

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOINGEGNERIA DELLA RIABILITAZIONE

TESI DI LAUREA

**EFFETTI DELLA MATRICE
EXTRACELLULARE SULLA
TRASMISSIONE DELLA FORZA DI
CONTRAZIONE MUSCOLARE**

LAUREANDO

Daide Bombassei De Bona

Matricola 2053798

RELATORE

Prof. Piero Pavan

Università degli Studi di Paodva

CORRELATORE

Dott.ssa Silvia Spadoni

Università degli Studi di Paodva

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

DATA DI LAUREA 05/03/2024

A tutta la mia famiglia

Abstract

La diminuzione della capacità dei muscoli di generare forza e di trasmettere tale forza in conseguenza alla contrazione può avvenire per molteplici ragioni; tra queste le più importanti riguardano la diminuzione dell'area trasversale delle proteine contrattili, oppure la perdita di distrofina come accade nella distrofia muscolare di Duchenne. In questo lavoro si vuole studiare, mediante l'uso del *software* di analisi agli elementi finiti ABAQUS, gli effetti dell'invecchiamento sulla produzione e sulla trasmissione della forza di contrazione muscolare. In particolare, dopo aver testato in una fase preliminare le capacità di un modello costitutivo del comportamento di una fibra muscolo-scheletrica, si valutano i meccanismi di contrazione di fascetti muscolari di giovani e anziani, cercando di capire l'impatto dell'ispessimento della matrice extracellulare sul muscolo.

Indice

Abstract	5
1 Introduzione	9
1.1 L'apparato muscolo-scheletrico	9
1.2 Il sistema muscolare	10
1.2.1 I muscoli lisci	11
1.2.2 Il muscolo cardiaco	11
1.2.3 I muscoli scheletrici	12
1.2.4 La matrice extracellulare	14
1.2.5 La contrazione muscolare	15
1.2.6 La trasmissione della forza	16
2 Materiali e metodi	21
2.1 Descrizione del modello computazionale della singola fibra	21
2.1.1 Descrizione della <i>subroutine</i> Fortran e del comportamento delle singole fibre	24
2.1.2 Visualizzazione delle capacità del modello di base	28
2.2 Descrizione delle analisi effettuate sul fascetto muscolare	34
2.2.1 Premessa alla seconda fase di analisi	34
2.2.2 Modello CAE utilizzato per le analisi	35
2.2.3 Modello costitutivo della matrice extracellulare	39

3 Risultati	43
3.1 Protocollo di Huijing caso “giovani”	44
3.2 Protocollo di Huijing caso “anziani”	49
3.3 Protocollo di Huijing confronto tra i casi "giovani" e "anziani"	52
3.4 Protocollo di Ramaswamy confronto tra i casi "giovani" e "anziani" . . .	54
3.5 Discussione e conclusioni	57
 Elenco delle figure	 58
 Elenco delle tabelle	 61
 Bibliografia e sitografia	 67
 Ringraziamenti	 69

Capitolo 1

Introduzione

1.1 L'apparato muscolo-scheletrico

L'apparato muscolo-scheletrico (**Figura 1.1**) ha il ruolo di fornire il movimento, la stabilità, la forma ed il supporto al corpo umano. Questo apparato è suddiviso in due sistemi:

- il sistema muscolare, che include tutti i tipi di muscoli del corpo; i muscoli scheletrici, in particolare, agiscono sulle articolazioni e sono i responsabili della generazione del movimento. Oltre ai muscoli, il sistema muscolare comprende anche i tendini, le strutture anatomiche che connettono muscoli ed ossa;
- il sistema scheletrico, la cui componente principale è rappresentata dalle ossa; le ossa sono collegate tra loro tramite le articolazioni, fornendo così al nostro corpo uno scheletro resistente, ma allo stesso tempo mobile. Strutture accessorie come le cartilagini e i legamenti costituiscono un ausilio al sistema scheletrico, con il ruolo di supportare le ossa nelle proprie funzioni [1].



Figura 1.1: Apparato muscolo-scheletrico [1]

1.2 Il sistema muscolare

Il sistema muscolare è un sistema composto da tessuto contrattile specializzato, il tessuto muscolare. Il tessuto muscolare gode di quattro fondamentali proprietà:

- eccitabilità – l’abilità di rilevare uno stimolo neurale (potenziale d’azione);
- contrattilità – l’abilità di contrarsi in risposta allo stimolo neurale;
- estensibilità – l’abilità di un muscolo di allungarsi senza rompersi;
- elasticità – l’abilità di ritornare alla condizione di partenza dopo la deformazione.

Grazie a queste proprietà, il sistema muscolare svolge diverse importanti funzioni. Queste includono la produzione di forza e movimento, il supporto della statura e posizione del corpo, la stabilità delle articolazioni e la generazione di calore corporeo. Indipendentemente dalla forma o dal tipo, il tessuto muscolare è composto da cellule specializzate conosciute come miociti, più comunemente note con il nome di fibre muscolari. I miociti sono cellule caratterizzate da un’abbondante presenza di filamenti di proteine all’interno del proprio citoplasma, disposte generalmente lungo una singola direzione. Due proteine in particolare, actina e miosina, sono in grado di scorrere l’una sull’altra producendo così la contrazione muscolare, consentendo di conseguenza il movimento del corpo e degli organi interni.

Esistono molte classificazioni dei muscoli, basate su diversi criteri. La classificazione più semplice che si può fare è distinguere tra tessuto muscolare liscio e striato in base alla disposizione dei filamenti proteici visibile al microscopio. La prima categoria si trova alla base dei muscoli lisci, mentre la seconda si trova nel tessuto muscolare cardiaco e nei muscoli scheletrici (**Figura 1.2**).

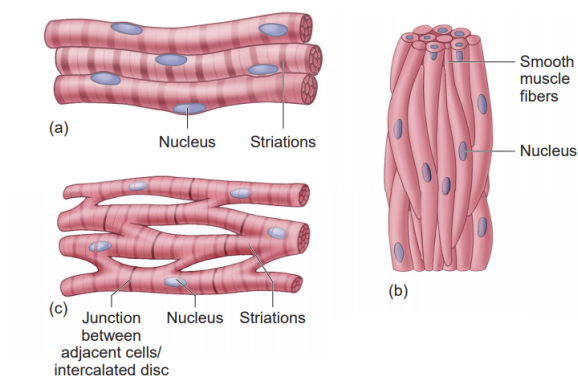


Figura 1.2: Tipologie di tessuto muscolare. a) tessuto muscolo-scheletrico; b) tessuto muscolare liscio; c) tessuto muscolare cardiaco [2].

1.2.1 I muscoli lisci

I muscoli lisci si trovano principalmente nelle pareti delle strutture tubulari (vasi sanguigni, bronchi, ecc.), così come negli organi cavi (stomaco, vescica, ecc.). La funzione primaria del tessuto muscolare liscio è quella di modificare la dimensione di queste strutture in modo da bloccare/permettere l'espulsione delle sostanze. Morfologicamente e funzionalmente, i muscoli lisci sono molto diversi dai muscoli scheletrici e dal miocardio e sono soggetti al controllo involontario da parte del sistema nervoso autonomo.

Le cellule del tessuto muscolare liscio sono generalmente mononucleate e sono molto più piccole e corte delle cellule del tessuto muscolare scheletrico; sono cellule fusiformi, avvolte da una membrana basale. La componente extracellulare, prodotta dalle cellule stesse e dai fibroblasti, è costituita da fibre che si uniscono a formare delle particolari strutture chiamate placche dense, ovvero delle regioni di ancoraggio per le cellule. Due placche dense consecutive permettono l'adesione cellula-cellula, fornendo stabilità meccanica al tessuto. L'assenza di striatura in questo tipo di muscoli è dovuta alla particolare organizzazione delle proteine contrattili (actina/miosina). Nelle cellule del tessuto muscolare liscio, actina e miosina si trovano sparpagliate all'interno del sarcoplasma (citoplasma dei miociti). I filamenti di actina (filamenti sottili) sono attaccati a condensazioni dei filamenti citoscheletrici, i corpi densi, e, terminalmente, alle placche dense; i filamenti di miosina (filamenti spessi) si frappongono tra i filamenti di actina (**Figura 1.3**). Lo scioglimento dei filamenti di actina, causato dalla miosina fa sì che avvenga la contrazione.

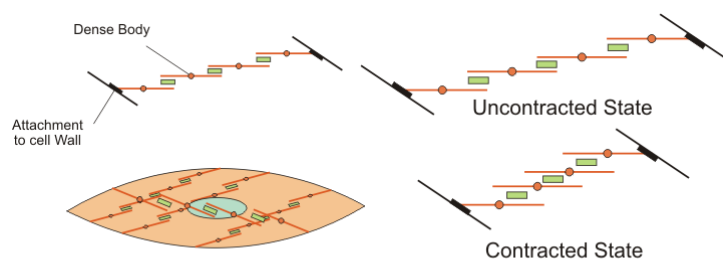


Figura 1.3: Organizzazione dei miofilamenti contrattili nei muscoli lisci [3]

1.2.2 Il muscolo cardiaco

Il muscolo cardiaco fa parte dei muscoli striati. Anche le cellule del tessuto muscolare cardiaco, i cardiomiociti, sono più corte delle cellule del tessuto muscolare scheletrico; sono larghe e sono generalmente mononucleate, anche se in alcuni casi possono essere

binucleate. Le striature nel miocardio non sono ben evidenti in quanto l'elevata domanda metabolica di questo tessuto è soddisfatta grazie alla presenza di un gran numero di mitocondri e altri organuli nelle cellule. I cardiomiociti sono tra loro connessi alle estremità attraverso giunzioni specializzate chiamate dischi intercalati; questi servono per collegare funzionalmente tutti i cardiomiociti, permettendo una rapida propagazione dei segnali di contrazione attraverso il tessuto muscolare cardiaco (**Figura 1.4**). Particolari cardiomiociti specializzati, le cellule *pacemaker*, sono in grado di generare e trasportare il segnale contrattile lungo il miocardio. Queste cellule si organizzano in nodi (senoatriale ed atrioventricolare), fasci e *network* conduttivi a formare il sistema di conduzione del cuore. Tali *network* sono innervati e regolati da divisioni parasimpatiche e simpatiche del sistema nervoso autonomo; i segnali provenienti dalla parte simpatica incrementano il battito cardiaco, mentre quelli provenienti dalla parte parasimpatica lo rallentano.

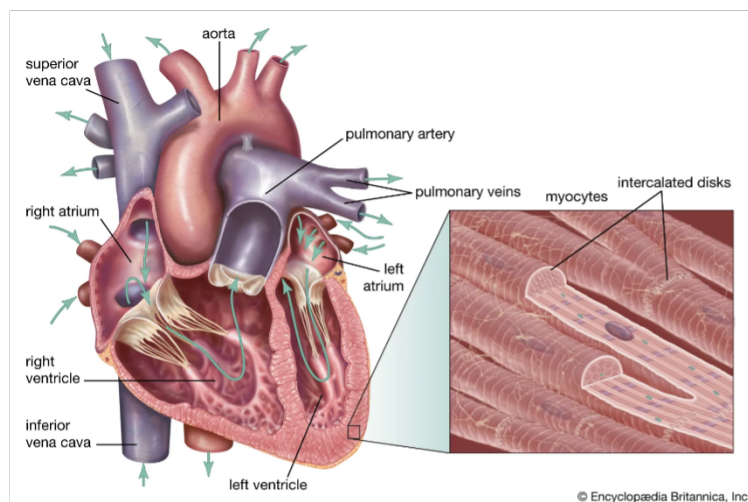


Figura 1.4: Tessuto muscolare del miocardio [4]

1.2.3 I muscoli scheletrici

I muscoli scheletrici rappresentano la tipologia di muscolo più abbondante all'interno del corpo umano e sono caratterizzati da cellule lunghe e multinucleate, disposte parallelamente le une alle altre. I miociti scheletrici spesso raggiungono lunghezze dell'ordine dei centimetri, con un numero di nuclei proporzionale alla lunghezza della fibra muscolare. Queste cellule sono biologicamente classificate come sincizi, ovvero fusioni di più cellule mononucleate; nel caso dei muscoli scheletrici, i mioblasti si fondono a formare i miociti. I muscoli scheletrici vengono solitamente definiti muscoli volontari perché si pensa che la loro contrazione sia sottoposta al nostro controllo consapevole; ciò non è completamente vero, in quanto questi muscoli sono coinvolti in meccanismi controllati a livello subconscio

(ad esempio la respirazione). Il sarcoplasma di ogni fibra muscolo-scheletrica è ampiamente occupato dalle miofibrille, delle subunità che estendono la lunghezza della cellula. Le miofibrille sono essenzialmente delle strutture caratterizzate da unità ripetitive, i sarcomeri; i sarcomeri a loro volta sono principalmente composti da actina, il miofilamento proteico sottile e miosina, il miofilamento proteico spesso, responsabili della contrazione muscolare. La disposizione di actina e miosina all'interno di ogni sarcomero è molto regolare e contribuisce alla formazione di evidenti striature. La miosina rappresenta la banda A del sarcomero. I filamenti di actina sono ancorati invece ad una struttura chiamata disco Z localizzata ad ogni estremità del sarcomero; i filamenti di actina si trovano in due diverse zone: nella banda I in cui risiedono esclusivamente questi filamenti e in una porzione della banda A dove si sovrappongono ai filamenti di miosina. La banda A è di particolare importanza considerando che rappresenta la zona in cui avvengono i movimenti dei filamenti durante il meccanismo di contrazione. Nella banda A si trova una regione centrale, la zona H, più leggera del resto della banda A, occupata solo ed esclusivamente dai filamenti di miosina che si congiungono in quella che si chiama linea M (**Figura 1.5**). Durante la contrazione la lunghezza del sarcomero diminuisce o aumenta in conseguenza allo scivolamento dei filamenti di miosina sui filamenti di actina, avvicinando o allontanando così i dischi Z. Questo meccanismo di contrazione prende il nome di “teoria dello scorrimento dei filamenti” [5].

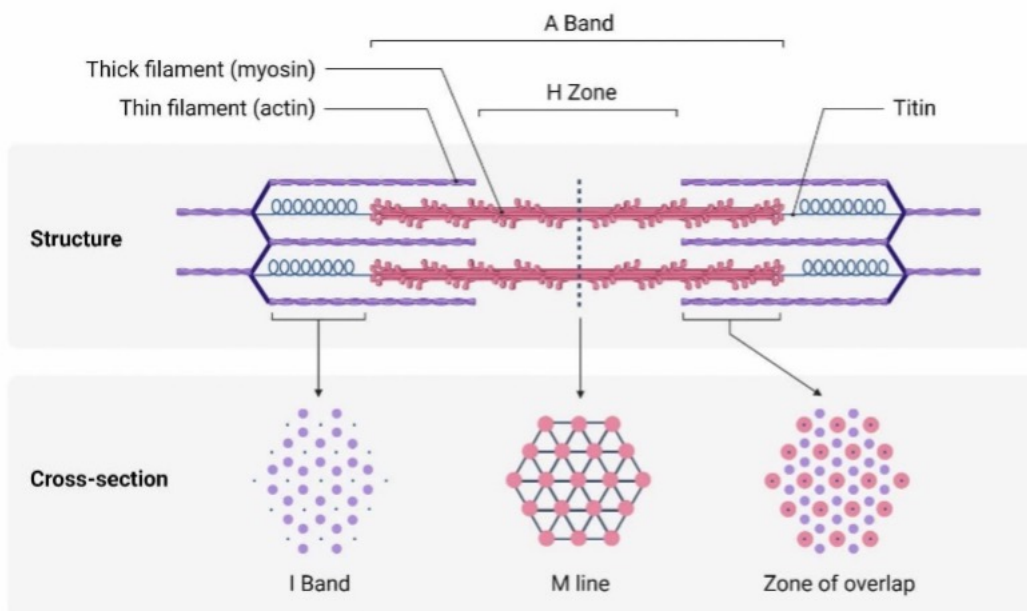


Figura 1.5: Struttura dei sarcomeri [6]

1.2.4 La matrice extracellulare

Il tessuto connettivo dei muscoli è un'entità complessa, comprensiva di una matrice extracellulare (ECM) non-contrattile in cui sono incorporati fibroblasti e macrofagi ed un'estesa rete di capillari e nervi. La ECM è coinvolta nei cicli di contrazione e rilassamento grazie alla sua deformabilità e permette inoltre la distribuzione uniforme e la trasmissione della forza generata dal muscolo. I legami reticolari tra la ECM ed il citoscheletro dei miociti, mediati dal complesso proteico associato alla distrofina, hanno un ruolo fondamentale nel supporto biomeccanico dei muscoli e nella gestione del meccanismo di contrazione, dimostrando di essere elementi chiave nel mantenimento dell'omeostasi muscolare.

La ECM dei muscoli scheletrici è organizzata in tre strutture distinte, ma interconnesse: l'epimisio, il perimisio e l'endomisio. L'epimisio è uno strato di tessuto connettivo denso che incapsula l'intero muscolo, mentre il perimisio, che deriva dall'epimisio, circonda i fascetti muscolari. L'endomisio, composto da una lamina basale adiacente al sarcolemma ed una lamina reticolare esterna, avvolge invece ogni singola fibra muscolare (**Figura 1.6**). Le componenti principali della ECM sono collagene, glicoproteine, proteoglicani ed elastina. Il collagene rappresenta la frazione maggioritaria della ECM ed è presente in diverse tipologie. Il collagene di tipo I, III, V e XI forma le fibrille della ECM. Il collagene di tipo IV forma l'architettura di base dell'endomisio integrando proteine diverse all'interno di una struttura stabile. Tra le componenti della ECM troviamo poi la fibronectina che svolge un ruolo di organizzatore delle fibrille della matrice e l'elastina che contribuisce all'elasticità muscolare. Delle proteine regolatorie, infine, sono coinvolte nell'assemblaggio della ECM e nella modulazione delle interazioni cellula-matrice [7].

La ECM è una struttura molto importante in quanto interviene coadiuvando l'azione dei muscoli scheletrici, ma è una struttura soggetta a cambiamenti nel tempo. Con l'invecchiamento i muscoli scheletrici dimostrano infatti una morfologia fibrotica. La fibrosi muscolare legata all'invecchiamento è caratterizzata dalla sostituzione del tipico reticolo di fibre di collagene, con un *network* di fibre irregolare. Il contenuto assoluto di collagene ed il *cross-linking* non enzimatico del collagene aumentano creando dei densi accumuli di collagene; di conseguenza si osserva un ispessimento della ECM (**Figura 1.7**). Il rimodellamento della ECM è associato a diversi fattori. Il primo corrisponde al fatto che la frazione corrispondente al contenuto delle diverse tipologie di collagene cambia, favorendo ad esempio un maggior contenuto di fibre di tipo III rispetto al tipo I. Recenti studi inoltre alimentano l'ipotesi che l'addensamento di collagene nella ECM è dovuto non tanto ad una maggiore sintesi di questa proteina, quanto ad una minore degradazione della stessa [8].

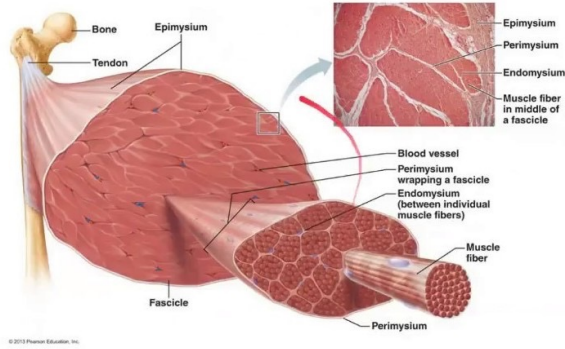


Figura 1.6: ECM dei muscoli scheletrici [9]

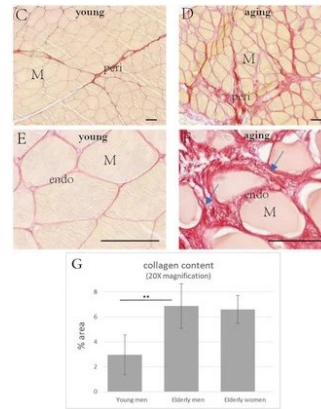


Figura 1.7: Effetto dell'invecchiamento sulla ECM [10]

1.2.5 La contrazione muscolare

Il meccanismo di contrazione muscolare inizia con l'impulso che, partendo dal sistema nervoso, percorre i nervi raggiungendo la giunzione neuromuscolare, ovvero il luogo in cui il motoneurone crea una sinapsi con le cellule muscolari. Il motoneurone, conseguentemente allo stimolo, rilascia acetilcolina nello spazio sinaptico. L'acetilcolina, quindi, attraversa la sinapsi e si lega ai recettori di membrana delle fibre muscolari con successiva depolarizzazione e attivazione della contrazione. Questo meccanismo, che, come detto in precedenza, segue la teoria dello scorrimento dei filamenti, richiede l'idrolisi di molecole di ATP e l'aggancio/il rilascio delle teste globulari della miosina ai/dai filamenti di actina. In seguito all'eccitazione indotta alla giunzione neuromuscolare, l'ATP si lega alla miosina inizialmente attaccata all'actina. L'ATP diminuisce l'affinità tra miosina e actina, quindi la miosina rilascia l'actina. A questo punto, la miosina idrolizza l'ATP con produzione di ADP e di una molecola di fosfato, la quale fornisce l'energia necessaria alle teste globulari della miosina per ruotarsi e riagganciarsi all'actina. Quando il muscolo non si contrae, il sito di legame della miosina è parzialmente bloccato da una molecola di troponina. Durante la contrazione, ioni calcio Ca^{2+} immagazzinati nel reticolo sarcoplasmatico si legano alla troponina diminuendone l'affinità per la miosina, sbloccandone dunque il sito di legame. Una volta che il sito di legame è completamente a disposizione, la miosina si lega ancora più fortemente all'actina. Il rilascio del fosfato precedentemente prodotto dall'idrolisi dell'ATP causa il movimento delle teste globulari con conseguente spostamento dei filamenti di actina ad esse legati. Alla fine di questo step chiamato "power stroke", la miosina rilascia l'ADP; le teste globulari tornano alla loro posizione iniziale ed il ciclo di contrazione può nuovamente cominciare (**Figura 1.8**) [11].

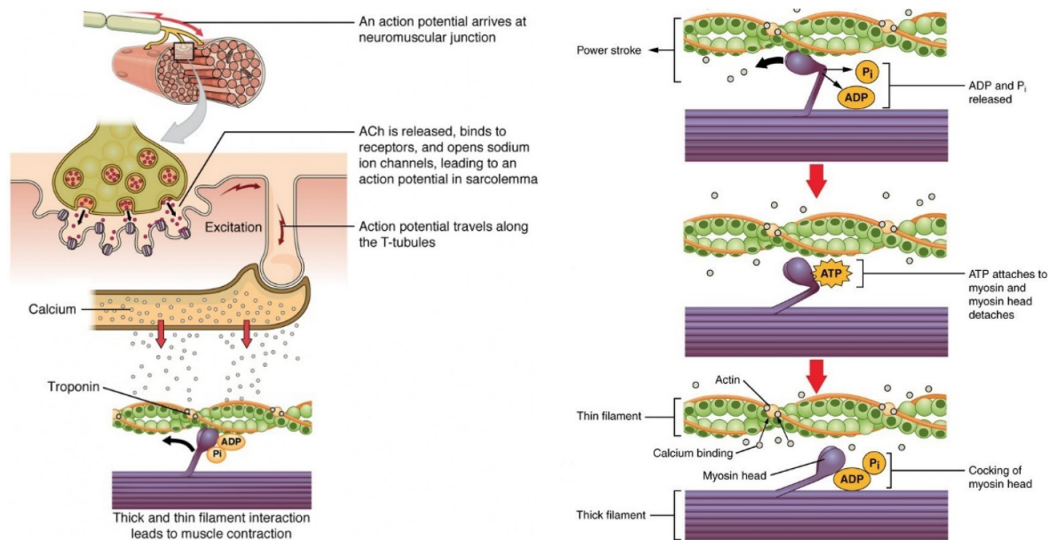


Figura 1.8: Meccanismo di contrazione [12, 13]

La contrazione muscolare non ha sempre le stesse caratteristiche per quanto riguarda la produzione di forza e la deformazione a livello macroscopico. Esistono infatti diverse tipologie di contrazione:

- **contrazione isometrica:** è una contrazione in cui si riscontrano una variazione nella tensione muscolare ed una produzione di forza, senza però alcuna modifica nella lunghezza del muscolo. Una contrazione isometrica si manifesta quando, ad esempio, si prova a spingere un oggetto immobile;
- **contrazione concentrica:** si presenta quando la tensione muscolare è sufficiente da sorpassare il carico a cui è sottoposto il muscolo; il muscolo si contrae e si accorcia. Un esempio di contrazione concentrica si ha quando si solleva un manubrio da palestra con un movimento di flessione dell'avambraccio sul braccio;
- **contrazione eccentrica:** ha come obiettivo la generazione di una forza in opposizione all'allungamento del muscolo. Si può osservare una contrazione eccentrica quando si percorrono le scale in discesa.

1.2.6 La trasmissione della forza

Diretta implicazione della teoria dello scorrimento dei filamenti, è che la forza generata durante il meccanismo di contrazione sia trasmessa longitudinalmente, in conseguenza alla deformazione del sarcomero lungo la stessa direzione in cui sono orientati i miofilamenti proteici. Una più profonda considerazione del modello legato a questa teoria richiede però che vi sia una matrice di proteine secondaria, in grado di trasmettere la

forza prodotta dai filamenti spessi e sottili attraverso le fibre muscolari, fino ai tendini e capace di proteggere le fibre stesse dagli infortuni. Un'importante struttura in questo *network* è il costamero, il quale connette la membrana dei miociti, il sarcolemma, all'apparato contrattile. Alcuni studi suggeriscono che i costameri non solo trasmettono la forza all'ambiente extracellulare, ma presentano anche un ruolo attivo nella salute dei muscoli scheletrici. La trasmissione della forza nei muscoli avviene dunque in due modalità. Si ha una forza longitudinale dovuta alla trasmissione lungo la fibra muscolare da linea Z a linea Z e tramite la giunzione miotendinea fino al tendine; diversamente, la trasmissione laterale della forza trasporta la forza fuori da ogni sarcomero verso il tessuto connettivo e la ECM che lo circondano e da queste strutture poi ai tendini (**Figura 1.9**).

La trasmissione longitudinale della forza supporta e permette le interazioni tra miosina e actina. Questo meccanismo incorpora proteine che si trovano in corrispondenza dei filamenti spessi (titina), dei filamenti sottili (nebulina) e della linea Z (α -actinina) e proteine che legano i miofilamenti alla linea Z. Quando il sistema di trasmissione longitudinale della forza funziona correttamente, la forza generata dal complesso dell'actomiosina viene trasferita rapidamente da sarcomero a sarcomero fino alla giunzione miotendinea. Secondo alcuni studi diverse proteine intervengono nel meccanismo di trasferimento della forza, anche con ruoli di particolare interesse. La titina è la proteina più grande del corpo umano e la terza per abbondanza nei muscoli scheletrici dei mammiferi. Questa proteina si estende dalla linea Z del sarcomero fino alla linea M. La titina è stata proposta come una molla molecolare in quanto è responsabile per la tensione passiva e protegge il sarcomero da situazioni di deformazione eccessiva. Inoltre, la rigidità di questa proteina sembra poter essere regolata attivamente dall'interazione dell'actina con la stessa titina, oppure indotta dagli ioni calcio Ca^{2+} influenzando quindi le caratteristiche meccaniche del sarcomero. La nebulina è un'altra proteina gigante che interviene nella trasmissione longitudinale. Come la titina, la nebulina ha un ruolo importante per quanto riguarda la contrazione muscolare ed inoltre agisce sull'omeostasi del calcio. Entrambe influenzano anche la velocità di sviluppo della forza da parte dei sarcomeri. L' α -actinina è un'ulteriore proteina che collabora al corretto mantenimento delle normali funzioni del sarcomero e alla trasmissione longitudinale. Il ruolo principale di questa proteina è quello di preservare la relazione spaziale tra i miofilamenti e di stabilizzarne il reticolo. L' α -actinina influenza a sua volta la velocità di sviluppo della forza e ha un ruolo chiave anche negli infortuni.

La trasmissione laterale della forza viene così definita perché utilizza come meccanismo il trasferimento della forza prodotta dal sarcomero prima alla linea Z, poi al sarcolemma ed infine alla ECM. La trasmissione della forza in questo caso avviene per mezzo dei costameri; i costameri sono costituiti da grandi complessi citoscheletrici di membrana (complesso

associato alla distrofina, integrine, ecc.) in grado di collegare la matrice intracellulare dei miociti alla ECM, analogamente a come dei rivetti collegano due materiali adiacenti. Come succede nel caso appena citato, il sistema di trasmissione laterale della forza ha il compito principale di proteggere il sarcolemma dai danni che gli sforzi di taglio possono causare. Ciò è esemplificato dal ruolo funzionale della distrofina, classificata come un “citolinker”, in grado di formare forti connessioni tra il sarcolemma ed i filamenti di actina. Le proteine coinvolte in questo meccanismo di trasmissione della forza ne dimostrano il ruolo attivo nella prevenzione degli infortuni. Il complesso glicoproteico associato alla distrofina è di fondamentale importanza. Come già detto precedentemente, il ruolo specifico di questa proteina nella trasmissione laterale della forza è quello di fare da ponte tra il sarcomero e la ECM; questo aiuta sia per quanto riguarda l’integrità del sarcolemma, sia nell’omeostasi del calcio. A sottolineare l’importanza di questo complesso, esiste una famiglia di malattie del muscolo, quella delle distrofie muscolari, che impatta in modo negativo l’abilità del muscolo di produrre copie del complesso glicoproteico associato alla distrofina. Quello che succede è che si verificano facilmente infortuni e degenerazione del muscolo con conseguente perdita progressiva di massa del muscolo e forza muscolare; questa situazione si ripercuote poi a livello locomotorio e respiratorio. La famiglia delle integrine collabora attivamente con il complesso della distrofina nella trasmissione laterale della forza. Nei muscoli scheletrici le integrine hanno la funzione di recettori dell’adesione cellulare superficiale e mediana, perciò, le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice [14].

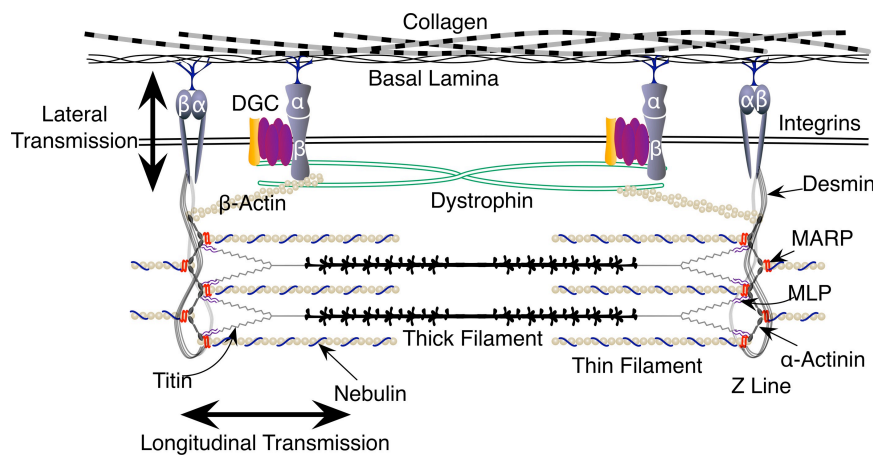


Figura 1.9: Diagramma delle componenti proteiche coinvolte nelle due tipologie di trasmissione [14]

Come questi meccanismi siano influenzati dall’invecchiamento non è ad oggi del tutto chiaro. Lo scopo di questo lavoro è quello di indagare tramite l’utilizzo di metodi computazionali, come le modificazioni della struttura muscolare dovute all’invecchiamento possano influenzare i meccanismi di trasmissione delle forze generate dalla contrazione muscolare. L’analisi dei fenomeni muscolari nel presente lavoro non si pone l’obiettivo

di studiare gli effetti dell'invecchiamento a livello molecolare, ma si focalizza su ciò che accade ad un livello di mesoscala, con particolare attenzione al comportamento della ECM.

Capitolo 2

Materiali e metodi

Le simulazioni condotte nel presente lavoro sono state effettuate tramite il *software* per l'analisi agli elementi finiti ABAQUS (Dassault Systèmes). Per i grafici che verranno in seguito presentati, si è preferito utilizzare il software MATLAB (MathWorks), in modo da offrire una migliore visualizzazione. Il lavoro di analisi computazionale è stato suddiviso in due fasi: nella prima fase si è voluto studiare le potenzialità di un modello relativo ad una singola fibra muscolare, mentre nella seconda è stato condotto un lavoro di studio per osservare in che modo l'invecchiamento influisce sulle capacità di trasmissione della forza in un fascetto muscolare.

2.1 Descrizione del modello computazionale della singola fibra

Il modello computazionale per la prima fase delle analisi è stato definito completamente attraverso il *software* ABAQUS. In questa fase si è voluto indagare la capacità del modello di simulare correttamente contrazioni isometriche, concentriche ed eccentriche. Il modello CAE è stato costruito con le specifiche di seguito riportate (la descrizione del modello segue l'ordine dei moduli di lavoro presenti nel *software*).

- *Part*: per rappresentare la singola fibra muscolare è stata creata una Parte definita come solido 3D deformabile, ottenibile mediante estrusione. Per la geometria di base si è scelto un cerchio di raggio 55 μm , avente centro in corrispondenza dell'origine del sistema di riferimento proprio del *software*. Lo *Sketch* così creato è stato poi estruso per 1000 μm in modo da ottenere un cilindro che potesse approssimare la fibra (**Figura 2.1**).

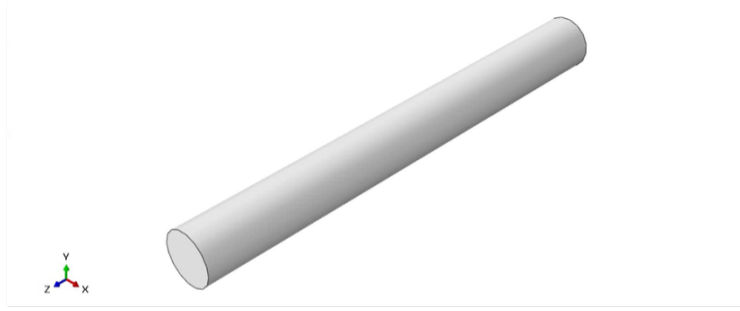


Figura 2.1: Geometria scelta per rappresentare la singola fibra muscolare

- Property: si è definito un materiale unico per la fibra con modello costitutivo implementato tramite l'utilizzo di una *user subroutine* scritta in linguaggio Fortran in grado di distinguere tra comportamento attivo e passivo delle fibre muscolari seguendo il modello a tre elementi di Hill. I parametri del modello sono stati trovati tramite procedure di fitting sulla base di dati sperimentali e verranno riportati più avanti.
- Assembly: siccome la simulazione prevede l'utilizzo di una singola struttura geometrica, per quanto riguarda questo modulo è stata semplicemente creata l'istanza relativa alla parte precedentemente definita.
- Step: è stato creato uno *step* relativo alla prova di contrazione della fibra con durata di 6 s. Viene effettuata in questo *step* un'analisi statica in condizioni di non linearità per geometria. In questo modulo si scelgono anche le grandezze di interesse da visualizzare nella sessione di *post-processing*, impostate per essere calcolati ogni 0.02 s. Ai fini di questo lavoro di studio sono state scelte le tensioni, gli spostamenti, le forze di reazione e le variabili di stato che derivano dalla scrittura della *subroutine* e che verranno spiegate in seguito.
- Interaction: nel modello riferito alla contrazione eccentrica è stato applicato un *Multi-Point Constraint* (MPC) per distribuire su un'intera sezione una forza poi applicata nel modulo load.
- Load: sono stati applicati dei vincoli di tipo Displacement/Rotation, forzando di volta in volta la fibra muscolare a contrarsi seguendo il meccanismo desiderato. I vincoli sono stati poi applicati in modi diversi nei modelli relativi alle tre prove di contrazione; nel caso della contrazione isometrica sono state vincolate le due sezioni trasversali poste alle estremità del cilindro, mentre nelle altre due prove solamente una sezione trasversale è stata vincolata (la sezione posta nell'origine del sistema di riferimento). Nel caso poi della contrazione eccentrica è stata applicata

una forza concentrata, distribuita sulla sezione trasversale libera da vincoli (Figura 2.2). Il valore di tale forza è stato calcolato a partire da un parametro definito nella *subroutine* Fortran già citata. Si è preso infatti il valore del parametro P_0 , ovvero il valore della massima tensione isometrica e lo si è moltiplicato per l'area trasversale del cilindro in modo da ottenere la forza massima generata dalla fibra durante la contrazione.

- $P_0 \times A = 0.4 \text{ MPa} \times \pi(55 \mu\text{m})^2 \approx 3801 \mu\text{N}$, portato a $4000 \mu\text{N}$ per superare il valore ottenuto analiticamente, cioè per superare la massima forza generata dalla fibra muscolare e quindi generare una contrazione eccentrica. La forza è stata applicata con andamento a rampa.

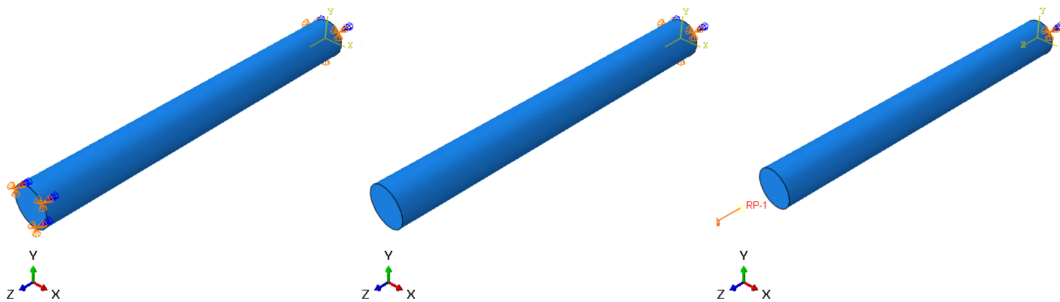


Figura 2.2: Rappresentazione dei vincoli e carichi applicati per ogni contrazione. A sinistra isometrica, al centro concentrica e a destra eccentrica.

- *Mesh*: la *mesh* della struttura è stata costruita con tecnica *sweep*, utilizzando elementi solidi continui esaedrici lineari, aventi quindi 8 nodi posti ai vertici – C3D8 – con integrazione completa. È stata usata una dimensione approssimativa degli elementi pari a $10 \mu\text{m}$, generando così un totale di 14645 elementi e 16728 nodi (**Figura 2.3**).

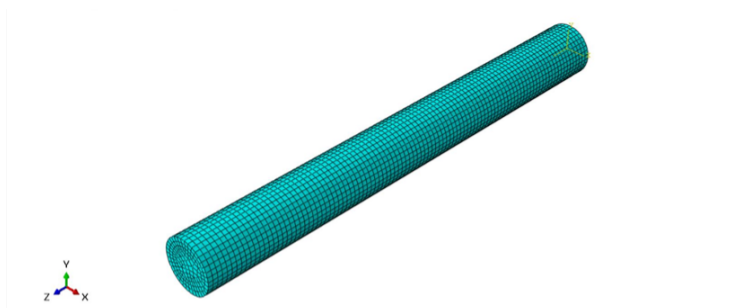


Figura 2.3: Visualizzazione della mesh creata

- *Job*: si sono creati e lanciati i *Job* per le analisi relative alle tre prove di contrazione del modello CAE fino ad ora descritto.

2.1.1 Descrizione della *subroutine* Fortran e del comportamento delle singole fibre

Pur essendo uno strumento estremamente potente nella risoluzione delle analisi agli elementi finiti, ABAQUS non sempre incorpora al suo interno tutti gli elementi/modelli costitutivi utili e/o necessari alla formulazione dei modelli. Nel caso di questo studio, infatti, è stato necessario definire il materiale ed il comportamento della fibra muscolare tramite l'utilizzo di una *subroutine* scritta in linguaggio Fortran.

Per le analisi in questione è stata usata una *subroutine* in grado di descrivere un modello costitutivo di tessuto muscolare e/o fibra muscolare. La formulazione costitutiva si basa sul modello fenomenologico a tre elementi di Hill. Il modello di Hill è uno strumento utilizzato nella modellazione della risposta elettro-attiva dei muscoli e nella sua versione classica si compone di un elemento contrattile e due elementi elastici non lineari, uno in serie ed uno in parallelo (**Figura 2.4** all'elemento contrattile. Questa struttura è coerente con la teoria secondo cui la tensione muscolare si decompone additivamente in due parti, una passiva ed una attiva [15].

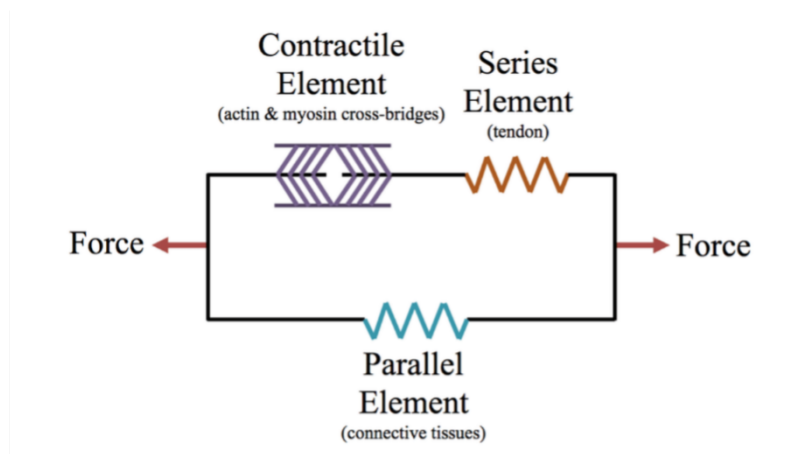


Figura 2.4: Rappresentazione del modello a tre elementi di Hill [16]

Relativamente alla *subroutine*, si riportano innanzitutto le costanti di modello utilizzate nella formulazione specifica del modello costitutivo:

- k_v : modulo di rigidità volumetrica
- k_m, a_m : parametri della parte isotropa deviatorica esponenziale
- \vec{m}_o : vettore dei coseni direttori delle fibre indeformate
- P_o : massima tensione isometrica
- $S_{rate}, n_1, n_0, t_1, t_0$: parametri della funzione di attivazione

- λ_{opt} : lunghezza ottimale del sarcomero
- λ_{min} : lunghezza minima del sarcomero
- $dlfib_{min}$ minima velocità di accorciamento del sarcomero
- d, k_c, k_e : parametri della curva forza velocità
- β, α : parametri elemento passivo ramo CE-SE
- k_k : rapporto iniziale tra le lunghezze degli elementi CE e SE

I valori di tali parametri caratterizzano il comportamento della fibra muscolare e sono specificati nel materiale relativo alla fibra, all'interno del modulo *property* di ABAQUS. Le prime equazioni fondamentali presenti nella *subroutine* sono quelle relative alla funzione di attivazione $f_a(t)$ della fibra, ovvero la funzione che determina la modalità con cui si sviluppa la contrazione (Figura 2.5).

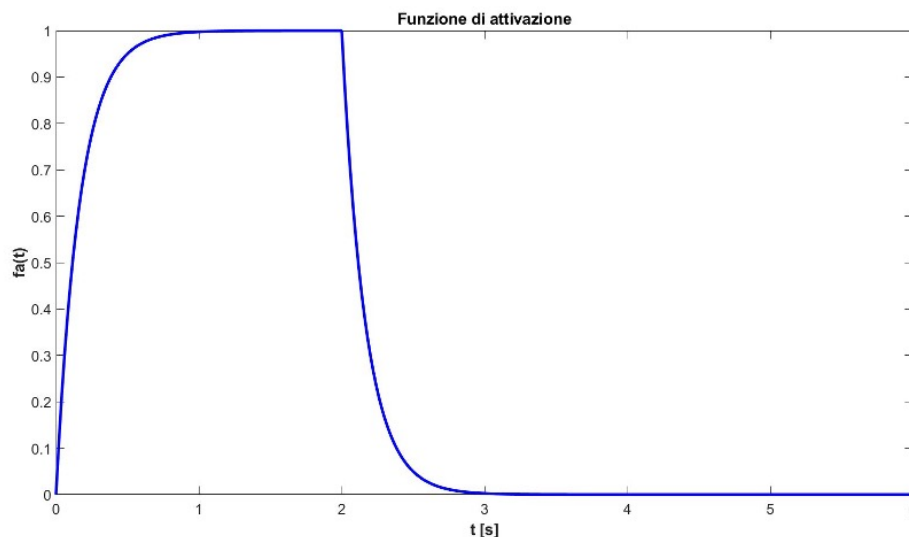


Figura 2.5: Funzione di attivazione

La curva rappresentata è caratterizzata da due rami ben distinguibili, uno crescente legato alla contrazione ed uno decrescente legato al rilassamento del sarcomero. I due rami sono così definiti:

$$f_a(t) = \begin{cases} n_0 + (n_1 - n_0)(1 - e^{-srate(t-t_0)}), & t_0 < t < t_1 \\ n_0 + (n_1 - n_0)(1 - e^{-srate(t_1-t_0)})(e^{-srate(t-t_1)}), & t \geq t_1 \end{cases}$$

con:

- $n_0 = 0$, valore minimo della funzione di attivazione;
- $n_1 = 1$, valore massimo della funzione di attivazione;
- $\text{srate} = 6s^{-1}$, tasso di crescita/decrecita della funzione di attivazione;
- $t_0 = 0s$, istante di inizio della contrazione;
- $t_1 = 2s$, istante corrispondente al valore di massimo della funzione di attivazione (stato di massima contrazione).

Altre due funzioni necessarie quando si va a valutare il meccanismo di contrazione muscolare sono la funzione forza-lunghezza (**Figura 2.6**) e la funzione forza-velocità (**Figura 2.7**). La funzione forza-lunghezza $f_l(\lambda_m)$ è funzione della dilatazione del sarcomero λ_m , mentre la funzione forza-velocità $f_v(\eta)$ è funzione della velocità di deformazione η , calcolata tenendo conto della differenza tra la dilatazione del sarcomero al tempo $t+dt$ e al tempo t .

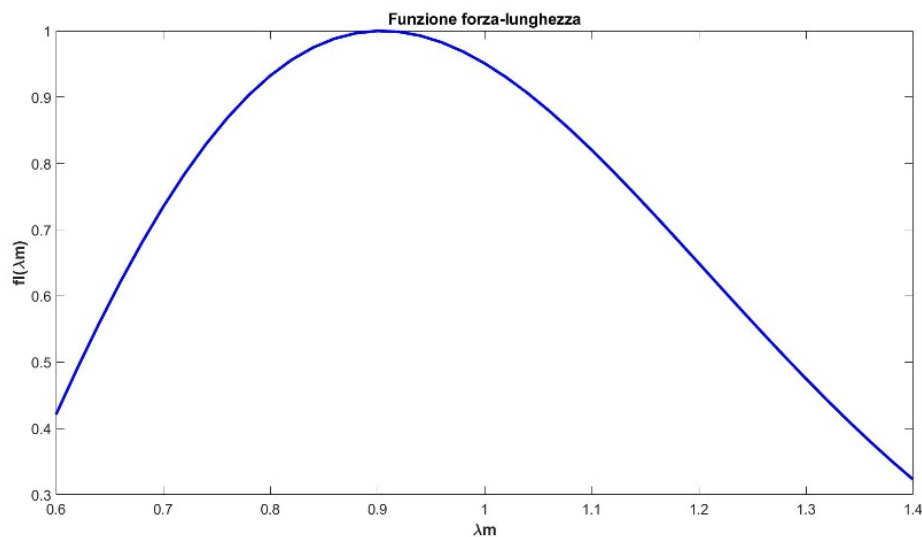


Figura 2.6: Funzione forza-lunghezza

La curva rappresentata fornisce informazioni su come la forza generata nella contrazione si relaziona alla dilatazione del sarcomero e ci indica che, in corrispondenza di un valore ottimo della dilatazione del sarcomero, si riscontra un valore massimo della forza generata. Possiamo inoltre dividere anche in questo caso la curva in due rami che si congiungono nel punto corrispondente al valore unitario della dilatazione (sarcomero in condizione di riposo); il ramo di sinistra corrisponde al caso della contrazione concentrica (con accorciamento del sarcomero), mentre il ramo di destra è relativo ad una situazione in cui si presenta una contrazione eccentrica (con allungamento del sarcomero). La funzione è descritta dalla seguente equazione:

$$f_l(\lambda_m) = \frac{(\lambda_m - \lambda_{min})}{(\lambda_{opt} - \lambda_{min})} e^{((2\lambda_{min} - \lambda_m - \lambda_{opt}) \frac{(\lambda_m - \lambda_{opt})}{(2(\lambda_{min} - \lambda_{opt})^2)})}$$

con:

- $\lambda_{min} = 0.4907$, dilatazione minima del sarcomero;
- $\lambda_{opt} = 0.9041$, dilatazione ottimale del sarcomero.

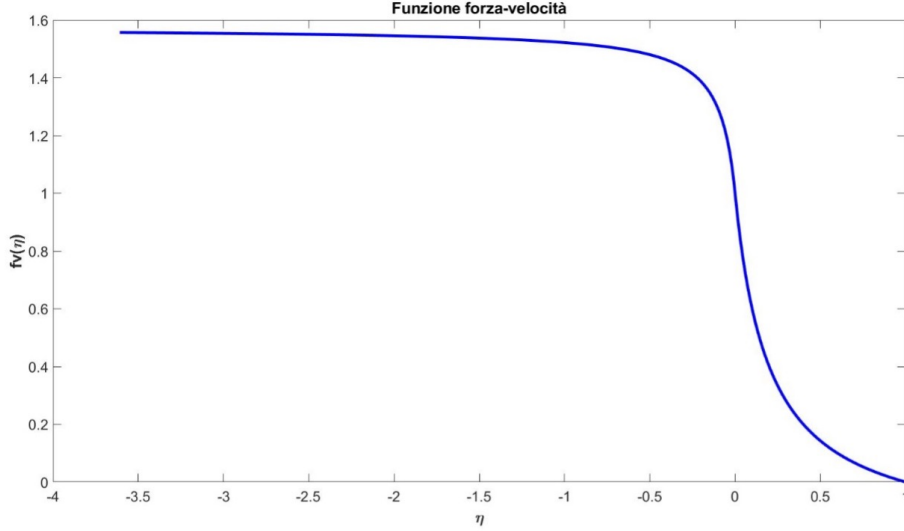


Figura 2.7: Funzione forza-velocità

La curva rappresentata fornisce informazioni riguardanti la relazione tra la forza di contrazione e la velocità con cui la fibra muscolare si contrae. Il parametro η , infatti, è calcolato come rapporto tra la velocità di deformazione del sarcomero ed una costante rappresentativa della minima velocità di deformazione del sarcomero stesso, ovvero il parametro $dlfib_{min}$ già citato. Anche in quest'ultimo caso si può pensare alla curva come formata da due rami che si incontrano nel punto corrispondente al valore nullo della velocità di deformazione. Il ramo destro fa riferimento ad una condizione di contrazione concentrica e ci indica che la forza generata è nulla per una massima velocità di contrazione, mentre cresce quando la velocità diminuisce fino al valore nullo. Per quanto riguarda il ramo di sinistra, invece, ci troviamo in uno stato di contrazione eccentrica e possiamo osservare che in questo caso, all'aumentare in modulo della velocità di deformazione, la forza generata cresce fino al raggiungimento di un *plateau*. L'espressione di tale funzione è la seguente:

$$f_v(\eta) = \begin{cases} d - (d - 1) \frac{(1+\eta)}{(1-k_c \cdot k_e \cdot \eta)}, & \eta < 0 \\ \frac{(1-\eta)}{(1+k_c \cdot \eta)}, & \eta \geq 0 \end{cases}$$

con:

- $k_c = 5$, costante relativa alla contrazione concentrica;
- $k_e = 2.1$, costante relativa alla contrazione eccentrica; $d = \frac{(2+k_c+k_c \cdot k_e)}{(1+k_c \cdot k_e)}$

Queste tre importanti funzioni in grado di regolare il comportamento delle singole fibre muscolari vengono tutte utilizzate nella definizione della formula che permette di calcolare la tensione di contrazione della fibra e vengono calcolate da ABAQUS durante la simulazione sotto forma di variabili di stato, richieste nei *Field Output* del modello. L'equazione che descrive tale grandezza è la seguente:

$$P = P_o \cdot f_a \cdot f_l \cdot f_v$$

2.1.2 Visualizzazione delle capacità del modello di base

Per la discussione relativa alle analisi svolte su ognuna delle tre diverse prove di contrazione, si è deciso di focalizzarsi unicamente sulla fase di interesse di ogni contrazione, trascurando quindi la fase di rilassamento della fibra.

Contrazione isometrica: la contrazione isometrica è una tipologia di contrazione muscolare in cui la lunghezza delle fibre non varia. Si ha una situazione in cui si registra una generazione di tensione non accompagnata da accorciamento o allungamento a livello macroscopico. Vediamo come i risultati di questa prima analisi si relazionano alle caratteristiche specificate nella subroutine.

Concordemente a quanto già detto, si osserva che durante la fase di contrazione della fibra muscolare si hanno degli spostamenti che assumono valori del tutto trascurabili (dell'ordine di 10^{-13} μm – **Figura 2.8**).

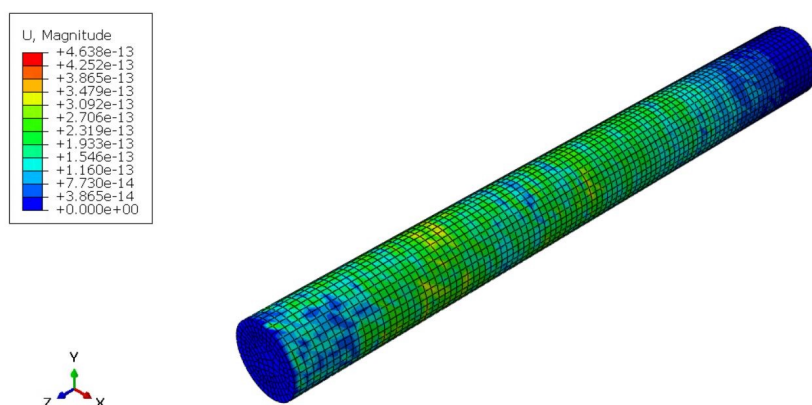


Figura 2.8: Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione isometrica

Corrispondentemente si nota che, nonostante ciò, viene generata tensione dalla fibra (**Figura 2.9a**) e che tale tensione segue approssimativamente l'andamento della funzione di attivazione $f_a(t)$. Questo è dovuto al fatto che, a livello microscopico, il sarcomero va comunque incontro ad un piccolo accorciamento durante la contrazione isometrica (**Figura 2.9b**). Si osserva infatti che la dilatazione del sarcomero non è fissa al valore unitario, ma diminuisce nella fase di attivazione della fibra muscolare.

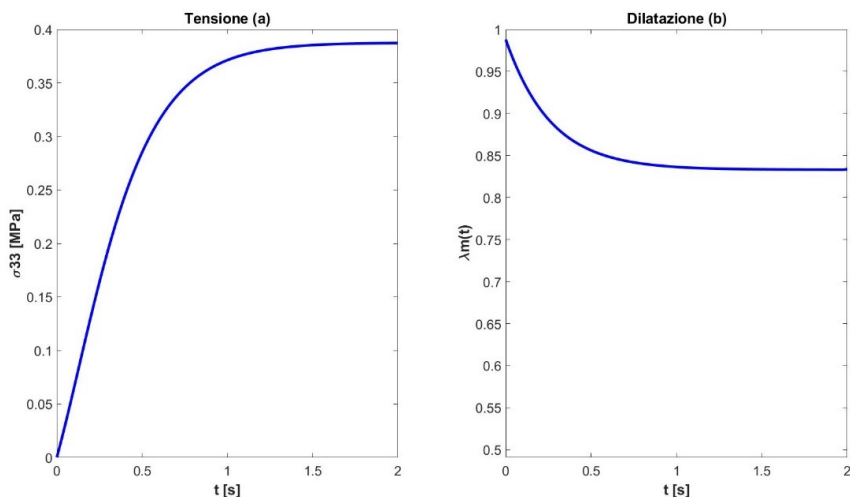


Figura 2.9: Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione isometrica

Passiamo ora ad osservare cosa accade quando si prendono in considerazione le funzioni forza-lunghezza e forza-velocità. Nel primo caso (**Figura 2.10**), possiamo notare che la contrazione isometrica occupa solo una piccola porzione della curva. Questo perché l'accorciamento del sarcomero è piccolo e fa sì che la dilatazione del sarcomero si discosti di poco dal valore unitario.

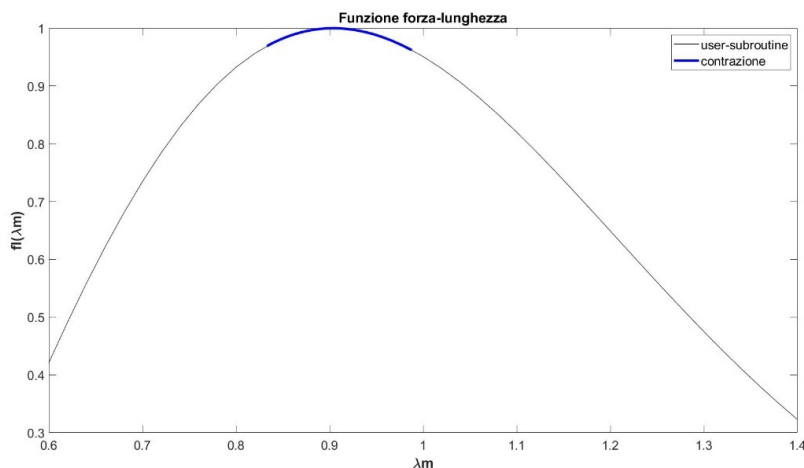


Figura 2.10: Funzione forza-lunghezza per la contrazione isometrica

Analizzando a questo punto la funzione forza-velocità (**Figura 2.11**), si vede che la contrazione isometrica, non essendo caratterizzata da un rapido accorciamento del sarcomero, corrisponde ad un tratto della curva che non è mai nullo in modulo. Questo ci indica che c'è sempre generazione di forza durante la fase di contrazione.

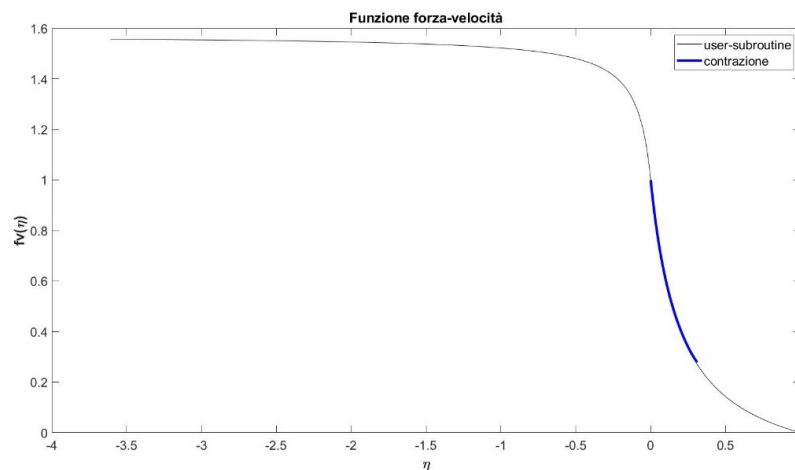


Figura 2.11: Funzione forza-velocità per la contrazione isometrica

Contrazione concentrica: la contrazione concentrica è una tipologia di contrazione muscolare in cui si genera tensione accompagnata dall'accorciamento delle fibre muscolari. Visualizziamo i risultati della simulazione relativa a questa tipologia di contrazione confrontando con ciò che ci si aspetta dalla definizione del modello costitutivo della fibra.

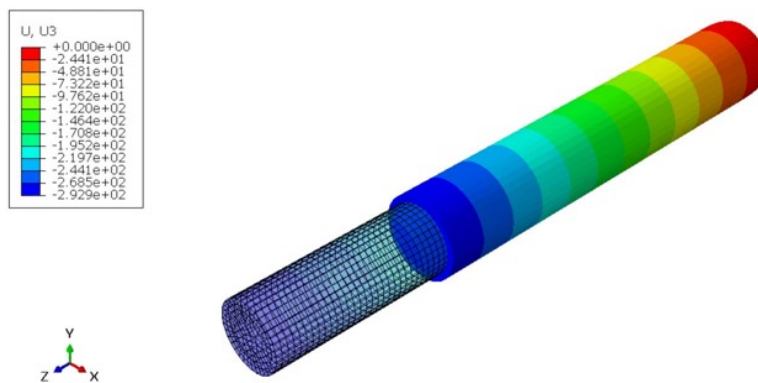


Figura 2.12: Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione concentrica

In questo caso, si osserva un evidente accorciamento della fibra muscolare (**Figura 2.12**). Il campo degli spostamenti non è più trascurabile, ma si riscontra un accorciamento massimo in modulo pari a circa $293 \mu\text{m}$. Come si può notare dalla mappa di colori relativa alla configurazione deformata, la fibra non solo si accorcia, ma subisce un ispessimento in direzione radiale. Prendendo nuovamente in esame la tensione (**Figura 2.13a**) si

nota anche in questo caso che durante la contrazione si genera una tensione in direzione longitudinale che segue approssimativamente l'andamento della funzione di attivazione $f_a(t)$, ma raggiungendo valori inferiori in modulo.

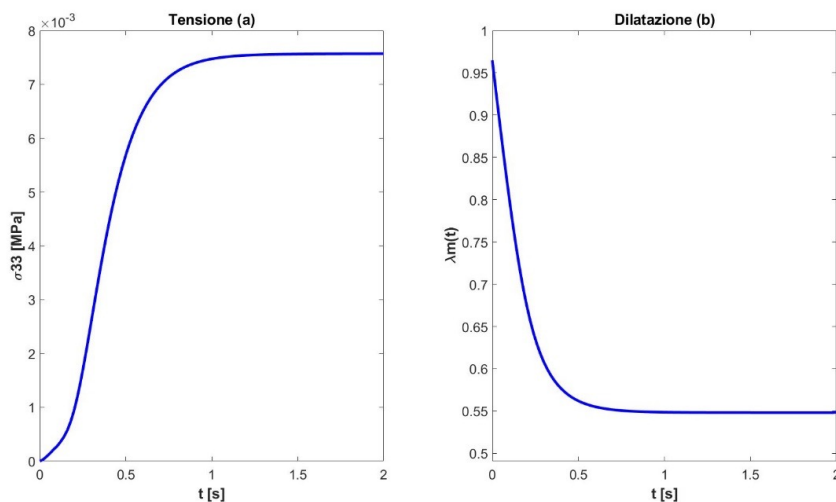


Figura 2.13: Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione concentrica

Il grafico della dilatazione del sarcomero (**Figura 2.13b**), infine, mostra un accorciamento di maggior entità rispetto al caso della contrazione isometrica.

Come nel caso precedente, osserviamo ora le funzioni forza-lunghezza e forza-velocità. Per quanto riguarda la prima funzione, si nota in questo caso che il tratto di curva relativo alla simulazione include la porzione già precedentemente trovata per la contrazione isometrica e si estende fino a coprire completamente il ramo di sinistra della funzione (Figura 2.14).

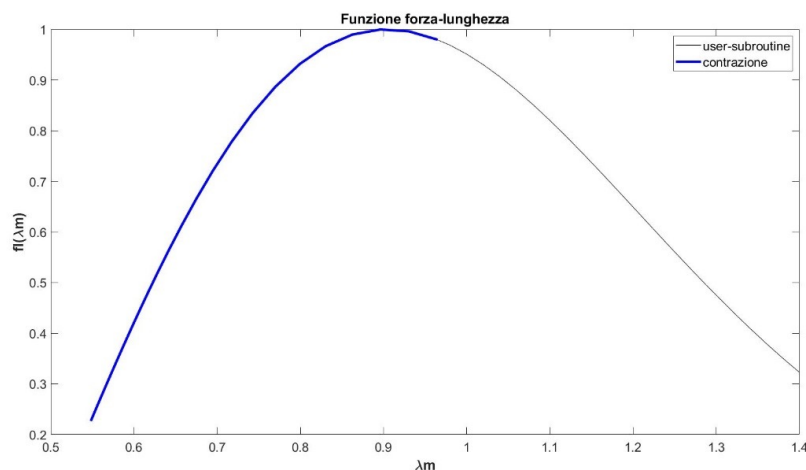


Figura 2.14: Funzione forza-lunghezza per la contrazione concentrica

Questo perché nel caso in esame, l'accorciamento del sarcomero è di entità ben più grande rispetto a quello che si riscontra nella contrazione isometrica. La funzione forza-velocità

presenta un grafico che inizia in ordinata da un valore prossimo allo zero (**Figura 2.15**). Ciò accade perché, come si può vedere dal grafico della dilatazione in **Figura 2.13b**, la velocità con cui si accorcia il sarcomero è inizialmente molto maggiore rispetto a quella registrata nella simulazione precedente.

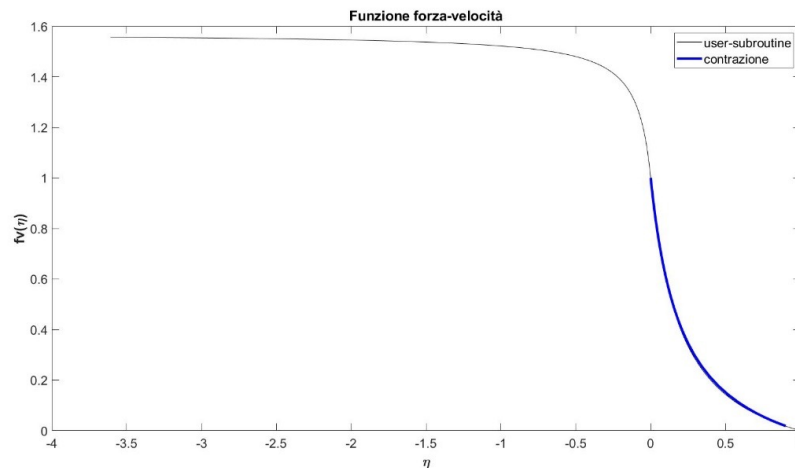


Figura 2.15: Funzione forza-velocità per la contrazione concentrica

Contrazione eccentrica: la contrazione eccentrica è una tipologia di contrazione muscolare in cui la generazione di tensione è accompagnata dall'allungamento delle fibre muscolari. La simulazione della prova di contrazione eccentrica ha fornito i seguenti risultati:

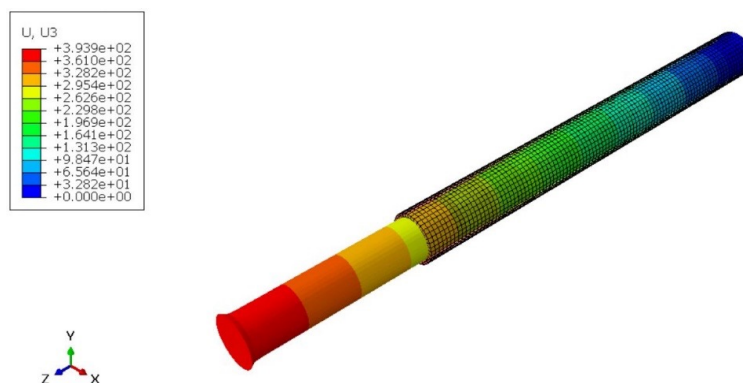


Figura 2.16: Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione eccentrica

Si osserva dunque un evidente allungamento della fibra ed il conseguente restringimento radiale (**Figura 2.16**). Gli spostamenti raggiungono un valore massimo in modulo pari a $393 \mu\text{m}$. Nei grafici viene rappresentato solo l'intervallo temporale da cui inizia la fase di contrazione eccentrica. A causa della tensione generata dall'applicazione della forza esterna (**Figura 2.17a**), la fibra muscolare si allunga. In questo nuovo caso, il grafico della tensione non può essere confrontato con quello della funzione di attivazione $f_a(t)$, questo

per via della sollecitazione esterna applicata in modo da creare una contrazione eccentrica. Quello che accade a livello macroscopico trova una corrispondenza nella dilatazione del sarcomero, che cresce fino a superare il valore unitario rappresentando una lunghezza finale del sarcomero maggiore di quella che si ha nella configurazione indeformata (**Figura 2.17b**).

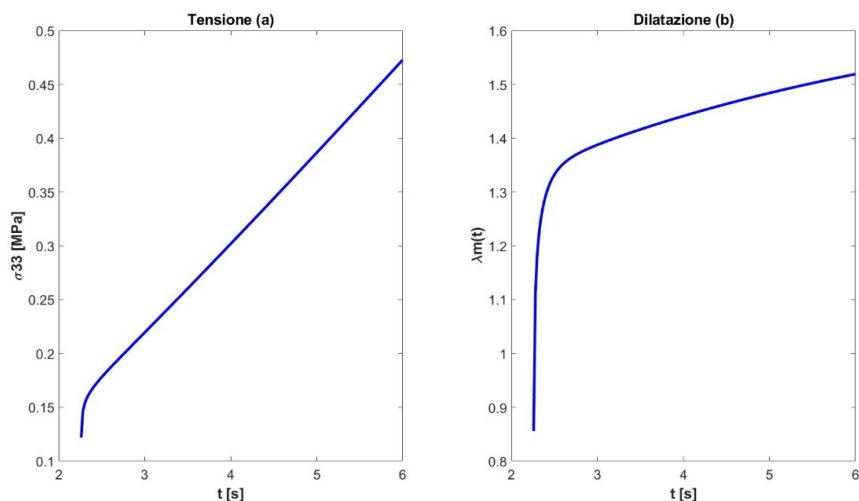


Figura 2.17: Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione eccentrica

La funzione forza-lunghezza ricopre in questo caso il ramo di destra della curva, come del resto ci si aspetta (**Figura 2.18**). Tale funzione mostra che passando da una situazione di riposo del sarcomero ad una elongazione dello stesso, la capacità del muscolo di generare forza, diminuisce progressivamente.

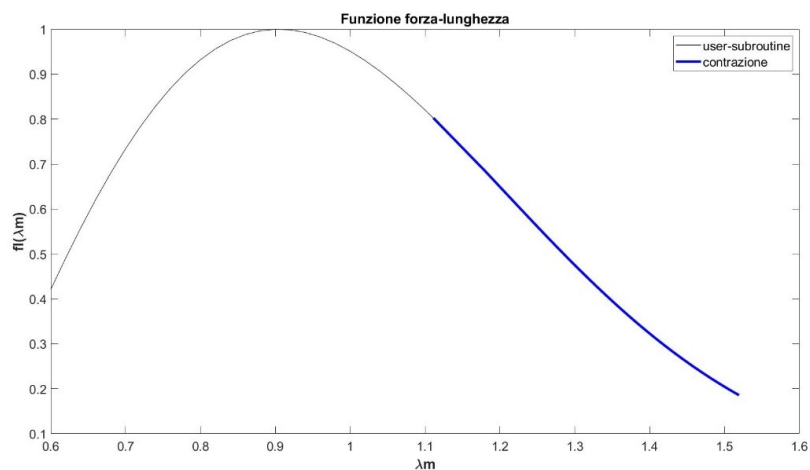


Figura 2.18: Funzione forza-lunghezza per la contrazione eccentrica

Infine, quello che accade per la funzione forza-velocità è diverso da ciò che si è visto precedentemente. La velocità con cui il sarcomero si deforma è molto elevata all'inizio del processo di contrazione eccentrica e poi cala improvvisamente e continua a diminuire nel tempo. Ciò che si verifica nella funzione è una crescita nella capacità di generare forza fino ad arrivare ad un plateau (**Figura 2.19**).

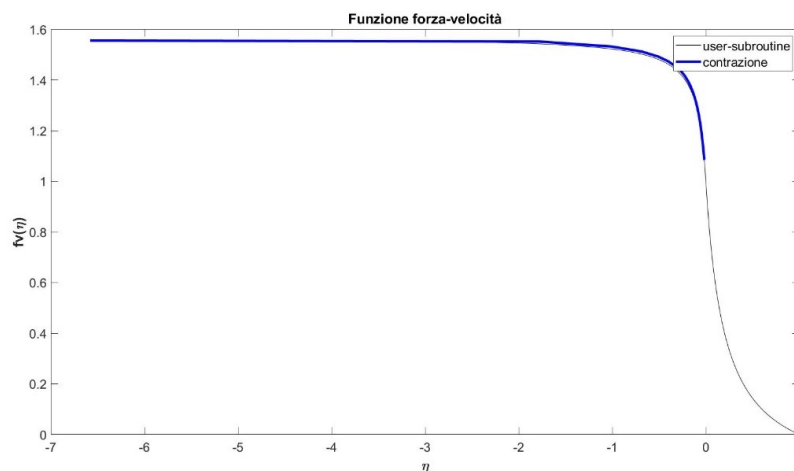


Figura 2.19: Funzione forza-velocità per la contrazione eccentrica

2.2 Descrizione delle analisi effettuate sul fascetto muscolare

2.2.1 Premessa alla seconda fase di analisi

Le prove di contrazione isometrica e concentrica effettuate nella fase di test sul fascetto muscolare sono ispirate ai lavori sperimentali *in-vivo* su ratti/topi eseguiti da Huijing *et al.* [17] e da Ramaswamy *et al.* [18] (d'ora in poi ci si riferirà a tali esperimenti come "Protocollo di Huijing" e "Protocollo di Ramaswamy"), per dimostrare come l'invecchiamento influisce sulla trasmissione della forza generata durante la contrazione. Il protocollo sperimentale di Huijing consiste nel testare il muscolo estensore lungo delle dita di un ratto per capire i meccanismi di trasmissione della forza. L'obiettivo che si pone tale studio è quello di verificare se la trasmissione avviene solo ed esclusivamente attraverso la giunzione miotendinea o se vi sono ulteriori meccanismi aggiuntivi. Il muscolo estensore lungo delle dita, nel ratto, è formato da quattro teste nominate in base al dito sul quale si trova la propria inserzione. Questo muscolo è caratterizzato da un tendine prossimale condiviso e dei tendini separati nella parte distale. Il protocollo prevede l'analisi della trasmissione attraverso una stimolazione esterna in successive prove che differiscono per

la presenza di tenotomie ai tendini distali in modo da diminuire progressivamente l'area trasversale in grado di trasmettere la forza generata dalla contrazione. Il protocollo sperimentale di Ramaswamy consiste, invece, nell'analisi del deterioramento della capacità dei muscoli di trasmettere lateralmente la forza, effettuando prove di contrazione in topi e ratti giovani, confrontandoli con topi cosiddetti *mdx* (in cui una mutazione del gene DMD li rende adatti per studi riguardanti la distrofia muscolare di Duchenne) e ratti molto anziani. Viene sviluppato un particolare apparato che viene poi posizionato centralmente sui muscoli, suturato all'epimisio e ad un trasduttore di forza, in modo da rilevare la forza trasmessa lateralmente. Verrà discusso in seguito come questi protocolli sono stati traslati all'analisi computazionale del fascetto muscolare.

2.2.2 Modello CAE utilizzato per le analisi

Il modello computazionale per la seconda fase delle analisi è stato creato a partire da geometrie già definite in precedenza. Le geometrie in questione riguardano le fibre muscolari e la ECM. In particolare, le ECM relative ai due casi giovani ed anziani differiscono per la loro area laterale (unico criterio utilizzato per discriminare i due casi). A causa dell'invecchiamento, il contenuto di collagene aumenta e, perciò, la ECM del caso anziani è più spessa di circa 1-2 μm . Il modello CAE è stato costruito con le specifiche di seguito riportate (la descrizione segue l'ordine dei moduli di lavoro presenti nel *software* ABAQUS).

- *Part*: per rappresentare la singola fibra è stata importata una Parte definita come solido 3D deformabile. La fibra viene approssimata da un prisma a base esagonale. L'esagono di base ha il lato lungo circa 53.55 μm ed il prisma ha una lunghezza di 1000 μm (**Figura 2.20**). La seconda struttura importata è quella relativa alla ECM. Tale Parte è stata realizzata come solido 3D deformabile ed è di due tipologie differenti, una specifica per il caso giovani ed una per il caso anziani. In entrambi i casi si ha una geometria particolare in grado di avvolgere sette fibre muscolari sia esternamente, sia intervallandosi tra le singole fibre. Le fibre, perciò, non sono in contatto tra loro, ma sono circondate dalla ECM che ne lascia libere solo le estremità. La caratteristica che ci permette di distinguere tra le due diverse ECM è lo spessore; nel primo fascetto si trova una matrice che ha uno spessore medio di circa un micron (**Figura 2.21**), mentre nel modello riferito al caso anziani, la matrice ha uno spessore che varia da un valore minimo attorno ai 2 μm ad un valore massimo attorno ai 2.975 μm (**Figura 2.22**).

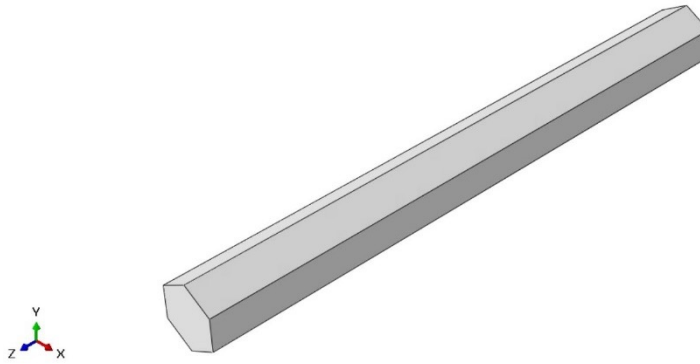


Figura 2.20: Geometria della singola fibra muscolare

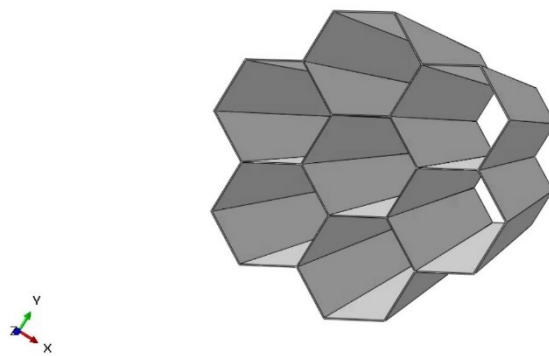


Figura 2.21: Geometria della ECM del fascetto nel caso giovani

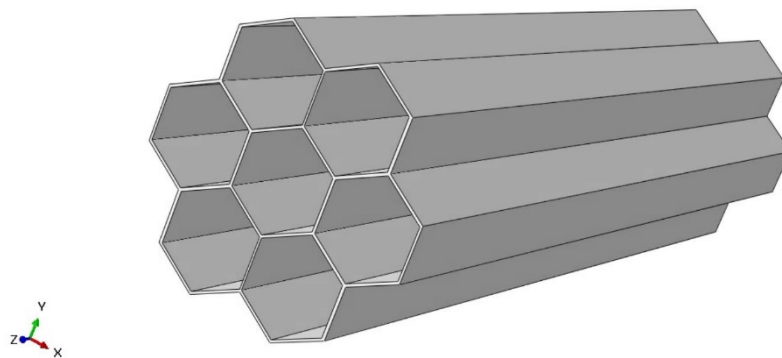


Figura 2.22: Geometria della ECM del fascetto nel caso anziani

- Property: si è definito un materiale per la fibra con lo stesso modello costitutivo implementato nella prima fase delle analisi, quindi facendo uso della *subroutine* Fortran in grado di specificarne il comportamento e le caratteristiche. Per quanto riguarda invece il materiale relativo alla ECM, è richiesta una discussione più approfondita che verrà fatta successivamente.
- Assembly: le Parti importate nel primo modulo sono state precedentemente definite

già nella posizione finale desiderata. È bastato dunque creare le Istanze associate a tali Parti per avere l'Assembly formato correttamente.

- Step: è stato creato uno *step* relativo alla prova di contrazione della fibra con durata di 2 s. Viene effettuata in questo *step* un'analisi statica in condizioni di non linearità per geometria. La scelta dei 2 s deriva dal fatto che al parametro t_1 , ovvero il tempo a cui si ha il picco nella funzione di attivazione $f_a(t)$, è stato assegnato il valore 2 s. In questo modo ci si interessa solamente alla fase del processo in cui si ha l'attivazione dei sarcomeri e, quindi, il meccanismo di contrazione. Non si discute della fase di rilassamento. In questo modulo si scelgono anche i parametri di interesse per i *Field Output*, impostati per essere calcolati ogni 0.02 s. Ai fini di queste simulazioni vengono scelte le tensioni, gli spostamenti, le forze di reazione e le variabili di stato che derivano dalla definizione della *subroutine*.
- Interaction: poichè la ECM è in continuità con le fibre muscolari e deve, perciò, deformarsi a causa del meccanismo di contrazione di queste, vengono applicati dei vincoli di tipo *Tie* in modo da legare le superfici interne degli spazi della matrice alle superfici esterne delle corrispondenti fibre muscolari. Così facendo, imponiamo che il fascetto subisca gli effetti della contrazione come fosse un'unica entità. Oltre a questo, sono stati definiti dei *Reference Point* (RP) nei centri delle facce esagonali alle estremità delle fibre e collegati ognuno alla propria superficie di riferimento tramite dei *Multi-Point Constraint* (MPC). In questo modo, è possibile valutare in fase di visualizzazione dei risultati le forze di reazione totali agenti sulle facce alle estremità considerando le risultanti nei RP.
- Load: sono stati applicati dei vincoli di tipo Displacement/Rotation, forzando di volta in volta una specifica tipologia di contrazione per il fascetto muscolare. I vincoli sono stati poi applicati in modo da ricreare delle condizioni simili a quelle dei due protocolli da cui è stato preso spunto. Prima di tutto sono stati applicati i vincoli a tutti e 14 i *Reference Point* precedentemente creati, in modo da bloccare tutte le facce esagonali alle estremità e simulare quindi una contrazione isometrica utile come situazione di riferimento. A questo punto sono stati modificati progressivamente i vincoli in base allo specifico protocollo da utilizzare.
 - Protocollo di Huijing: per simulare quanto avviene con le progressive tenotomie effettuate al muscolo, sono state effettuate molteplici prove di contrazione andando a sbloccare una fibra dopo l'altra ad una stessa estremità del modello, fino a raggiungere una situazione in cui 5 fibre sono state sbloccate e 2

sole restano ancora vincolate (le facce alle estremità opposte restano sempre bloccate per avere una contrazione concentrica del fascetto).

- Protocollo di Ramaswamy: per rappresentare l'apparato costruito appositamente per meglio comprendere la trasmissione laterale della forza, sono state in questo caso liberate tutte le facce ad una delle estremità del fascetto ed è stato posto un giogo nella sezione di mezzeria delle fibre, a rappresentare il posizionamento dell'apparato. La contrazione è perciò libera di avvenire in modo concentrico per metà della lunghezza del fascetto, mentre per la restante metà si ha una condizione prossima a quella di isometria.
- Mesh: la *mesh* della struttura è stata costruita con tecnica *sweep*, utilizzando elementi solidi continui esaedrici lineari, aventi quindi 8 nodi posti ai vertici – C3D8 – con integrazione completa, per le fibre, ed elementi analoghi ma con formulazione ibrida – C3D8H – per la matrice in quanto alla ECM è stato assegnato un modello costitutivo iperelastico incompressibile. La *mesh* delle singole fibre è costituita da un numero di elementi che varia tra i 1 300 ed i 1 600 circa (Figura 2.23); quella della ECM relativa al caso giovani è formata da 11 904 elementi e quella della ECM relativa al caso anziani da 72 240 elementi (Figura 2.24).
- Job: si sono creati e lanciati i *Job* per le analisi in modo da ottenere i risultati relativi alle prove di contrazione effettuate sulla base dei due protocolli di riferimento.

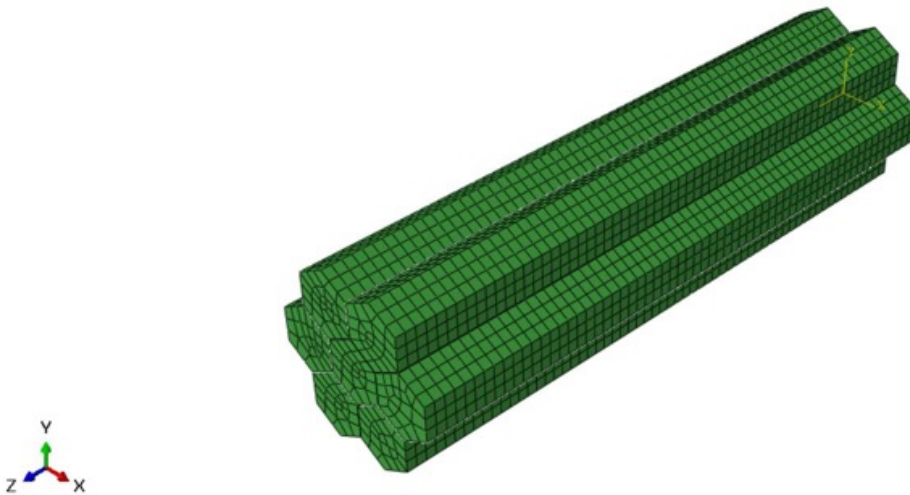


Figura 2.23: Visualizzazione della mesh creata per le fibre

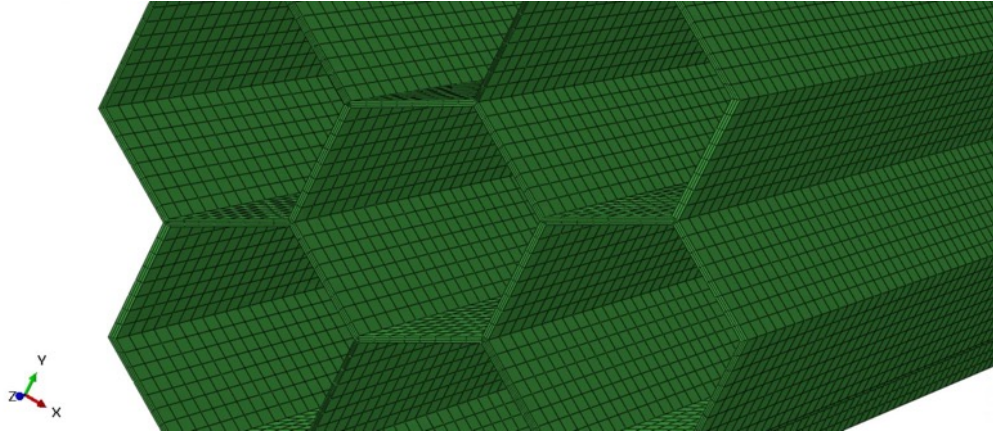


Figura 2.24: Visualizzazione della mesh creata per la matrice del caso anziani

2.2.3 Modello costitutivo della matrice extracellulare

Non esiste una vasta raccolta bibliografica relativa a studi riguardanti le proprietà meccaniche della ECM ed ai modelli costitutivi applicabili in questo contesto. È stato comunque eseguito un lavoro di documentazione per capire se poter applicare i risultati di studi precedentemente condotti oppure se dover scegliere un modello costitutivo proveniente da prove sperimentali. In un articolo pubblicato nel 2011 relativo ad uno studio condotto da Meyer *et al.* [19] i ricercatori decidono di provare a determinare dei valori descrittivi delle proprietà meccaniche passive della ECM con metodi definiti *indiretti*. Questo obiettivo nasce dal fatto che lavori precedenti hanno tentato di isolare la sola ECM tramite la rimozione chimica delle cellule dalla matrice stessa ed eliminando le fibre muscolari. Questa metodologia porta inevitabilmente alla degradazione della struttura nativa e compromette così le proprietà meccaniche. In particolare, la rimozione delle fibre muscolari porta la struttura della ECM a modificarsi spazialmente, con conseguente variazione dell'orientazione delle fibre di collagene in essa presenti e, perciò, anche il modulo elastico trovato in queste condizioni risulta non idoneo per descrivere le proprietà meccaniche. Il procedimento seguito in questo studio per l'analisi indiretta delle proprietà della ECM consiste nell'isolare singole fibre muscolari e fascetti muscolari dal muscolo estensore lungo delle dita. Ciò che viene fatto è un confronto tra il comportamento delle singole fibre, dei fascetti e di gruppi di singole fibre legate tra loro a formare una struttura simile a quella del fascetto muscolare, ma privata della ECM. Sono poi stati eseguiti protocolli di rilassamento delle tensioni sulle diverse strutture in modo da derivare le proprietà elastiche. Infine è stato calcolato il modulo elastico della matrice tramite la seguente regola delle fasi per i compositi:

$$E_m = \frac{(E_c - E_f(1 - A_m))}{A_m}$$

dove, E_m è il modulo della ECM, E_f è il modulo della singola fibra, E_c è il modulo del fascetto e, infine, A_m è la frazione di area trasversale occupata dalla ECM nel fascetto muscolare.

Un articolo dello stesso anno pubblicato da Gillies *et al.* [20] descrive invece una metodologia diretta per l'analisi meccanica della ECM a partire dal muscolo tibiale anteriore del topo. Rispetto alle precedenti tecniche per la decellularizzazione dei muscoli scheletrici, come i cicli di congelamento e scongelamento, i detergenti e i trattamenti enzimatici con il Triton X-100, metodi che risultano inevitabilmente nella degradazione della ECM e ne intaccano le proprietà strutturali e meccaniche, in questo studio è stato ideato un innovativo metodo di decellularizzazione in grado di preservare in modo migliore la struttura e le proprietà originarie. Tramite il solo utilizzo di *shock* osmotico e della depolimerizzazione di actina e miosina è stato raggiunto l'obiettivo di isolare dei fascetti di approssimativamente 20 foglietti di endomisio per poi testarli. I fascetti sono stati collegati ad un trasduttore di forza ultrasensibile e ad un servomotore posizionato su un micromanipolatore in modo da poter eseguire dei test applicando la deformazione desiderata. Confrontando i campioni non trattati con quelli una volta applicata la decellularizzazione si è osservato che le curve rappresentative della relazione tensione-deformazione sono caratterizzate da una forma simile ed i valori risultanti del modulo tangenziale (308 ± 51.1 kPa per il campione non trattato e 218 ± 24.5 kPa per il campione decellularizzato) non presentano differenze significative.

Un successivo articolo presentato da Konno *et al.* [21] propone un modello costitutivo per descrivere il comportamento della ECM. Per capire i complessi effetti derivanti dall'eterogeneità dell'architettura muscolare bisogna considerare dei modelli tridimensionali basati sulla teoria della meccanica del continuo. Nel caso in esame, l'obiettivo è quello di sviluppare un materiale isotropo che sia in grado di rappresentare gli effetti micromeccanici in modo che possano essere modellati a livello macroscopico. Questa omogeneizzazione tiene conto di due fattori: una componente cellulare che include fibre e materiale cellulare ed una componente per la ECM. Il muscolo viene spesso rappresentato tramite un materiale fibro-rinforzato e perciò nello studio si considera il muscolo come un materiale isotropo tridimensionale con fibre unidimensionali che si sviluppano lungo la lunghezza del muscolo stesso. La componente delle fibre ha lo scopo di tenere conto di tutti gli effetti anisotropi, mentre il materiale cellulare e la ECM compongono il materiale di base isotropo. Per quanto riguarda la ECM è stato usato un modello iperelastico di Yeoh, adatto per materiali con elasticità non-lineare e quasi incomprimibili. Questa scelta permette di associare alla ECM un modello isotropo in via semplificativa, nonostante l'anisotropia della stessa matrice, e di implementare dati sperimentali pur mantenendo un modello computazionalmente semplice.

Non essendo sufficientemente ed esaustivamente spiegati i risultati raggiunti ed i modelli costitutivi scelti negli studi già citati, si è scelto autonomamente un modello da utilizzare nel caso delle analisi condotte nel presente lavoro. Per questo studio è stato utilizzato un risultato ottenuto da prove sperimentali effettuate in precedenza [22]; le prove sono state condotte su fascetti e singole fibre muscolari e tramite sottrazione è stato ricavato il comportamento della sola ECM. Non essendo chiara però la differenza nel modulo della ECM di giovani e anziani, si è utilizzato lo stesso valore per entrambi i casi; ciò ha il vantaggio di evidenziare differenze nei risultati dovute solamente ai due diversi quantitativi di ECM utilizzati per i modelli. Per la ECM, dunque, si è scelto di usare un modello iperelastico isotropo neo-hookeano il cui valore del modulo elastico di taglio iniziale è pari a 0.81 MPa, modellazione impostata per il materiale della matrice nel modello CAE.

Capitolo 3

Risultati

La visualizzazione dei risultati si riferisce solo ed esclusivamente alla fase di attivazione della contrazione. Il tempo dello *step*, come detto in precedenza, è stato impostato a 2 s, pari al valore del parametro t_1 della *subroutine*, corrispondente all'istante in cui la funzione di attivazione $f_a(t)$ raggiunge il suo picco. Per questa ragione i risultati delle prove di contrazione effettuate in questa seconda fase di analisi si riferiscono alla contrazione isometrica oppure alla contrazione concentrica. Sia nel caso giovani che nel caso anziani, la prima analisi condotta è stata effettuata in condizione di isometria.

Per meglio comprendere e per capire come confrontare i risultati ottenuti per i due diversi casi, si è scelto di focalizzarsi inizialmente su un solo caso alla volta ed osservare ciò che accade e che variazioni si riscontrano mettendo a confronto le analisi effettuate.

Non si desidera valutare le tensioni che si generano come fatto invece nella prima fase delle analisi, ma confrontare ciò che accade nelle diverse simulazioni per quanto riguarda variabili che possano darci informazioni riguardanti la trasmissione laterale della forza. Le variabili che si è scelto di valutare a tale scopo sono la funzione forza-lunghezza e le forze di reazione vincolare. Queste due grandezze permettono infatti di osservare le differenze nei meccanismi di trasmissione tra i due casi analizzati.

3.1 Protocollo di Huijing caso “giovani”

La prima prova che viene presentata è la prova di contrazione isometrica del fascetto muscolare del caso giovani. Prima di tutto si desidera verificare che la contrazione che si presenta è una contrazione isometrica e, per questa ragione, si riporta in **Figura 3.1** la mappa di colore degli spostamenti.

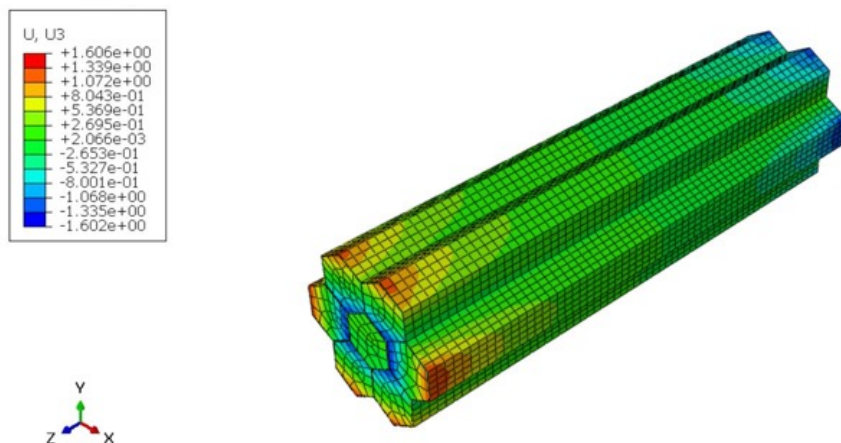


Figura 3.1: Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di contrazione isometrica per il fascetto del caso giovani

Si osserva che il campo di spostamenti assume valori del tutto trascurabili rispetto alla lunghezza di $1000 \mu\text{m}$ del fascetto muscolare e quindi ci si trova effettivamente nel caso di una contrazione isometrica. Si vuole ora osservare cosa succede quando, delle fibre, si sbloccano progressivamente le facce orientate nel verso positivo dell'asse z . Queste estremità precedentemente vincolate, vengono sbloccate in modo da simulare le tenotomie al muscolo estensore lungo delle dita, effettuate nello studio di Huijing. Ciò che ci si aspetta è una riduzione della capacità del muscolo di generare forza, in quanto alcune fibre non risultano più connesse alla giunzione miotendinea. Nonostante questo problema, si può notare che le fibre libere non sono scariche, ma sono sottoposte all'effetto di forze di reazione che permettono loro di allungarsi e contribuire alla forza totale generata dal muscolo. Prima di osservare queste caratteristiche però, si riportano le mappe di colore degli spostamenti per visualizzare ciò che accade al fascetto muscolare man mano che vengono sbloccate le fibre muscolari (Figure dalla 3.2 alla 3.5).

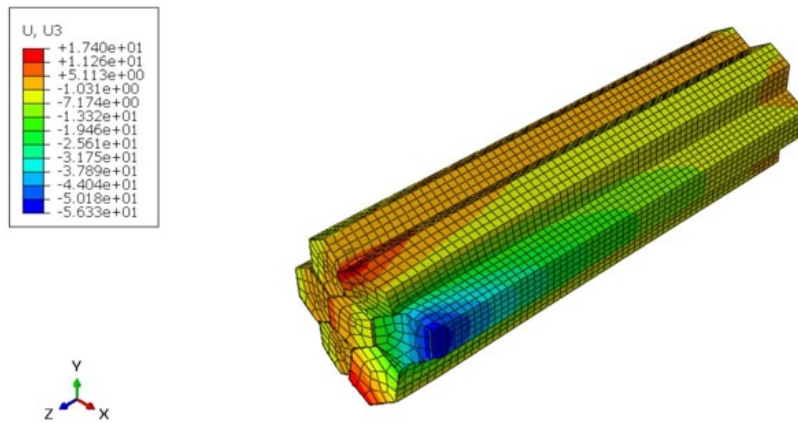


Figura 3.2: Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di una fibra sbloccata. La fibra sbloccata è visibile perché caratterizzata da un accorciamento in direzione longitudinale, in blu nell'immagine

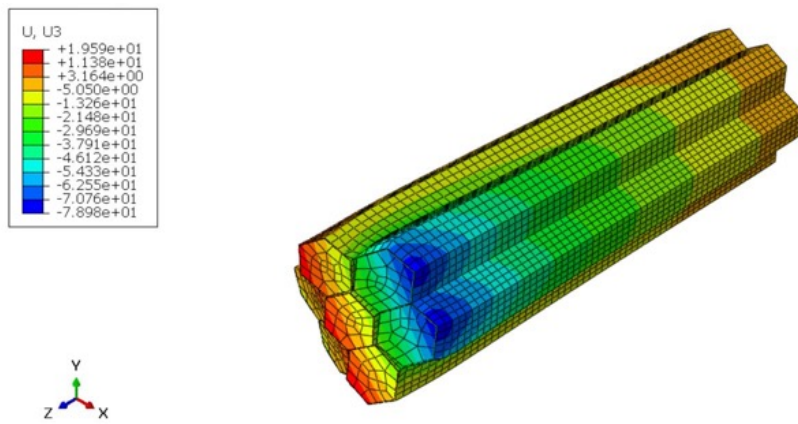


Figura 3.3: Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di due fibre sbloccate. Le fibre sbloccate sono visibili per quanto spiegato nella figura precedente

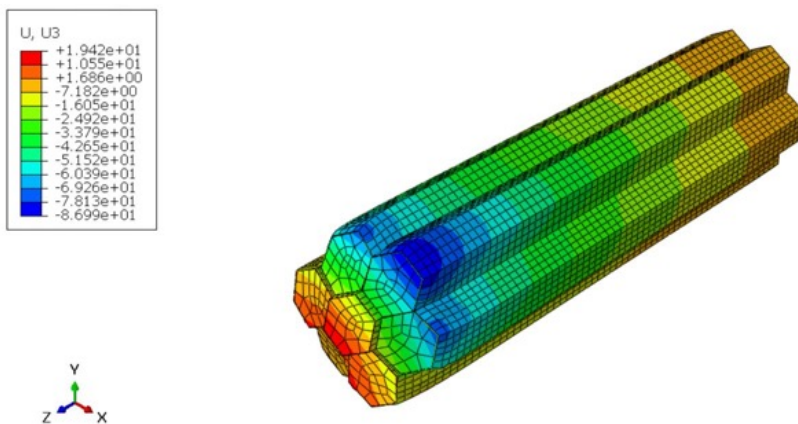


Figura 3.4: Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di tre fibre sbloccate

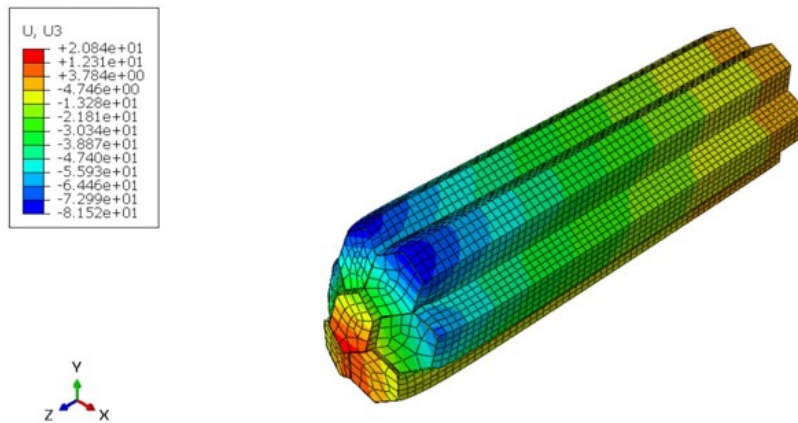


Figura 3.5: Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di quattro fibre sbloccate

Un aspetto interessante che si può considerare è che, sebbene da un lato le fibre a cui vengono rimossi i vincoli tendono ad accorciarsi, le fibre adiacenti vanno incontro ad allungamento, come dimostrato dalle figure. Dallo studio condotto da Huijing ci si aspetta che la funzione di forza-lunghezza assuma valori via via più bassi in modulo, proprio a causa delle tenotomie che vengono simulate nel modello computazionale. In una tenotomia, infatti, le connessioni tendinee vengono rimosse con conseguente diminuzione nella capacità delle fibre muscolari di generare e trasmettere forza. Si può quindi passare a valutare qualitativamente l'aspetto delle mappe di colore rappresentative della funzione forza-lunghezza nei casi già mostrati. Le figure di seguito riportate mantengono l'ordine utilizzando per la presentazione delle mappe di colore degli spostamenti.

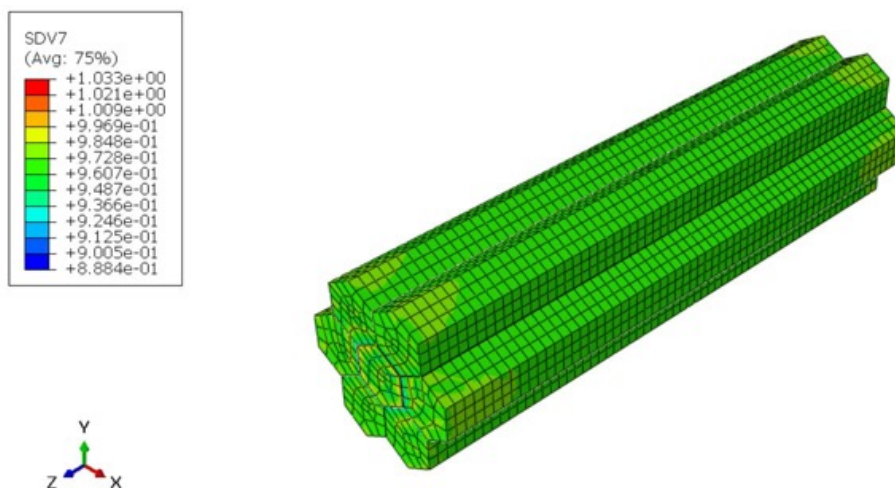


Figura 3.6: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso della contrazione isometrica

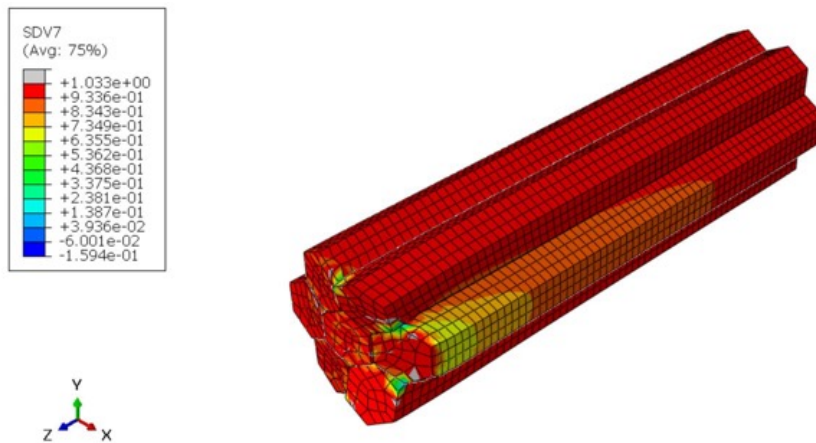


Figura 3.7: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di una fibra sbloccata

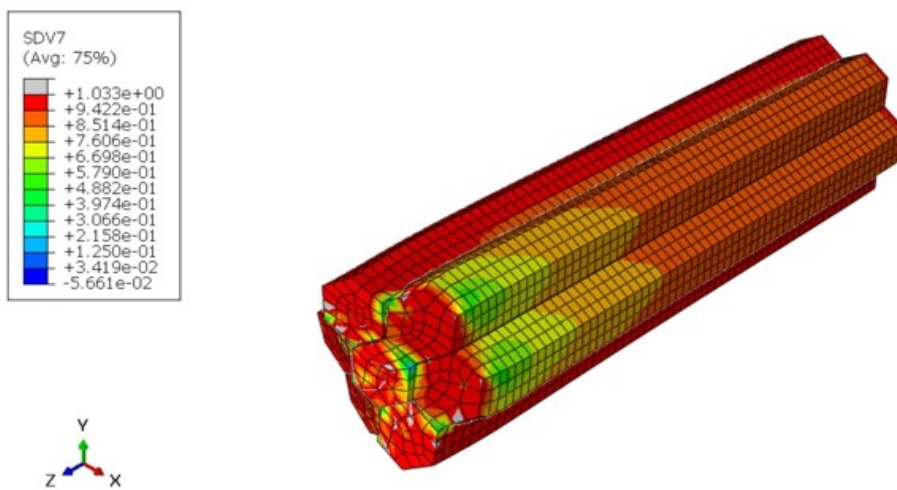


Figura 3.8: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di due fibre sbloccate

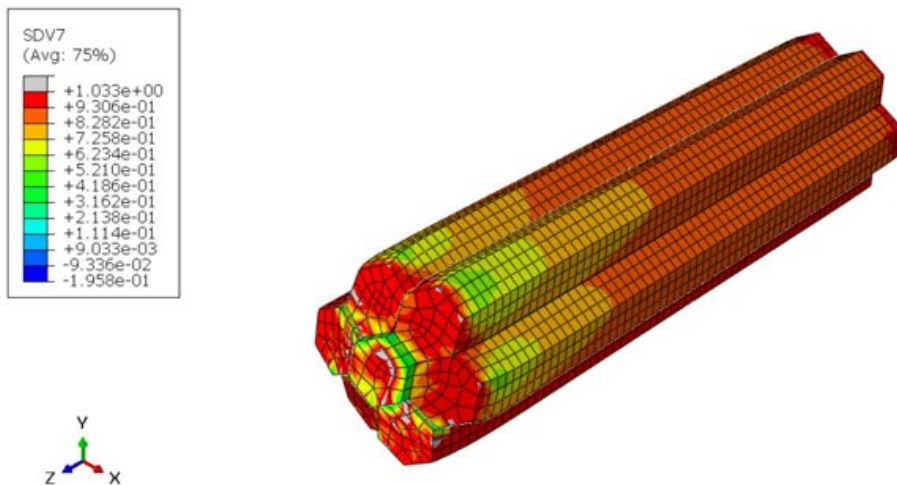


Figura 3.9: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di tre fibre sbloccate

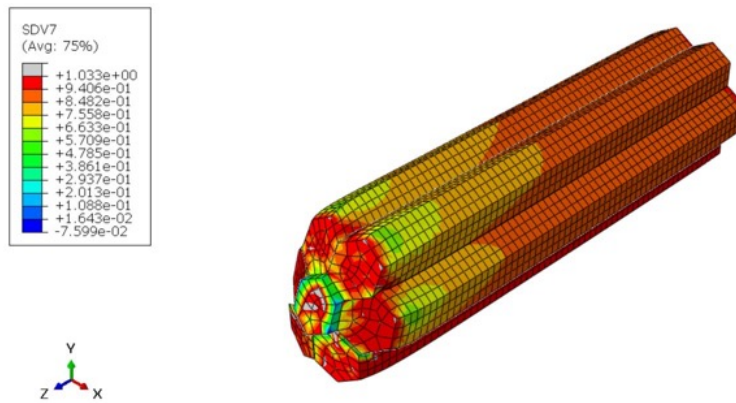


Figura 3.10: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di quattro fibre sbloccate

Per effettuare dei confronti in modo agevole, è stato imposto un limite superiore nei valori da visualizzare; tale limite corrisponde al massimo valore della curva forza-lunghezza calcolato da ABAQUS per il caso in contrazione isometrica. Si può confermare che con la progressiva rimozione dei vincoli alle fibre si osserva una conseguente riduzione della capacità della fibra di generare forza. Ampie regioni nelle mappe di colore presentano valori via via inferiori e ciò si nota dal passaggio a colori leggermente sempre più chiari. Risulta evidente quindi che la diminuzione della forza sviluppata va di pari passo con la diminuzione dell'area trasversale vincolata durante la contrazione. Tale diminuzione si può osservare anche prendendo in considerazione le forze di reazione che si generano nel corso delle prove di contrazione. In **Figura 3.11** sono rappresentate le curve che descrivono l'andamento della somma delle risultanti delle forze di reazione vincolare, calcolate in corrispondenza dei Reference Point posti alle estremità delle fibre che vengono sottoposte ai vincoli di tipo Displacement/Rotation per tutta la durata delle analisi.

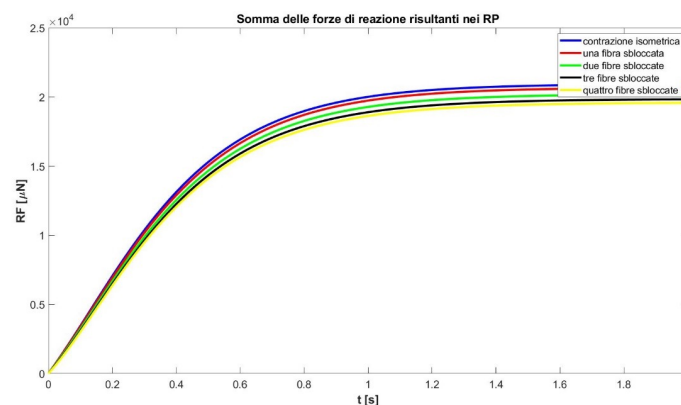


Figura 3.11: Diagramma della somma delle forze di reazioni risultanti calcolate nei Reference Point

Il fatto che la diminuzione nella forza sviluppata dal processo di contrazione non sia di grande entità rende evidente che nella produzione e distribuzione della forza intervengono dei meccanismi di trasmissione laterale che permettono di diffondere la tensione muscolare generata anche alle fibre i cui tendini sono stati sottoposti a tenotomia (che sono quindi state sbloccate nel software di analisi). Questa osservazione è ancora più evidente se si fa un confronto tra la riduzione percentuale dell'area trasversale dovuta alle tenotomie e la riduzione della somma delle forze di reazione vincolare. Come si vede in Tabella 3.1, infatti, la riduzione della forza è nettamente inferiore alla riduzione dell'area; ciò implica che necessariamente ci deve essere un meccanismo che trasmette la forza lateralmente e fa sì che gran parte della forza generata non vada a perdersi.

Numero fibre tagliate	Riduzione area trasversale	Riduzione forza
1	14.3%	1.22%
2	28.6%	3.48%
3	42.9%	5.20%
4	57.2%	6.42%

Tabella 3.1: Confronto tra le riduzioni percentuali dell'area trasversale e della somma delle forze di reazione vincolare (riduzioni rispetto alla condizione di isometria) per il protocollo di Huijing nel caso giovani

3.2 Protocollo di Huijing caso “anziani”

Si possono effettuare considerazioni analoghe per quanto riguarda il caso anziani, dove si ha una ECM più spessa a causa degli effetti dell'invecchiamento. In quanto a livello di spostamenti ciò che avviene in questo caso è del tutto paragonabile al comportamento del fascetto nel caso giovani, si è deciso di non riportare le figure degli spostamenti per questo caso. In modo da eseguire successivamente semplici confronti tra i due casi giovani ed anziani, si riportano nelle figure le mappe di colore della forza-lunghezza applicando come limite superiore il valore usato anche in precedenza, ovvero il valore massimo registrato per la funzione forza-lunghezza nella contrazione isometrica del caso giovani. Anche in questo caso ci si aspetta una diminuzione analoga a quella già registrata ed è effettivamente quello che si nota nelle Figure dalla 3.12 alla 3.16.

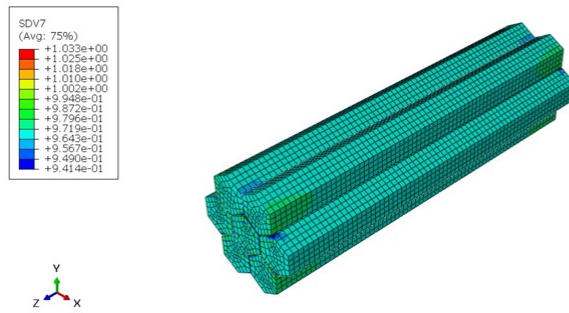


Figura 3.12: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso della contrazione isometrica

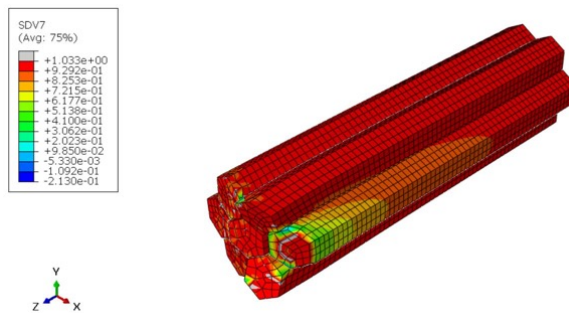


Figura 3.13: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di una fibra sbloccata

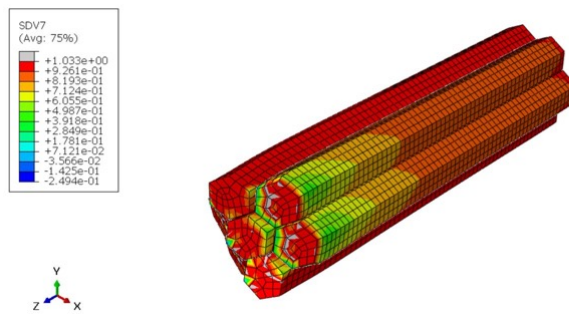


Figura 3.14: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di due fibre sbloccate

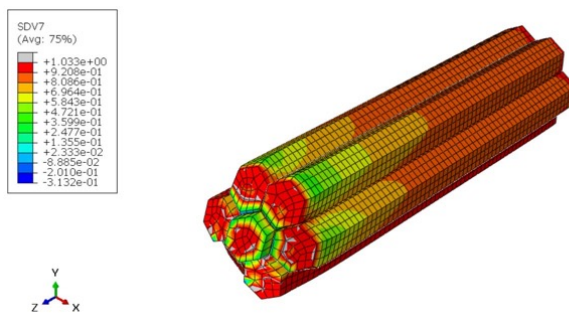


Figura 3.15: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di tre fibre sbloccate

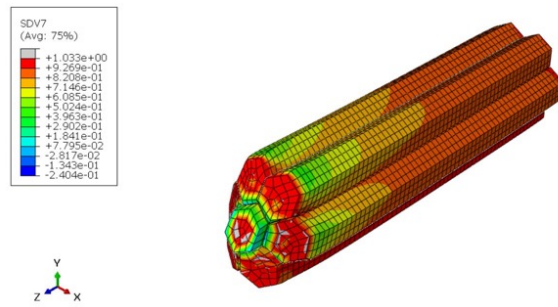


Figura 3.16: Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di quattro fibre sbloccate

Si osserva dunque lo stesso comportamento registrato per il caso giovani, ovvero si ha una progressiva riduzione della forza prodotta dal fascetto. Allo stesso modo di quanto fatto precedentemente, si riportano il diagramma della somma delle forze di reazione vincolare per avere un'ulteriore dimostrazione della diminuzione nella produzione della forza da parte del fascetto ed una tabella analoga a quella mostrata in precedenza (Figura 3.17 e Tabella 3.2). Completata quindi la presentazione dei risultati dei singoli casi per il protocollo di Huijing si passa alla visualizzazione combinata di stesse prove di contrazione per i due differenti casi in modo da valutare gli effetti dell'ispessimento della ECM dovuto all'invecchiamento sulle capacità di contrazione del fascetto muscolare.

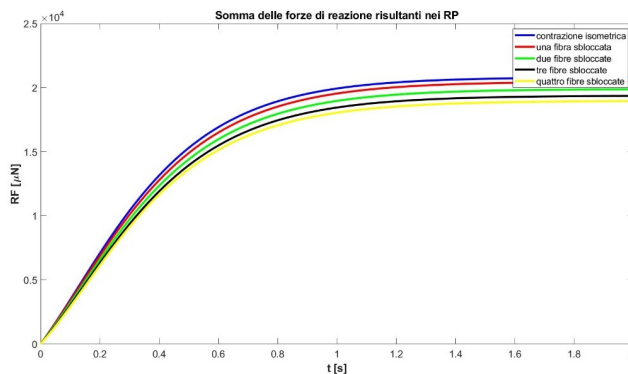


Figura 3.17: Diagramma della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point

Numero fibre tagliate	Riduzione area trasversale	Riduzione forza
1	14.3%	1.64%
2	28.6%	4.44%
3	42.9%	6.93%
4	57.2%	8.86%

Tabella 3.2: Confronto tra le riduzioni percentuali dell'area trasversale e della somma delle forze di reazione vincolare (riduzioni rispetto alla condizione di isometria) per il protocollo di Huijing nel caso anziani

3.3 Protocollo di Huijing confronto tra i casi "giovani" e "anziani"

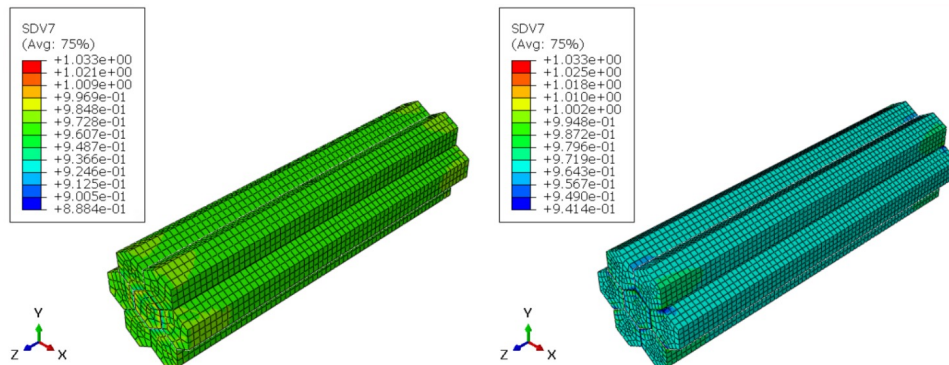


Figura 3.18: Mappe di colore della forza-lunghezza per la contrazione isometrica. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

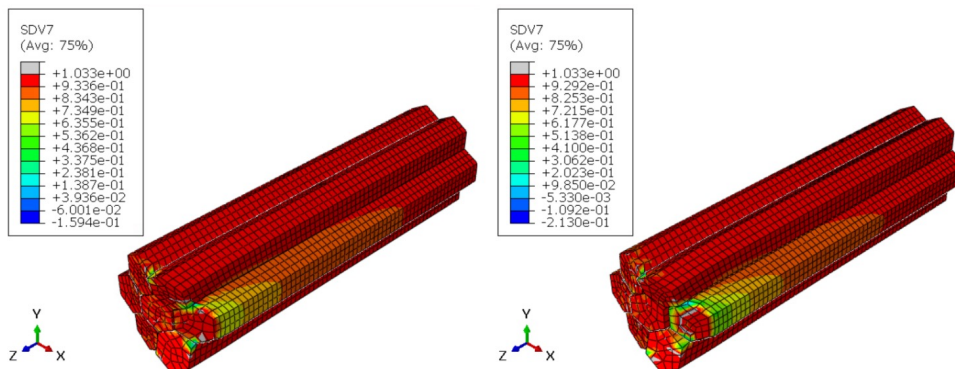


Figura 3.19: Mappe di colore della forza-lunghezza con una fibra sbloccata. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

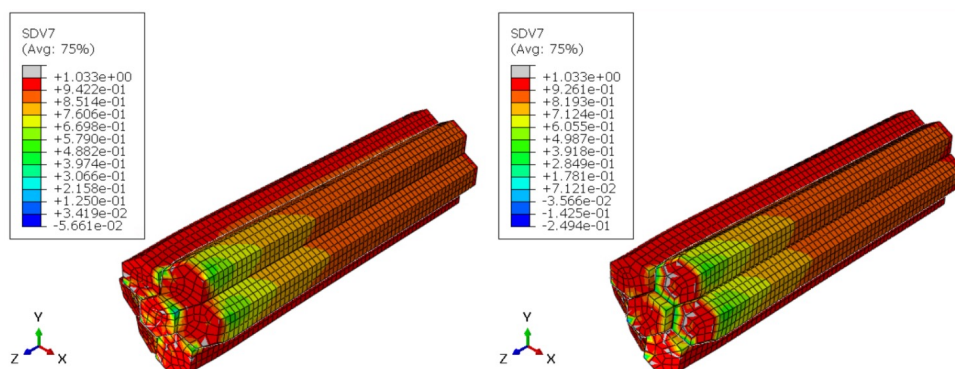


Figura 3.20: Mappe di colore della forza-lunghezza con due fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

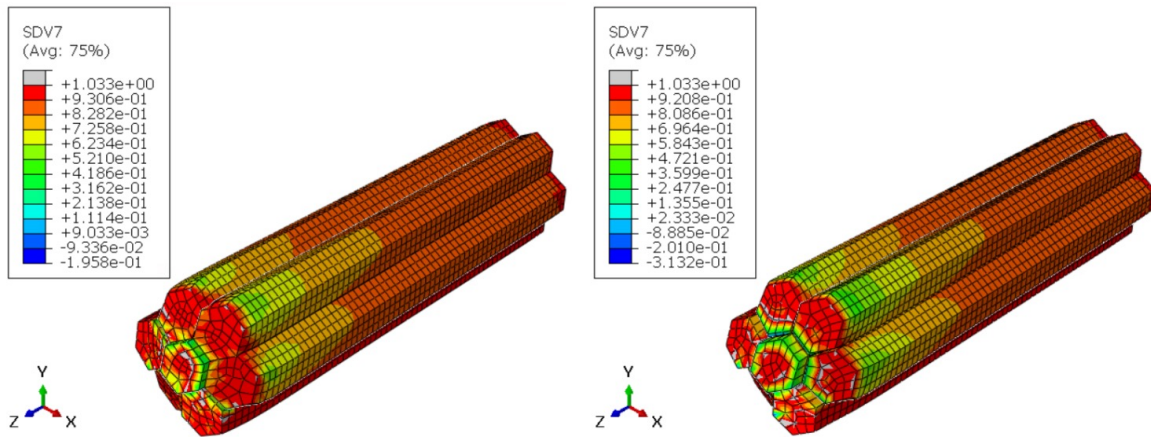


Figura 3.21: Mappe di colore della forza-lunghezza con tre fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

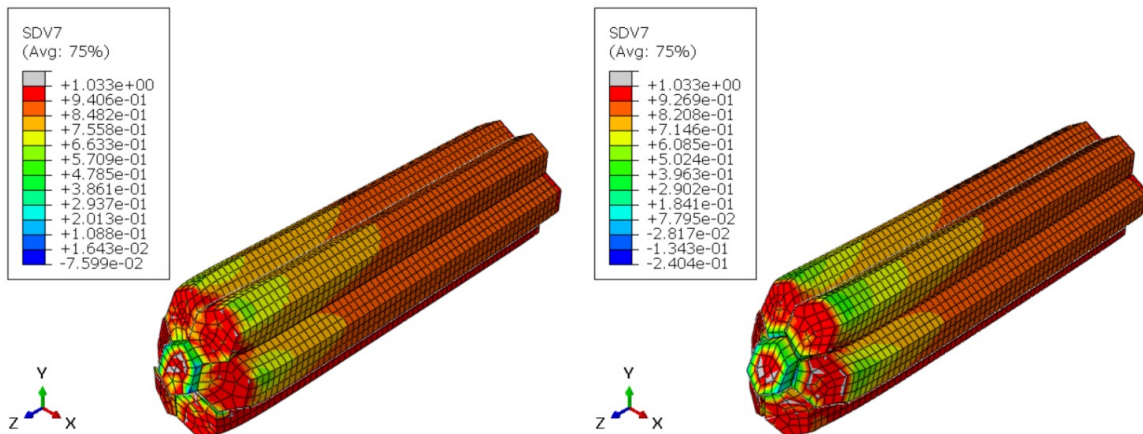


Figura 3.22: Mappe di colore della forza-lunghezza con quattro fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

Si osserva in ognuna delle figure presentate che in ampie regioni i valori della forza-lunghezza sono più bassi nel caso anziani rispetto a quelli che si riscontrano nel caso giovani. Per ultima cosa, si riportano i diagrammi della somma delle forze di reazione vincolare (Figura 3.23) e la Tabella 3.3 descrittiva della riduzione percentuale di tali forze quando si passa dal modello del fascetto dei giovani al modello con spessore della ECM maggiore del fascetto degli anziani. Questo ci permette di concludere il confronto dei due casi per il protocollo di Huijing. Per quanto riguarda il diagramma, si osserva in tutti i casi che la curva riferita al caso giovani si trova sopra, anche se di poco, alla curva relativa al caso anziani. Tale risultato è rappresentato quantitativamente nella tabella.

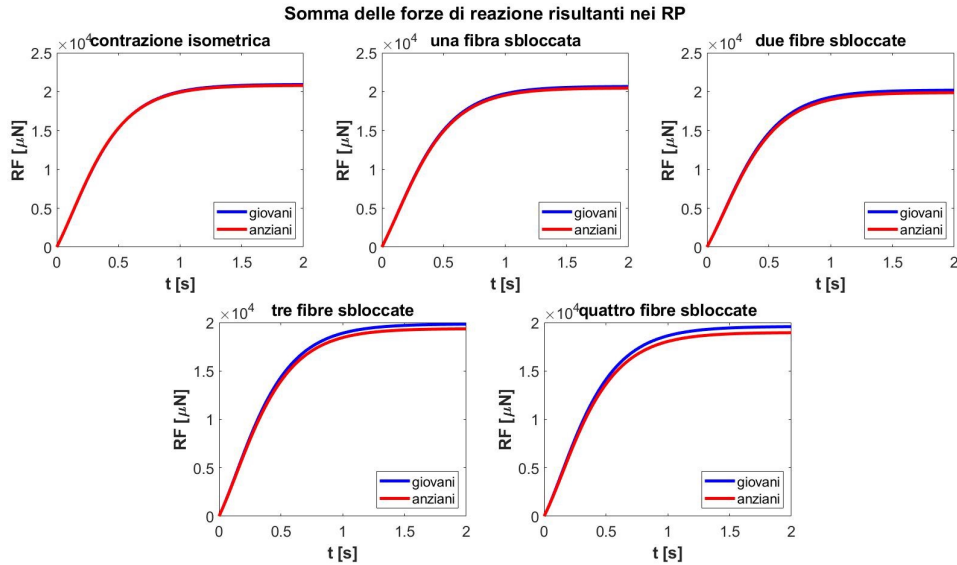


Figura 3.23: Diagrammi della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point

Numero fibre tagliate	Riduzione della forza dal caso giovani al caso anziani (Huijing)
0 (isometria)	0.61%
1	1.03%
2	1.60%
3	2.42%
4	3.21%

Tabella 3.3: Confronto tra le riduzioni percentuali della somma delle forze di reazione vincolare per il protocollo di Huijing tra il caso giovani ed il caso anziani

3.4 Protocollo di Ramaswamy confronto tra i casi "giovani" e "anziani"

Per come è stato strutturato il protocollo di Ramaswamy ha senso andare a confrontare direttamente i due casi giovani e anziani senza discutere di un caso alla volta. Nel protocollo di Huijing viene affrontato lo studio del muscolo estensore lungo delle dita dei ratti senza fare confronti tra popolazioni di ratti giovani ed anziani, ma viene effettuato un confronto tra i diversi studi in vivo a fronte delle tenotomie effettuate. Per quanto riguarda il protocollo di Ramaswamy, invece, vengono studiate due popolazioni differenti di ratti, una giovane ed una composta da ratti anziani e vengono quindi confrontati i risultati ottenuti nei due casi. Come già fatto per il protocollo precedente, si riporta prima di tutto una mappa di colore degli spostamenti in modo da visualizzare come si

comporta il fascetto in presenza del giogo inserito sulla sezione di mezzeria del fascetto stesso (Figura 3.24). Si visualizzano poi la funzione forza-lunghezza (Figura 3.25) e i diagrammi della somma delle forze di reazione vincolare (Figura 3.26) per capire come differisce la trasmissione laterale della forza tra un caso e l'altro.

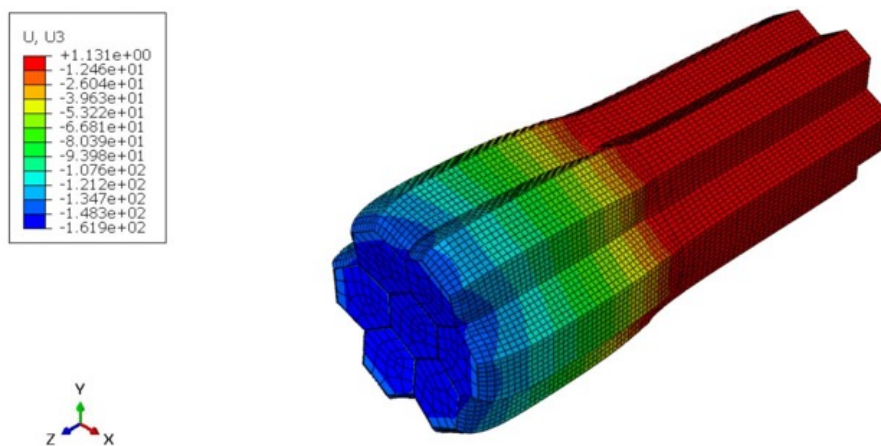


Figura 3.24: Mappa di colore degli spostamenti per il fascetto del caso giovani con giogo nella sezione di mezzeria

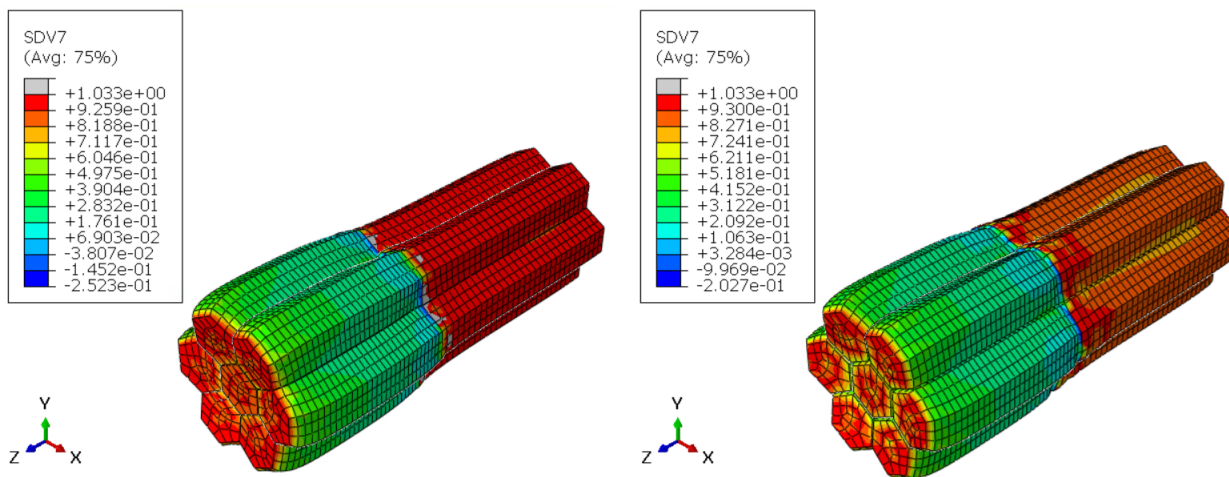


Figura 3.25: Mappe di colore della forza-lunghezza per il fascetto con giogo nella sezione di mezzeria. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani

Anche per quanto riguarda questo protocollo si osserva che c'è una riduzione della forza prodotta visibile dalle mappe di colore della forza-lunghezza in quanto le colorazioni nell'immagine di destra, riferita al caso anziani, sono relative a valori più bassi di quelli che si presentano nel caso giovani. Osservando poi il diagramma della somma delle forze di reazione vincolare si nota una netta differenza tra i due casi analizzati; tra i due casi si ha una riduzione di tale forza pari al 15.7%.

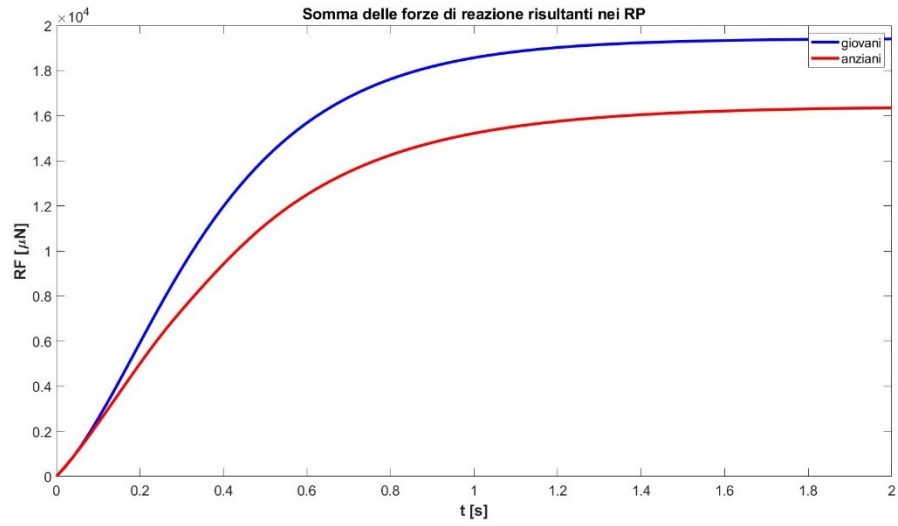


Figura 3.26: Diagramma della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point

3.5 Discussione e conclusioni

L'esperimento condotto da Street [23] ha dimostrato per la prima volta che, quando una fibra ottenuta a partire dal muscolo di una rana veniva attivata massimamente, la forza era trasmessa lateralmente attraverso le fibre adiacenti fino all'epimisio con un decremento minimo o nullo. I muscoli scheletrici delle rane hanno una struttura molto più semplice rispetto a quella dei muscoli scheletrici dei mammiferi (Patel & Lieber [24]; Huijing [25]), ma i costameri (gli elementi del reticolo trasversale in grado di trasmettere lateralmente la forza) erano già state studiate nei conigli (Pardo et al. [26]). In questo lavoro si è dimostrato, tramite analisi computazionali agli elementi finiti effettuate su fascetti muscolari di giovani e anziani, l'impatto che il rimodellamento della ECM dei muscoli scheletrici dovuto all'invecchiamento ha sulla trasmissione laterale della forza generata durante il processo di contrazione negli umani. I risultati precedentemente presentati indicano che l'ispessimento della ECM dovuto all'invecchiamento causa globalmente una minore capacità di produzione e trasmissione della forza durante la contrazione. Nelle Figure dalla 3.18 alla 3.23 e nelle Figure 3.25 e 3.26, sono rappresentate prima la funzione forza-lunghezza calcolata dal software di analisi sulla superficie esterna delle fibre muscolari e poi la somma delle forze di reazione calcolate nei Reference Point creati durante la definizione del modello CAE. Nelle mappe di colore che evidenziano la funzione forza-lunghezza si osserva che la distribuzione dei valori calcolati genera, nel caso del fascetto muscolare degli anziani, aree più vaste (rispetto a quelle osservate sul fascetto dei giovani) caratterizzate da un modulo inferiore della variabile di stato. Questi risultati vanno a riflettere una situazione di minore capacità di generare forza durante la contrazione da parte del fascetto degli anziani rispetto a ciò che si registra per il fascetto muscolare dei giovani. Gli effetti che si osservano sono imputabili in questo caso alla sola differenza nello spessore della ECM, in quanto è l'unico fattore di cui si tiene conto che distingue i due fascetti utilizzati nelle simulazioni. Andando ad osservare i diagrammi che rappresentano la somma delle forze di reazione vincolare e considerando i dati quantitativi riportati nelle tabelle, si nota che nel fascetto degli anziani si registra una minore trasmissione della forza di contrazione muscolare. In tutti i diagrammi presentati, sia per il protocollo di Huijing, sia per il protocollo di Ramaswamy, la curva rappresentativa della situazione riscontrata per il fascetto degli anziani si trova al di sotto della curva relativa al fascetto dei giovani. Le analisi condotte permettono quindi di stabilire che il rimodellamento della ECM dovuto all'invecchiamento rappresenta un fattore di primaria importanza nella riduzione della capacità dei muscoli scheletrici di produrre e trasmettere la forza di contrazione.

Tale studio si è basato su alcune assunzioni che ne limitano l'efficacia. Prima di tutto,

si è scelto di assegnare alle strutture rappresentative della ECM per i due casi giovani e anziani, una modellazione caratterizzata dagli stessi parametri costitutivi; ciò è stato fatto perchè le informazioni raccolte non sono sufficienti a distinguere in modo chiaro le differenze nei moduli elastici delle due matrici. L'analisi di questo lavoro si è focalizzata su un solo fattore discriminante per le due ECM, ovvero il loro spessore.

Studi futuri possono focalizzarsi sull'estensione di tali modelli ad un livello di scala maggiore, ad esempio all'intero muscolo. Un'ulteriore possibilità consiste nel valutare in modo sperimentale il modulo elastico longitudinale delle ECM dei giovani e degli anziani e di effettuare una successiva analisi utilizzando il modello di fascetto.

Elenco delle figure

1.1	Apparato muscolo-scheletrico [1]	9
1.2	Tipologie di tessuto muscolare. a) tessuto muscolo-scheletrico; b) tessuto muscolare liscio; c) tessuto muscolare cardiaco [2].	10
1.3	Organizzazione dei miofilamenti contrattili nei muscoli lisci [3]	11
1.4	Tessuto muscolare del miocardio [4]	12
1.5	Struttura dei sarcomeri [6]	13
1.6	ECM dei muscoli scheletrici [9]	15
1.7	Effetto dell'invecchiamento sulla ECM [10]	15
1.8	Meccanismo di contrazione [12, 13]	16
1.9	Diagramma delle componenti proteiche coinvolte nelle due tipologie di trasmissione [14]	18
2.1	Geometria scelta per rappresentare la singola fibra muscolare	22
2.2	Rappresentazione dei vincoli e carichi applicati per ogni contrazione. A sinistra isometrica, al centro concentrica e a destra eccentrica.	23
2.3	Visualizzazione della mesh creata	23
2.4	Rappresentazione del modello a tre elementi di Hill [16]	24
2.5	Funzione di attivazione	25
2.6	Funzione forza-lunghezza	26
2.7	Funzione forza-velocità	27
2.8	Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione isometrica	28
2.9	Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione isometrica	29
2.10	Funzione forza-lunghezza per la contrazione isometrica	29
2.11	Funzione forza-velocità per la contrazione isometrica	30
2.12	Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione concentrica	30
2.13	Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione concentrica	31
2.14	Funzione forza-lunghezza per la contrazione concentrica	31
2.15	Funzione forza-velocità per la contrazione concentrica	32
2.16	Modulo degli spostamenti (in μm) della fibra in contrazione eccentrica	32

2.17	Grafici di tensione e dilatazione relativi alla fibra in contrazione eccentrica	33
2.18	Funzione forza-lunghezza per la contrazione eccentrica	33
2.19	Funzione forza-velocità per la contrazione eccentrica	34
2.20	Geometria della singola fibra muscolare	36
2.21	Geometria della ECM del fascetto nel caso giovani	36
2.22	Geometria della ECM del fascetto nel caso anziani	36
2.23	Visualizzazione della mesh creata per le fibre	38
2.24	Visualizzazione della mesh creata per la matrice del caso anziani	39
3.1	Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di contrazione isometrica per il fascetto del caso giovani	44
3.2	Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di una fibra sbloccata. La fibra sbloccata è visibile perché caratterizzata da un accorciamento in direzione longitudinale, in blu nell'immagine	45
3.3	Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di due fibre sbloccate. Le fibre sbloccate sono visibili per quanto spiegato nella figura precedente	45
3.4	Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di tre fibre sbloccate	45
3.5	Mappa di colore degli spostamenti (valori in μm) nel caso di quattro fibre sbloccate	46
3.6	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso della contrazione isometrica	46
3.7	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di una fibra sbloccata . . .	47
3.8	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di due fibre sbloccate . . .	47
3.9	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di tre fibre sbloccate . . .	47
3.10	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di quattro fibre sbloccate .	48
3.11	Diagramma della somma delle forze di reazioni risultanti calcolate nei Reference Point	48
3.12	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso della contrazione isometrica	50
3.13	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di una fibra sbloccata . . .	50
3.14	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di due fibre sbloccate . . .	50
3.15	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di tre fibre sbloccate . . .	50
3.16	Mappa di colore della forza-lunghezza nel caso di quattro fibre sbloccate .	51
3.17	Diagramma della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point	51
3.18	Mappe di colore della forza-lunghezza per la contrazione isometrica. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	52
3.19	Mappe di colore della forza-lunghezza con una fibra sbloccata. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	52

3.20	Mappe di colore della forza-lunghezza con due fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	52
3.21	Mappe di colore della forza-lunghezza con tre fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	53
3.22	Mappe di colore della forza-lunghezza con quattro fibre sbloccate. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	53
3.23	Diagrammi della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point	54
3.24	Mappa di colore degli spostamenti per il fascetto del caso giovani con giogo nella sezione di mezzeria	55
3.25	Mappe di colore della forza-lunghezza per il fascetto con giogo nella sezione di mezzeria. A sinistra il caso giovani, a destra il caso anziani	55
3.26	Diagramma della somma delle forze di reazione vincolare risultanti calcolate nei Reference Point	56

Elenco delle tabelle

3.1	Confronto tra le riduzioni percentuali dell'area trasversale e della somma delle forze di reazione vincolare (riduzioni rispetto alla condizione di isometria) per il protocollo di Huijing nel caso giovani	49
3.2	Confronto tra le riduzioni percentuali dell'area trasversale e della somma delle forze di reazione vincolare (riduzioni rispetto alla condizione di isometria) per il protocollo di Huijing nel caso anziani	51
3.3	Confronto tra le riduzioni percentuali della somma delle forze di reazione vincolare per il protocollo di Huijing tra il caso giovani ed il caso anziani	54

Bibliografia e sitografia

- [1] Gordana Sendić MD. *Musculoskeletal system*. 2023. URL: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-musculoskeletal-system>.
- [2] Raghavan G. *Muscle tissue*. URL: https://www.brainkart.com/article/Muscle-Tissue_33169.
- [3] Jeremy Laforet. “The lower urinary tract : modeling and experimental validation. Study of its selective activation.” In: (dic. 2009).
- [4] Alexander Martynenko, Volodymyr Zozulya e V Karazin. “Mathematical modeling of the cardiac tissue Mathematical modeling of the cardiac tissue”. In: *Mechanics of Advanced Materials and Structures* 28 (giu. 2021), pp. 1–17. DOI: 10.1080/15376494.2021.1931992.
- [5] Declan Tempany BSc (Hons). *Muscles and muscle tissue*. 2023. URL: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/muscles>.
- [6] URL: <https://www.biorender.com/template/sarcomere-structure>.
- [7] Kavitha Mukund e Shankar Subramaniam. “Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease”. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 12 (2019). URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:199548668>.
- [8] Robert Csapo, Matthias Gumpenberger e Barbara Wessner. “Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review”. In: *Frontiers in Physiology* 11 (2020). URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:212748272>.
- [9] Matej G. *Skeletal muscle diagram*. URL: <https://healthiack.com/encyclopedia/skeletal-muscle-diagram>.
- [10] Caterina Fede et al. “The Effects of Aging on the Intramuscular Connective Tissue”. In: *International Journal of Molecular Sciences* 23 (set. 2022), p. 11061. DOI: 10.3390/ijms231911061.

- [11] MSc Julie Doll BSc. *Skeletal muscle histology*. 2023. URL: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/histology-of-skeletal-muscle>.
- [12] Carl Gillett. “Using Compositional Explanations to Understand Compositional Levels: An Integrative Account”. In: (mar. 2020).
- [13] John O’Neal. *Muscles motility and energy*. URL: <https://natural-universe.net/the-scientific-view-of-the-universe/the-geological-present/what-anatomy-and-physiology-tell-us-energy/muscles-motility-and-energy/>.
- [14] David C. Hughes, Marita A Wallace e Keith Baar. “Effects of aging, exercise, and disease on force transfer in skeletal muscle.” In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 309 1 (2015), E1–E10. URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:2586600>.
- [15] Serdar Göktepe, Andreas Menzel e Ellen Kuhl. “The Generalized Hill Model: A Kinematic Approach Towards Active Muscle Contraction”. In: *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 72 (nov. 2014), pp. 20–39. DOI: 10.1016/j.jmps.2014.07.015.
- [16] Nicholas Battista, Christopher Strickland e Laura Miller. “IB2d: A Python and MATLAB implementation of the immersed boundary method”. In: *Bioinspiration Biomimetics* 12 (ott. 2016). DOI: 10.1088/1748-3190/aa5e08.
- [17] Peter A. Huijting, Guus C. Baan e Guido T. Rebel. “Non-Myotendinous Force Transmission in Rat Extensor Digitorum Longus Muscle”. In: *Journal of Experimental Biology* 201.5 (mar. 1998), pp. 683–691. ISSN: 0022-0949. DOI: 10.1242/jeb.201.5.683. eprint: https://journals.biologists.com/jeb/article-pdf/201/5/683/2571902/jexbio_201_5_683.pdf. URL: <https://doi.org/10.1242/jeb.201.5.683>.
- [18] Krishnan Ramaswamy et al. “Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats”. In: *The Journal of physiology* 589 (feb. 2011), pp. 1195–208. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.201921.
- [19] Gretchen Meyer e Richard Lieber. “Elucidation of Extracellular Matrix Mechanics from Muscle Fibers and Fiber Bundles”. In: *Journal of biomechanics* 44 (feb. 2011), pp. 771–3. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.044.
- [20] Allison Gillies e Richard Lieber. “Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix”. In: *Muscle nerve* 44 (set. 2011), pp. 318–31. DOI: 10.1002/mus.22094.

- [21] Ryan N. Konno, Nilima Nigam e James M. Wakeling. “Modelling extracellular matrix and cellular contributions to whole muscle mechanics”. In: *PLOS ONE* 16.4 (apr. 2021), pp. 1–20. DOI: 10.1371/journal.pone.0249601. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249601>.
- [22] Piero Pavan et al. “Alterations of Extracellular Matrix Mechanical Properties Contribute to Age-Related Functional Impairment of Human Skeletal Muscles”. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21.11 (2020). ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21113992. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/3992>.
- [23] Sibyl F. Street. “Lateral transmission of tension in frog myofibers: A myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters”. In: *Journal of Cellular Physiology* 114.3 (1983), pp. 346–364. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.1041140314>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcp.1041140314>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.1041140314>.
- [24] TJ Patel e RL Lieber. “Force transmission in skeletal muscle: from actomyosin to external tendons”. In: *Exercise and sport sciences reviews* 25 (1997), pp. 321–363. ISSN: 0091-6331. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/9213097>.
- [25] Peter A Huijing. “Muscular force transmission necessitates a multilevel integrative approach to the analysis of function of skeletal muscle”. In: *Exercise and sport sciences reviews* 31.4 (ott. 2003), pp. 167–175. ISSN: 0091-6331. DOI: 10.1097/00003677-200310000-00003. URL: <https://doi.org/10.1097/00003677-200310000-00003>.
- [26] JV Pardo, JD Siliciano e SW Craig. “A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80.4 (feb. 1983), pp. 1008–1012. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.80.4.1008. URL: <https://europepmc.org/articles/PMC393517>.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto la mia famiglia per il silenzioso sostegno che mi fornite e per il bene che mi volete.

Ringrazio poi Maria per aver realizzato alcuni dei manicaretti più buoni che io abbia mai assaggiato e per avermi segretamente ed inconsapevolmente incentivato e motivato a studiare, in modo da poter continuare a mangiare le sue prelibatezze.

Un grazie sincero a Maria per essere stata un'amica costante e per avermi accompagnato nel chiederci se fossimo strani noi a pensarla sempre diversamente dagli altri. Un grazie anche per la disponibilità che mi hai sempre dimostrato e per gli aiuti che mi hai dato.

Ringrazio Alessia, Angelica, Diego, Gabriele e Manuel per essere le amicizie di vecchia data con cui trovarsi per una chiacchierata in compagnia. Grazie che siete rimasti negli anni.

Concludo con il ringraziamento più grande e sentito a te, Gaia, faro che illumina la mia strada anche nel buio più totale. Sei fonte di ispirazione ed io ti ammiro. Grazie per mostrarmi come e quanto io possa crescere ancora come persona e grazie per essere la compagna con cui condividere tutti i momenti. Posso solo che sentirmi fortunato ad averti conosciuta perchè il tuo impatto nella mia vita è enorme. Ti devo veramente tanto e, per questa stessa ragione, le parole non basteranno mai per dirti grazie a dovere.