericardio trattati con TriCol presentano valori inferiori rispetto al nativo, in particolare in tutta la zona RPV. La differenza tra campioni nativi e trattati con TriTDoc, non sembra essere significativa, anche se quest'ultimi presentano, in generale, valori di densità leggermente superiori.

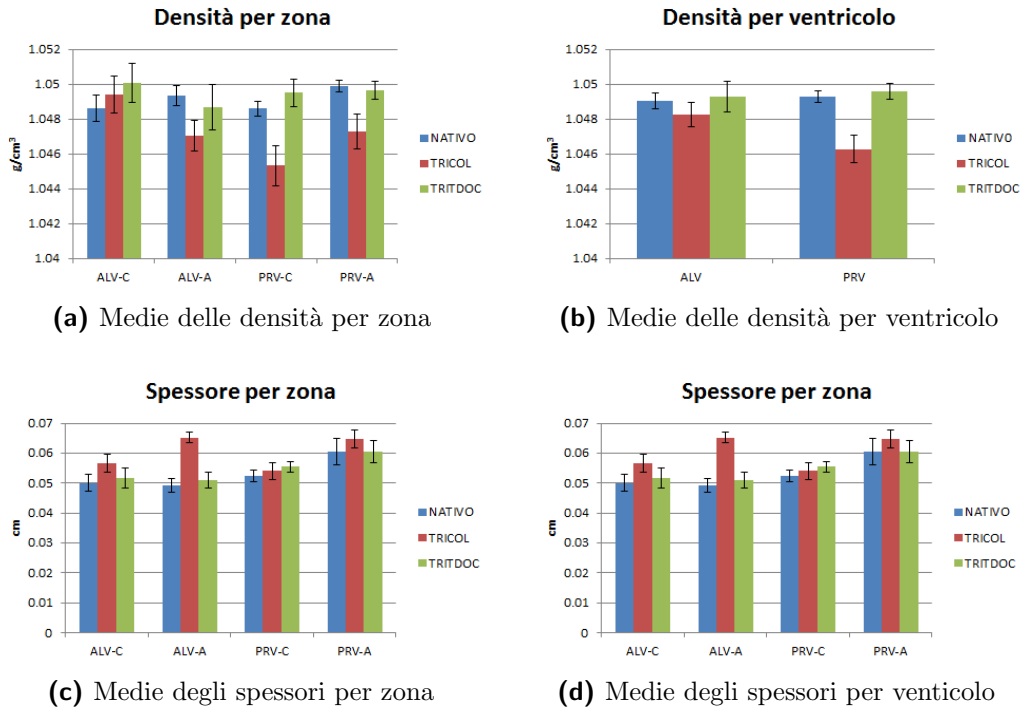


Figura 3.1: Effetti dei trattamenti su densità e spessore.

### 3.3 Effetti dei trattamenti su modulo elastico e rigidezza

A partire dai dati ottenuti dai test effettuati con il sistema Bose Electroforce, sono stati analizzati anche gli effetti che i trattamenti di decellularizzazione hanno avuto sulle caratteristiche meccaniche. In particolare sono stati confrontati i valori medi di modulo elastico longitudinale e rigidezza, suddivisi sia per zone che per area ventricolare (tabelle 3.10-3.9).

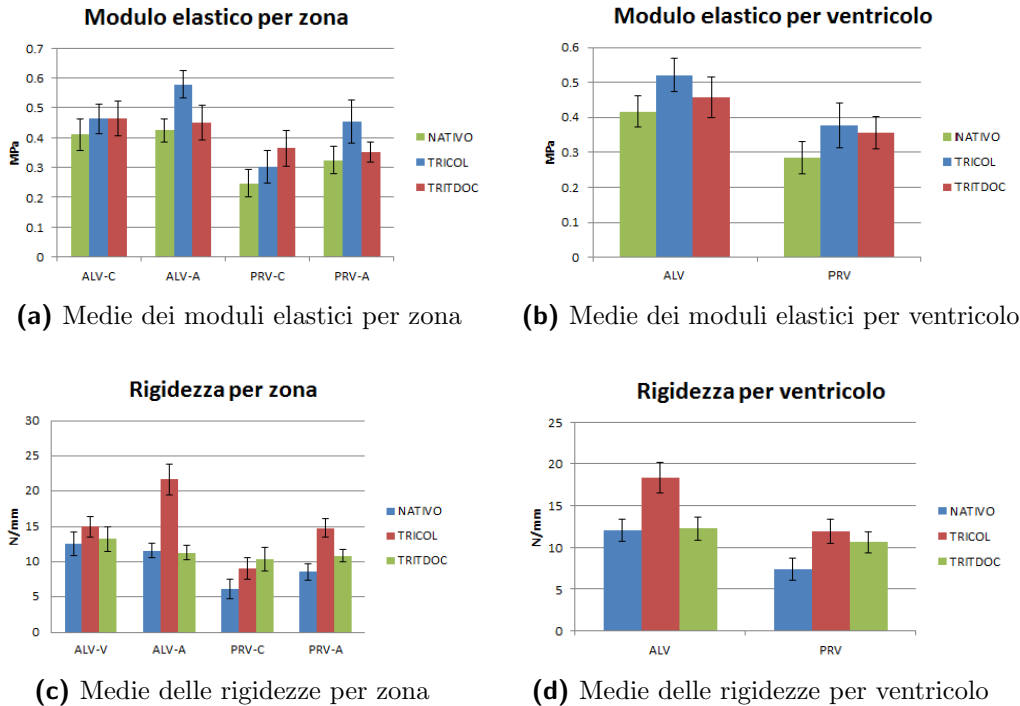
Osservando i grafici si nota che la zona dell'ALV presenta una resistenza complessivamente maggiore alle prove a trazione rispetto alla zona del PRV, sia in termini di modulo di Young che in termini di rigidezza.

Stiffness [N/mm]			
zona	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV-C	12.53526897 ± 1.64319561	14.95795302 ± 1.400388055	13.19661819 ± 1.809491673
ALV-A	11.58917451 ± 0.989410209	21.69318205 ± 2.169213631	11.28275098 ± 1.023217333
PRV-C	6.14303665 ± 1.401419425	9.02041557 ± 1.544850204	10.39817187 ± 1.660311524
PRV-A	8.54767851 ± 1.214870081	14.78087844 ± 1.354637139	10.84317932 ± 0.894236937
ventricolo	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV	12.06222174 ± 1.316302910	18.32556754 ± 1.784800843	12.23968458 ± 1.416354503
PRV	7.34535758 ± 1.308144753	11.90064701 ± 1.449743671	10.62067559 ± 1.277274230

Tabella 3.9: Rigidezza media dei campioni

Elastic Modulus [Mpa]			
zona	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV-C	0.40980764 ± 0.051828657	0.46274893 ± 0.048512725	0.46321836 ± 0.057708495
ALV-A	0.42365804 ± 0.038535938	0.57780385 ± 0.046275582	0.45006748 ± 0.057024945
PRV-C	0.24642915 ± 0.046525144	0.30199926 ± 0.056120560	0.36366360 ± 0.058755464
PRV-A	0.32425746 ± 0.046880326	0.45242877 ± 0.072188389	0.35127472 ± 0.033672515
ventricolo	NATIVO	TRICOL	TRITDOC
ALV	0.41673284 ± 0.045182298	0.52027639 ± 0.047394154	0.45664292 ± 0.057366720
PRV	0.28534331 ± 0.046702735	0.37721402 ± 0.064154474	0.35746916 ± 0.046213989

Tabella 3.10: Modulo elastico medio dei campioni

Figura 3.2: Effetti dei trattamenti su *modulo elastico* e *rigidezza*.

Per quanto riguarda gli effetti dei trattamenti di decellularizzazione, i campioni di pericardio trattati presentano, in generale, un modulo elastico ed una



rigidezza complessivamente maggiori rispetto al nativo.

In particolare, i campioni trattati con TriCol mostrano valori di modulo elastico e rigidezza sensibilmente maggiori rispetto ai corrispondenti campioni nativi e decellularizzati TriTDoc; questa differenza appare ancora più marcata nelle zone A sia dell'area dell'ALV che del PRV. I campioni trattati con TriTDoc sembrano essere a loro volta più resistenti di quelli nativi; questa differenza risulta marcata solo nei campioni provenienti dalle zone PRV del pericardio.

Come ci si poteva aspettare, è presente un parallelismo tra i valori di modulo elastico e rigidezza, valido per ogni gruppo di campioni analizzato. Tale somiglianza è dovuta al fatto che modulo elastico e rigidezza sono direttamente proporzionali, come visto nella 3.7.

### 3.4 Analisi statistiche

A supporto delle valutazioni fatte tramite istogrammi, sono stati effettuati alcuni test statistici per valutare la significatività delle differenze nei parametri di spessore, densità, rigidezza e modulo elastico.

#### 3.4.1 T-Test

La T di student (o T-test) è una procedura di statistica inferenziale utilizzata per determinare se le medie di due gruppi di dati uniformi siano significativamente differenti.

La formula per il calcolo della T-test tiene conto di 2 parametri: l'ampiezza della differenza tra le medie e l'ampiezza dell'errore standard. Più la differenza tra le due medie è alta, più è probabile che essa sia significativa, viceversa, più è elevata la variabilità dei dati (quindi l'errore della stima) più è bassa la probabilità che le differenze osservate tra le medie siano significative.

Utilizzando excell sono state ottenute le Tabelle 3.11-3.12-3.13 dove sono riportati rispettivamente i valori delle T-test di spessore, densità e modulo elastico, relative ai confronti tra zone pericardiche e trattamenti.

In blu sono stati evidenziati i valori di  $T < 0.05$ , valore preso come discriminante per la significatività della differenza tra le medie.

Dai valori evidenziati in tabella, risulta che i campioni TriCol presentano una differenza di spessore significativa sia tra zona A e zona C dell'ALV che tra zona A e zona C del PRV; tali differenze non risultano invece significative

Pericardial zone			Treatment			
ALV-A/ALV-C	NATIVO	0.80518	NATIVO/TRICOL	ALV-C	0.10892	ALV 0.00003 PRV 0.68662
	TRICOL	0.01803		ALV-A	5.4E-06	
	TRITDOC	0.82670		PRV-C	0.67767	
		PRV-A		0.47029		
PRV-A/PRV-C	NATIVO	0.14670	NATIVO/TRITDOC	ALV-C	0.69516	ALV 0.52959 PRV 0.80156
	TRICOL	0.01608		ALV-A	0.64367	
	TRITDOC	0.23804		PRV-C	0.32376	
		PRV-A		0.99596		
ALV / PRV	NATIVO	0.03500	TRICOL/TRITDOC	ALV-C	0.26872	ALV 0.00091 PRV 0.84951
	TRICOL	0.45751		ALV-A	0.00010	
	TRITDOC	0.02467		PRV-C	0.67351	
	ALL	0.03637		PRV-A	0.39531	

(a) Confronto tra zone.

(b) Confronto tra trattamenti.

**Tabella 3.11:** T-Test spessore

nei campioni di pericardio nativo ed in quelli trattati con TriTDoc.

Viceversa, prendendo in analisi le due zone pericardiche senza distinzioni tra zona A e zona C, risulta che i campioni TriCol non presentano una significativa differenza di densità tra ALV e PRV, differenza che risulta invece significativa nel caso del pericardio nativo e in quello trattato con TriTDoc.

Se si analizza la differenza di spessore tra pericardio dell'ALV e pericardio del PRV a prescindere dai trattamenti, tale differenza risulta, ancora una volta, significativa.

Mettendo a confronto i trattamenti invece, si nota che i campioni di pericardio trattati con TriCol presentano una generale differenza di spessore significativa rispetto al nativo nella zona dell'ALV ed, in particolare, questa differenza sembra dipendere dalla significativa differenza di spessore riscontrata nella zona A dell'ALV.

Una condizione analoga si trova anche nel confronto tra pericardio trattato con TriCol e trattato con TriTDoc.

Tra campioni di pericardio nativo e trattato con TriTDoc sembra non esserci alcuna significativa differenza di spessore. Dai valori evidenziati in tabella, si nota che non vi sono significative differenze di densità tra le varie zone pericardiche; l'unica eccezione si riscontra nel confronto interno al PRV tra zona A e zona C nel caso del pericardio nativo.

Differenze più significative si riscontrano invece nei confronti effettuati tra trattamenti.

Si nota infatti che, nel confronto tra pericardio nativo e trattato con TriCol, la densità varia significativamente all'interno del PRV, sia considerato come unica zona che confrontando singolarmente le zone A e C; considerando questa

Pericardial zone			Treatment			
ALV-A/ALV-C	NATIVO	0.46009	NATIVO/TRICOL	ALV-C	0.56393	ALV 0.36049 PRV 0.00041
	TRICOL	0.10085		ALV-A	0.04061	
	TRITDOC	0.42204		PRV-C	0.01330	
		PRV-A		0.01139		
PRV-A/PRV-C	NATIVO	0.02723	NATIVO/TRITDOC	ALV-C	0.30122	ALV 0.78215 PRV 0.58653
	TRICOL	0.17914		ALV-A	0.64122	
	TRITDOC	0.87578		PRV-C	0.32605	
		PRV-A		0.70031		
ALV / PRV	NATIVO	0.64072	TRICOL/TRITDOC	ALV-C	0.66353	ALV 0.35562 PRV 0.00031
	TRICOL	0.05702		ALV-A	0.31590	
	TRITDOC	0.78207		PRV-C	0.00525	
	ALL	0.32741		PRV-A	0.02601	

(a) Confronto tra zone.

(b) Confronto tra trattamenti.

Tabella 3.12: T-Test densità

suddivisione, sempre tra nativo e trattato con TriCol, risulta significativa anche la differenza di densità nella zona A dell'ALV.

Anche nel confronto tra pericardio trattato con TriCol e TriTDoc si nota che la differenza di densità risulta significativa solo nel PRV, sia considerato come unica zona che confrontando singolarmente le zone A e C.

Tra campioni di pericardio nativo e trattato con TriTDoc sembra non esserci nessuna significativa differenza di densità.

Pericardial zone			Treatment			
ALV-A/ALV-C	NATIVO	0.12471	NATIVO/TRICOL	ALV-C	0.72021	ALV 0.01738 PRV 0.06954
	TRICOL	0.01252		ALV-A	0.00020	
	TRITDOC	0.06919		PRV-C	0.12993	
		PRV-A		0.12613		
PRV-A/PRV-C	NATIVO	0.04530	NATIVO/TRITDOC	ALV-C	0.31362	ALV 0.24742 PRV 0.02370
	TRICOL	0.09248		ALV-A	0.53881	
	TRITDOC	0.80657		PRV-C	0.01748	
		PRV-A		0.42159		
ALV / PRV	NATIVO	2.1E-06	TRICOL/TRITDOC	ALV-C	0.15297	ALV 0.24130 PRV 0.89086
	TRICOL	1.2E-04		ALV-A	0.00567	
	TRITDOC	0.00068		PRV-C	0.26504	
	ALL	2.1E-11		PRV-A	0.30625	

(a) Confronto tra zone.

(b) Confronto tra trattamenti.

Tabella 3.13: T-Test modulo elastico

Analizzando le differenze nel modulo elastico, queste appaiono significative tra pericardio dell'ALV e del PRV sia per il pericardio nativo che per quelli trattati. Si riscontrano inoltre significative differenze tra le zone A e C del PRV nel pericardio nativo e tra le zone A e C del pericardio trattato con TriCol. Rispetto ai trattamenti si ha che nel confronto tra pericardio nativo e TriCol risulta significativa la differenza di modulo elastico nel pericardio dell'ALV, in particolare, tale differenza risulta significativa nella zona A dell'ALV.

Mettendo a confronto il pericardio nativo con quello trattato con TriTDoc, si ha che la differenza che risulta significativa è quella presente nel pericardio del PRV, differenza risulta significativa nella zona C del PRV.

Infine, nel confronto tra pericardio trattato con TriCol e trattato con TriTDoc, l'unica differenza nel modulo elastico che risulti significativa è quella presente della zona A dell'ALV.

### 3.4.2 ANOVA (Kruskall-Wallis) test

Per effettuare un'ulteriore analisi statistica sul modulo elastico (parametro di primo interesse in questo studio), è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis (K.W.), versione non parametrica dell'ANOVA. Tale test consente di verificare l'uguaglianza delle mediane di diversi gruppi, confrontando la variabilità interna del singolo gruppo con la variabilità tra gruppi.

In questo modo è stato possibile effettuare anche un confronto per zona tra le tre tipologie di tessuto (uno nativo e due trattati) prese assieme.

Come per il T-test, è stato preso come discriminante di significatività il valore 0.05. Utilizzando Matlab sono stati ottenuti i risultati del K.W. test riportati nella Tabella 3.14. I valori inferiori al discriminante sono stati evidenziati in blu. Nell'analisi tra zone pericardiche, risultano significative le differenze tra

Pericardial zone			Treatment						
ALV-A/ALV-C	NATIVO	0.9495	NATIVO/TRICOL	ALV-C	0.3928	ALV	0.0022		
	TRICOL	0.0136		ALV-A	0.0006				
	TRITDOC	0.5478		PRV-C	0.3585			PRV	0.0808
		PRV-A		0.0619					
PRV-A/PRV-C	NATIVO	0.0816	NATIVO/TRITDOC	ALV-C	0.2546	ALV	0.237		
	TRICOL	0.0192		ALV-A	0.7042			PRV	0.0848
	TRITDOC	0.8743		PRV-C	0.0575			PRV	0.0848
		PRV-A		0.8247					
ALV / PRV	NATIVO	0.0001	TRICOL/TRITDOC	ALV-C	0.8743	ALV	0.05		
	TRICOL	0.0005		ALV-A	0.0024			PRV	0.8658
	TRITDOC	0.0031		PRV-C	0.1839			PRV	0.8658
		PRV-A		0.1065					
(a) Confronto tra zone.			TRICOL/TRITDOC/NATIVO	ALV-C	0.5023	ALV	0.0075		
				ALV-A	0.0008			PRV	0.1324
				PRV-C	0.1254			PRV	0.1324
				PRV-A	0.1269				
			(b) Confronto tra trattamenti.						

**Tabella 3.14:** Analisi A-NOVA Kruskal-Wallis modulo elastico

pericardio dell'ALV e del PRV, a prescindere dal trattamento. Il pericardio trattato con TriCol presenta una differenza significativa anche tra le zone A e C dell'ALV e tra zone A e C del PRV.

Per quanto riguarda il confronto tra trattamenti, si ha che nel confronto tra pericardio nativo e pericardio trattato con TriCol, risulta significativa la differenza di modulo elastico nell'ALV; questa differenza appare anche nella zona A dell'ALV.

Nel confronto tra pericardi trattati con TriCol e trattati con TriTDoc, l'unica differenza significativa risulta essere nella zona A dell'ALV.

Non sembrano esserci differenze significative tra nativo e TriTDoc.

Mettendo infine a confronto tutti i trattamenti, si nota che la zona pericardica che presenta differenze nel modulo di Young più significative è quella dell'ALV. In particolare, risulta significativa la differenza presente nella zona A dell'ALV.

### 3.5 Analisi preliminare del Pericardio Porcino

I test effettuati sul pericardio bovino, sono stati effettuati anche su campioni di pericardio porcino.

Questa fase di studio è stata svolta, momentaneamente, solo a livello preliminare a causa delle maggiori difficoltà riscontrate nel lavorare con questo tipo di tessuto.

Il pericardio porcino risulta infatti essere meno resistente alle prove di trazione rispetto a quello bovino, probabilmente a causa del minor spessore (0.2,0.3 mm circa contro i 0.4,0.5 del bovino); ciò comporta che molti campioni giungono a rottura prima della fine del test meccanico ed una conseguente difficoltà ad elaborare delle analisi statistiche significative e confrontabili con quelle relative al pericardio bovino.

Sono state comunque effettuate una serie di prove su pericardio porcino non trattato, per avere un'indicazione del suo modulo di elasticità longitudinale a seconda delle zone pericardiche e dell'orientamento, in modo da poter fornire, se non altro, un punto d'inizio su cui lavorare per eventuali studi successivi.

Purtroppo, una sensibile quantità di campioni sono andati rotti durante le prove e questo ha permesso di elaborare dei dati soltanto parzialmente indicativi. In alcuni casi, ad esempio, non è stato possibile elaborare medie su gruppi, essendo questi costituiti da un solo campione; ciò ha impedito di poter effettuare dei confronti in termini di errore standard, tra le medie, portando quindi a dover ragionare su valori di debole significatività.

#### 3.5.1 Suddivisione dei campioni

I campioni utilizzati sono stati ricavati da un unico pericardio, in modo da poter trascurare l'errore dovuto alla variabilità intra-specie.

Il pericardio è stato suddiviso in 4 aree, in base alla corrispondenza con le camere sottostanti, rispettivamente in pericardio del ventricolo anteriore destro (ARV), sinistro (ALV), posteriore destro (PRV) e posteriore sinistro (PLV). La distinzione tra le aree è analoga a quella fatta per il pericardio bovino [Paragrafo 2.1].

Dalle aree dell'ARV, ALV e PLV sono stati ricavati, prendendo come riferimento l'asse atrio-ventricolare:

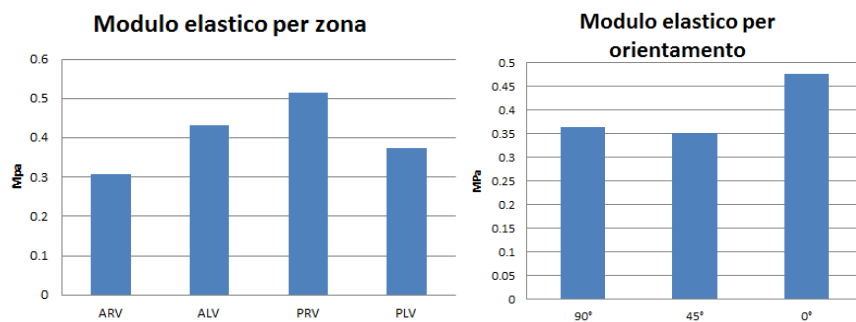
- 5 campioni orientati a 90°.

- 4 campioni orientati a  $45^\circ$ .
- 4 campioni orientati a  $0^\circ$  (paralleli all'asse, come i campioni studiati nel pericardio bovino).

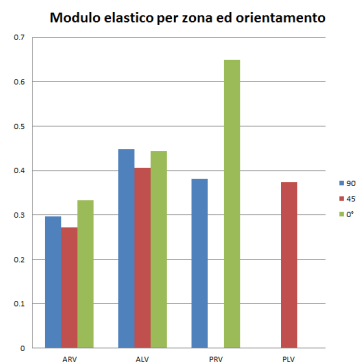
Per problemi legati alla natura estremamente eterogenea del tessuto e quindi alla sua difficile lavorazione, invece, dall'area del PRV è stato possibile ricavare solo un campione per orientamento.

### 3.5.2 Confronto per zona ed orientamento

Dai test effettuati, sono stati ottenuti i risultati riportati in tabella,



(a) Medie sui campioni raggruppati per zona (b) Medie sui campioni raggruppati per orientamento



(c) Medie totali

**Figura 3.3:** Modulo elastico del pericardio porcino per zona ed orientamento.

Dagli istogrammi [Fig 3.3], si nota che la zona pericardica più resistente parrebbe essere quella del PRV, mentre sarebbero i campioni relativi al pericardio

campione	zona e orientamento	D-min [mm]	L-min [N]	D-max [mm]	L-max [N]	n-camp	$\Delta L$ [N]	$\Delta D$ [mm]	p1 [N/mm] (95% c.b.)	p2 [N] (95% c.b.)
1	ARV 90°	2.469	0.32	3.004	3.12	18	2.8	0.535	5.318 (4.801, 5.835)	-13.15 (-14.57, -11.73)
2		2.20	0.65	3.004	4.04	27	3.39	0.804	4.24 (4.007, 4.472)	-8.958 (-9.566, -8.349)
3										
4		2.289	0.08	3.003	2.10	24	2.02	0.714	2.847 (2.563, 3.132)	-6.709 (-7.465, -5.953)
4bis (49)		2.226	-0.1	3.003	2.48	26	2.58	0.777	3.373 (3.127, 3.62)	-7.888 (-8.534, -7.241)
5	45°									
6										
7		2.300	0.05	3.004	2.40	24	2.35	0.704	3.438 (3.145, 3.73)	-8.15 (-8.93, -7.37)
8										
9	0°	2.022	-0.21	2.979	1.04	32	1.25	0.957	1.379 (1.228, 1.53)	-3.231 (-3.612, -2.849)
10		2.165	-0.13	3.001	2.07	28	2.2	0.836	2.612 (2.407, 2.816)	-6.032 (-6.563, -5.5)
11		2.098	1.47	2.995	6.68	30	5.21	0.897	5.846 (5.651, 6.041)	-11.08 (-11.58, -10.58)
12		2.272	1.35	2.99	6.05	24	4.7	0.718	6.583 (6.302, 6.864)	-13.9 (-14.65, -13.16)
13	ALV 90°	2.183	0.330	2.989	3.490	27	3.16	0.806	3.903 (3.667, 4.14)	-8.462 (-9.076, -7.848)
14		1.788	-0.17	2.866	0.98	36	1.15	1.078	1.095 (0.9642, 1.225)	-2.362 (-2.668, -2.055)
15										
16		2.095	1.96	2.962	7.49	29	5.53	0.867	6.342 (6.139, 6.545)	-11.58 (-12.1, -11.07)
16bis (50)		1.979	1.22	2.965	7	33	5.78	0.986	5.879 (5.717, 6.042)	-10.68 (-11.09, -10.28)
17	45°	2.162	-0.03	3	1.31	28	1.34	0.838	1.546 (1.341, 1.751)	-3.596 (-4.128, -3.065)
18		2.004	0.90	2.991	5.66	33	4.76	0.987	4.835 (4.677, 4.993)	-9.053 (-9.45, -8.656)
19		2.251	-0.03	2.998	1.85	25	1.88	0.747	2.476 (2.195, 2.757)	-5.879 (-6.619, -5.139)
20		1.837	1.29	2.973	10.22	38	8.93	1.136	7.939 (7.819, 8.059)	-13.61 (-13.9, -13.32)
21	0°	1.926	-0.190	3.003	1.020	36	1.21	1.077	1.095 (0.9656, 1.225)	-2.517 (-2.84, -2.195)
22		2.159	0.020	2.995	2.080	28	2.06	0.836	2.429 (2.215, 2.643)	-5.483 (-6.037, -4.93)
23		2.055	0.99	2.982	6.67	31	5.68	0.927	6.17 (5.994, 6.345)	-11.97 (-12.41, -11.52)
24		2.232	0.69	2.98	5.36	25	4.67	0.748	6.327 (6.062, 6.591)	-13.73 (-14.43, -13.04)
25	PRV 90°	2.426	0.1	2.995	1.22	19	1.12	0.569	1.976 (1.824, 2.127)	-4.796 (-5.208, -4.384)
26		2.081	1.12	2.979	5.36	30	4.24	0.898	4.72 (4.529, 4.912)	-8.968 (-9.455, -8.481)
27										
28										
28bis		2.268	0.38	3.003	2.29	25	1.91	0.735	2.617 (2.505, 2.728)	-5.663 (-5.958, -5.367)
29	45°									
30		2.296	0.14	3.005	1.19	24	1.05	0.709	1.502 (1.392, 1.612)	-3.418 (-3.711, -3.126)
31										
32										
33	0°									
34		2.311	0.9	2.998	5.18	23	4.28	0.687	6.26 (5.944, 6.575)	-13.86 (-14.7, -13.02)
35										
36										
37	PLV 90°									
38	45°	2.18	4.37	2.957	13.31	26	8.94	0.777	11.5 (11.24, 11.75)	-20.97 (-21.62, -20.32)
39	0°									

Tabella 3.15: Dati Matlab Porcino nativo

della zona dell'ARV ad essere quelli che presentano il minor modulo elastico. Tuttavia questo dato è di dubbia interpretazione poiché, mentre per le zone dell'ARV ed ALV sono andati rotti circa il 30% dei campioni, nella zona del PRV sono andati rotti il 75% dei campioni, dato profondamente in contrasto con l'ipotesi di maggior resistenza.

Sembra invece essere più affidabile il dato relativo agli orientamenti. In tutti le aree infatti (tralasciando l'analisi del PLV, non avendo campioni utili su cui elaborare stime) sembra che l'orientamento a 0°, parallelo cioè all'asse ventricolo-atrio, sia quello preferibile mentre il taglio di campioni a 45° pare essere il più sconsigliato.



SSE	R <sup>2</sup>	Adj-R <sup>2</sup>	RMSE	m [N/mm]	E(m) [N/mm]	fle [mm]	spe [cm]	lar [cm]	sez [mm]	coeff [MPa]	media [MPa]	dev.st [MPa]
0.5156	0.9651	0.9631	0.1741	5.234	3.900	1.136	0.01975	0.4583	0.9053	0.3547	0.2969	0.0555
0.5435	0.9818	0.9811	0.1446	4.216		1.5855	0.01873	0.4517	0.8458	0.3283		
0.5034	0.949	0.9468	0.1479	2.829		2.2135	0.01830	0.4077	0.7461	0.2735		
0.5227	0.9695	0.9683	0.1446	3.320		2.331	0.02238	0.4710	1.0541	0.2309		
					3.338						0.2723	
0.5286	0.9625	0.9609	0.1516	3.338		2.3445	0.02307	0.3903	0.9004	0.2723		
					4.995						0.333	0.1029
0.4871	0.9621	0.9607	0.1343	2.632		1.9700	0.02029	0.3833	0.7779	0.2358		
0.5853	0.9923	0.9921	0.1421	5.808		1.4550	0.02332	0.4983	1.1621	0.3226		
0.4918	0.9903	0.9899	0.1462	6.546		1.6595	0.02467	0.4010	0.9891	0.4407		
0.560	0.978	0.977	0.147	3.921	5.387	1.989	0.03129	0.2787	0.8719	0.3143	0.4479	0.1162
0.551	0.9932	0.993	0.1403	6.378		1.4815	0.02010	0.4073	0.8187	0.5049		
0.5929	0.9942	0.994	0.1361	5.862		1.486	0.01940	0.3737	0.7247	0.5246		
					5.067						0.4055	0.2092
0.5627	0.9918	0.9916	0.1326	4.823		1.66	0.02201	0.3230	0.7109	0.4518		
0.5801	0.9324	0.9296	0.1555	2.517		2.3855	0.02696	0.3893	1.0498	0.1771		
0.5736	0.9979	0.9979	0.1245	7.861		0.984	0.01799	0.4450	0.8005	0.5876		
					4.945						0.4442	0.2543
0.532	0.953	0.951	0.140	2.464		2.48	0.02455	0.3817	0.9369	0.1967		
0.5405	0.9942	0.994	0.1342	6.127		1.6815	0.02190	0.4337	0.9499	0.431		
0.5161	0.9902	0.9898	0.1466	6.243		1.9485	0.01388	0.4433	0.6156	0.7048		
					3.6601						0.3814	
0.56330	0.9887	0.9883	0.13940	4.7216		0.9575	0.0197	0.3747	0.7375	0.3814		
0.09094	0.9899	0.9895	0.06156	2.5986		1.3835	0.019	0.2877	0.5476			
					6.2300						0.6494	
0.52140	0.9872	0.9866	0.15390	6.2300		1.3975	0.0171	0.3597	0.6137	0.6494		
					11.5058							
0.55130	0.9972	0.997	0.14850	11.5058		0.9395	0.0414	0.4417	1.8282		0.3738	

Tabella 3.16: Analisi meccanica Porcino nativo

### 3.5.3 Analisi su campioni con larghezza maggiore

Per ovviare al problema della frequente rottura dei campioni, sono stati testati 9 ulteriori campioni, provenienti da uno stesso pericardio porcino. Tali campioni, orientati tutti parallelamente all'asse ventricolo-atrio, sono stati prelevati dalle zone del ventricolo anteriore sinistro, del ventricolo anteriore destro e del ventricolo posteriore destro.

Le dimensioni dei campioni sono però state aumentate da 20x3 mm<sup>2</sup> a 20x5 mm<sup>2</sup>. In tal modo, probabilmente a causa del maggior numero di fibre resistenti o della minor influenza degli effetti di compressione dovuti alla pressione delle DMA grips alle estremità del campione, il tessuto, non incorrendo più così frequentemente a rottura, sembrerebbe essere più facile da studiare.

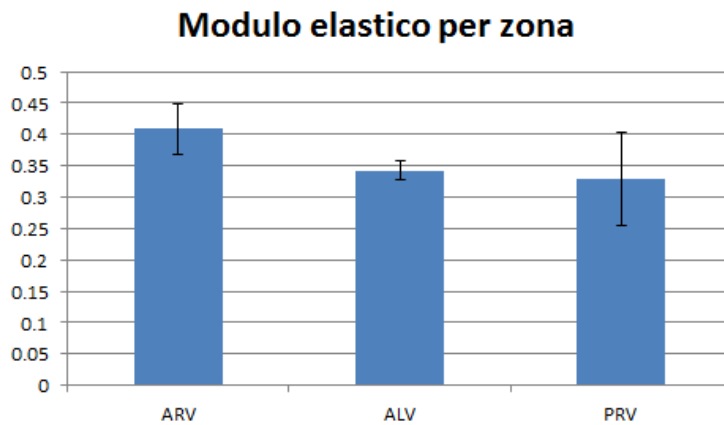
In seguito sono riportati i dati ottenuti dai test meccanici (tabelle 3.17-3.18) ed un istogramma [Fig 3.4] relativi alle medie del modulo elastico nelle varie zone.

campione	D-min [mm]	L-min [N]	D-max [mm]	L-max [N]	n-camp	$\Delta L$ [N]	$\Delta D$ [mm]	p1 [N/mm] (95% c.b.)	p2 [N] (95% c.b.)	SSE	R <sup>2</sup>	Adj-R <sup>2</sup>	RMSE
VAD 1	2.334	4.39	2.991	15.35	22	10.96	0.657	16.67 (16.3, 17.03)	-34.81 (-35.78, -33.83)	0.58050	0.9977	0.9976	0.16630
2	2.422	1.97	2.989	8.31	19	6.34	0.567	11.2 (10.72, 11.68)	-25.47 (-26.77, -24.17)	0.55070	0.9926	0.9922	0.17490
3	2.284	5.25	2.969	14.52	22	9.27	0.685	13.46 (13.13, 13.78)	-25.74 (-26.59, -24.9)	0.53800	0.9971	0.997	0.15640
VAS 4	2.347	5.49	2.973	15.55	21	10.06	0.626	16.04 (15.64, 16.43)	-32.46 (-33.52, -31.4)	0.57050	0.9972	0.9971	0.16890
5													
6	2.348	5.58	3.002	14.57	22	8.99	0.654	13.8 (13.44, 14.16)	-27.13 (-28.1, -26.16)	0.57050	0.9967	0.9965	0.16480
VPD 7	2.350	8.36	3.005	23.33	22	14.97	0.655	23.05 (22.73, 23.37)	-46.12 (-46.99, -45.25)	0.46000	0.9990	0.999	0.14800
8	2.387	5.29	3.007	18.61	21	13.32	0.620	21.74 (21.36, 22.12)	-46.96 (-47.99, -45.93)	0.52000	0.9986	0.9985	0.16120
9	2.232	3.20	3.005	12.35	26	9.15	0.773	12 (11.75, 12.25)	-23.89 (-24.55, -23.23)	0.53860	0.9974	0.9973	0.14680

**Tabella 3.17:** Dati Matlab Porcino nativo con campioni da 5mm

campione	m [N/mm]	E(m) [N/mm]	fle [mm]	spe [cm]	lar [cm]	sez [mm]	coeff [MPa]	media [MPa]	dev.st [MPa]	err [MPa]
VAD 1	16.6819	13.7988	1.246	0.037109	0.614	2.278501	0.457297	0.408675	0.069687	0.040234
2	11.1817		0.402	0.031688	0.579667	1.836874	0.328837			
3	13.5328		1.0145	0.030907	0.598667	1.850304	0.439892			
VAS 4	16.0703	14.9082	0.2685	0.039609	0.654333	2.59176	0.326675	0.341741	0.021306	0.015066
5										
6	13.7462		0.928	0.044576	0.512333	2.283797	0.356806			
VPD 7	22.8550	18.7253	1.084	0.078872	0.637667	5.029395	0.276474	0.32882	0.128669	0.074287
8	21.4839		1.39	0.046252	0.624333	2.887644	0.475412			
9	11.8370		1.052	0.052775	0.578667	3.053938	0.234574			

**Tabella 3.18:** Analisi meccanica Porcino nativo con campioni da 5mm



**Figura 3.4:** Modulo elastico pericardio porcino nativo con campioni da 5mm

# Capitolo 4

## Discussione e conclusioni

Le protesi biologiche Xenograft attualmente utilizzate per le sostituzioni valvolari cardiache, vanno incontro a degenerazione entro 10-15 anni dall'impianto e per questo nel 30% dei casi devo essere espantate e sostituite. Uno dei principali motivi di questa degenerazione è l'utilizzo di sostanze quali la glutaraldeide come fissanti. La glutaraldeide infatti, pur rimuovendo la componente cellulare dal tessuto (evitando così crisi di rigetto acuto da parte del ricevente a causa dell'impianto di materiale xenogenico) e migliorandone le proprietà meccaniche, essendo citotossica impedisce il ripopolamento cellulare autologo del paziente e porta a calcificazione [16].

Gli studi effettuati hanno avuto lo scopo di analizzare il Pericardio Bovino ed il Pericardio Porcino (tessuti xenogenici impiegati abitualmente per la costruzione di bioprotesi cardiache tradizionali e percutanee) decellularizzati attraverso diverse metodiche, alternative alla glutaraldeide, che utilizzano detergenti in condizioni non denaturanti (TRITON X-100, Colato di sodio, Deossicolato di sodio, e Taurodeossicolato di sodio), abbinati a soluzioni ipo ed ipertoniche, inibitori di proteasi ed endonucleasi. Il metodo TriCol (TRITON X-100 e Colato di sodio) è stato utilizzato in quanto il primo ad essere stato sviluppato e testato nei laboratori in cui sono stati svolti i lavori. Il metodo TriTDoc (TRITON X-100 e Taurodeossicolato di sodio) è stato usato in quanto metodo "innovativo" di decellularizzazione poiché impiega il Taurodeossicolato di Sodio.

## 4.1 Confronto tra i campioni

### 4.1.1 Pericardio Bovino

Dall'osservazione complessiva dei dati ottenuti dai vari test meccanici e statistici, si nota innanzi tutto che il pericardio della zona ALV presenta complessivamente caratteristiche migliori rispetto a quello della zona del PRV; tale dato risulta essere in accordo con la differente disposizione delle fibre collagene all'interno del tessuto, aventi un ordinamento parallelo e più ordinato nell'ALV che nel PRV [16].

Prendendo in analisi il solo pericardio dell'ALV, si nota inoltre che la zona ALV-A sembrerebbe leggermente più resistente alle prove di trazione rispetto alla zona C, anche se questa differenza risulta significativa solo nei campioni trattati con TriCol.

Il trattamento con Tricol risulta essere quello che comporta incrementi più significativi rispetto al pericardio nativo in termini di resistenza a trazione. A questa differenza si accompagnano anche un aumento dello spessore del tessuto ed una diminuzione media della densità. Quest'ultima caratteristica è dovuta al fatto che il trattamento con TriCol determina un aumento del contenuto d'acqua del tessuto, il che potrebbe inoltre portare ad un aumento dello spazio disponibile per il ripopolamento cellulare autologo nonché per l'inserimento di eventuali sostanze che favoriscano tale processo.

Il trattamento con TriTDoc non sembrerebbe causare significative variazioni rispetto al tessuto nativo, incrementandone solo leggermente tutti i parametri tenuti in analisi. Anche il confronto con il pericardio trattato con TriCol porta all'incirca alle stesse differenze statisticamente significative che quest'ultimo presentava con il pericardio nativo. Ponendo per certo che il trattamento svolga a pieno la sua funzione decellularizzante, la non significativa variazione dei parametri fisici e meccanici potrebbe indicare che, a differenza di quanto parrebbe mostrare il trattamento TriCol, non vi siano effetti significativi sulla ECM.

### 4.1.2 Pericardio Porcino

Purtroppo, la mancanza dei campioni decellularizzati di pericardio porcino ed il numero ridotto degli stessi anche nel caso del porcino nativo, non danno la possibilità di trarre conclusioni di alcun tipo. L'unico dato che potrebbe esser

tenuto in considerazione è il frequente raggiungimento del punto di rottura dei campioni aventi dimensioni uguali a quelli impiegati nelle analisi del pericardio bovino; questo dato potrebbe significare un'inferiore resistenza meccanica media complessiva a trazione del pericardio porcino rispetto a quello bovino. Tali dati necessitano comunque d'esser verificati con ulteriori studi.

## 4.2 Studi futuri

Per poter avere dei dati quantitativamente significativi, che possano essere confrontati con quelli relativi alle tecnologie attualmente impiegate per la realizzazioni di bioprotesi valvolari cardiache percutanee, il lavoro svolto andrà in futuro completato con ulteriori analisi più approfondite. In particolare, alla luce dei risultati ottenuti, nei seguenti studi potrebbero essere utile effettuare uno studio comparato tra campioni di pericardio bovino e porcino con campioni di grandezza omogenea e uguale a quella impiegata nella seconda fase dello studio preliminare sul pericardio porcino (paragrafo [3.5.3]); in questo modo sarebbe possibile verificare se effettivamente il pericardio porcino sia meno resistente alle prove di trazione longitudinale rispetto a quello bovino, anche a seconda dei diversi trattamenti di decellularizzazione a cui i campioni andrebbero sottoposti. Anche l'utilizzo di stampini per campioni biologici per ottenere campioni tutti identici in termini di dimensioni potrebbe ridurre la variabilità intra-campione, oltre che eventualmente limitare o quanto meno semplificare le analisi da effettuare per la determinazione delle caratteristiche fisiche dei singoli campioni.

Per migliorare la qualità delle analisi sarebbe inoltre utile riuscire ad elaborare una fase di condizionamento del campione durante i cicli di test, automatizzata e controllata con WinTest, con un algoritmo analogo al seguente:

1. *Controllo su Load, Azione su Displacement*: raggiungimento di un valore minimo di forza esercitata prestabilito (ad esempio 0.5N) e memorizzazione del corrispondente valore di trazione  $X_0$ .
2. *Controllo su Displacement, Azione su Load*: cicli di trazione analoghi a quelli descritti nel paragrafo [2.4.2] con valore di Displacement minimo  $X_0$  anziché 0.

In questo modo i campioni non raggiungerebbero mai una fase di rilassamento ma sarebbero sempre soggetti ad una tensione minima che ne garantisca la trazione minima iniziale. Un altro miglioramento utile potrebbe essere l'impiego di un sistema ottico per l'analisi in tempo reale della variazione di spessore del

campione, sincronizzata con l'acquisizione dei dati del sistema Bose Electroforce. Grazie al suo impiego (o all'impiego di una tecnologia equivalente), si otterrebbero valori del modulo di Young corretti e non approssimati, eliminando l'errore introdotto dall'utilizzo di modelli semplificati come descritto nel paragrafo [3.1] e potendo lavorare così con dati quantitativamente molto più significativi. Infine, al termine di queste ulteriori analisi, sarebbe produttivo effettuare un confronto finale con campioni trattati con i metodi attualmente impiegati dalle case produttrici di bioprotesi valvolare (come la fissazione con glutaraldeide) per verificare se uno dei trattamenti presi in analisi con questo studio possa essere effettivamente una valida alternativa a quelli già esistenti.

# Bibliografia

- [1] Barone R. «Anatomia comparata dei mammiferi domestici». In: a cura di Bortolami R e Callegari E eds. Vol. 5. 1993, pp. 69–74.
- [2] Spodick D.H. «The Pericardium». In: a cura di Dekker M eds New York. 1997, pp. 7–26.
- [3] Ishihara T. et al. «Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium». In: *Am J Cardiol* 46 (1980), pp. 744–753.
- [4] Fentie I.H. et al. «Comparative electron microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium, as material for cardiac valve bioprostheses». In: *J Submicrosc Cytol* 18 (1986), pp. 53–65.
- [5] Simionescu D.T. e Kefalides N.A. «The biosynthesis of proteoglycans and interstitial collagens by bovine pericardial fibroblasts». In: *Exp Cell Res* 195 (1991), pp. 171–176.
- [6] Whittaker M. e Ayscough A. «Matrix metalloproteinases and their inhibitors: current status and future challenges». In: *Cell transmission* 17 (2000), pp. 3–14.
- [7] Di Bello C. *Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. A cura di Patron. Vol. 9. 2009.
- [8] Hardingham T.E. e Fosang A.J. «Proteoglycans: many forms, many functions». In: *FASEB J* 6 (1992), pp. 861–870.
- [9] Sacks M.S. e Yoganathan A.P. «Heart valve function: a biomechanical perspective». In: *Phil Trans R Soc B*. Vol. 362. 2007, pp. 1369–1391.
- [10] Li S. et al. «Matrix assembly, regulation and survival function of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation». In: *J Cell Biol* 157 (2002), pp. 1279–1290.

- [11] Van der Rest M. e Garrone R. «Collagen family of proteins». In: *FASEB J* 5 (1991), pp. 2814–2823.
- [12] Bateman J.F., Lamande S.R. e Ramshaw J.A.M. «Collagen superfamily». In: vol. *Molecular components and interactions*. Gordon e Breach Pub, 1996. Cap. *Extracellular Matrix*, pp. 22–67.
- [13] Naimark W.A. et al. «Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species». In: *Am J Physiol* 263 (1992), pp. 1095–1106.
- [14] Courtman D.W. et al. «Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction». In: *J Biomed Mater Res* 28 (1994), pp. 655–666.
- [15] Hiester E.D. e Sacks M.S. «imal bovine pericardial tissue selection sites: fiber architecture and tissue thickness measurements». In: *J Biomed Mater Res* 39 (1998), pp. 207–214.
- [16] Gastaldello A. «Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache: valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su Pericardio Bovino e Porcino». PhD. Università degli studi di Padova, Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, 2012.
- [17] Baharuddin A. et al. «Bovine pericardium for dural graft: clinical results in 22 patients». In: *Clin Neurol Neurosurg* 104.342-344 (2002).
- [18] Hoffmann G., Lutter G. e Creme J. «Durability of Bioprosthetic Cardiac Valves». In: *Dtsch Arztebl Int* 105.8 (2008), pp. 143–148.
- [19] Rinna C. et al. «Orbital floor restoration». In: *J Craniofac Surg* 16 (2005), pp. 968–972.
- [20] Schoof P.H. et al. «Autologous pericardium for ventricular septal defect closure». In: *J Heart Valve Disease* 7 (1998), pp. 407–409.
- [21] Bonnet D. et al. «Surgical angioplasty of the main coronary arteries in children». In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 117 (1999), pp. 352–357.
- [22] Hiester E.D. e Sacks M.S. «imal bovine pericardial tissue selection sites». In: *J Biomed Mater Res* 39 (1998), pp. 215–221.
- [23] Borgogno C. «Valvole cardiache percutanee». Tesi di laurea mag. Università degli studi di Padova, Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, 2010.



- [24] Sacks, Schoen F.J. e Mayer J.E. «Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering». In: *Annu Rev Biome Eng.* 11. 2009, pp. 289–313.
- [25] Lung B e Vahanian A. «Epidemiology of valvular heart disease in the adult». In: *Nature Reviews: Cardiology* (2011).
- [26] Westaby S. e Piwnica A. «Surgery for Acquired Aortic Valve Disease». In: *Taylor and Francis* (1997).
- [27] Lung B. et al. «A prospective survey of patients with valvular heart diseases in europe: the euro heart survey on valvular heart disease». In: *Euro Heart J* 24 (2003), pp. 1231–1243.
- [28] Parolari A et al. «Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention». In: *Eur J Cardiothorac* 35 (2009), pp. 493–504.
- [29] Bonow R. et al. «Focused update incorporated into the acc/aha 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease): endorsed by the society of cardiovascular anesthesiologists, society for cardiovascular angiography and interventions, and society of thoracic surgeons». In: *Circulation* 118 (2008), e523–e661.
- [30] Jegatheeswaran A. e Butany J. «Pathology of infectious and inflammatory diseases in prosthetic heart valves». In: *Cardiovasc Pathol* 15.5 (2006), pp. 252–255.
- [31] Butany J. et al. «Mechanical heart valves: 50 years of evolution». In: *Cardiovasc Pathol* 12.6 (2003), pp. 322–344.
- [32] Mangold A., Szerafin T. e Hoetzenecker K. «Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses». In: *Thorac Cardiovasc Surg* 4.57 (2009), pp. 191–195.
- [33] Braile M.C. et al. «In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic acid». In: *Artif Organs* 35 (2011), pp. 497–501.

- [34] Chambers J.B. et al. «Bovine pericardial versus porcine stented replacement aortic valves: early result of a randomized comparison of the Perimount and the Mosaic valves». In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 136 (2008), pp. 1142–1148.
- [35] Thamilarasan M. e Griffin B. «Choosing the most appropriate valve operation ad prosthesis». In: *Cleve Clin J Med* 69.9 (2002), pp. 693–694.
- [36] Colombo P. et al. «Trattamento percutaneo delle valvulopatie: ruolo nella realtà clinica». In: *G Ital Cardiol* 9 (2008).
- [37] Santoro G. et al. «Impianto transcateretere di protesi valvolare aortica in pazienti con stenosi valvolare severa sintomatica: Documento di Consenso Federazione Italiana di Cardiologia (FIC)- Società Italiana di Chirurgia Cardiaca (SICCH)». In: *G Ital Cardiol* 11.1 (2010), pp. 45–53.
- [38] Cribier A. et al. «Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description». In: *Circulation* 106 (2002), 3006–3008.
- [39] Singh I.M. et al. «Percutaneous treatment of aortic valve stenosis». In: *Cleve Clin J Med* 75 (2008), pp. 805–812.
- [40] Godino C. e Colombo A. *Il trattamento percutaneo della stenosi aortica: indicazione e limiti*. Rapp. tecn. Unità di Emodinamica - Ospedale San Raffaele di Milano.
- [41] Sacks M.S., Choung C.C.J. e R.More. «Collagen fiber architecture of bovine pericardium». In: *ASAIO* (1994).
- [42] Bose corporation. *ElectroForce Planar Biaxial 2 Motor TestBench Test Instrument Brochure*. 2012. URL: [http://worldwide.bose.com/electroforce/en/web/planar\\_biaxial\\_2\\_motor/page.html](http://worldwide.bose.com/electroforce/en/web/planar_biaxial_2_motor/page.html).
- [43] Carew E.O. et al. «Effect of specimen size and aspect ratio on te tensile properties of porcine aortic valve tissues». In: *Annals of Biomedical Engineering*. Vol. 31. 2003, pp. 526–535.
- [44] Paez J.M.G. et al. «Comparison of the mechanical behaviors of biological tissues subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex». In: *Biomaterials* 24 (2003), pp. 1671–1679.