

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA
TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**IL CUORE BIOINGEGNERIZZATO:
VALUTAZIONE DI DIFFERENTI METODI DI
DECELLARIZZAZIONE TOTALE D'ORGANO DAL
PUNTO DI VISTA BIOLOGICO E BIOMECCANICO**

Relatore: **Prof. Andrea Bagno**

Correlatori: **Prof. Gino Gerosa**
Dott. Laura Iop

Laureanda: **Eleonora Dal Sasso**

20 Aprile 2015
Anno Accademico 2014-2015

*Ai quei cuori che mi hanno amata,
accompagnata ed accudita.*

Sommario

Il trattamento definitivo dell'insufficienza cardiaca terminale è costituito dal trapianto ortotopico di cuore. L'utilizzo di questa tecnica è fortemente limitato dalla carenza di donatori ideali e dalle problematiche di rigetto cronico che possono verificarsi nonostante l'assunzione di terapia immunosoppressiva. Al fine di risolvere queste problematiche, le nuove tecniche di ingegneria tissutale e di medicina rigenerativa propongono la generazione di organi totali bioingegnerizzati, ottenuti da matrici extracellulari cardiache decellularizzate e ripopolate con cellule autologhe. Nel presente lavoro, è stata applicata la tecnica della decellularizzazione totale d'organo per perfusione retrograda e, sulla matrice risultante, sono state eseguite analisi per la caratterizzazione biologica e biomeccanica. I risultati hanno messo in evidenza che è stato possibile ottenere, mediante due dei tre protocolli adottati, scaffold matriciali efficacemente decellularizzati e dotati di geometria tridimensionale e vascolarizzazione intatti.

Indice

| | |
|---|----------|
| Introduzione | XXI |
| I Revisione della letteratura | 1 |
| 1 Anatomia macroscopica | 3 |
| 1.1 L'apparato circolatorio sanguigno | 3 |
| 1.1.1 Funzioni dell'apparato circolatorio sanguigno | 4 |
| 1.1.2 Le circolazioni sistemica e polmonare | 5 |
| 1.2 Il cuore | 7 |
| 1.2.1 Caratteristiche generali | 8 |
| 1.2.1.1 Dimensioni e peso | 8 |
| 1.2.1.2 Posizione ed orientamento | 8 |
| 1.2.1.3 Struttura | 9 |
| 1.2.2 Anatomia di superficie | 9 |
| 1.2.2.1 La faccia sterno-costale | 9 |
| 1.2.2.2 La faccia diaframmatica | 13 |
| 1.2.2.3 Il margine acuto | 14 |
| 1.2.2.4 Il margine ottuso | 14 |
| 1.2.2.5 La base | 14 |
| 1.2.2.6 L'apice | 16 |
| 1.2.3 Anatomia della sezione | 16 |
| 1.2.3.1 Le cavità atriali | 17 |
| 1.2.3.2 Le cavità ventricolari | 20 |
| 1.3 I vasi del cuore | 29 |
| 1.3.1 Le arterie coronarie | 29 |
| 1.3.2 Le vene | 33 |
| 1.4 Il pericardio | 35 |
| 1.4.1 Il pericardio fibroso | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.4.2 | Il pericardio sieroso | 36 |
| 2 | Anatomia microscopica | 39 |
| 2.1 | La struttura della parete cardiaca | 39 |
| 2.1.1 | La tonaca esterna o epicardio | 39 |
| 2.1.2 | La tonaca media o miocardio | 41 |
| 2.1.2.1 | Lo scheletro fibroso | 41 |
| 2.1.2.2 | La muscolatura cardiaca | 43 |
| 2.1.3 | La tonaca interna o endocardio | 48 |
| 2.2 | Il tessuto muscolare cardiaco | 48 |
| 2.2.1 | Similitudini e differenze tra muscolatura cardiaca e scheletrica | 48 |
| 2.2.2 | Il muscolo cardiaco | 50 |
| 2.2.3 | I cardiomiociti o cardiociti | 51 |
| 2.3 | Il tessuto connettivo cardiaco | 52 |
| 2.3.1 | La ECM | 53 |
| 2.3.1.1 | Funzioni principali | 54 |
| 2.3.1.2 | La componente fibrosa | 54 |
| 2.3.1.3 | La componente amorfa | 57 |
| 2.3.1.4 | La membrana basale nel tessuto cardiaco . . | 60 |
| 2.3.2 | Le cellule del tessuto connettivo | 60 |
| 3 | La decellularizzazione | 63 |
| 3.1 | Metodiche di decellularizzazione | 63 |
| 3.1.1 | I metodi fisici | 64 |
| 3.1.2 | I metodi chimici | 66 |
| 3.1.3 | I metodi biologici | 67 |
| 3.1.4 | Modalità di applicazione dei detergenti | 68 |
| 3.1.4.1 | Perfusione di organi totali | 68 |
| 3.1.4.2 | Altre modalità | 69 |
| 3.2 | Il danneggiamento della ECM | 69 |
| 3.3 | Variabilità dell'efficacia del processo | 69 |
| 3.4 | Verifica della rimozione cellulare | 70 |
| 3.5 | I residui dei detergenti | 70 |
| 3.6 | La decellularizzazione totale del cuore: lo stato dell'arte . . . | 70 |
| 3.6.1 | La decellularizzazione del cuore di ratto | 71 |
| 3.6.2 | La decellularizzazione del cuore di maiale | 73 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4 | La meccanica dei tessuti biologici | 79 |
| 4.1 | Considerazioni preliminari | 79 |
| 4.1.1 | La deformazione | 80 |
| 4.1.2 | La tensione | 81 |
| 4.1.3 | Il modulo elastico o modulo di Young | 81 |
| 4.2 | Aspetti fondamentali del comportamento dei tessuti biologici molli | 82 |
| 4.2.1 | Non linearità | 82 |
| 4.2.2 | Simmetria anisotropa | 82 |
| 4.2.3 | Viscoelasticità | 83 |
| 4.2.4 | Pseudoelasticità | 85 |
| 4.2.5 | Il comportamento tenso-deformativo | 85 |
| 4.3 | Prove sperimentali di trazione | 86 |
| 4.3.1 | Trazione monoassiale | 87 |
| 4.3.2 | Trazione biassiale planare | 87 |
| 4.3.3 | Ancoraggio del campione | 87 |
| 4.4 | La parete ventricolare cardiaca ed il tessuto miocardico | 89 |
| 4.4.1 | Le caratteristiche generali | 89 |
| 4.4.2 | Funzione meccanica delle diverse componenti | 91 |
| 4.4.2.1 | Il collagene | 91 |
| 4.4.2.2 | L'elastina | 92 |
| 4.5 | Le prove meccaniche sul tessuto cardiaco: stato dell'arte | 93 |
| 4.5.1 | Prove sul tessuto cardiaco di ratto | 93 |
| 4.5.2 | Prove sul tessuto cardiaco di maiale | 95 |
| II | Sperimentazione | 99 |
| 5 | Materiali e metodi | 101 |
| 5.1 | Preparazione degli organi cardiaci decellularizzati | 101 |
| 5.1.1 | Preparazione e sacrificio degli animali sperimentali | 101 |
| 5.1.2 | Espianto dell'organo ed incannulazione dell'aorta | 102 |
| 5.1.3 | L'apparato di perfusione | 103 |
| 5.1.4 | I protocolli di decellularizzazione | 106 |
| 5.2 | Pesatura dei campioni | 111 |
| 5.3 | Analisi istologiche e tecniche immunologiche | 111 |
| 5.3.1 | Fissazione del tessuto ed inclusione | 111 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.3.1.1 | Protocollo di fissazione | 112 |
| 5.3.1.2 | Protocollo di inclusione | 113 |
| 5.3.2 | Sezionamento | 114 |
| 5.3.3 | Colorazioni istologiche | 114 |
| 5.3.3.1 | Ematossilina ed Eosina | 115 |
| 5.3.3.2 | Tricromica di Masson | 115 |
| 5.3.4 | Immunofluorescenza indiretta | 115 |
| 5.3.4.1 | Protocollo per l'immunofluorescenza indiretta | 116 |
| 5.3.5 | Acquisizione ed elaborazione delle immagini | 117 |
| 5.4 | Le prove meccaniche | 117 |
| 5.4.1 | Il sistema Bose ElectroForce | 117 |
| 5.4.2 | Il software WinTest® | 119 |
| 5.4.3 | Configurazione del sistema | 119 |
| 5.4.4 | Preparazione dei campioni | 121 |
| 5.4.5 | Protocollo di test | 122 |
| 5.4.6 | Elaborazione dei dati | 123 |
| 5.4.6.1 | Pre-elaborazioni | 123 |
| 5.4.6.2 | Filtraggio | 123 |
| 5.4.6.3 | Normalizzazioni | 126 |
| 5.4.6.4 | Determinazione dei massimi | 130 |
| 5.4.6.5 | Determinazione della pendenza | 130 |
| 6 | Risultati | 133 |
| 6.1 | Il cuore nativo | 133 |
| 6.1.1 | Analisi macroscopiche | 133 |
| 6.1.2 | Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche | 133 |
| 6.2 | Prove biomeccaniche | 135 |
| 6.3 | Il cuore decellularizzato con protocollo SDS 1% | 137 |
| 6.3.1 | Analisi macroscopiche | 137 |
| 6.3.2 | Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche | 138 |
| 6.4 | Prove biomeccaniche | 141 |
| 6.5 | Il cuore decellularizzato con protocollo TriCol | 142 |
| 6.5.1 | Analisi macroscopiche | 142 |
| 6.5.2 | Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche | 143 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6.6 | Prove biomeccaniche | 144 |
| 6.7 | Protocollo con SDS 0.5% | 147 |
| 6.7.1 | Analisi macroscopiche | 147 |
| 6.7.2 | Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche | 148 |
| 6.8 | Prove biomeccaniche | 149 |
| 7 | Discussione | 153 |
| 7.1 | Analisi macroscopica | 153 |
| 7.2 | Analisi microscopica | 155 |
| 7.2.1 | La ECM | 155 |
| 7.2.2 | Le componenti cellulari | 155 |
| 7.3 | Prove meccaniche | 156 |
| 7.3.1 | Le curve tenso-deformative | 156 |
| 7.3.2 | Stima delle proprietà di anisotropia | 157 |
| 7.3.3 | Analisi delle pendenze delle curve di carico | 159 |
| 7.3.4 | Analisi dei massimi delle curve di carico | 160 |
| 8 | Conclusioni | 163 |
| A | Pannelli | 165 |
| A.1 | Protocollo con SDS 1% | 165 |
| A.2 | Protocollo TriCol | 170 |
| A.3 | Protocollo con SDS 0.5% | 172 |
| | Bibliografia | 175 |
| | Elenco degli acronimi | 185 |

Elenco delle figure

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Il sistema circolatorio. | 4 |
| 1.2 | Schema generale delle circolazioni sistemica e polmonare. . . | 5 |
| 1.3 | Il sistema circolatorio sanguigno. | 6 |
| 1.4 | Rappresentazione schematica della configurazione interna del cuore. | 7 |
| 1.5 | Visione anteriore del cuore <i>in situ</i> | 10 |
| 1.6 | Area cardiaca | 11 |
| 1.7 | La faccia sternocostale del cuore | 12 |
| 1.8 | La faccia diaframmatica del cuore | 13 |
| 1.9 | La base del cuore | 15 |
| 1.10 | L'atrio destro aperto: vista laterale destra | 18 |
| 1.11 | L'atrio sinistro aperto: vista posterolaterale | 19 |
| 1.12 | Sezione trasversale delle camere ventricolari | 20 |
| 1.13 | Valvola atrioventricolare destra: la valvola tricuspide | 21 |
| 1.14 | Valvola atrioventricolare sinistra: la valvola bicuspidale o valvola mitrale | 22 |
| 1.15 | Valvola arteriosa sinistra: la valvola aortica | 22 |
| 1.16 | Piano valvolare durante le sistole ventricolari | 24 |
| 1.17 | Piano valvolare durante le diastole ventricolari | 24 |
| 1.18 | Il ventricolo destro aperto: vista anteriore | 25 |
| 1.19 | Il ventricolo sinistro aperto: vista posterolaterale | 27 |
| 1.20 | Le arterie coronarie e le vene cardiache. | 30 |
| 1.21 | Distribuzione delle arterie coronarie destra e sinistra. | 31 |
| 1.22 | L'arteria coronaria destra: vista anteriore destra e sinistra. . | 32 |
| 1.23 | L'arteria coronaria sinistra: vista anteriore destra e sinistra. | 34 |
| 1.24 | Le vene cardiache. | 35 |
| 1.25 | Sacco pericardico | 36 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Struttura della parete cardiaca | 40 |
| 2.2 | Lo scheletro fibroso | 42 |
| 2.3 | Muscolatura cardiaca: visione anteriore e posteriore | 44 |
| 2.4 | Muscolatura cardiaca: base e apice | 45 |
| 2.5 | Organizzazione dei fasci muscolari ventricolari | 46 |
| 2.6 | I differenti tipi di tessuto muscolare | 49 |
| 2.7 | Sezioni trasversali e longitudinali del tessuto muscolare cardiaco | 50 |
| 2.8 | Visione tridimensionale della muscolatura cardiaca | 51 |
| 2.9 | Il cardiomiocita | 52 |
| 2.10 | Il tessuto connettivo propriamente detto: denso e lasso | 53 |
| 2.11 | Il collagene | 55 |
| 2.12 | Confronto tra le fibre reticolari ed il collagene | 56 |
| 2.13 | L'elastina | 58 |
| 2.14 | GAG e proteoglicani | 59 |
| 2.15 | La fibronectina e la laminina | 60 |
| 2.16 | Le cellule principali del tessuto connettivo propriamente detto | 61 |
| | | |
| 3.1 | Tabella riassuntiva delle differenti metodiche di decellulariz- zazione | 65 |
| 3.2 | Risultati macroscopici dei tre protocolli proposti da Ott et al. [1] | 72 |
| 3.3 | Risultati macroscopici dei protocolli proposti da Akhyari et al. [2] | 72 |
| 3.4 | Risultati macroscopici del protocollo proposto da Aubin et al. [3] | 73 |
| 3.5 | Risultati macroscopici del protocollo proposto da Wainwright et al. [4] | 74 |
| 3.6 | Risultati macroscopici del protocollo proposto da Weymann et al. [5] | 75 |
| 3.7 | Risultati macroscopici del protocollo proposto da Remlinger et al. [6] | 75 |
| 3.8 | Risultati macroscopici dei protocolli proposto da Merna et al. [7] | 76 |
| | | |
| 4.1 | La deformazione di un corpo | 80 |
| 4.2 | La teoria della tensione | 81 |
| 4.3 | I modelli teologici per la viscoelasticità | 83 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.4 | Il fenomeno di creep | 84 |
| 4.5 | Il fenomeno di rilassamento delle tensioni | 84 |
| 4.6 | Curva tenso-deformativa a trazione caratteristica dei tessuti molli | 86 |
| 4.7 | Schema di una prova a trazione biassiale | 88 |
| 4.8 | Differenti metodi di ancoraggio del campione in una prova biassiale | 88 |
| 4.9 | Organizzazione gerarchica in lamine del miocardio sinistro | 90 |
| 4.10 | Caratteristiche tenso-deformative delle fibre di collagene | 92 |
| 4.11 | Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Ott et al. [1] | 93 |
| 4.12 | Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Witzenburg et al. [8] | 94 |
| 4.13 | Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Wainwright et al. [4] | 95 |
| 4.14 | Prove meccaniche realizzate su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Weymann et al. [5] | 96 |
| 4.15 | Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Merna et al. [5] | 96 |
| 4.16 | Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Methe et al. [9] | 97 |
| 5.1 | Il ratto Wistar. | 102 |
| 5.2 | Le pompe ed i supporti utilizzati per la perfusione | 104 |
| 5.3 | Schema della perfusione coronarica retrograda. | 104 |
| 5.4 | Allestimento originale dell'apparato di Langendorff | 105 |
| 5.5 | Il cuore nativo espantato ed incannulato | 106 |
| 5.6 | Il cuore perfuso ed immerso nel protocollo con SDS 0.5% | 110 |
| 5.7 | Il criostato | 114 |
| 5.8 | L'immunofluorescenza indiretta | 115 |
| 5.9 | Il sistema Bose [®] planar biaxial TestBench | 118 |
| 5.10 | Componenti del sistema Bose [®] planar biaxial TestBench | 119 |
| 5.11 | Il software WinTest [®] | 120 |
| 5.12 | I campioni per i test biomeccanici | 122 |
| 5.13 | Esempio di curva originale non filtrata | 124 |
| 5.14 | Modulo e fase del filtro ellittico | 125 |
| 5.15 | Filtraggio del segnale originale con filtro ellittico | 126 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.16 | Filtraggio del segnale originale con filtro a media mobile . . . | 127 |
| 5.17 | Filtraggio del segnale originale con filtro di Butterworth . . . | 128 |
| 5.18 | Esempio di curva con valore non nullo della forza nell'origine | 129 |
| 5.19 | Esempio di curva con valori minori di zero della forza | 129 |
| 5.20 | Esempio di massimi locali delle curve di carico | 131 |
| 5.21 | Esempio di stima della pendenza di una curva di carico . . . | 131 |
| 6.1 | Istologie del cuore nativo. | 134 |
| 6.2 | Immunofluorescenza del cuore nativo. | 134 |
| 6.3 | Curve tenso-deformative del cuore nativo. | 136 |
| 6.4 | Confronto tra le curve tenso-deformative medie del cuore nativo | 137 |
| 6.5 | Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. | 137 |
| 6.6 | Istologie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1% . | 138 |
| 6.7 | Miocardio decellularizzato con protocollo SDS 1% | 139 |
| 6.8 | Assottigliamento della parete ventricolare con protocollo SDS 1% | 140 |
| 6.9 | Immunofluorescenza del decellularizzato con protocollo SDS 1% | 140 |
| 6.10 | Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. | 141 |
| 6.11 | Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1% | 142 |
| 6.12 | Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo TriCol | 143 |
| 6.13 | Istologie del cuore decellularizzato con protocollo TriCol . . | 144 |
| 6.14 | Immunofluorescenza del cuore decellularizzato con protocollo TriCol | 145 |
| 6.15 | Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con protocollo TriCol. | 146 |
| 6.16 | Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decellularizzato con protocollo TriCol | 146 |
| 6.17 | Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5%. | 147 |
| 6.18 | Verifica della competenza della valvola aortica. | 148 |
| 6.19 | Istologie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5% . | 148 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.20 | Immunofluorescenza del decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 149 |
| 6.21 | Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con pro- tocollo con SDS 0.5%. | 150 |
| 6.22 | Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decel- lularizzato con protocollo con SDS 0.5% | 151 |
| 7.1 | Confronto tra curve tenso-deformative medie suddivise per ventricolo e direzione | 157 |
| 7.2 | Confronto tra curve tenso-deformative medie suddivise per protocollo | 158 |
| 7.3 | Confronto tra le pendenze medie delle curve di carico | 159 |
| 7.4 | Confronto tra i massimi delle curve di carico | 161 |
| A.1 | Cuore 1 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 165 |
| A.2 | Cuore 2 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 165 |
| A.3 | Cuore 3 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 166 |
| A.4 | Cuore 4 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 166 |
| A.5 | Cuore 5 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 166 |
| A.6 | Cuore 6 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 166 |
| A.7 | Cuore 7 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 167 |
| A.8 | Cuore 8 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 167 |
| A.9 | Cuore 9 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 167 |
| A.10 | Cuore 10 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 167 |
| A.11 | Cuore 11 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 168 |
| A.12 | Cuore 12 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 168 |
| A.13 | Cuore 13 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 168 |
| A.14 | Cuore 14 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 168 |
| A.15 | Cuore 15 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 169 |
| A.16 | Cuore 16 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 169 |
| A.17 | Cuore 17 decellularizzato con protocollo SDS 1% | 169 |
| A.18 | Cuore 1 decellularizzato con protocollo TriCol | 170 |
| A.19 | Cuore 2 decellularizzato con protocollo TriCol | 170 |
| A.20 | Cuore 3 decellularizzato con protocollo TriCol | 171 |
| A.21 | Cuore 4 decellularizzato con protocollo TriCol | 171 |
| A.22 | Cuore 5 decellularizzato con protocollo TriCol | 171 |
| A.23 | Cuore 6 decellularizzato con protocollo TriCol | 172 |

| | |
|---|-----|
| A.24 Cuore 1 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 172 |
| A.25 Cuore 2 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 172 |
| A.26 Cuore 3 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 173 |
| A.27 Cuore 4 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 173 |
| A.28 Cuore 5 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 173 |
| A.29 Cuore 6 decellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 173 |

Elenco delle tabelle

| | | |
|-----|--|-----|
| 6.1 | Dati quantitativi delle prove meccaniche su tessuto nativo . | 136 |
| 6.2 | Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto de- cellularizzato con protocollo SDS 1% | 142 |
| 6.3 | Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto de- cellularizzato con protocollo TriCol | 145 |
| 6.4 | Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto de- cellularizzato con protocollo SDS 0.5% | 151 |

Introduzione

Considerazioni preliminari Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte del mondo occidentale, determinando 17.3 milioni di decessi per anno, numero destinato a crescere fino a superare i 23.6 milioni nel 2030 [10]. L'incidenza è superiore al numero di morti causate da tumore, malattie infettive ed incidenti stradali. Si calcola, in particolare, che in Italia nel 2014 il 44% di tutti i decessi fosse legato a queste patologie [11].

I fattori di rischio sono differenti e legati sia a particolari stili di vita (fumo, inattività fisica, nutrizione non corretta) sia al quadro clinico (obesità o sovrappeso, storia familiare e genetica, ipercolesterolemia, ipertensione, diabete mellito e sindromi metaboliche) [12]. Inoltre, gli stessi pazienti che sopravvivono all'infarto miocardico, contribuiscono ad aumentare il numero di individui che soffrono di insufficienza cardiaca [13].

Il trattamento definitivo per l'insufficienza terminale d'organo (end-stage organ failure) è rappresentato dal trapianto ortotopico, il quale al giorno d'oggi costituisce una pratica ben consolidata dal punto di vista clinico. Tuttavia, questa soluzione presenta due problemi principali: in primo luogo, il numero delle richieste di trapianto risulta largamente maggiore della disponibilità degli organi da donatore e non è infrequente, per un paziente, decedere in lista d'attesa; in secondo luogo, nel caso in cui il malato riesca ad ottenere l'organo, sussiste il rischio di rigetto cronico, il quale comporta la somministrazione di terapia immunosoppressiva per tutta la durata della vita [1, 5, 13, 14, 15, 16, 17].

Cenni di patologia cardiaca Lo scompenso cardiaco rappresenta l'esito finale di ogni patologia del cuore che non venga correttamente curata o che non risponda in maniera positiva alla terapia.

L'insufficienza cardiaca Questa sindrome clinica costituisce una condizione in cui, a seguito di un danno che può essere sia di natura strutturale sia funzionale, il cuore non è più in grado di adeguare la portata cardiaca alle richieste dettate dall'attività metabolica dei tessuti oppure l'incremento della stessa è associato a valori di pressione di riempimento ventricolare e frequenza cardiaca superiori ai limiti fisiologici [18]. Tale condizione comporta l'attivazione di processi biologici (cellulari e molecolari) che, se persistenti nel tempo, influiscono sul deterioramento funzionale e strutturale dei cardiomiociti. Lo scompenso cardiaco può essere classificato in base al ventricolo interessato oppure in base al decorso temporale. Nel primo caso, è possibile distinguere scompenso sinistro (viene colpito il ventricolo sinistro), scompenso destro (viene colpito il ventricolo destro) e scompenso globale (entrambi i ventricoli vengono colpiti). Nel secondo caso, invece, si può definire un'insufficienza cardiaca acuta se si sviluppa nell'arco di ore o di giorni, e un'insufficienza cardiaca cronica se si sviluppa nell'arco di mesi o anni.

Le malattie che portano allo scompenso cardiaco Le patologie dell'apparato cardiocircolatorio che possono condurre allo scompenso cardiaco sono differenti [19] ed, in generale, consistono in:

Cardiopatía ischemica: consiste nella presenza di uno squilibrio tra l'apporto ematico e la richiesta di ossigeno da parte del tessuto ed è dovuta ad una stenosi parziale o totale del lume arterioso coronarico (aterosclerosi dei vasi coronarici). Tra le manifestazioni cliniche di questa patologia si ricordano l'angina pectoris stabile (presenza di dolore al torace dovuto ad un'ossigenazione insufficiente del muscolo cardiaco) e la sindrome coronarica acuta (può comportare angina pectoris instabile e l'infarto acuto del miocardio, determinando la necrosi del muscolo cardiaco in seguito ad una non corretta perfusione dello stesso) [20].

Cardiomiopatie: costituiscono un insieme di malattie del cuore associate all'alterazione della funzione cardiaca e provocate da disfunzioni elettriche e/o meccaniche. Generalmente possono determinare lo sviluppo di fenomeni di dilatazione delle camere cardiache (cardiomiopatia dilatativa) o ipertrofia (cardiomiopatia ipertrofica) [21].

Miocardite : si tratta di una patologia infiammatoria che può colpire i cardiomiociti, l'interstizio ed i vasi cardiaci. Può essere di natura virale, batterica o non infettiva [22].

Valvulopatie: si tratta di un insieme di patologie che colpiscono le valvole cardiache e possono essere distinte in difetti acquisiti e congeniti. In generale, si presentano come stenosi o come insufficienza. Nel primo caso si ha un restringimento dell'orifizio valvolare in condizione di massima apertura della valvola, con conseguenti alterazioni del profilo emodinamico, mentre nel secondo caso si ha la chiusura incompleta dei lembi valvolari, la quale provoca il reflusso ematico dalle arterie nei ventricoli (insufficienza delle valvole semilunari) o dagli atri nei ventricoli (insufficienza delle valvole atrioventricolari) [23].

Cardiopatie congenite: sono costituite da malformazioni a carico del cuore e dei grossi vasi. Possono essere classificate in ostruzione delle valvole e vasi oppure si manifesta la presenza di shunt. Questi ultimi comportano la comunicazione diretta tra parte destra e sinistra del cuore, tramite aperture che possono essere collocate, ad esempio, sul setto interatriale o sul setto interventricolare [24].

Ipertensione arteriosa: rappresenta una condizione in cui la pressione del sangue nelle arterie della circolazione sistemica è elevata. Nella maggior parte dei casi non è possibile individuare una causa precisa e l'ipertensione viene definita, pertanto, primitiva o essenziale [25].

Trattamento chirurgico dello scompenso cardiaco Le strategie che possono essere adottate sono strettamente correlate alla patologia che ha determinato lo scompenso e a considerazioni che riguardano le condizioni generali del paziente. Gli approcci chirurgici possono essere categorizzati in chirurgia tradizionale, trapianto cardiaco e assistenze meccaniche [26].

Il trapianto di cuore è un intervento chirurgico che consiste nella sostituzione del muscolo cardiaco danneggiato con un altro organo omologo funzionante. Questa procedura può essere definita ortotopica se l'intero organo viene rimosso e sostituito, oppure eterotopica se il cuore del donatore viene posto in parallelo al cuore del ricevente. Inoltre, è possibile distinguere in trapianti omologhi, se donatore e ricevente sono vicini dal punto di vista filogenetico (genitori, fratelli, figli) oppure allogenico se donatore o

ricevente appartengono semplicemente alla stessa specie. In questo secondo caso, è possibile che il paziente sviluppi fenomeni di rigetto in seguito all'attivazione del sistema immunitario, nonostante la somministrazione di un'adeguata terapia immunosoppressiva. La stessa, basata sull'impiego di farmaci corticosteroidi ed immunosoppressori, presenta effetti collaterali, in quanto può nuocere direttamente gli organi deputati al loro metabolismo ed eliminazione, ed inoltre rende il soggetto più sensibile al rischio di incorrere in infezioni [27].

L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa Il cuore umano possiede caratteristiche di rigenerazione limitate, in quanto i cardiomiociti maturi non sono in grado di replicarsi rendendo irreversibili i danni eventualmente presenti nell'organo [5]. Vi è quindi la necessità di mettere a punto delle strategie cliniche e terapeutiche che permettano il ripristino in tempi rapidi della funzionalità cardiaca, presentando caratteristiche valide dal punto vista della disponibilità di utilizzo e della biocompatibilità. Soluzioni innovative per un approccio terapeutico vitale e funzionale vengono proposte dall'ingegneria tissutale e dalla medicina rigenerativa, le quali si occupano di creare tessuti ed organi sostitutivi bioartificiali con tecniche di diverse discipline. Nello specifico, l'ingegneria tissutale rappresenta un campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze biologiche al fine di realizzare sostituti funzionali di organi e tessuti danneggiati utilizzabili nella pratica clinica [15, 16, 28]. La medicina rigenerativa si occupa di sostituire o rigenerare cellule, tessuti ed organi al fine di ristabilirne la completa funzionalità [17].

La capacità rigenerativa del cuore Al momento, sono presenti differenti studi che si occupano di tissue engineering e rigenerazione cardiaca, i quali hanno fornito differenti approcci che spaziano dalla cardiomioplastica cellulare all'utilizzo di bioprotesi per il miocardio. La possibilità di realizzare queste soluzioni deriva dalla scoperta, relativamente recente, della cellule staminali cardiache, le quali presentano capacità autoreplicative e possibilità di differenziarsi in cardiomiociti, cellule endoteliali e fibroblasti cardiaci [29]. Tali cellule presentano, tuttavia, capacità di espansione *in vitro* limitate. Questo aspetto è in contrasto con le necessità proprie della tissue engineering la quale richiede l'utilizzo di grandi quantità di cellule al fine di ottenere condizioni fisiologiche di densità cellulare (circa 10^8 cellule/cm³)

ed il ripristino dell'azione contrattile necessaria. Pertanto sono state individuate altre fonti cellulari, quali cellule staminali embrionali (ES) o cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).

La matrice biologica come scaffold per la semina cellulare Per quanto riguarda le bioprotesi, le cellule selezionate vengono coltivate su un supporto specifico al fine di assemblare un tessuto in grado di generare una forza di contrazione adeguata e di propagare segnali elettrici, ovvero che presenti caratteristiche simili al miocardio nativo ed in grado di mantenere le stesse anche successivamente all'impianto [30]. Gli scaffold possono essere di derivazione naturale (realizzati con collagene e alginato), polimerica (come l'acido poliglicolico o l'acido polilattico) oppure possono essere costituiti da matrice biologica. Quest'ultima rappresenta il supporto ideale, in quanto possiede caratteristiche di biocompatibilità molto elevate ed inoltre, essendo prodotta dalle cellule residenti nello specifico tessuto, si trova in rapporto dinamico con l'ambiente circostante favorendo la migrazione, il differenziamento, la proliferazione cellulare e modulando la risposta immunitaria [31]. Possiede quindi proprietà ottimali, dal punto di vista biologico, meccanico e funzionale, per la realizzazione di costrutti bioingegnerizzati. Per poter utilizzare questo genere di scaffold è tuttavia necessario un passaggio intermedio che viene definito "decellularizzazione". Quest'ultima permette la rimozione selettiva delle cellule dal tessuto processato per mezzo di trattamenti o manipolazioni che mirano a non danneggiare la componente matriciale. L'utilizzo delle matrici decellularizzate permette sia di risolvere i problemi di risposta immunitaria (in quanto le proteine che la compongono sono altamente conservate tra le specie) sia di garantire corretto apporto di ossigeno e nutrienti alle cellule seminate. Infatti, uno dei punti fondamentali che ha fortemente limitato lo sviluppo dello spessore dei tessuti assemblati *in vitro* è rappresentato dalla limitata capacità di diffusione dell'ossigeno in profondità all'interno degli stessi [13, 30]. I cardiomiociti sono fortemente sensibile all'ipossia e necessitano di grandi quantità di ossigeno per poter svolgere la loro attività. A tale scopo, un espediente può essere rappresentate dall'utilizzo di carrier specifici per l'ossigeno presenti nel terreno di coltura o nella matrice artificiale. Tuttavia, la soluzione migliore è costituita dall'utilizzo delle matrici biologiche, le quali naturalmente possiedono una rete vascolare adatta a soddisfare le necessità metaboliche delle cellule.

Organi totali bioingegnerizzati La nuova frontiera dell'ingegneria tissutale è rappresentata dalla produzione e semina di colture di cellule autologhe non più su scaffold biologici di tessuti semplici, ma su supporti tridimensionali derivati da organi totali. Così facendo, sarà possibile ottenere un cuore totale bioingegnerizzato, in grado di risolvere i problemi di rigetto e carenza di donatori. Tale scaffold deve necessariamente essere di derivazione biologica, in quanto non risulta realizzabile la creazione *in vitro* di una struttura tridimensionale complessa, dotata di un sistema vascolare altamente sviluppato e attiva dal punto di vista biologico al fine di garantire un adeguato substrato per la cellule [13]. Per ottenere questo supporto altamente biocompatibile ed organizzato si sfruttano tecniche di decellularizzazione innovative, rappresentate dalla perfusione dell'organo con soluzioni che operano la rimozione cellulare, permettendo di ottenere la matrice extracellulare specifica con proprietà biologiche e meccaniche analoghe a quanto si evidenzia per i tessuti nativi.

Scopo del lavoro di tesi Il presente elaborato costituisce la prima parte di un lavoro molto più ampio e complesso che, applicando le tecniche dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa non più a tessuti semplici, ma ad organi complessi, avrà come scopo finale la generazione di cuori totali bioingegnerizzati di derivazione umana. Questi ultimi saranno ottenuti attraverso la semina, opportunamente condizionata, di progenitori cardiovascolari differenziati da iPS paziente-specifiche, su uno scaffold allogeneico di matrice cardiaca totalmente decellularizzata. L'organo così ottenuto avrà la caratteristica peculiare di rappresentare una soluzione paziente-specifica, in grado di risolvere problemi quali il rigetto cronico e la mancanza donatori.

Pertanto, si è partiti da un modello animale semplice, molto utilizzato nella pratica biologica anche per le dimensioni ridotte: il ratto. Sui cuori espantati sono stati, quindi, applicati tre differenti approcci di decellularizzazione totale per perfusione retrograda dell'organo, comprendenti differenti tipi e combinazioni di detergenti. Gli scaffold ottenuti sono stati valutati dal punto di vista biologico e biomeccanico al fine di verificare l'efficacia dei protocolli adottati ed, eventualmente, il grado di danno arrecato dagli stessi alla matrice ottenuta. In particolare, sono state utilizzate colorazioni istologiche e tecniche di immunoistochimica, oltre che realizzate prove a trazione fino alla rottura di ognuno dei due ventricoli isolati, considerando due direzioni di carico ortogonali tra loro (circonferenziale e longitudinale).

Parte I

Revisione della letteratura

Capitolo 1

Anatomia macroscopica

La presenza del sistema cardiocircolatorio risponde alle necessità, proprie di ogni cellula che compone i tessuti viventi, di ricevere ossigeno ed elementi nutritivi dai fluidi interstiziali e di disperdere, sempre in questi ultimi, i rifiuti metabolici. Il livello di tali sostanze viene mantenuto stabile attraverso lo scambio continuo con il torrente circolatorio: affinché l'omeostasi sia conservata vi è, quindi, l'esigenza di mantenere il sangue in movimento. Come conseguenza di ciò, tutte le funzioni del sistema cardiovascolare risultano dipendere strettamente dal funzionamento del cuore, in quanto organo deputato a garantire la circolazione sanguigna.

Per il seguente capitolo, ove non sia indicato esplicitamente, è necessario fare riferimento a [32, 33, 34, 35] per la parte teorica e a [36, 37] per gli atlanti anatomici.

1.1 L'apparato circolatorio sanguigno

L'apparato circolatorio (Figura 1.1) è costituito da un insieme di molteplici condotti variamente ramificati, noti come *vasi*, i quali si distribuiscono in tutto l'organismo. Nel loro lume scorrono distintamente due tipi di umori nutritivi circolanti: il *sangue* e la *linfa*. È pertanto possibile distinguere un *apparato circolatorio sanguigno*, che permette il movimento del sangue, ed un *apparato circolatorio linfatico* che permette il trasporto della linfa (Figura 1.1).

L'apparato circolatorio sanguigno è composto dal *cuore*, posto nel torace avvolto nel *pericardio*, il quale svolge la funzione di pompa assicurando con la sua contrazione ritmica la circolazione del sangue, e dalla rete dei vasi

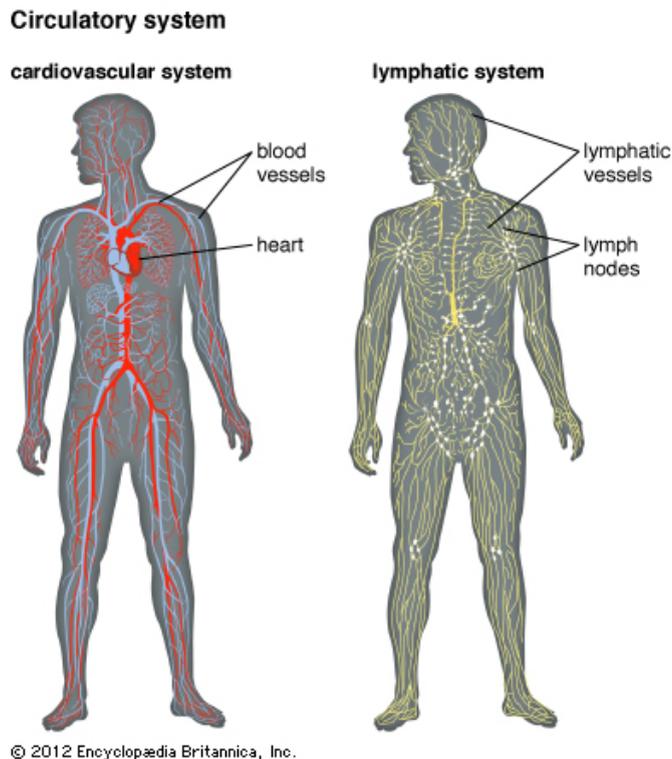


Figura 1.1: Il sistema circolatorio. Il sistema circolatorio sanguigno è costituito dal cuore e dai vasi sanguigni e permette il trasporto di sostanze nutritive ed ossigeno ad organi e tessuti e la rimozione degli scarti del metabolismo cellulare, il sistema circolatorio linfatico è un sistema di drenaggio che trasporta i fluidi dallo spazio interstiziale dei tessuti al torrente circolatorio [38].

arteriosi e venosi, i quali sono classificabili sulla base della dimensione, della struttura e della direzionalità del fluido che trasportano.

1.1.1 Funzioni dell'apparato circolatorio sanguigno

L'apparato circolatorio svolge numerose funzioni all'interno dell'organismo, tra le quali è utile ricordare le seguenti:

- trasporto e distribuzione di sostanze nutritive e ossigeno ad organi e tessuti;
- rimozione ed allontanamento dei prodotti derivanti dal catabolismo cellulare dai siti di produzione;
- regolazione dell'omeostasi dei fluidi corporei;
- termoregolazione;

- contributo nei processi immunitari attraverso il trasporto di cellule ad attività fagocitaria, di cellule immunocompetenti ed anticorpi;
- regolazione dei vari apparati attraverso il trasporto di sostanze messaggere quali, per esempio, gli ormoni.

1.1.2 Le circolazioni sistemica e polmonare

Nell'uomo e nei vertebrati superiori esiste una circolazione doppia e completa (Figura 1.2). È possibile infatti distinguere un *grande circolo* o *circolazione generale* o *circolazione sistemica* il cui scopo è portare nutrimento a tutti i segmenti corporei, e costituisce il cosiddetto *circolo nutrizio*, ed un *piccolo circolo* o *circolo polmonare* il cui scopo è quello di mantenere il corretto livello di ossigeno e di anidride carbonica nel sangue, detto pertanto *circolo funzionale*. Le due circolazioni si incrociano tra loro formando un otto, il cui centro è costituito dal *cuore* (Paragrafo 1.2). Quest'ultimo rappresenta il punto di origine e di terminazione delle circolazioni stesse. Nello specifi-

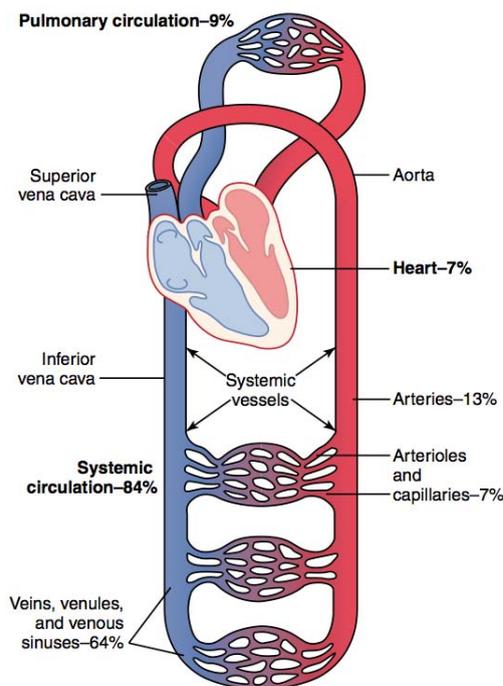


Figura 1.2: Schema generale delle circolazioni sistemica e polmonare. La grande circolo permette di portare nutrimento a tutti i segmenti corporei e si contrappone al piccolo circolo che permette invece di mantenere la corretta quantità di ossigeno e di anidride carbonica nel sangue. Il cuore rappresenta il punto iniziale e terminale delle due circolazioni (Guyton et al. [39]).

co, la circolazione sistemica trova origine nel *ventricolo sinistro* da un unico tronco arterioso, denominato *aorta*, la quale ramificandosi progressivamente si risolve, in corrispondenza della compagine dei singoli organi, nella reti dei capillari, i quali permettono la distribuzione del sangue arterioso. A questo livello, il sangue cede ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti e riceve anidride carbonica e prodotti di scarto, divenendo sangue venoso. I capillari sanguigni confluiscono, quindi, in vasi di calibro progressivamente maggiore, le *vene*, facendo pervenire il sangue nuovamente al cuore, in particolare all'*atrio destro*, attraverso la *vena cava superiore* e la *vena cava inferiore* che in esso si aprono. Dall'atrio destro il sangue fluisce successivamente nel *ventricolo destro*. In quest'ultimo ha origine la circolazione polmonare: il *tronco polmonare* trasporta il sangue venoso verso i due polmoni biforcandosi nelle *arterie polmonari*, le quali in questa sede si diramano ulteriormente dissolvendosi nella rete dei capillari polmonari addossati alle pareti degli alveoli. I capillari cedono l'anidride carbonica contenuta nel sangue venoso all'aria presente negli alveoli e ricevono ossigeno. Il sangue, nuovamente arterioso, fa pertanto ritorno all'*atrio sinistro* del cuore attraverso le quattro *vene polmonari*, passando successivamente al ventricolo sinistro, il quale attraverso l'*aorta* dà origine nuovamente alla circolazione sistemica (Figura 1.3).

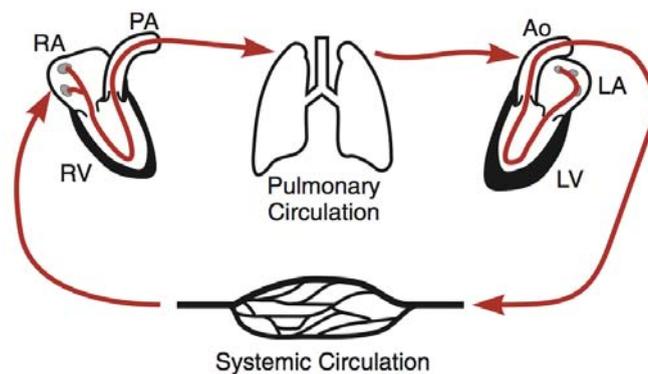


Figura 1.3: Il sistema circolatorio sanguigno. La circolazione polmonare ha origine nella parte destra del cuore, mentre la circolazione sistemica nella parte sinistra. Le due circolazioni sono collegate in serie e nel complesso costituiscono il sistema cardiocircolatorio sanguigno (Klabunde [40]).

1.2 Il cuore

Il cuore è un organo muscolare cavo in grado di contrarsi ritmicamente. Dal punto di vista ingegneristico può essere definito come una doppia pompa volumetrica alternata, costituita complessivamente da quattro cavità: due posterosuperiori (*atrio destro* ed *atrio sinistro*), separate tra loro dal *setto interatriale*, e due anteroinferiori (*ventricolo destro* e *ventricolo sinistro*), separate tra loro dal *setto interventricolare* (Figura 1.4).

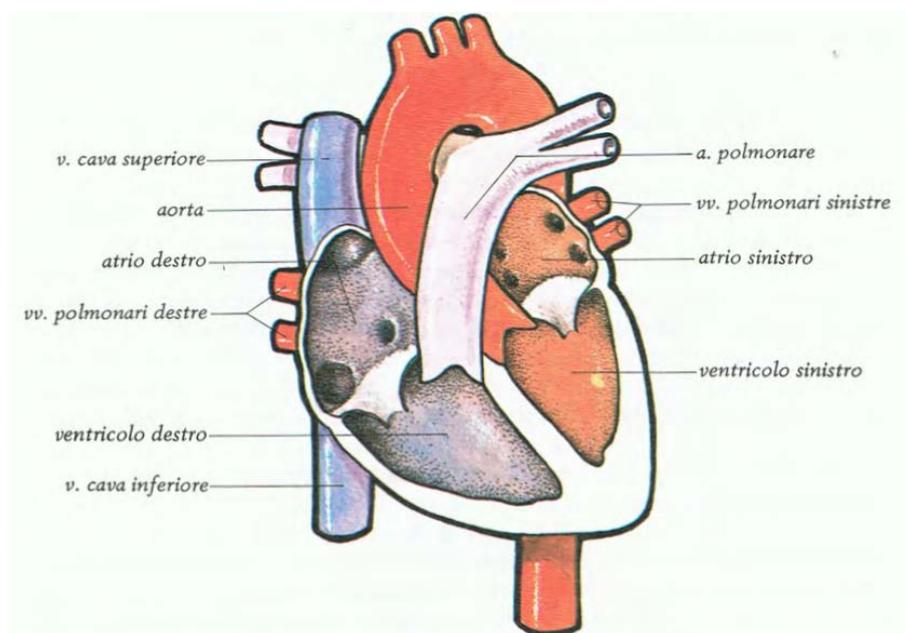


Figura 1.4: *Rappresentazione schematica della configurazione interna del cuore.* Il cuore destro si compone dell'atrio e del ventricolo destri ed è rappresentato in blu, in maniera analoga il cuore sinistro si compone dell'atrio e del ventricolo sinistri ed è rappresentato in rosso. Il primo contiene sangue venoso (ricco di anidride carbonica), il secondo sangue arterioso (ricco di ossigeno) (Cattaneo [32]).

Comunemente si definisce come *cuore destro* l'insieme dell'atrio e del ventricolo destri, e come *cuore sinistro* l'insieme dell'atrio e del ventricolo sinistri. Le due parti si trovano pertanto separate, sia dal punto di vista fisico sia dal punto di vista fisiologico, e disposte in serie in differenti posizioni della doppia circolazione.

Allo scopo di mantenere la corretta direzionalità del sangue, entrambe le pompe sono dotate di una *valvola atrioventricolare*, la quale separa gli atri dai ventricoli, e di una *valvola arteriosa* che permette il passaggio del sangue dai ventricoli alle rispettive arterie.

1.2.1 Caratteristiche generali

Il cuore possiede una struttura tridimensionale, di forma conica o piramidale leggermente appiattita in direzione anteroposteriore, ed è dotato di una base (*base del cuore*) rivolta addietro verso la destra e corrispondente alla componente atriale, un apice (*punta del cuore*) rivolto in avanti verso la sinistra e corrispondente alla componente ventricolare, e di una serie di superfici e bordi. La particolare configurazione spaziale permette inoltre di definire una *faccia anteriore* o *sterno-costale*, una *faccia posteriore* o *diaframmatica*, un *margin destro* definito come *margin acuto* ed un *margin sinistro* definito come *margin ottuso*.

L'organo presenta un colore rossastro, molto simile a quello dei muscoli scheletrici. Sulla sua superficie sono inoltre presenti diffuse macchie giallastre, di grandezza variabile, dovute ai depositi di grasso e localizzate prevalentemente lungo il decorso dei vasi coronarici.

1.2.1.1 Dimensioni e peso

Le dimensioni del muscolo cardiaco variano in funzione del sesso, dell'età e delle condizioni del soggetto: nell'uomo adulto la distanza media tra la base e l'apice (*diametro longitudinale*) è di circa 12-13 cm, il diametro maggiore nella direzione trasversale (*diametro trasversale*, ortogonale al precedente) assume valori compresi tra 8 e 10 cm, mentre nella direzione anteroposteriore (*diametro anteroposteriore* o *spessore*) tra 5 e 6 cm [32, 33, 34, 35]. Il peso può variare tra 280 e 340 g nell'uomo (in media 300 g) e tra i 230 e 280 g nella donna (in media 250g), rappresentando circa lo 0.45% del peso corporeo nell'uomo e lo 0.40% nella donna. La capacità complessiva delle camere è di circa 500 ml.

1.2.1.2 Posizione ed orientamento

Il cuore è situato nella cavità toracica, in particolare nel mediastino anteriore tra i due polmoni, dove si trova avvolto dal *pericardio* (si veda il Paragrafo 1.4). Rispetto al piano sagittale mediano, non risulta essere perfettamente centrato, infatti un terzo dell'organo è disposto alla destra ed i restanti due terzi alla sinistra dello stesso (Figura 1.5). La direzione lungo la quale giacciono la base e l'apice forma un angolo di circa 45° [33, 34] rispetto all'asse longitudinale del corpo. Inoltre il cuore appare essere leggermente ruotato verso sinistra. Come conseguenza di questa rotazione, la faccia

anteriore risulta essere costituita prevalentemente dalle pareti dell'atrio e del ventricolo destri, mentre la faccia posteriore si compone dell'atrio e del ventricolo sinistri e di una piccola porzione dell'atrio destro.

Per valutare la posizione reale del cuore e delle sue componenti è possibile servirsi della parete anteriore del torace e utilizzare come punti di riferimento le strutture ossee. Infatti, proiettando la faccia sterno-costale su tale parete, è possibile definire l'*area cardiaca* (Figura 1.6) di forma trapezoidale.

All'interno dell'area cardiaca è possibile collocare le valvole cardiache le quali si dispongono su un piano obliquo, corrispondente al *piano valvolare*. La proiezione delle singole valvole sulla parete toracica anteriore definisce i *focolai anatomici*.

1.2.1.3 Struttura

La struttura e l'anatomia microscopica della parete cardiaca verranno trattate estesamente nel Capitolo 2.

1.2.2 Anatomia di superficie

Come già discusso in precedenza, data la particolare configurazione spaziale del muscolo cardiaco è possibile individuare sulla superficie una serie di facce e di margini la cui anatomia di superficie verrà discussa in dettaglio.

1.2.2.1 La faccia sterno-costale

La faccia sternocostale presenta una forma triangolare, moderatamente convessa, rivolta in avanti, verso l'alto e a sinistra. Si estende dal margine acuto, che la delimita nettamente dalla faccia diaframmatica, al margine ottuso, in corrispondenza del quale la faccia frontale e quella posteriore si fondono con continuità (Figura 1.7).

Trasversalmente viene percorsa dalla porzione anteriore del *solco coronarico* o *solco atrioventricolare*, il quale decorre circolarmente sulla superficie del cuore ed è interrotto nella porzione centrale dalle emergenze dell'*aorta* e dell'*arteria polmonare*. Il solco atrioventricolare è percorso dai vasi coronarici e permette di distinguere, sulla superficie esterna, quale sia la porzione di cuore spettante agli atri e quale quella spettante ai ventricoli.

La regione superiore presenta invece l'emergenza dell'arteria polmonare collocata in alto e a sinistra, la quale è preceduta da una sporgenza conica

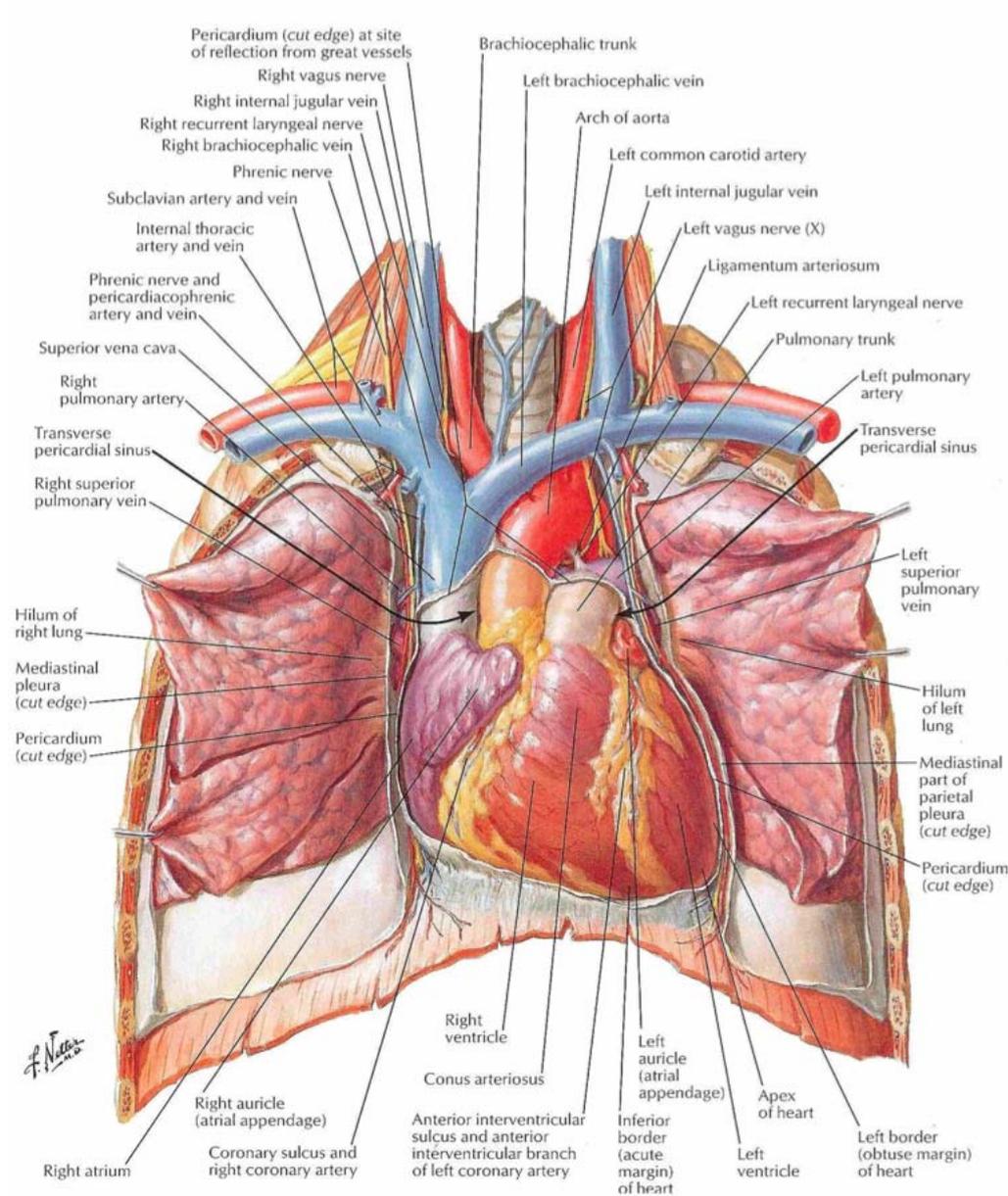


Figura 1.5: Visione anteriore del cuore in situ. Il cuore è collocato nel mediastino anteriore tra i due polmoni. Rispetto al piano sagittale mediano, un terzo del cuore giace alla destra e due terzi alla sinistra dello stesso. L'asse maggiore giace sulla linea immaginaria che congiunge la spalla destra all'ipocondrio sinistro (Netter [36]).

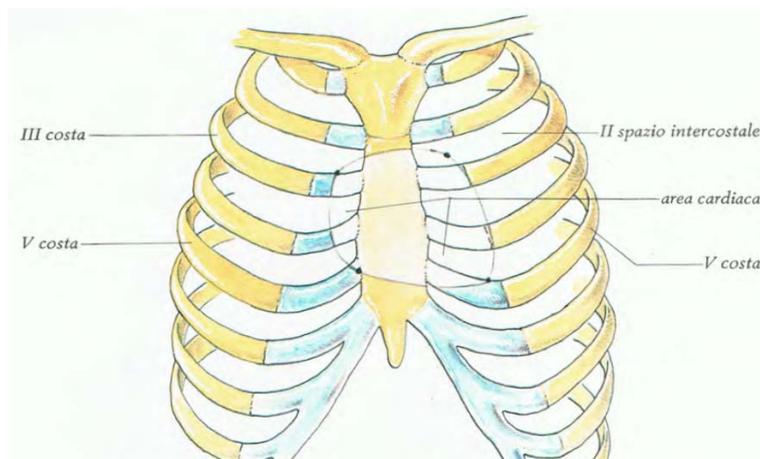


Figura 1.6: Area cardiaca. L'area cardiaca viene definita proiettando il cuore sulla parete anteriore del torace. È pertanto possibile ottenere un trapezio dotato di lato superiore, lato destro, lato inferiore e lato sinistro (Cattaneo [32]).

rivolta verso l'alto del ventricolo destro (*cono arterioso* o *cono polmonare*) il quale prosegue nel *tronco polmonare*. Quest'ultimo, portandosi in alto e a sinistra nasconde il tratto iniziale dell'*aorta*, la cui emergenza è collocata posteriormente e sulla destra, trovando la sua origine alla base del ventricolo sinistro. L'*aorta* sale quindi verso destra, curvando in alto alla sinistra e all'indietro, formando in questo modo un arco, l'*arco aortico*. Il tronco polmonare, posizionato anteriormente all'origine dell'*aorta*, portandosi in alto e alla sinistra si avvolge a spirale al tratto iniziale dell'*aorta* stessa disponendosi posteriormente a questa. Ivi si divide nelle due *arterie polmonari*, la *destra* e la *sinistra*. Tra la biforcazione dell'arteria polmonare e l'*aorta* è teso il *legamento anteriore di Botallo*. Lateralmente al complesso aorticopolmonare sono collocati i due prolungamenti anteriori degli atri, detti *auricole* o *appendici atriali*, che presentano un contorno dentellato. Alla base dell'*aorta* è collocata la propaggine dell'atrio destro (*auricola destra*), la quale possiede una forma conica con apice anteriore e avvolge con il suo margine sinistro l'origine dell'*aorta* stessa. Analogamente, alla base dell'arteria polmonare è collocata la propaggine anteriore dell'atrio sinistro (*auricola sinistra*), la quale presenta una forma più stretta ed allungata, e abbraccia con il margine destro l'origine del tronco polmonare stesso.

La regione sottostante al solco coronarico è costituita dalle pareti dei ventricoli. Il confine di questi ultimi sulla faccia sternocostale viene marcato dal *solco longitudinale anteriore* o *solco interventricolare anteriore*, il quale

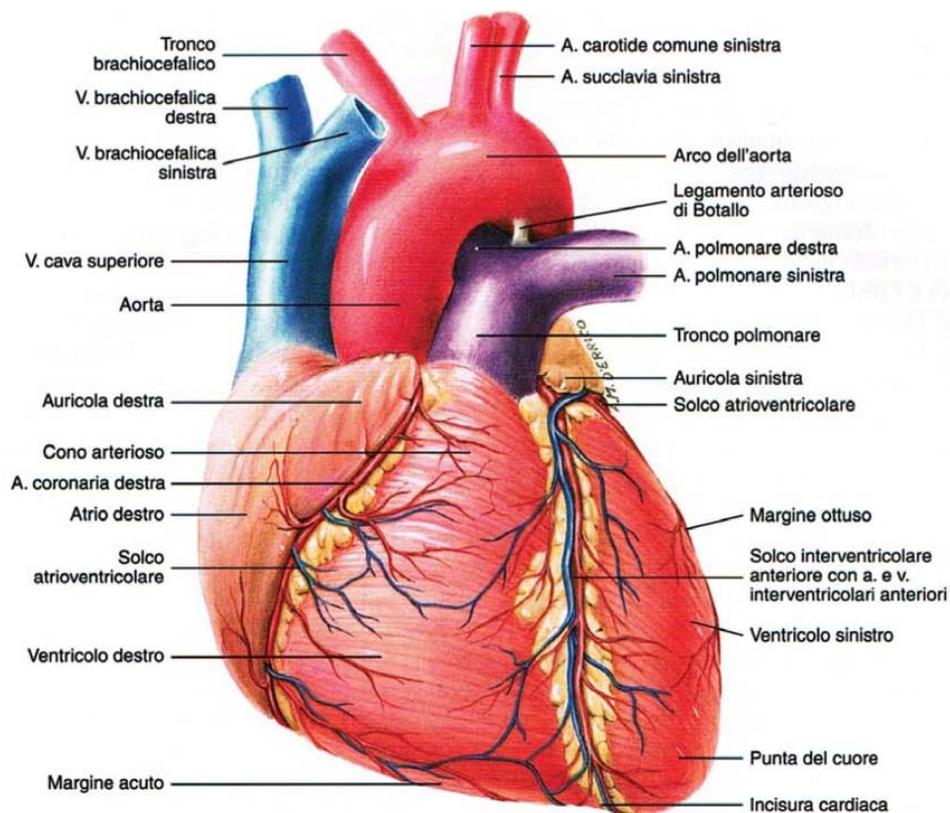


Figura 1.7: *La faccia sternocostale del cuore.* La faccia anteriore del cuore è caratterizzata dalla presenza della porzione anteriore del seno coronarico, il quale segna la zona di separazione tra atri e ventricoli, dal solco interventricolare anteriore, il quale separa la zona di parete inerente al ventricolo destro e al ventricolo sinistro, superiormente sono presenti le emergenze dell'arteria polmonare e dell'aorta alle cui basi sono collocate l'auricola sinistra e destra rispettivamente (Anastasi et al. [33]).

trova origine superiormente nei pressi del margine ottuso e dal solco coronarico si protrae quasi verticalmente, decorrendo spostato sul margine destro, fino a raggiungere il contorno destro dell'apice, dove si ricongiunge al solco interventricolare posteriore collocato sulla faccia diaframmatica. Tale solco è occupato dai rami dei vasi coronarici, i quali in generale sono circondati da depositi di grasso. La porzione di superficie sternocostale pertinente al ventricolo destro è più ampia (circa 2/3) di quella spettante al ventricolo sinistro (circa 1/3).

1.2.2.2 La faccia diaframmatica

La faccia diaframmatica presenta una forma triangolare e piana, rivolta indietro e verso il basso, adattandosi in questo modo al centro frenico del diaframma (Figura 1.8). Anch'essa è attraversata trasversalmente dal *solco coronarico posteriore* o *solco atrioventricolare*, il quale rappresenta la prosecuzione dell'omonimo solco presente sulla faccia sternocostale. Il solco atrioventricolare, analogamente a quello anteriore, è attraversato dai vasi coronarici spesso accompagnati da accumuli di grasso e segna il limite tra la porzione di parete inerente ai ventricoli (più estesa e collocata inferiormente) e quella inerente agli atri (più ristretta e collocata superiormente).

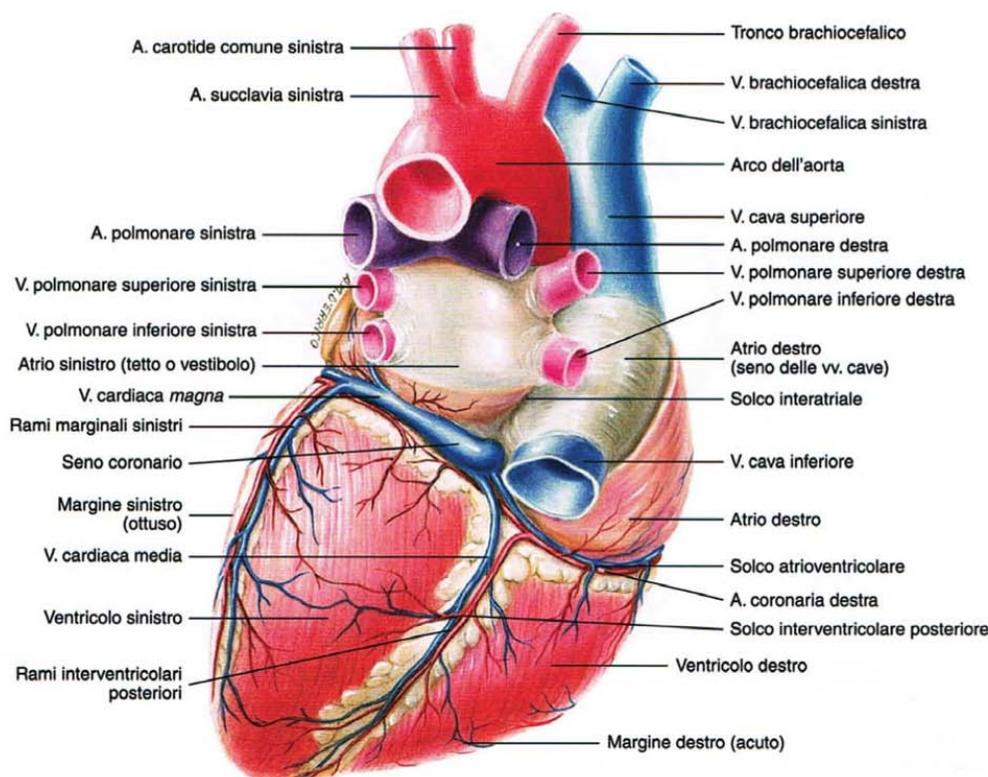


Figura 1.8: *La faccia diaframmatica del cuore.* La faccia posteriore del cuore è caratterizzata dalla presenza della porzione posteriore del seno coronarico, il quale segna la zona di separazione tra atri e ventricoli, e dal solco interventricolare posteriore, il quale separa la zona di parete inerente al ventricolo destro e al ventricolo sinistro. La faccia diaframmatica è costituita prevalentemente dalla parete del ventricolo sinistro, maggiormente rappresentato rispetto al ventricolo destro (Anastasi et al. [33]).

Al di sopra di tale solco, il confine tra atrio destro e sinistro è marcato dal

solco interatriale. La componente atriale è rappresentata da una ristretta porzione di parete degli atri compresa tra il solco interatriale e gli sbocchi della vena cava inferiore a destra e delle vene polmonari inferiori a sinistra.

Al di sotto del solco atrioventricolare, il confine tra i due ventricoli è marcato dal *solco longitudinale posteriore* o *solco interventricolare posteriore*, il quale si distacca ad angolo retto dal solco coronarico e, decorrendo in maniera rettilinea spostato verso il margine acuto, raggiunge il lato destro dell'apice, dove unendosi all'estremità inferiore del solco longitudinale anteriore costituisce l'*incisura cardiaca* o *incisura dell'apice*. Sulla faccia sternocostale risulta essere maggiormente rappresentato il ventricolo sinistro.

1.2.2.3 Il margine acuto

Il margine acuto rappresenta la zona di separazione destra tra la faccia sterno-costale e la faccia diaframmatica. Tale margine è sottile, pressoché orizzontale e presenta un andamento dall'indietro in avanti e verso la sinistra. È costituito dal ventricolo destro e, nella sua porzione superiore, dall'auricola destra. In prossimità dell'apice del cuore, è solcato dall'incisura della punta del cuore e per tutta l'estensione della sua superficie è percorso da un ramo dell'arteria coronaria sinistra.

1.2.2.4 Il margine ottuso

Il margine ottuso rappresenta la zona di separazione sinistra tra la faccia sterno-costale e la faccia diaframmatica. Tale margine è spesso e presenta un andamento obliquo dall'alto in basso ed in avanti. La sua superficie è percorsa da un ramo dell'arteria coronaria destra.

1.2.2.5 La base

La base del cuore possiede una forma a cupola, con concavità rivolta verso il basso, direzionata all'indietro e alla destra, facendo seguito, senza alcun limite di demarcazione, alla faccia diaframmatica (Figura 1.9). La base è caratterizzata dallo sbocco delle grandi vene ed è costituita dalla parete posterosuperiore degli atri. Quest'ultima normalmente non è visibile in quanto nascosta dal complesso aortopolmonare. La linea di separazione tra i due atri non è facilmente reperibile in quanto risulta celata per la maggior parte dalla parte terminale delle vene polmonari di destra: è costituita da un solco curvilineo, poco profondo e concavo verso destra (*solco interatriale*).

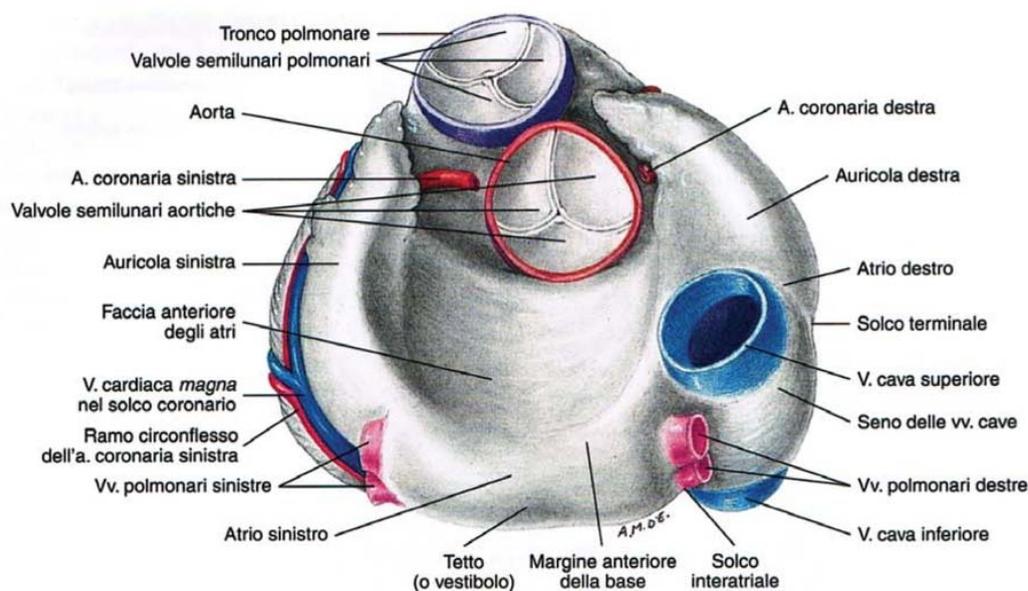


Figura 1.9: La base del cuore. Sulla base del cuore gli atri trovano la loro massima estensione. Nell'atrio destro confluiscono il seno coronarico e le due vene cave (superiore ed inferiore). Nell'atrio sinistro si scaricano le quattro vene polmonari (due destre e due sinistre, superiori ed inferiori) (Anastasi et al. [33]).

Alla destra vi si trova la parete dell'atrio destro, mentre alla sinistra la parete dell'atrio sinistro.

In corrispondenza della porzione superiore dell'atrio destro vi è lo sbocco della *vena cava superiore* e inferiormente, lungo lo stesso asse, vi è lo sbocco della *vena cava inferiore*, con accanto lo sbocco del seno coronarico. Sul lato destro dello sbocco della vena cava superiore decorre un solco longitudinale, variamente sviluppato, detto *solco terminale*, il quale si protrae verso il basso fino a raggiungere il contorno esterno nello sbocco della vena cava inferiore. Tale solco segna il limite tra la parte anterolaterale della parete dell'atrio destro, percorsa dai rilievi muscolari e denominata *atrio propriamente detto*, il quale si estende in avanti circondando il margine destro dell'aorta costituendo l'auricola destra, e quella posteromediale, liscia, denominata *seno delle vene cave* o *seno venoso*. Il solco terminale rappresenta, inoltre, il punto di repere anatomico utilizzato per la localizzazione del *nodo senoatriale*.

In corrispondenza dell'atrio sinistro sono presenti gli sbocchi delle due *vene polmonari destre, superiore ed inferiore*, immediatamente accanto al solco interatriale, e più lateralmente lo sbocco delle due *vene polmonari*

sinistre, superiore ed inferiore. La porzione di atrio compreso tra lo sbocco delle vene polmonari destre e sinistre si definisce *tetto* o *vestibolo* dell'atrio sinistro, il cui significato e morfologia sono analoghi al seno delle vene cave.

L'insieme del tronco polmonare, dell'aorta e della vena cava superiore costituisce il *peduncolo vascolare del cuore*. Quest'ultimo nasconde la parete anteriore concava degli atri, dal quale sono separati dal *seno trasverso*, un solco rivestito dalla *membrana sierosa cardiaca* (si veda il Paragrafo 1.4.2).

1.2.2.6 L'apice

L'apice del cuore è rivolto in basso, in avanti e alla sinistra. È costituito esclusivamente dal ventricolo sinistro, dal momento che l'apice del ventricolo destro si arresta al livello dell'incisura dell'apice.

1.2.3 Anatomia della sezione

Come accennato in precedenza, il cuore si articola internamente in quattro camere: due posterosuperiori, definite *atrio destro* ed *atrio sinistro*, e due anteroinferiori, definite *ventricolo destro* e *ventricolo sinistro*.

Le cavità degli atri comunicano con i rispettivi ventricoli per mezzo dell'*orifizio atrioventricolare*, il quale è dotato di un apparato valvolare, detto *valvola atrioventricolare*. In particolare, per il cuore destro si parla di *orifizio atrioventricolare destro* e di *valvola tricuspide*, mentre per il cuore sinistro si parla di *orifizio atrioventricolare sinistro* e di *valvola bicuspidale* o *valvola mitrale*, rispettivamente.

Le cavità destre e sinistre del cuore non comunicano tra loro in quanto separate da un setto continuo, definito *setto del cuore*. Quest'ultimo può essere scomposto, a seconda dei rapporti topografici, in tre parti:

1. il *setto interatriale*: posizionato superiormente, separa i due atri;
2. il *setto atrioventricolare*: interposto tra l'estremità inferiore dell'atrio destro e quella superiore del ventricolo sinistro;
3. il *setto interventricolare*: posizionato inferiormente, divide i due ventricoli.

Le superfici interne degli atri e dei ventricoli presentano delle caratteristiche strettamente correlate alla funzione svolta. L'organizzazione di base

è comune, tuttavia esistono sostanziali differenze strutturali tra la parte sinistra e la parte destra del cuore. Analoghe considerazioni possono essere espresse in relazione agli apparati valvolari atrioventricolari ed arteriosi.

1.2.3.1 Le cavità atriali

Gli atri presentano una forma globosa, approssimabile ad un cuboide dotato di cinque pareti: possiedono una *parete laterale*, una *mediale*, una *superiore*, una *posteriore* ed una *anteriore* mancando tuttavia della *parete inferiore*, la quale risulta essere sostituita dall'*orifizio atrioventricolare*, attraverso cui entrano in comunicazione con il sottostante ventricolo. Tali pareti presentano uno spessore medio di 1 mm [33], notevolmente ridotto rispetto allo spessore delle relative pareti ventricolari.

La superficie interna degli atri appare liscia e regolare nella porzione di parete compresa tra lo sbocco delle grandi vene, mentre lateralmente ed anteriormente assume un aspetto trabecolato, il cui massimo sviluppo viene raggiunto all'interno delle auricole.

Il *setto interatriale* separa le due cavità atriali ed è disposto su un piano obliquo orientato da dietro in avanti e da destra a sinistra. Tale setto si assottiglia nella porzione inferoposteriore, ove assume il nome di *parte membranacea del setto interatriale*, in quanto costituito prevalentemente da tessuto connettivo fibroso.

L'atrio destro La cavità dell'atrio destro (Figura 1.10) presenta uno sviluppo prevalentemente verticale. In esso la porzione di superficie liscia (*seno venoso* o *seno delle vene cave*) risulta essere nettamente separata dalla porzione trabecolata attraverso una sporgenza, la *cresta terminale*, corrispondente sulla superficie del cuore al solco terminale. Da quest'ultima origina ad angolo retto una serie di rilievi muscolari, verticali e paralleli tra loro, definiti *muscoli pettinati*, i quali costituiscono la parete laterale dell'atrio destro.

La parete mediale, formata dal setto interatriale e dal setto atrioventricolare inferiormente, presenta nella sua regione membranacea una depressione allungata in senso verticale, detta *fossa ovale*.

Sulla parete superiore è presente l'ampio orifizio della vena cava superiore, mentre sulla parete inferiore è situato, in asse con il precedente, l'orifizio della vena cava inferiore, il cui contorno anteroinferiore è circondato da una

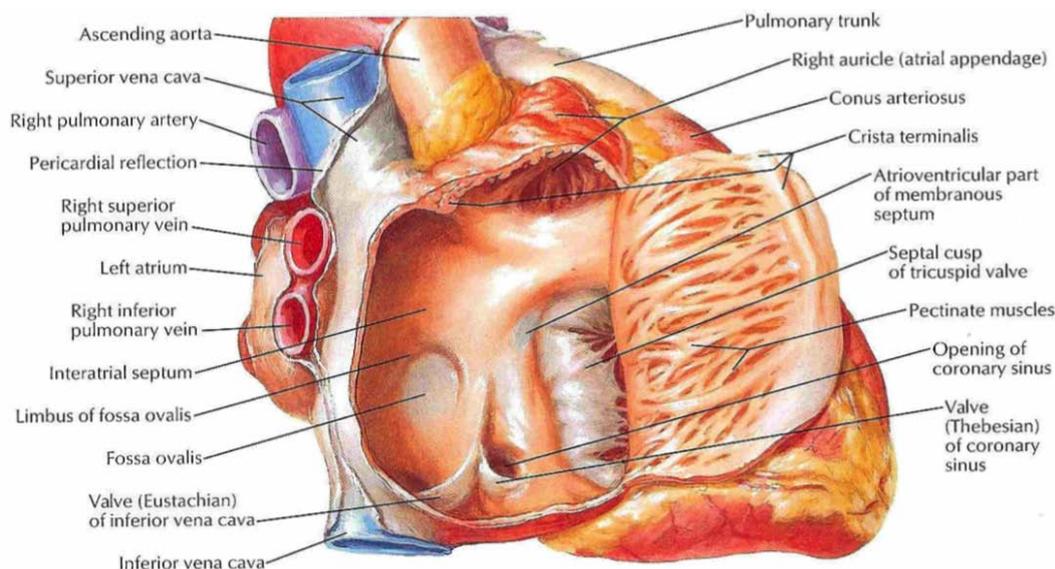


Figura 1.10: L'atrio destro aperto: vista laterale destra (Netter [36]).

piccola valvola incontinente, la *valvola della vena cava inferiore* o *valvola di Eustachio*. Sottostante e alla sinistra dell'orifizio della vena cava inferiore vi è lo sbocco del *seno coronarico*, anch'esso provvisto di una valvola incontinente, detta *valvola del seno coronarico* o *valvola di Tebesio*, la quale impedisce il reflusso di sangue all'interno del seno stesso durante la sistole atriale. Il seno coronarico trasporta all'atrio destro la maggior parte del sangue refluo dalle pareti del cuore. I due lembi valvolari presentano commisure dalle quali origina un sottile cordoncino fibroso, detto *tendine di Todaro*, il quale decorrendo al di sotto dell'endocardio perviene alla base del setto interatriale ove forma, assieme alla linea di inserzione del lembo settile della valvola tricuspide, il vertice del *triangolo di Koch*. Quest'ultimo rappresenta uno dei punti di repere per il *nodo atrioventricolare*.

La parete anteriore si protrae in avanti all'interno dell'auricola destra, la cui parete è rivestita di trabecole muscolari che si intersecano tra loro.

Nella parete dell'atrio destro sono inoltre presenti degli orifizi puntiformi, dovuti agli orifizi delle *vene minime* o *vene di Tebesio*, ed altri orifizi di dimensioni leggermente maggiori che rappresentano lo sbocco delle *vene cardiache anteriori*.

L'atrio sinistro La cavità dell'atrio sinistro (Figura 1.11) presenta uno sviluppo prevalentemente trasversale e costituisce la camera più posteriore

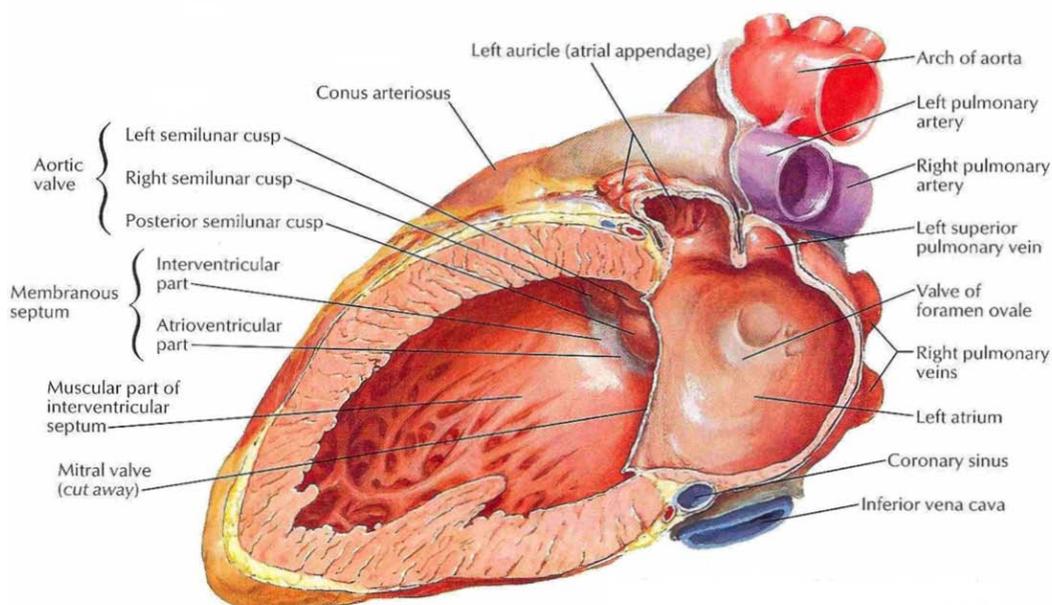


Figura 1.11: *L'atrio sinistro aperto: vista posterolaterale (Netter [36]).*

di quelle che compongono il muscolo cardiaco. Nell'atrio sinistro non è presente una netta separazione tra la porzione di parete a superficie liscia e la porzione trabecolata. In questo caso le trabecole risultano meno pronunciate e con decorso più irregolare rispetto a quelle presenti nell'atrio destro.

Sulla superficie liscia si trova lo sbocco delle quattro vene polmonari, le quali sono privi di strutture valvolari. Questa porzione di superficie atriale costituisce, assieme alla parte di parete cardiaca posteriore, la parete superiore dell'atrio sinistro.

La parete mediale è costituita dal setto interatriale, sulla cui faccia sinistra è collocata una modesta depressione corrispondente alla fossa ovale.

La parete inferiore corrisponde all'orifizio atrioventricolare sinistro.

La parete anteriore è in rapporto con l'aorta e lateralmente si prolunga in avanti all'interno dell'*auricola sinistra*. Quest'ultima presenta un decorso ad S con numerosi restringimenti ed è rivestita internamente da trabecole muscolari.

Analogamente all'atrio destro, sulla parete dell'atrio sinistro si trovano minuscoli orifizi rappresentanti lo sbocco delle *vene minime* o *vene di Tebesio*.

1.2.3.2 Le cavità ventricolari

Le cavità ventricolari presentano una struttura di base comune ed una forma approssimativamente conoidale, con un apice anteroinferiore ed una base posterosuperiore, coincidente con il pavimento degli atri (Figura 1.12). Le pareti dei *ventricoli* sono di natura muscolare e più spesse nel *ventricolo sinistro* (in media 1-1.5 cm) che nel *ventricolo destro* (in media 0.3 - 0.5 cm) [33, 37].

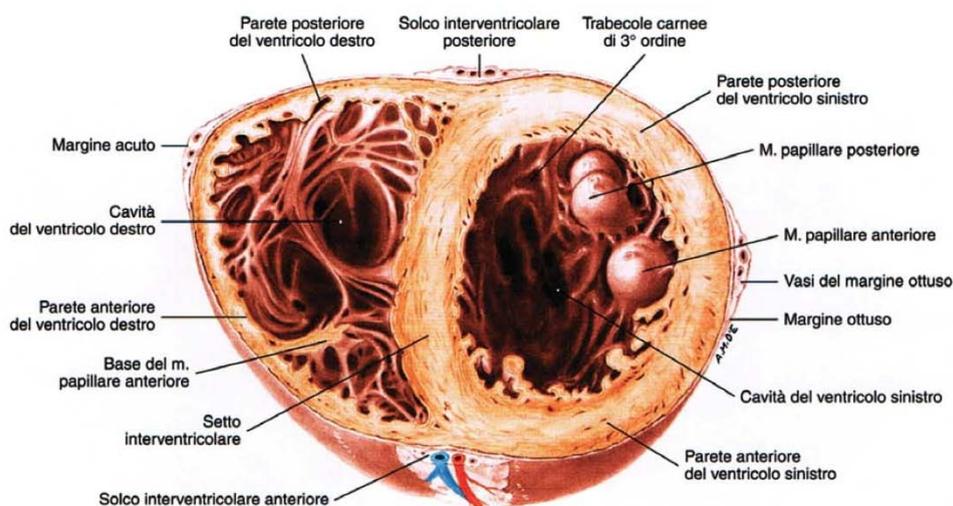


Figura 1.12: Sezione trasversale delle camere ventricolari. I ventricoli sono dotati di pareti muscolari, le quali presentano un'organizzazione strutturale comune. Si noti, tuttavia, il differente spessore di queste ultime, giustificato dalla differente funzione delle due camere (Anastasi et al. [33]).

I ventricoli sono separati tra loro dal *setto interventricolare*. Quest'ultimo presenta una convessità orientata verso la cavità del ventricolo destro e subisce un ispessimento verso l'apice del cuore. La struttura è prevalentemente muscolare, infatti presenta un'unica zona connettivale, posizionata superoposteriormente, detta *parte membranacea del setto interventricolare*.

In corrispondenza della base di ciascun ventricolo si aprono due ampi orifizi: l'*orifizio atrioventricolare* od *ostio venoso*, il quale collocato all'indietro mette in comunicazione la camera ventricolare con la corrispondente camera atriale, e l'*orifizio arterioso* od *ostio arterioso*, che posizionato in avanti collega la camera ventricolare alla corrispondente arteria (*polmonare* nel caso di *ventricolo destro*, *aorta* nel caso di *ventricolo sinistro*). La porzione di cavità ventricolare rivolta verso l'orifizio atrioventricolare riceve il sangue dall'atrio e per tale motivo viene detta *porzione di afflusso*. Al con-

trario, la porzione di ventricolo rivolta verso l'orifizio arterioso spinge il sangue nella direzione dell'arteria e per questo motivo viene detta *porzione di efflusso*. Pertanto, in ciascuna cavità, il flusso ematico subisce un'inversione nella direzione di scorrimento, in quanto il sangue scende dall'atrio attraverso la porzione di afflusso, riempie la zona centroapicale del ventricolo e risale verso la porzione di afflusso uscendo dal ventricolo attraverso l'arteria da esso emergente.

I due *orifizi atrioventricolari* sono dotati ciascuno di una valvola atrioventricolare, di natura fibrosa, che si congiunge al contorno dell'orifizio stesso e, quando aperta, protrudente all'interno della cavità ventricolare come a formare un imbuto. Sono dette *valvole a lembi* o *valvole a cuspidi*, in quanto in prossimità dell'attacco, la valvola si estende con continuità, e allontanandosi da questo si sfrangia, seguendo dei tagli longitudinali, in lembi trapezoidali o triangolari detti *cuspidi*. La valvola atrioventricolare destra, possiede tre cuspidi e per questa ragione viene detta *valvola tricuspide* (Figura 1.13), la valvola atrioventricolare sinistra possiede due cuspidi e pertanto viene detta *valvola bicuspid* o *valvola mitrale* (Figura 1.14).

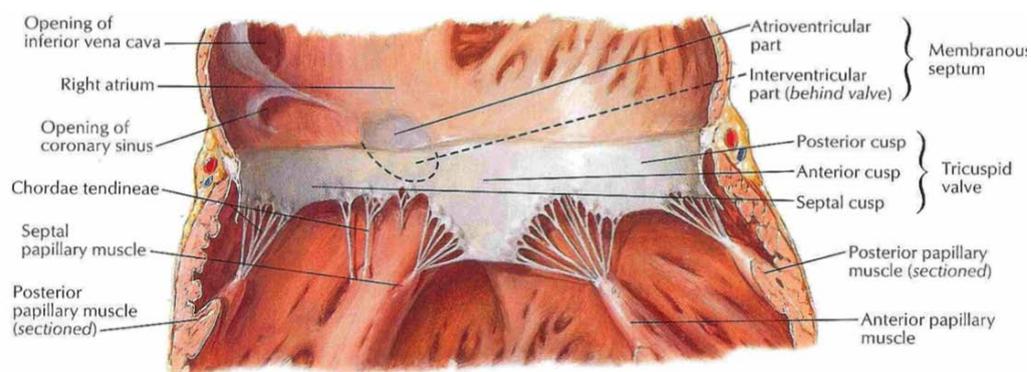


Figura 1.13: *Valvola atrioventricolare destra: la valvola tricuspide* (Netter [36]).

Durante la fase di contrazione cardiaca, la pressione all'interno della camera ventricolare aumenta provocando il sollevamento della valvola atrioventricolare ed il conseguente contatto delle facce assiali delle cuspidi, in prossimità dei margini, le quali chiudono il rispettivo orifizio impedendo il reflusso di sangue negli atri. L'ulteriore sollevamento viene impedito dall'apparato di tensionamento della valvola. Nella chiusura della valvola, le cuspidi non entrano in contatto tra loro attraverso il margine libero, il quale



Figura 1.14: *Valvola atrioventricolare sinistra: la valvola bicuspide o valvola mitrale (Netter [36]).*

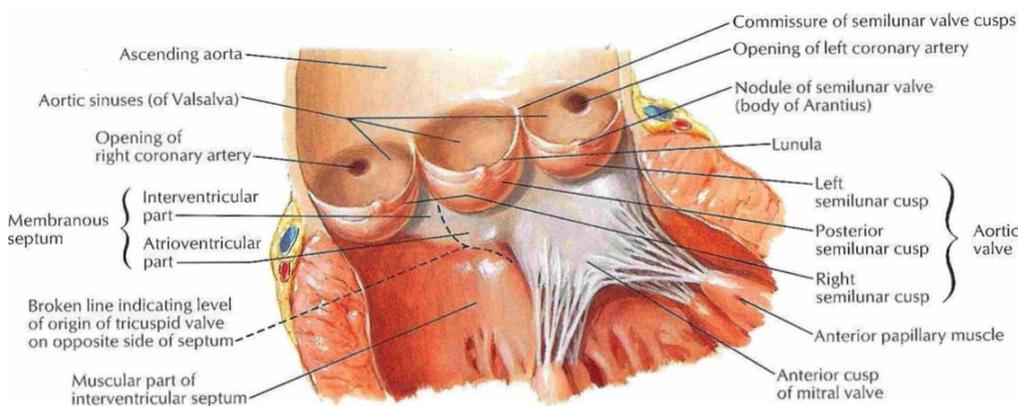


Figura 1.15: *Valvola arteriosa sinistra: la valvola aortica (Netter [36]).*

è occupato dall'inserzione delle corde tendinee, bensì secondo una *linea di chiusura*, situata sulla faccia assiale e separata di alcuni millimetri dal margine libero. Durante la fase di dilatazione o diastole dei ventricoli si aprono, permettendo quindi la discesa del sangue dagli atri nei ventricoli.

Gli *orifizi arteriosi* possiedono una valvola di natura fibrosa formata da tre pieghe membranose aventi l'aspetto di una tasca a nido (*semilune*) di rondine, concave superiormente e collocate in corrispondenza della giunzione fra porzione di efflusso di ciascun ventricolo e l'origine della rispettiva arteria, ove è collocato l'anello fibroso circondante l'orifizio. Per tale motivo sono dette *valvole semilunari* o *valvole a nido di rondine*.

Le valvole semilunari chiudono gli orifizi arteriosi durante le diastole ventricolari, avvicinando reciprocamente i loro margini ed impedendo il re-flusso di sangue dalle arterie nei ventricoli, e si aprono durante le sistole

ventricolari, permettendo il passaggio del sangue dai ventricoli alle arterie. Anche in questo caso la linea di chiusura non corrisponde al margine libero, ma ad una linea situata sulla faccia convessa a pochi millimetri dal margine libero. Fra quest'ultimo e la linea di chiusura, si trovano le lunule, le quali occasionalmente possono presentare delle fenestrature. La particolare robustezza strutturale delle cuspidi impedisce, in generale, il loro ribaltamento verso la cavità ventricolare rendendo quindi non necessaria la presenza di un sistema di ancoraggio.

Come già accennato, le quattro valvole cardiache sono collocate approssimativamente su uno stesso piano, obliquo da sinistra a destra e dall'alto in basso, detto *piano valvolare*. Tale piano corrisponde alla giunzione atrio-ventricolare, la quale è segnalata sulla superficie cardiaca attraverso il solco coronarico. Il piano valvolare comprende lo scheletro fibroso (si veda il Capitolo 2) e su di esso, in senso anteroposteriore, sono collocate la valvola polmonare, la valvola aortica (Figura 1.15), la valvola tricuspide e la valvola mitrale (Figura 1.16 e 1.17).

All'interno delle cavità ventricolari vi sono numerosi rilievi muscolari che sporgono dalle pareti stesse variamente disposti, detti *trabecole carnee*. Queste ultime sono suddivise in ordini a seconda del loro assetto rispetto alla parete ventricolare: si definiscono *trabecole del III ordine* se aderiscono alle pareti per l'intera lunghezza, *trabecole del II ordine* se si congiungono alle pareti con le sole estremità e lasciando libera la propria estensione, e *trabecole del I ordine* se si impiantano alla parete con una sola estremità proiettando l'estremità libera all'interno della cavità. Le trabecole carnee del I ordine sono dette anche *muscoli papillari*, presentano una forma approssimativamente conica e possiedono una base, connessa alle pareti ventricolari, ed un apice dal quale ramificandosi emettono numerosi tendinetti costituiti da tessuto fibroso denso, detti *corde tendinee*. Queste ultime ramificano progressivamente, inserendosi sui margini liberi e sulle facce parietali delle cuspidi delle valvole atrioventricolari. Talvolta le corde tendinee originano dalle stesse pareti ventricolari in maniera diretta. La funzione delle corde tendinee è quella di limitare il sollevarsi delle cuspidi, in modo da evitare che queste si rovescino all'interno degli atri durante la chiusura della valvola (sistola ventricolare). Per tale motivo, assieme ai muscoli papillari, costituiscono l'*apparato di tensione* o *apparato di ancoraggio valvolare*.

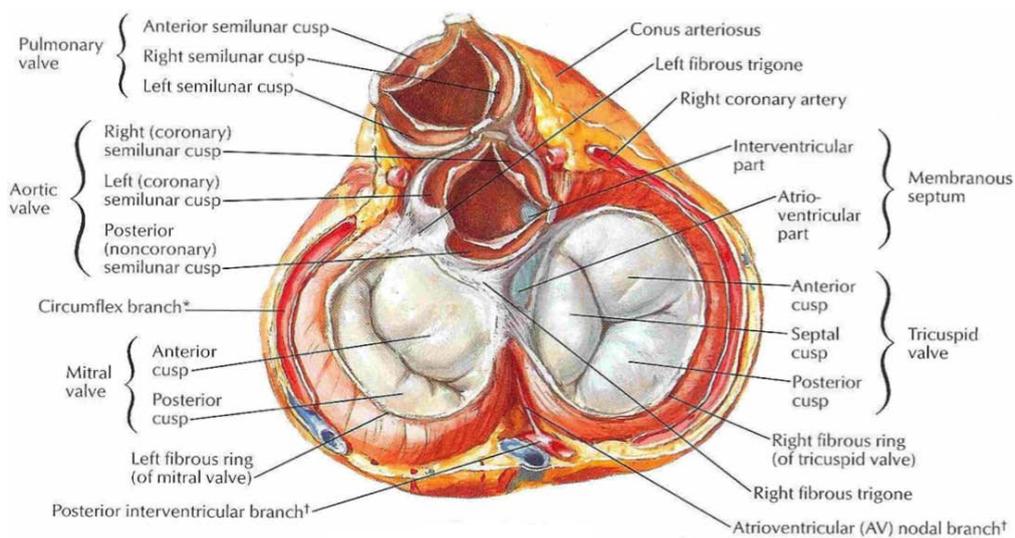


Figura 1.16: Piano valvolare durante le sistole ventricolari (Netter [36]).

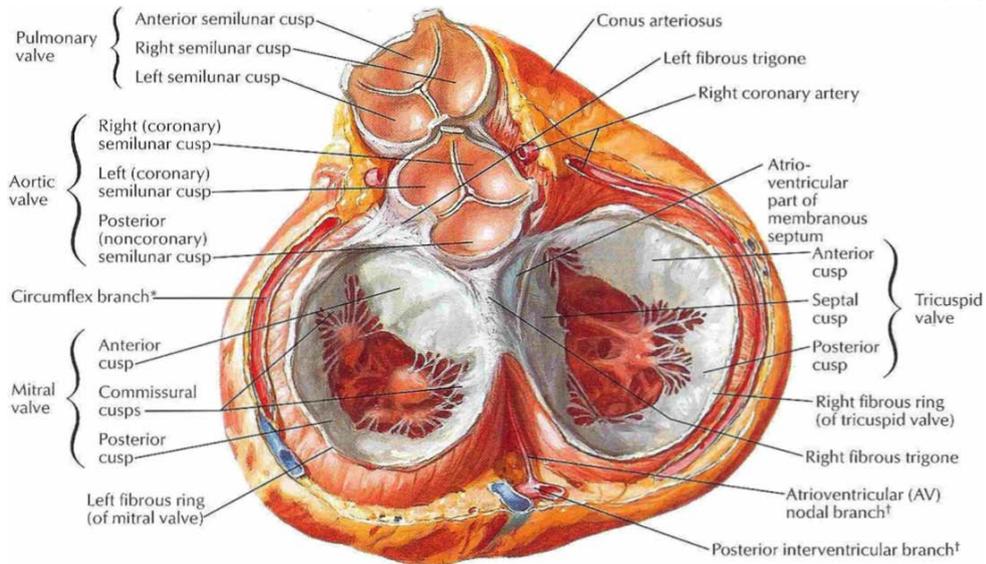


Figura 1.17: Piano valvolare durante le diastole ventricolari (Netter [36]).

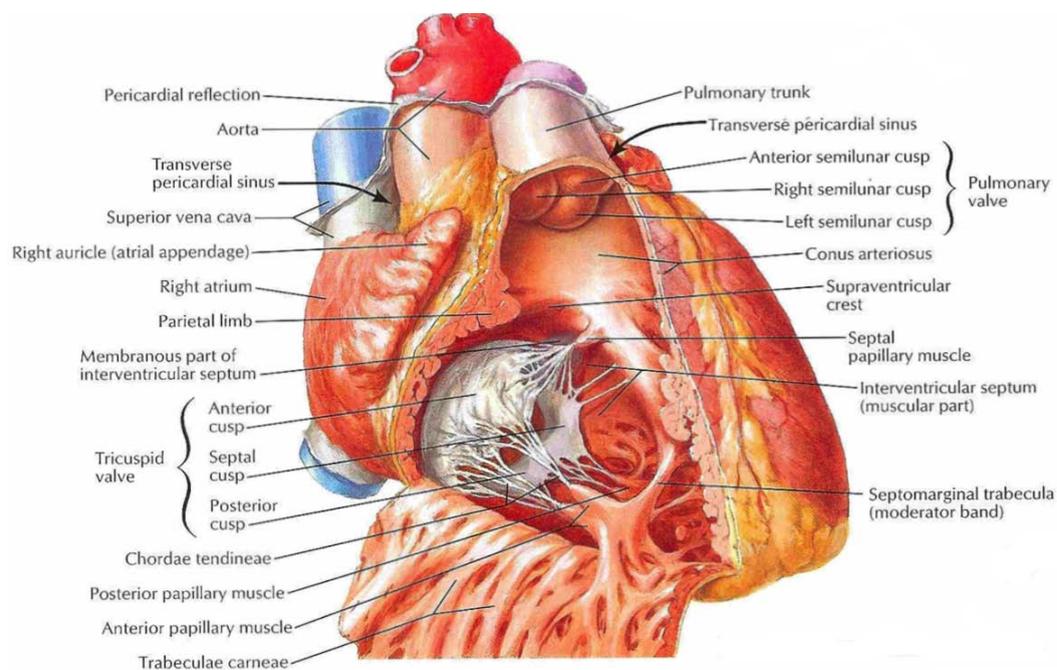


Figura 1.18: Il ventricolo destro aperto: vista anteriore (Netter [36]).

Il ventricolo destro La cavità ventricolare destra è dotata di tre pareti (Figura 1.18):

una *parete anteriore* concava e corrispondente alla faccia sternocostale del cuore;

una *parete posteriore* pianeggiante, appiattita e corrispondente alla porzione destra della faccia diaframmatica del cuore;

una *parete mediale* costituita dal setto interventricolare e convessa.

A causa della conformazione della parete mediale, in sezione trasversale la cavità ventricolare destra possiede una forma semilunare disposta in modo tale da abbracciare il ventricolo sinistro, il quale presenta invece un lume circolare. Possiede inoltre una *base* posizionata superiormente e sulla quale si aprono l'*orifizio atrioventricolare destro*, posteriormente, e l'*orifizio arterioso destro* o *orifizio dell'arteria polmonare*, anteriormente e su un piano più elevato.

L'*orifizio atrioventricolare destro* presenta un contorno ovale con una circonferenza di 12 cm [33]. È dotato di un apparato valvolare costituito dalla *valvola tricuspide*, i cui lembi, parzialmente fusi tra loro in corrispondenza della loro base di impianto, sono distinti in *anteriore*, *posteriore* e *mediale*.

Le rispettive *corde tendinee* provengono da tre *muscoli papillari* anch'essi distinti in *anteriore* o *grande muscolo papillare*, *posteriore*, i quali nascono in prossimità dell'apice, e *mediale*. Le *corde tendinee* del *papillare anteriore* raggiungono le cuspidi anteriore e posteriore, quelle del *papillare posteriore* le cuspidi posteriore e mediale. Il *papillare mediale*, il quale si solleva dalla parete ventricolare, invia le proprie *corde tendinee* alle cuspidi mediale e anteriore.

L'orifizio polmonare è circolare con una circonferenza di 7 cm [33] e possiede una *valvola semilunare* costituita da tre cuspidi, di cui una *anteriore* e due *posteriori*, *destra* e *sinistra* rispettivamente.

Tra i due orifizi è presente un rilievo muscolare denominato *cresta sopraventricolare* la quale separa la porzione di afflusso e di efflusso del ventricolo sinistro. Infatti il *ventricolo destro* è suddivisibile in due porzioni: la prima posteriore e sottostante l'*orifizio atrioventricolare*, è detta *parte venosa del ventricolo destro* e durante le diastole ventricolari è attraversata dalla corrente sanguigna in maniera discendente verso il ventricolo stesso; la seconda anteriore e sottostante l'orifizio dell'*arteria polmonare*, è detta *cavità del cono arterioso* e durante le sistole ventricolari è percorsa dalla corrente sanguigna in maniera ascendente verso l'orifizio arterioso. La comunicazioni tra le due parti è condotta attraverso una sorta di orifizio, il quale è limitato superiormente dal contorno inferiore della cuspidi anteriore della *valvola tricuspide*, inferiormente dalla *trabecola settomarginale* e lateralmente dal *muscolo papillare anteriore* e dalle sue *corde tendinee*. Nel ventricolo destro le porzioni di afflusso e di efflusso sono collocate ad una distanza relativamente discreta. Per questo motivo l'inversione di marcia del flusso ematico in questa cavità è moderatamente ampio.

La superficie interna del ventricolo destro presenta un aspetto trabecolato nella porzione centroapicale, dove sono presenti numerose trabecole carnee del III ordine variamente intrecciate. Tuttavia la presenza delle trabecole diminuisce nella porzione di afflusso e la parete appare completamente liscia nella porzione di efflusso corrispondente al cono arterioso o polmonare. Inoltre la camera ventricolare è attraversata da una consistente *trabecola carnea del II ordine*, detta *trabecola settomarginale* o *trabecola arcuata di Leonardo Da Vinci*, che diparte dalla *cresta sopramarginale*, robusto rilievo muscolare arcuato della parete mediale del ventricolo, e discende fino a raggiungere la base del *muscolo papillare anteriore*.

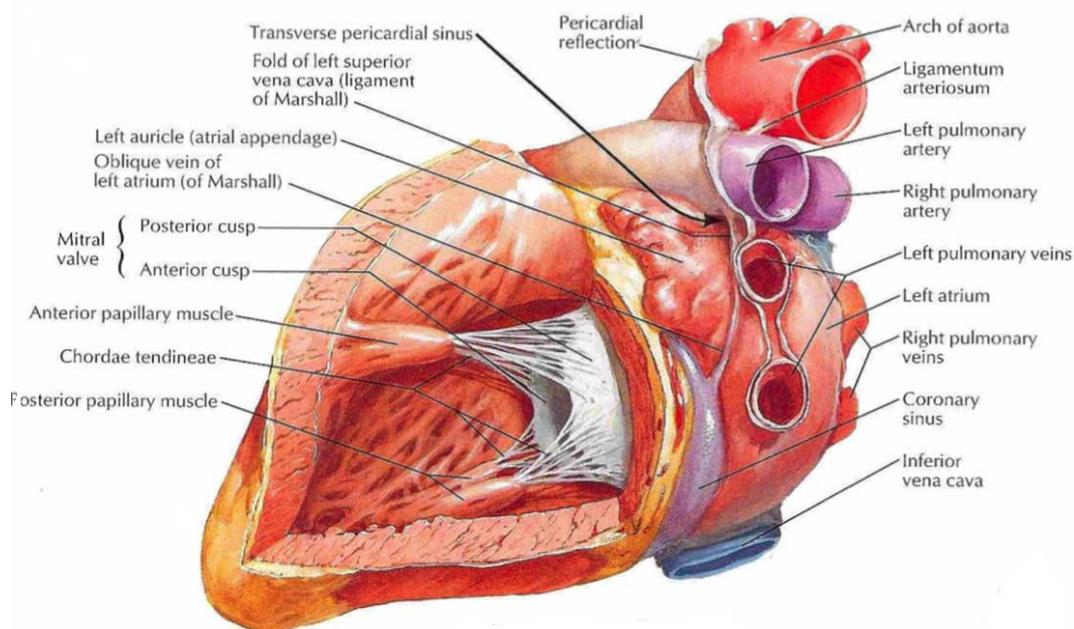


Figura 1.19: Il ventricolo sinistro aperto: vista posterolaterale (Netter [36]).

Il ventricolo sinistro La cavità ventricolare sinistra è dotata di due pareti concave: una *parete anteromediale*, costituita dal *setto interventricolare* ed in piccola parte dal *setto atrioventricolare*, ed una *parete posterolaterale*, corrispondente alla *faccia sternocostale*, al *marginine ottuso* ed alla *faccia diaframmatica* (Figura 1.19). Presenta inferiormente un *apice* e superiormente una *base*, in corrispondenza della quale si aprono l'*orifizio atrioventricolare sinistro*, posteriormente, e l'*orifizio arterioso sinistro* od *orifizio dell'aorta*, anteriormente.

L'*orifizio atrioventricolare sinistro* possiede un contorno ovale con una circonferenza di circa 10 - 12 cm [33] in media. È fornito della *valvola bicuspidale* o *valvola mitrale*, le cui cuspidi sono distinte in *anteromediale*, che si inserisce su meno della metà della circonferenza dell'anello fibroso e presenta una notevole altezza, e *posterolaterale*, che presenta una base di impianto più ampia ed una minore altezza. Le cuspidi, attraverso le *corde tendinee*, sono collegate a due *muscoli papillari* (*anteriore* e *posteriore*), connessi alla parete del ventricolo in corrispondenza dell'apice. Il *muscolo papillare anteriore* estende le proprie *corde tendinee* alle metà anteriori delle due cuspidi, quello *posteriore* alle metà posteriori.

L'*orifizio dell'aorta* presenta un contorno circolare con una circonferenza di circa 7cm [33] possiede, anch'essa, una *valvola semilunare* dotata di tre cuspidi: due *anteriori, destra e sinistra* rispettivamente, ed una *posteriore*. Le cuspidi anteriori sono denominate *semilune coronariche*, in quanto subito al di sopra di esse trovano origine, dai rispettivi seni aortici dell'aorta ascendente, le arterie coronarie destra e sinistra. Per questo motivo la semiluna posteriore prende anche il nome di *semiluna non coronarica*. La cuspidi anteriore della valvola mitrale presenta stretti rapporti di continuità con la semiluna posteriore della valvola aortica a causa di una saldatura esistente in questa sede tra l'anello fibroso dell'orifizio atrioventricolare e quello dell'orifizio aortico.

Analogamente alla cavità destra, il *ventricolo sinistro*, è scomponibile in due parti: la prima, posteriore, è sottostante all'*orifizio atrioventricolare*, viene detta *parte venosa del ventricolo sinistro* ed al suo interno, durante la diastole ventricolare, il sangue è discendente verso il ventricolo, la seconda, anteriore, è collocata al di sotto l'*orifizio aortico*, viene detta *canale aortico* e, durante la sistola ventricolare, la corrente del sangue è ascendente verso l'orifizio stesso. La comunicazione tra le due parti avviene attraverso un orifizio limitato dal margine inferiore della cuspidi anteromediale della *valvola bicuspidi*, superiormente, dai *muscoli papillari anteriore e posteriore* e dalle corde tendinee, rispettivamente anteriormente e posteriormente. La cuspidi anteromediale della *valvola bicuspidi* presenta una faccia parietale liscia, contrariamente a quella delle altre cuspidi, in quanto si trova interposta tra la *parte venosa del ventricolo sinistro* ed il *canale aortico* e quindi viene lambita su entrambi i lati dalla corrente sanguigna. La faccia parietale inoltre non offre attacco alle *corde tendinee* le quali si impiantano sui margini della cuspidi stessa. In questa cavità esiste uno stretto rapporto di vicinanza tra la valvola mitrale e la valvola aortica, inoltre non sono presenti strutture di separazione tra la porzione di afflusso e quella di efflusso paragonabili a quelle presenti nel ventricolo destro: ne consegue che in questo caso il raggio di curvatura necessario per l'inversione di marcia del flusso sanguigno è minore.

1.3 I vasi del cuore

La circolazione coronarica provvede a rifornire il tessuto muscolare cardiaco di ossigeno e nutrienti. Tale circolazione è costituita da un'estesa rete di vasi coronarici i quali si dipartono a partire da due arterie principali, le due *arterie coronarie*, le quali a loro volta originano alla base dell'aorta (Figura 1.20). Al circolo coronarico è destinato circa il 5% della gittata cardiaca [33] ed il sangue refluo viene raccolto da tre sistemi venosi.

1.3.1 Le arterie coronarie

Come descritto in precedenza, le arterie coronarie destra e sinistra originano dall'aorta ascendente in corrispondenza dei seni arteriosi, rispettivamente destro e sinistro, immediatamente al di sopra delle semilune destra e sinistra della valvola aortica (Figura 1.21). Il calibro delle due arterie è molto simile, circa 3 - 4 mm, anche se talvolta la coronaria sinistra presenta un diametro leggermente maggiore [33].

Le arterie coronarie e loro ramificazioni principali decorrono sulla superficie esterna del muscolo cardiaco, all'interno dei solchi coronario e interventricolare, talvolta circondate da accumuli di tessuto adiposo. I rami più sottili, al contrario, si approfondano nello spessore cardiaco risolvendosi nelle reti di capillari all'interno del connettivo interstiziale, dove possono contrarre parziali anastomosi fra loro. I principali collegamenti tra le due arterie coronarie sono situati in corrispondenza del setto interventricolare ed a livello della parete anteriore degli atri.

La circolazione coronarica si svolge prevalentemente durante la fase diastolica del cuore, in quanto durante la fase sistolica i rami coronarici risultano essere compressi a causa del notevole aumento di tensione nella muscolatura cardiaca.

Arteria coronaria destra. Irrora la maggior parte della parete dell'atrio e del ventricolo destri, la parte posterolaterale del ventricolo sinistro corrispondente alla faccia diaframmatica del cuore e la metà posteriore del setto del cuore (Figura 1.22). Successivamente alla sua origine alla base dell'aorta ascendente, la coronaria destra prosegue sulla sinistra attraverso l'auricola destra ed il tronco polmonare, immettendosi nel solco coronario posto sulla faccia sternocostale del cuore. Decorrendo sulla destra lungo que-

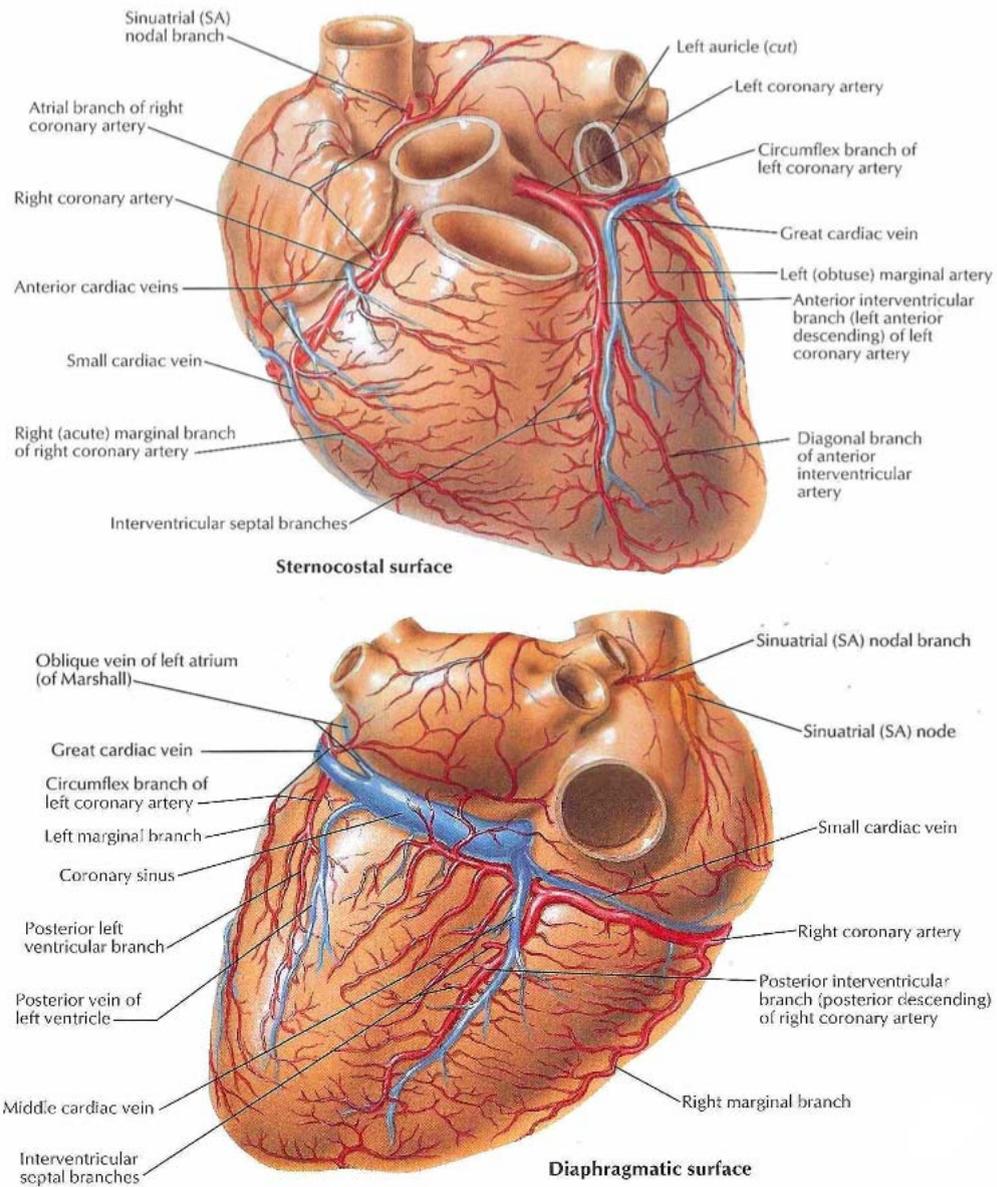


Figura 1.20: Le arterie coronarie e le vene cardiache (Netter [36])

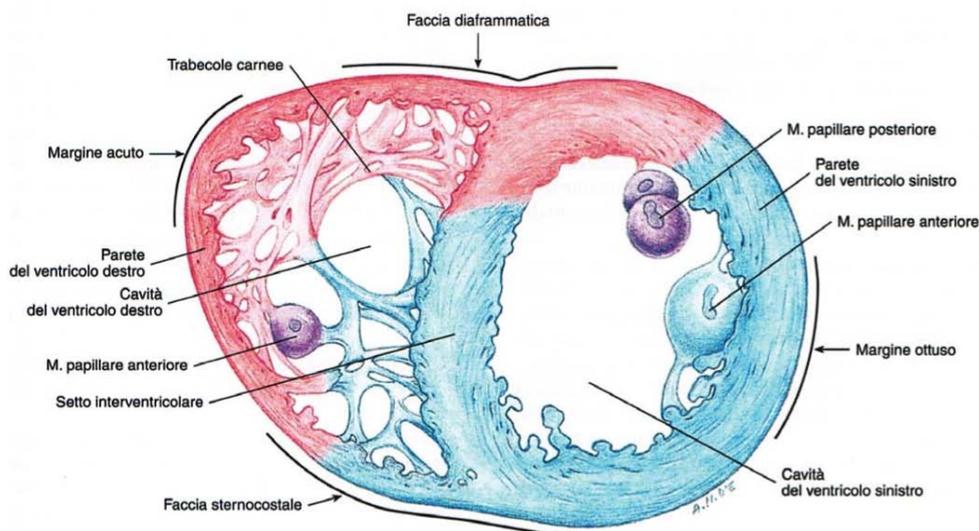


Figura 1.21: Distribuzione delle arterie coronarie destra (in rosso) e sinistra (in blu). L'arteria coronaria destra irrorla la maggior parte del ventricolo e dell'atrio destro, la porzione posterolaterale del ventricolo sinistro e la metà posteriore del setto del cuore. Mentre, l'arteria coronaria sinistra irrorla la maggior parte delle pareti dell'atrio e del ventricolo sinistri, una parte del ventricolo destro e la metà anteriore del setto del cuore (Anastasi et al. [33]).

st'ultimo, raggiunge il margine acuto del cuore, in corrispondenza del quale si distacca il *ramo del margine acuto*, il quale discende lungo il margine stesso costituendo il ramo maggiore dell'arteria coronaria destra. Circondando il margine acuto, prosegue nel solco coronarico sulla faccia diaframmatica fino a raggiungere l'estremità superiore del solco longitudinale posteriore. In quest'ultimo si immette, per poi discendere, il *ramo discendente posteriore* che ne costituisce il ramo terminale.

Nello specifico i rami collaterali che l'arteria coronaria destra presenta lungo il suo decorso sono:

- *arteria infundibolare*: collocata sulla faccia sternocostale;
- *rami atriali*: solitamente sono 2 o 3 arterie che si distribuiscono sulla parete dell'atrio destro e la prima delle quali può raggiungere (con probabilità pari al 55% [33]) il nodo senoatriale (*arteria del nodose-noatriale*);
- *rami ventricolari*: sono brevi e distribuiti sulla faccia sternocostale del ventricolo destro, in particolare uno di questi decorre lungo il margine

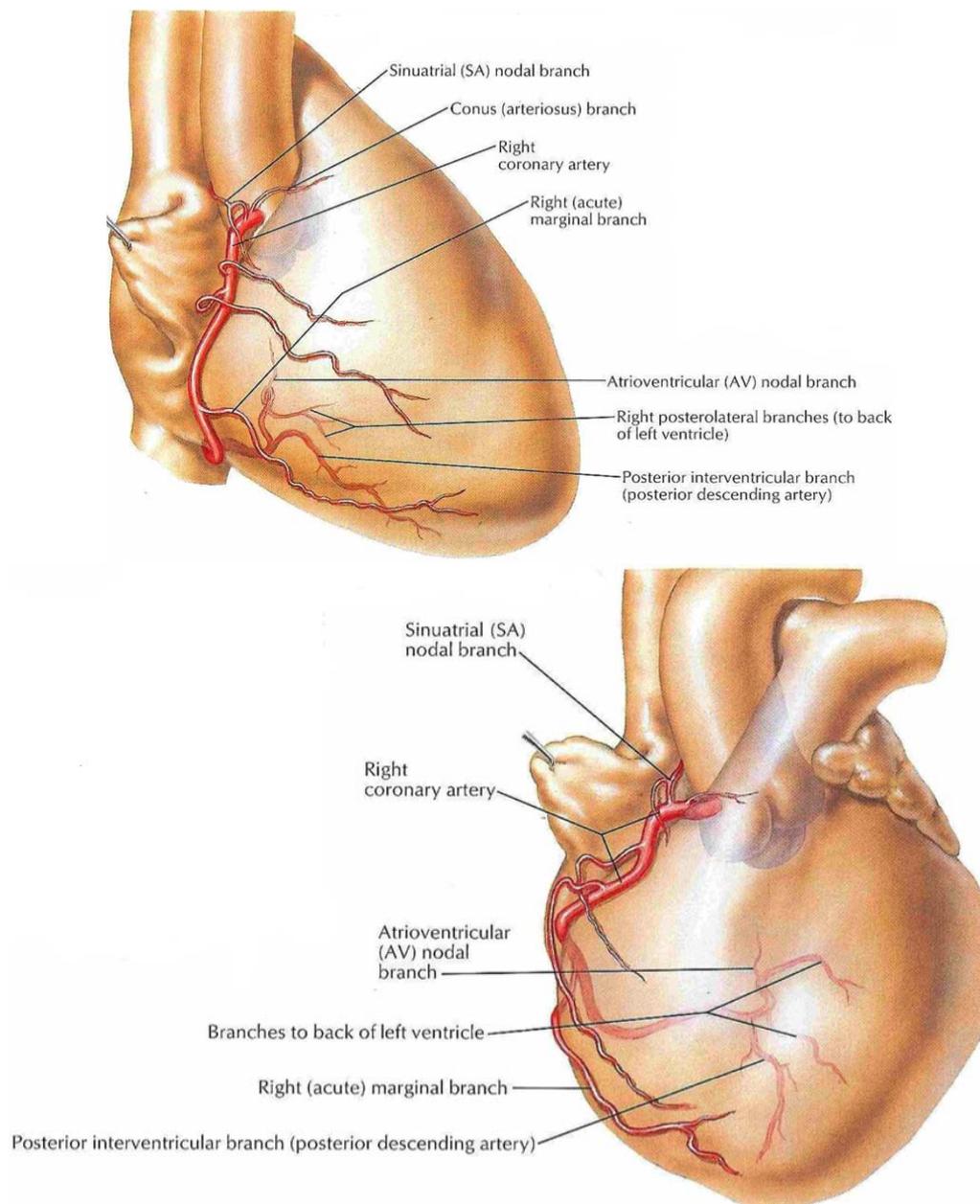


Figura 1.22: L'arteria coronaria destra: vista anteriore destra e sinistra (Netter [36]).

acuto fino ad avvicinarsi al margine del cuore (*arteria del margine acuto*);

- *rami atriali e ventricolari*: sono originati durante il decorso posteriore e sono di piccole dimensioni;
- *arteria del nodo atrioventricolare*: la quale si approfondisce per raggiungere la regione del nodo;
- *arteria interventricolare posteriore*: rappresenta la continuazione dell'arteria coronaria destra, nel suo decorso nel solco interventricolare posteriore fornisce dei rami per le porzioni limitrofe dei ventricoli destro e sinistro e dei rami settali.

Arteria coronaria sinistra Irrora la maggior parte delle pareti dell'atrio e del ventricolo sinistri, una parte del ventricolo destro e la metà anteriore del setto del cuore (Figura 1.23). Successivamente alla sua origine discende sulla faccia sternocostale del cuore raggiungendo l'estremità superiore del solco longitudinale anteriore. In questa regione si suddivide nei suoi due rami termali, ovvero il *ramo discendente anteriore* ed il *ramo circonflesso*. Il primo scende lungo il solco longitudinale anteriore fino all'apice del cuore, fornendo, durante il suo tragitto, dei rami per la faccia sternocostale dei ventricoli destro e sinistro e per il setto interventricolare. Il secondo si immette nel solco coronarico posizionato sulla faccia sternocostale e decorre verso sinistra fino al raggiungimento del margine ottuso del cuore, dove origina il *ramo del margine ottuso* per poi discendere lungo il margine stesso. In questo modo raggiunge la faccia diaframmatica proseguendo nel solco coronario fino a raggiungere l'estremità superiore del solco longitudinale posteriore. Il ramo circonflesso origina diversi rami collaterali che si distinguono in rami ventricolari ed atriali.

1.3.2 Le vene

I tre sistemi venosi che raccolgono il sangue refluo della circolazione coronarica sono:

- il *seno coronarico*: si tratta di un vaso breve e di calibro cospicuo situato nella faccia diaframmatica ed accolto nella parte sinistra del

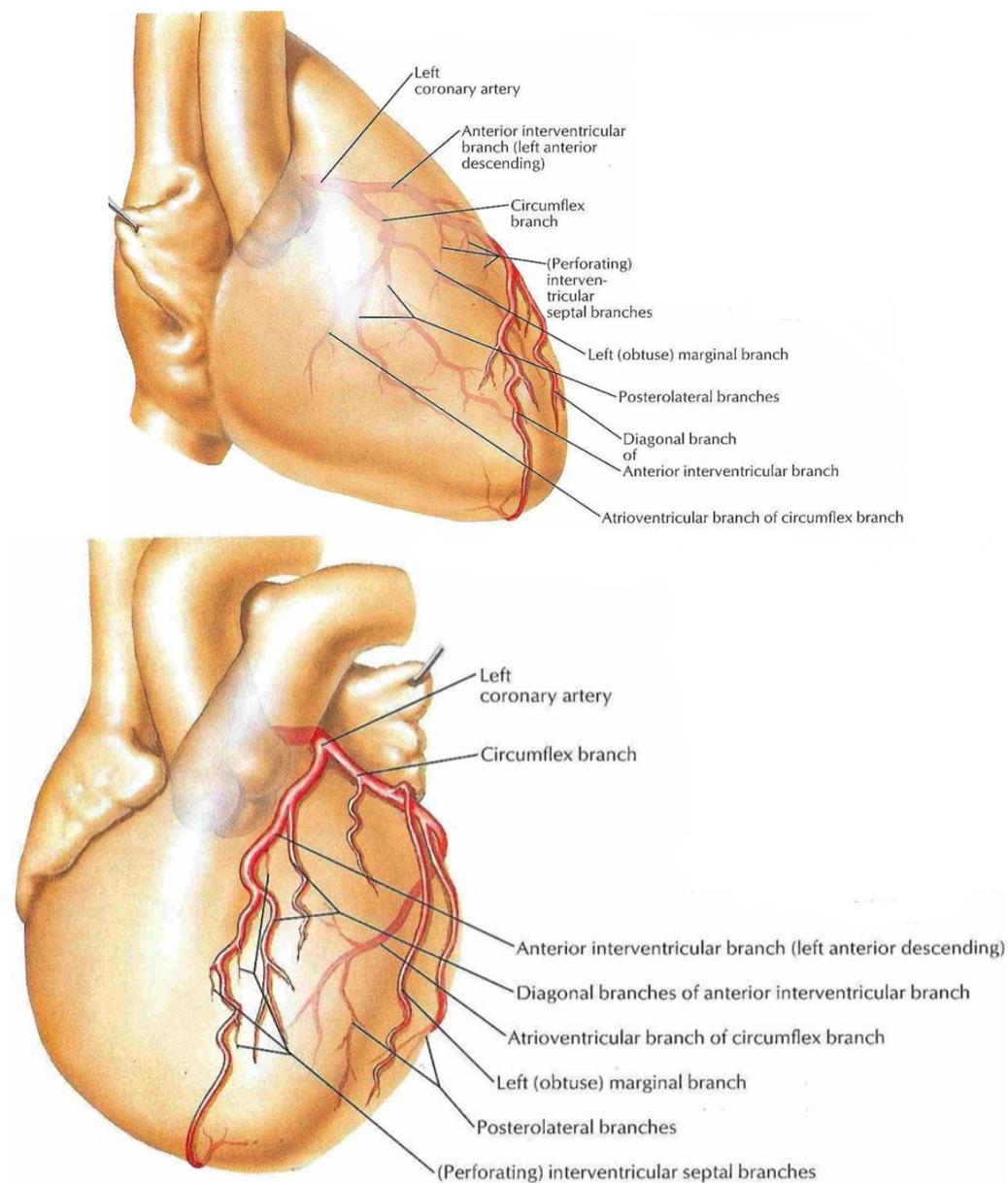


Figura 1.23: L'arteria coronaria sinistra: vista anteriore destra e sinistra (Netter [36]).

solco atrioventricolare. Si apre nell'atrio destro in prossimità del setto interatriale e dello sbocco della vena cava inferiore.

- le *vene cardiache anteriori*: raccolgono il sangue dalla parete sternocostale del ventricolo destro e sboccano nell'atrio destro.
- le *vene minime*: sono venule che raccolgono il sangue refluo da alcuni distretti cardiaci, aprendosi senza un ordine preciso nelle cavità cardiache più vicine.

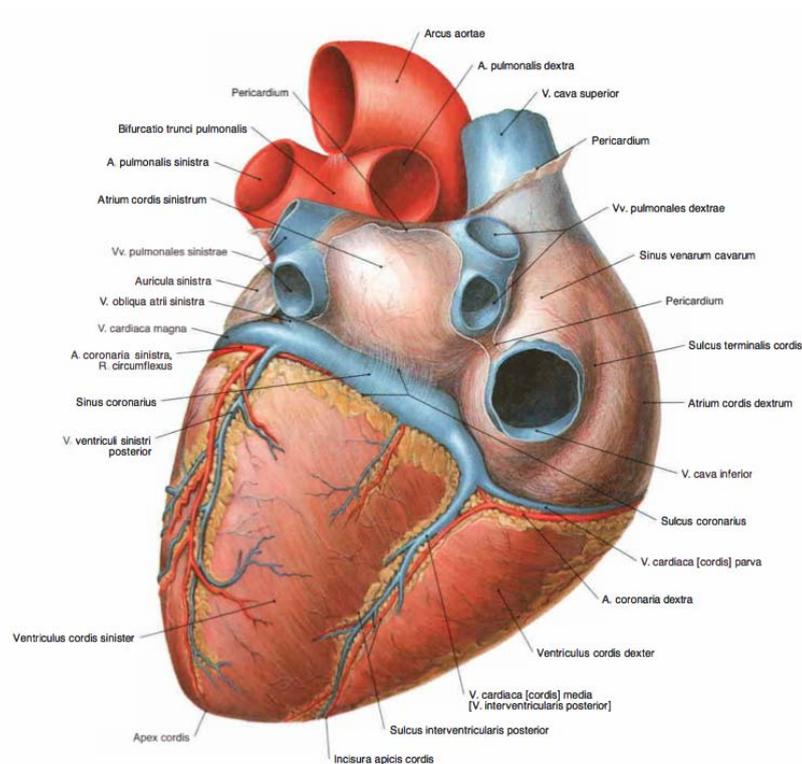


Figura 1.24: Le vene cardiache (Purst et al. [37]).

1.4 Il pericardio

Il *pericardio* è il sacco fibrosiero che contiene e riveste il cuore ed il suo peduncolo vascolare (Figura 1.25). È formato da due porzioni: la prima, esterna di tessuto fibroso, viene definita *pericardio fibroso*, la seconda, interna costituita dal foglietto parietale della sierosa cardiaca, è detta *pericardio sieroso*.

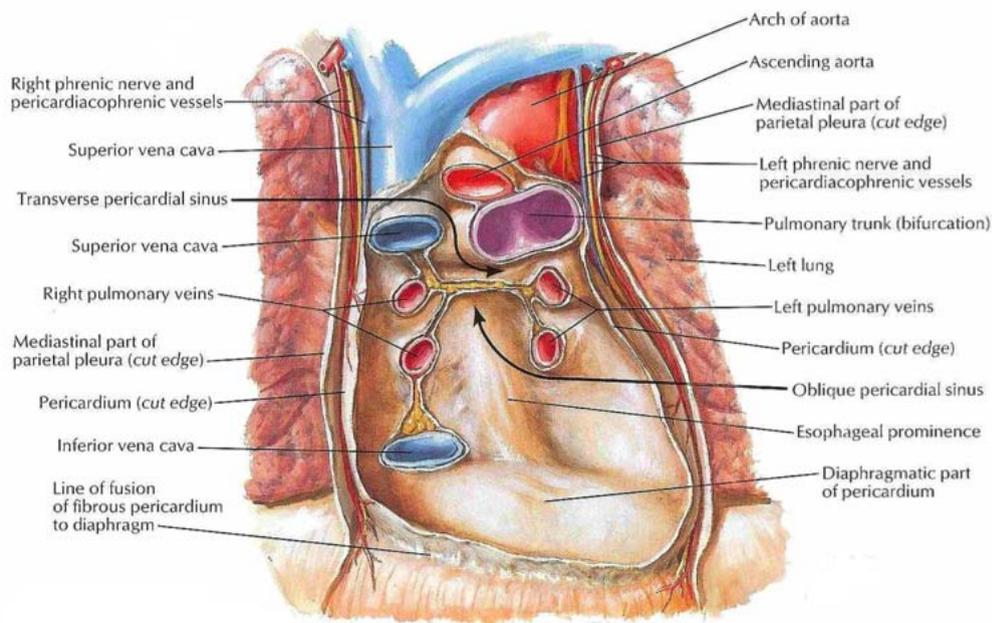


Figura 1.25: Sacco pericardico (Netter [36]).

1.4.1 Il pericardio fibroso

Il pericardio fibroso presenta una forma a tronco di cono in cui la *base* aderisce al centro frenico del diaframma, l'*apice* circonda i grossi vasi che emergono dalla base del muscolo cardiaco, la *faccia anteriore* si rapporta con lo sterno e le cartilagini costali, le *facce laterali* sono in rapporto con le pleure mediastiniche e la *faccia posteriore* è in rapporto con gli organi del mediastino posteriore ed in particolare con l'esofago. Il pericardio fibroso viene mantenuto disteso dalla presenza di aderenze (in corrispondenza della cupola diaframmatica e del peduncolo vascolare) e tratti fibrosi, detti *legamenti del pericardio*, che lo vincolano alle strutture circostanti (quali lo sterno, *legamenti sterno-pericardici*, i corpi delle prime vertebre toraciche, *legamenti vertebro-pericardici*, ed il centro frenico del diaframma, *legamenti freno-pericardici*).

1.4.2 Il pericardio sieroso

Il pericardio sieroso costituisce la membrana sierosa che riveste il cuore e, in quanto tale, presenta un *foglietto parietale*, applicato alla superficie profonda del pericardio fibroso, ed un *foglietto viscerale*, aderente al miocardio, che prende il nome di *epicardio* (si veda il Capitolo 2), costituendo pertanto lo

strato più esterno del cuore. In particolare, il foglietto viscerale riveste il tratto iniziale delle arterie e quello finale delle vene connesse alla base del cuore. I due foglietti si fondono in un unico rivestimento e si riflettono sul pericardio fibroso in corrispondenza della base del cuore. Questo avviene mediante due pieghe: una piega accoglie l'aorta e l'arteria polmonare, l'altra comprende le due vene cave e le quattro vene polmonari.

Tra il foglietto parietale e quello viscerale trova posto la cavità pericardica, la quale è limitata dalla sierosa cardiaca e presenta una superficie liscia e rivestita da un velo liquido (circa 10 - 20 ml [35]) secreto dalla membrana pericardica che funge da lubrificante. Tale cavità favorisce, pertanto, i movimenti del cuore durante la sua attività contrattile limitandone l'attrito conseguente.

Capitolo 2

Anatomia microscopica

Le proprietà meccaniche di una materiale sono strettamente correlata alla struttura e alla composizione dello stesso, la quale a sua volta risulta fortemente dipendente dalla funzione cui quest'ultimo è deputato. Per queste ragioni, si rende necessario trattare in maniera approfondita i costituenti elementari del muscolo cardiaco (quali le cellule muscolari e le componenti della matrice extracellulare) e la loro organizzazione strutturale dal punto di vista della distribuzione, dell'orientazione e dell'eventuale presenza di interconnessione tra le stesse.

Per i riferimenti di questo capitolo, si considerino [41, 42, 43, 44, 45, 46, 47], dove non ci sia la citazione esplicita.

2.1 La struttura della parete cardiaca

La parete cardiaca è costituita da tre *tonache* sovrapposte, le quali si susseguono dall'esterno verso l'interno dell'organo come descritto nel seguito (Figura 2.1).

2.1.1 La tonaca esterna o epicardio

L'epicardio rappresenta il foglietto viscerale del *pericardio sieroso* (si veda il Paragrafo 1.4.2) e riveste l'intera superficie esterna del cuore conferendole un aspetto liscio e traslucido. Dal punto di vista istologico è costituito da due strati:

mesotelio: rappresenta lo strato superficiale, è rivestito da un velo liquido e costituito da un epitelio di rivestimento, pavimentoso semplice, il

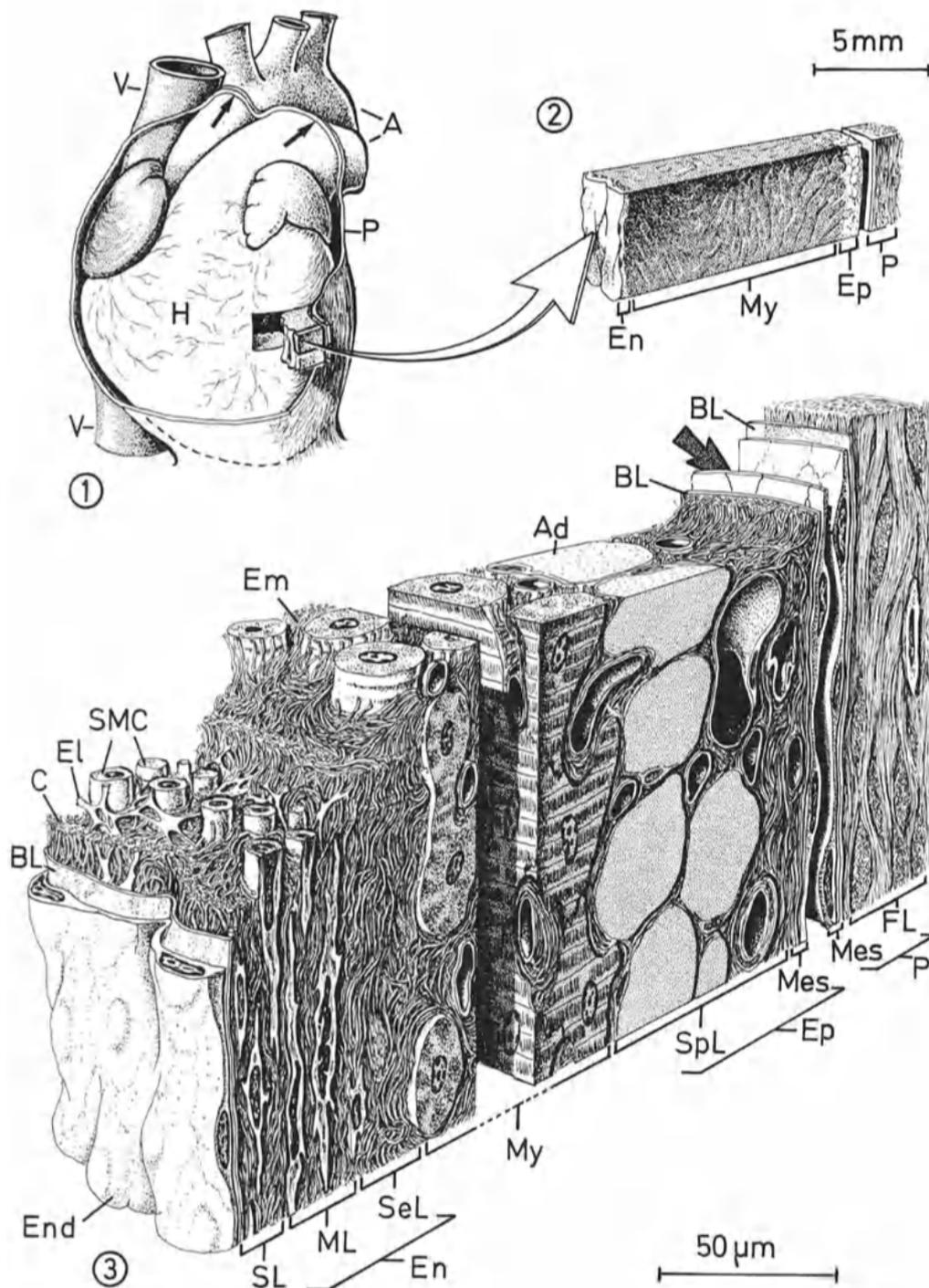


Figura 2.1: Struttura della parete cardiaca. La parete cardiaca si compone di tre tonache: una tonaca esterna o epicardio (Ep), una tonaca media o miocardio (My) ed una tonaca interna o endocardio (En) (Krstić [43]).

quale appoggia su una lamina propria di natura connettivale ricca di fibre elastiche,

strato sottoepicardico: l'epicardio aderisce alla superficie del miocardio attraverso l'interposizione di questo tessuto connettivo nel quale decorrono i rami maggiori dei vasi coronarici del cuore, spesso circondati da accumuli di tessuto adiposo. Si trova in stretta connessione con il tessuto connettivo interstiziale proprio della muscolatura cardiaca.

2.1.2 La tonaca media o miocardio

Il miocardio rappresenta la tonaca di maggiore rilevanza dal punto di vista dello spessore e del significato funzionale. Presenta una natura muscolare, essendo costituito da tessuto muscolare cardiaco, un tipo particolare di tessuto muscolare striato (si veda Paragrafo 2.2), e si suddivide in *miocardio di lavoro* che rappresenta circa il 90% [33] dell'intero miocardio e costituisce la muscolatura cardiaca (atriale e ventricolare) che assicura l'attività contrattile del cuore, ed in *miocardio specifico* il quale costituisce il *sistema di conduzione del cuore*, svolgendo le funzioni di pacemaker e di trasmissione dell'impulso contrattile.

La muscolatura delle pareti atriale e ventricolare risulta essere separata dall'inserimento dello *scheletro fibroso del cuore*, sul quale la muscolatura stessa aderisce.

2.1.2.1 Lo scheletro fibroso

Lo scheletro fibroso del cuore è costituito da un insieme di formazioni connettivali, quali gli *anelli fibrosi* che circondano distintamente i quattro orifizi valvolari, i *trigoni fibrosi destro e sinistro* e la *parte membranacea* del setto interventricolare (Figura 2.2). Dal punto di vista istologico è costituito da tessuto connettivo fibroso denso, povero di fibre elastiche, ma ricco di fasci di fibre di collagene variamente orientati all'interno delle diverse componenti dello scheletro fibroso stesso. Lo scheletro fibroso possiede differenti funzioni tra cui si ricordano:

- permettere l'impianto delle valvole attraverso la realizzazione di un valido supporto che ne garantisce l'ancoraggio alla massa ventricolare;
- costituire l'attacco dei fasci muscolari del miocardio;

- assicurare la separazione tra muscolatura atriale e ventricolare;
- redistribuire le forze durante la contrazione cardiaca;
- separazione tra la muscolatura cardiaca atriale e ventricolare.

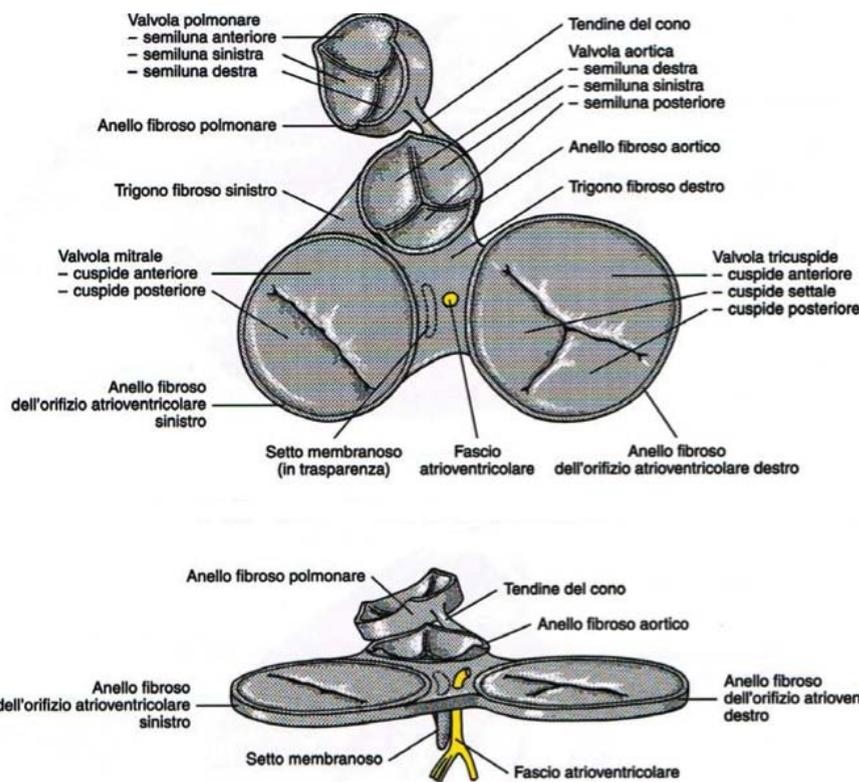


Figura 2.2: Lo scheletro fibroso (Anastasi et al. [33]).

Nello specifico, gli anelli fibrosi degli orifizi atrioventricolari e dell'orifizio arterioso sinistro sono collocati su un piano comune ed il loro punto di convergenza è costituito da un ammasso fibroso di forma triangolare, il *trigono fibroso destro*. Una struttura analoga (*trigono fibroso sinistro*), ma di dimensioni inferiori, è collocata tra l'anello fibroso dell'orifizio atrioventricolare sinistro e l'anello fibroso dell'orifizio arterioso sinistro. L'anello fibroso dell'orifizio arterioso destro è collocato in un piano più elevato, non partecipando quindi direttamente alla composizione dello scheletro, ed è connesso all'anello dell'orifizio arterioso sinistro mediante il *tendine del cono*, sul quale, analogamente ad altre componenti dello scheletro fibroso, si inseriscono piccoli fasci muscolari del miocardio. I trigoni fibrosi hanno lo scopo di mantenere la coesione tra le diverse strutture che compongono lo scheletro fibroso.

Dagli anelli fibrosi originano le lamine connettivali, le quali penetrando nelle cuspidi e nei lembi delle valvole corrispondenti, costituiscono un sistema di sostegno per le strutture valvolari stesse.

2.1.2.2 La muscolatura cardiaca

La componente muscolare del cuore è costituita dal *miocardio di lavoro* e risulta essere più sviluppata nei ventricoli, in particolare nel ventricolo sinistro, rispetto agli atri. Le fibre muscolari cardiache (*cardiomiociti* o *cardioci-ti*, si veda Paragrafo 2.2.3) trovano origine e termine nelle varie componenti che costituiscono lo scheletro fibroso del cuore negli atri e nei ventricoli, e presentano la tendenza a riunirsi in fasci di dimensioni variabili, circondati da uno stroma riccamente vascolarizzato. La muscolatura atriale e la muscolatura ventricolare costituiscono due sistemi indipendenti in quanto non sono presenti fasci di collegamento comuni alle due cavità, ad eccezione del *fascio atrioventricolare* (Figura 2.3).

La muscolatura degli atri La muscolatura atriale è costituita da *fasci muscolari propri* per ciascuna atrio e *fasci muscolari comuni* ai due atri.

I primi, detti *fasci muscolari anulo-spirali*, sono disposti circolarmente in corrispondenza dello sbocco dei grossi vasi e si prolungano per un tratto sulle pareti stesse di questi ultimi. Le superfici interne delle auricole sono rivestite dai *muscoli pettinati*, i quali sono costituiti da trabecole carnee del III ordine e presentano un andamento tra loro parallelo e convergente verso l'apice dell'auricola. I muscoli pettinati dell'atrio destro presentano dimensioni maggiori e originano ad angolo retto in corrispondenza della cresta terminale, dirigendosi verso il solco coronario e nell'auricola destra, lateralmente. Nell'atrio sinistro presentano dimensioni ridotte e sono meno distinguibili sulla parete dell'auricola. La funzione di questi muscoli è quella di aumentare la capacità di contrazione delle pareti atriali senza tuttavia gravare sullo spessore o sull'entità della massa muscolare.

I fasci comuni costituiscono i seguenti due sistemi:

Il *sistema trasversale* è costituito dai fasci che circondano trasversalmente i due atri. Nello specifico, originano in corrispondenza del setto interatriale e della parete dell'atrio destro (in particolare, in prossimità della cresta terminale e dell'orifizio della vena cava superiore), portandosi trasversalmente sulla parete anteriore dell'atrio sinistro, circon-

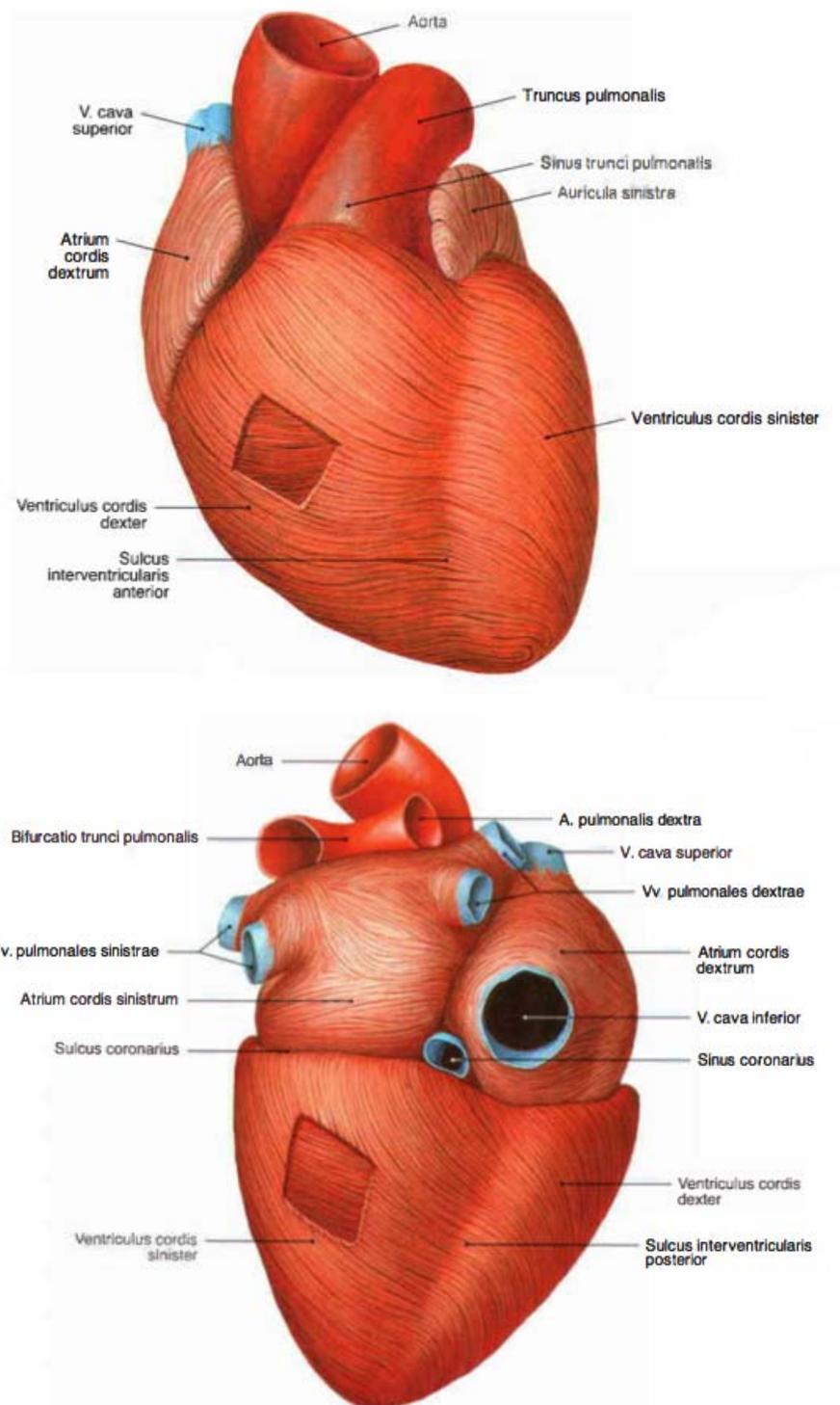


Figura 2.3: Muscolatura cardiaca: visione anteriore e posteriore (Purst et al. [37]).

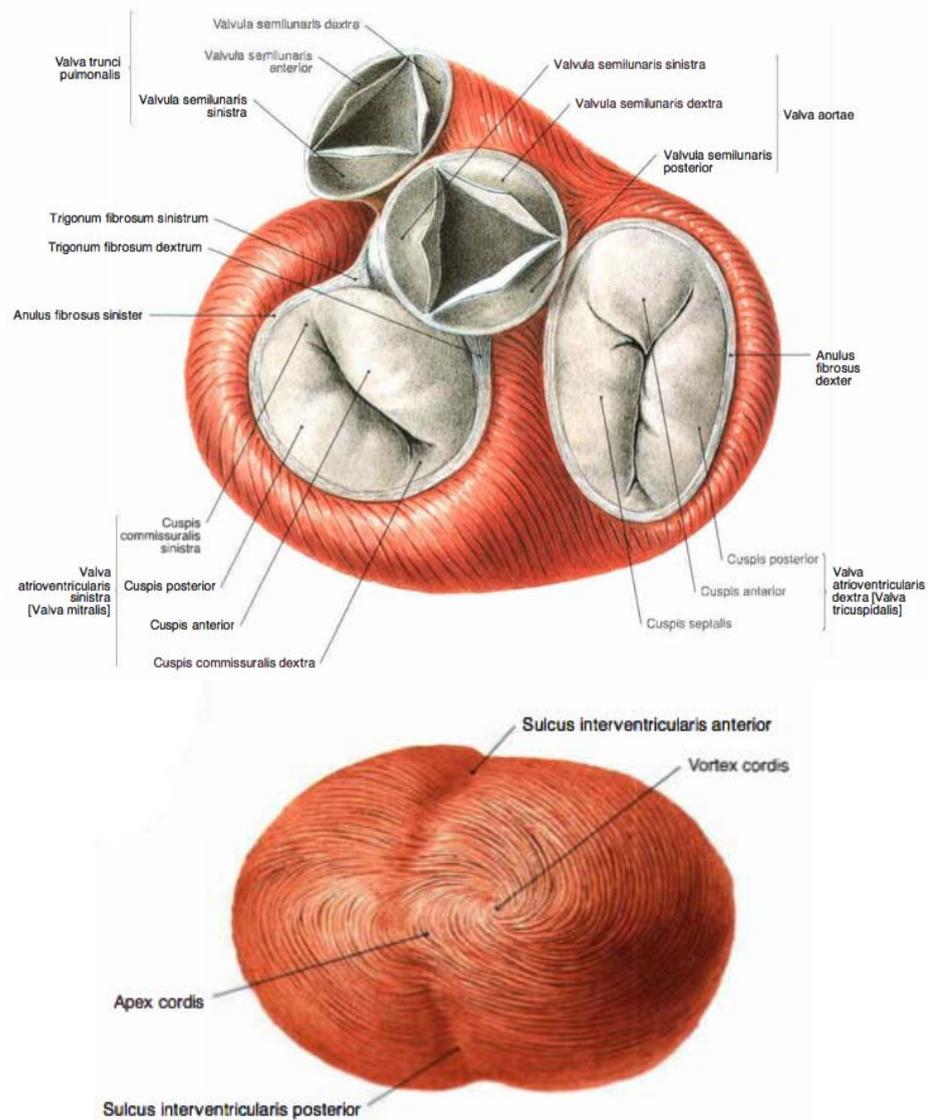


Figura 2.4: Muscolatura cardiaca: base e apice (Purst et al. [37]).

dandone l'auricola e proseguendo posteriormente nell'atrio sinistro. Raggiunto il setto interatriale, si innestano in corrispondenza degli anelli fibrosi degli orifizi atrioventricolari, ed in particolare nell'orifizio atrioventricolare sinistro.

Il *sistema verticale* è costituito da fasci disposti ortogonalmente rispetto ai fasci longitudinali e presentano un andamento ricurva sulla parete atriale, in particolare sull'atrio sinistro. Originano in corrispondenza dell'anello fibroso della valvola atrioventricolare sinistra e successivamente risalgono sulla faccia anteriore dell'atrio sinistro, portandosi sulla faccia posteriore dell'atrio sinistro ove raggiungono il solco interatriale, inserendosi successivamente sull'atrio destro nei pressi della vena cava inferiore.

La muscolatura dei ventricoli La muscolatura ventricolare è più robusta e presenta un'organizzazione più complessa rispetto a quella atriale. Risulta anch'essa costituita da *fasci muscolari propri* di ciascun ventricolo e *fasci comuni* ai due ventricoli.



Figura 2.5: Organizzazione dei fasci muscolari ventricolari. In rosa sono rappresentati i fasci propri, in azzurro ed in viola i fasci comuni anteriori e posteriori rispettivamente, in verde i fasci suturali (Anastasi et al. [33]).

I fasci muscolari propri costituiscono lo strato intermedio del miocardio ventricolare e descrivono delle anse oblique. Nello specifico, dipartono posteriormente dagli anelli fibrosi di ciascun orifizio ventricolare, discendendo successivamente obliquamente verso il contorno laterale del ventricolo stesso ed, infine, risalgono nuovamente verso l'anello fibroso dell'orifizio d'origine, piegandosi ad ansa ed inserendosi anteriormente. Complessivamente, tali fasci costituiscono due sacche muscolari incomplete di geometria conoidale, tra loro affiancate ed aperte sia superiormente (in corrispondenza degli anelli fibrosi) sia inferiormente. In particolare, nel ventricolo destro i fasci sono meno sviluppati ed in generale lo sono maggiormente della porzione superiore, mentre nel ventricolo sinistro i fasci sono maggiormente sviluppati e posizionati prevalentemente nel fondo della cavità.

I fasci muscolari comuni ai due ventricoli originano in corrispondenza degli anelli fibrosi e, discendendo superficialmente al di sotto dell'epicardio, si portano nei pressi dell'apice del cuore con un andamento obliquo. È possibile definire dei *fasci muscolari comuni anteriori* e dei *fasci muscolari comuni posteriori*. I primi originano in corrispondenza degli anelli fibrosi e dei trigoni destro e sinistro, decorrono sulla faccia sternocostale del cuore e raggiungono l'estremità inferiore del cono formato dalle fibre muscolari proprie del ventricolo sinistro ove, avvolgendosi a spirale, formano un vortice, in corrispondenza dell'apice del cuore, per poi addentrarsi nella stessa apertura inferiore, contribuendo alla formazione dei muscoli papillari o risalendo verso gli anelli fibrosi sinistri costituendo lo strato profondo del miocardio sinistro. Analogamente, i secondi originano dagli anelli fibrosi e dal trigono destro, decorrono sulla faccia diaframmatica del muscolo cardiaco, raggiungendo l'apertura inferiore del cono costituito dalle fibre muscolari proprie del ventricolo destro e ivi si addentrano ripiegandosi ad ansa, terminando quindi nei muscoli papillari o risalendo verso gli anelli fibrosi destri costituendo lo strato profondo del miocardio destro. In aggiunta a questi due sistemi, è presente un ulteriore sistema, detto delle *fibre suturali*, il quale mantiene unite le due tasche formate dalla muscolatura propria. Tale sistema origina in maniera prevalente in corrispondenza dell'anello fibroso dell'orifizio atrioventricolare destro, decorre in profondità all'interno della cavità ventricolare destra, attraversa il setto interventricolare, fondendosi ai fasci propri del ventricolo sinistro. Pertanto, il setto interventricolare risulta costituito dalla muscolatura propria e dall'insieme delle fibre suturali.

2.1.3 La tonaca interna o endocardio

L'endocardio è una membrana biancastra, liscia e lucente di natura endoteliale, la quale riveste internamente le cavità cardiache adeguandosi a tutte le superfici (*endocardio parietale*). In corrispondenza degli orifizi atrioventricolari costituisce delle pieghe caratteristiche e riveste i lembi valvolari (*endocardio valvolare*). L'endocardio parietale è applicato al miocardio attraverso uno strato di *connettivo sottoendocardico*, il quale penetra nel miocardio ed è costituito da tessuto connettivale lasso. Quest'ultimo non è presente a livello dei muscoli papillari, contiene vasi sanguigni, terminazioni nervose e le ramificazioni terminali del sistema di conduzione. L'endocardio parietale è costituito inoltre da uno strato di endotelio, le cui cellule di forma poligonale sono in continuità con l'endotelio dei grossi vasi, il quale appoggia su una lamina propria, di natura connettivale. L'endocardio valvolare forma le valvole atrioventricolari ed arteriose, ciascuna delle quali risulta essere rivestita superficialmente da endotelio e costituita, nella porzione centrale, da una robusta *membrana fibrosa* in continuità con l'anello fibroso del corrispondente orifizio e con le corde tendinee, nel caso di orifizio atrioventricolare.

2.2 Il tessuto muscolare cardiaco

Definita l'organizzazione strutturale della parete cardiaca, è possibile trattare nello specifico il tessuto che costituisce il miocardio di lavoro, ovvero il tessuto muscolare cardiaco. Quest'ultimo è costituito da cellule, generalmente mononucleate, definite *cardiomiociti* o *cardiociti*. Il tessuto muscolare cardiaco si differenzia dagli altri tipi di tessuto muscolare (scheletrico e liscio rispettivamente) presenti nel corpo umano per la funzione svolta e per differenti caratteristiche strutturali (Figura 2.6).

2.2.1 Similitudini e differenze tra muscolatura cardiaca e scheletrica

I muscoli cardiaci (Figura 2.7) e scheletrici sono entrambi muscoli striati ed, in quanto tali, presentano un meccanismo di contrazione comune: le fibre contrattili sono arrangiate in sarcomeri e l'interazione tra filamenti di actina e miosina è mediata dal rilascio di calcio. Tuttavia, tali muscolature si differenziano per diversi aspetti [41, 46]:

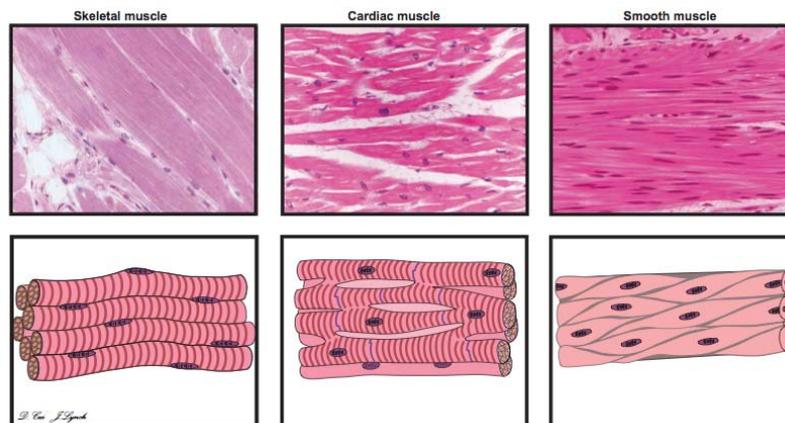


Figura 2.6: I differenti tipi di tessuto muscolare. Esistono tre tipi principali di tessuto muscolare: il tessuto muscolare scheletrico, il tessuto muscolare cardiaco ed il tessuto muscolare liscio. Il primo aderisce alle ossa del sistema scheletrico ed in generale permette i movimenti volontari dello scheletro stesso; il secondo rappresenta la componente principale del miocardio di lavoro e permette, per mezzo di contrazioni involontarie, il movimento del sangue all'interno dei vasi che compongono il sistema circolatorio; il terzo è presente in differenti tipi di organi e svolge funzioni di tipo fisiologico, come la regolazione del flusso e della pressione sanguigni (Cui et al. [41]).

- le cellule muscolari cardiache presentano minore estensione in lunghezza e generalmente si dividono in due o più rami, i quali anastomizzano nei tratti terminali con altre cellule muscolari cardiache al livello dei dischi intercalari;
- le cellule muscolari non costituiscono un sincizio polinucleato;
- la struttura complessiva del muscolo cardiaco è dovuto ad un intreccio di fasci muscolari, i quali non costituiscono singole unità e non presentano, come nel caso di muscolo scheletrico, una disposizione ordinata;
- l'eccitazione avviene attraverso le gap junction (contenute nei dischi intercalari) ed il rilassamento è spontaneo;
- la contrazione ritmica dei muscoli cardiaci è involontaria, non presentano innervazione diretta e la frequenza viene regolata dal sistema nervoso autonomo (in particolare dai sistemi simpatico e parasimpatico) e da ormoni e neurotrasmettitori presenti nel torrente circolatorio;
- la contrazione è regolata da un sistema di nodi pacemaker (nodo senoatriale e nodo atrioventricolare) e trasmessa da un sistema di fibre mu-

scolari ad alta conducibilità, le cellule di Purkinje, le quali connettono il nodo atrioventricolare alle cellule muscolari.

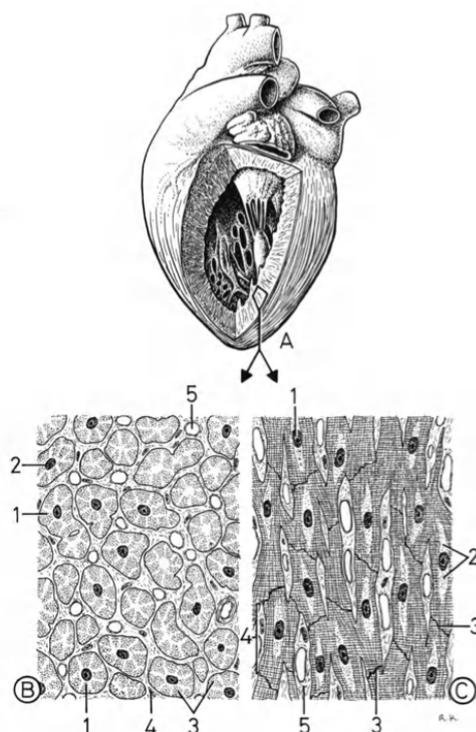


Figura 2.7: *Sezioni trasversali e longitudinali del tessuto muscolare cardiaco.* Effettuando una sezione trasversale del miocardio di lavoro è possibile verificare l'esistenza di una grande variabilità per quanto concerne la forma, il diametro e la dimensione stessa delle fibre muscolari. Ad una sezione trasversale, appare invece evidente la presenza delle estremità biforcute e le anastomosi tra le varie cellule muscolari (Krstić [42]).

2.2.2 Il muscolo cardiaco

I cardiomiociti sono raggruppati in fasci di dimensioni variabili e compongono una struttura continua, simile ad un reticolo, occasionalmente interrotta da setti incompleti di reticolo sarcoplasmatico (il sistema di tubuli che avvolge le miofibrille) e dai mitocondri. I fasci aderiscono allo scheletro fibroso del cuore e sono inframmezzati da fasci di tessuto connettivo lasso (costituito da miofibrille di collagene e da una lamina basale), in continuità con il connettivo presente negli strati sottoepicardico e sottoendocardico (Figura 2.8).

Sono inoltre presenti numerosi capillari sanguigni, i quali permettono di sopperire alla richiesta di energia dovuta all'elevata attività metabolica di questo distretto.

Fra le cellule muscolari ed i terminali assonici vi sono rapporti di vicinanza, ma non sono presenti giunzioni neuromuscolari complesse, quali le placche motrici, come invece si riscontra nella muscolatura scheletrica.

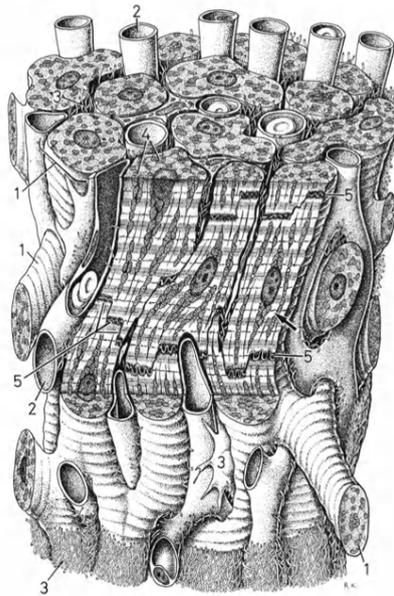


Figura 2.8: *Visione tridimensionale della muscolatura cardiaca.* Le cellule muscolari (1) della muscolatura cardiaca sono interconnesse in modo da formare una struttura simile ad una rete. Tale struttura presenta un'elevata vascolarizzazione (2) ed i fasci muscolari sono inframmezzati da fibre di tessuto connettivo (3). Il sezionamento trasversale permette di evidenziare la presenza dei dischi intercalari (5) (Krstić [42]).

2.2.3 I cardiomiociti o cardiociti

I singoli elementi che compongono la muscolatura cardiaca presentano lunghezza pari a 80 - 100 μm e spessore pari a 10 - 20 μm [33] (Figura 2.9). Possiedono, generalmente, un unico nucleo collocato in posizione centrale ed un numero molto elevato di mitocondri, visibili sia nelle sezioni trasversali che longitudinali. I mitocondri si trovano allineati in modo tale da formare lunghe file longitudinali, le quali interrompono la continuità dei filamenti.

Come già discusso, l'organizzazione delle proteine contrattili risulta essere analoga a quella presente nel tessuto muscolare scheletrico, infatti è presente la bandeggiatura trasversale tipica dell'organizzazione sarcomerica.

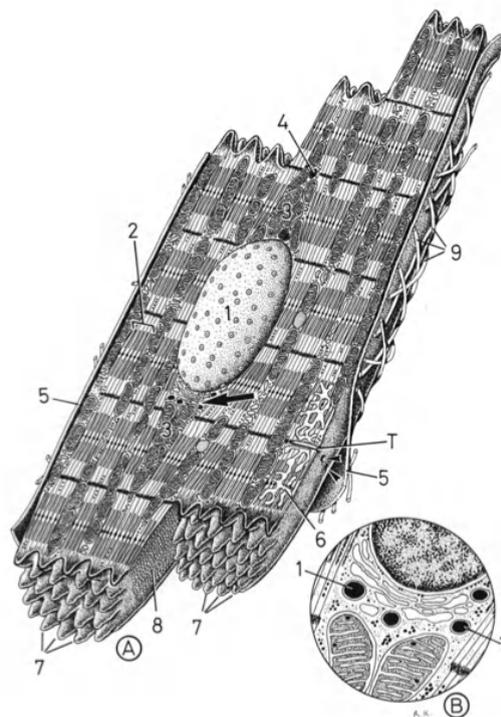


Figura 2.9: Il cardiomiocita. Il nucleo è localizzato al centro della cellula cardiaca ed è visibile la striatura trasversale dovuta all'alternanza dei due tipi di miofilamenti (l'azione e la miosina) (Krstić [42]).

Le cellule cardiache entrano in contatto tra loro per mezzo dei dischi intercalari, i quali costituiscono dei complessi specializzati collocati a livello delle giunzioni tra cardiomiociti. Presentano un andamento costituito da un'alternanza di tratti trasversali, ortogonali alla direzione prevalente delle cellule muscolari, e longitudinali. I tratti trasversali contengono i desmosomi, responsabili della coesione fra cardiomiociti, e giunzioni ricche di α -actina; i tratti longitudinali rappresentano invece le gap junction e permettono gli scambi ionici alla base della propagazione dello stimolo eccitatorio. Le suddivisioni delle cellule ed i dischi intercalari sono visibili unicamente nelle sezioni longitudinali.

2.3 Il tessuto connettivo cardiaco

Il tessuto connettivo è definito tale in quanto possiede la funzione di connettere, dal punto di vista funzionale e strutturale, altri tipi di tessuto contribuendo alla costituzione degli organi. Tuttavia, in aggiunta alla funzione meccanica di sostegno, partecipa al mantenimento dell'omeostasi, creando

un ambiente idrofilico che media lo scambio di materiali tra tessuto e torrente circolatorio, ed ai meccanismi di difesa. Esistono diversi tipi di tessuto connettivo, tutti accomunati dall'origine mesenchimale e dall'organizzazione strutturale: presentano, infatti, una componente cellulare immersa in una sostanza definita *matrice intercellulare* o *extracellulare* (ECM), composta a sua volta da fibre ed una sostanza di base (Figura 2.10). I rapporti tra le cellule presenti nel tessuto connettivale e la rispettiva matrice sono complessi: le macromolecole della matrice sono sintetizzate e disposte tridimensionalmente dalle cellule, ma la matrice, a sua volta, influenza e regola le funzioni delle cellule in essa immerse.

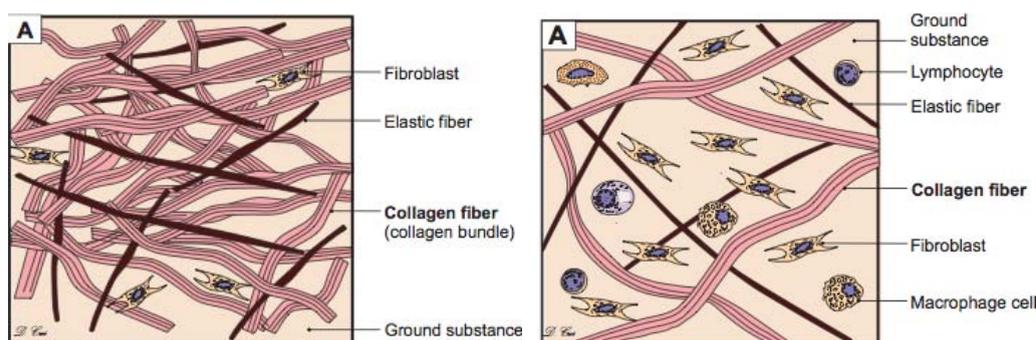


Figura 2.10: Il tessuto connettivo propriamente detto: denso e lasso. Il tessuto connettivo propriamente detto, può essere suddiviso in tessuto connettivo denso o lasso in base alle quantità di fibre in essi contenute: nel tessuto connettivo denso è preponderante la presenza delle fibre rispetto alla componente matriciale o cellulare, le quali sono raccolte in grossi fasci conferendo al tessuto una notevole consistenza, al contrario, il tessuto connettivo lasso è caratterizzato dall'abbondanza della matrice e le fibre sono bassamente intrecciate tra loro (Cui et al. [41]).

2.3.1 La ECM

La ECM può essere considerata come un materiale composito ed in essa è possibile individuare due componenti principali:

1. *componente fibrosa*: comprende i tre tipi fondamentali di fibre presenti del tessuto connettivo (collagene, fibre reticolari e fibre elastiche), le quali conferiscono al tessuto determinate caratteristiche meccaniche, e le *proteine fibrose di adesione* o *connessione* (come la fibronectina), che permettono di collegare le cellule alle componenti matriciali;
2. *sostanza amorfa* o *sostanza fondamentale*: le molecole principali sono i glicosaminoglicani (GAG) ed i proteoglicani, i quali derivano dall'u-

nione covalente tra GAG e proteine, e permettono il mantenimento di un elevato stato di idratazione, il quale a sua volta favorisce la diffusione di nutrienti, metaboliti ed ormoni attraverso la matrice.

2.3.1.1 Funzioni principali

Come accennato in precedenza, la ECM regola la forma delle cellule, l'orientazione, il loro movimento e l'attività metabolica. Nello specifico svolge differenti funzioni tra cui:

- permettere il mantenimento della forma e dell'integrità dei tessuti e degli organi;
- costituire un supporto (scaffold) attivo, dal punto di vista biologico;
- permettere la trasmissione di segnali;
- regolare lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, il fenotipo e le funzioni cellulari;
- provvedere all'ancoraggio di numerose proteine tra cui fattori di crescita ed enzimi quali le proteasi ed i loro inibitori;
- garantire un ambiente ricco d'acqua, in grado di permettere la diffusione di differenti sostanze (tra cui elementi nutritivi, ioni, ormoni e metaboliti) tra le cellule e la rete dei capillari vascolari [41, 45, 46, 47, 48, 49].

2.3.1.2 La componente fibrosa

Il collagene deriva dall'aggregazione, con modalità differenti, di fibre elementari appartenenti alla stessa classe (fibrille di *tropocollagene*). Le fibre elastiche presentano, invece, una natura chimica e strutturale differente. La quantità e la varietà dei tipi di fibre presenti in un determinato tessuto connettivo riflettono l'esigenza strutturale necessaria al tessuto stesso a svolgere la funzione cui è deputato [41].

Il collagene Le fibre di collagene costituiscono la classe di fibre più presenti nei tessuti connettivi (Figura 2.11). In generale, il collagene è la proteina maggiormente conservata nella scala evolutiva e rappresentata nella corpo umano, costituendo circa il 25 - 30% di tutte le proteine presenti [49].

Tali fibre appaiono come cordoni di spessore compreso tra $1\ \mu\text{m}$ e $10\ \mu\text{m}$, orientati in una o più direzioni e con andamento talvolta ondulato, dotati di una striatura longitudinale determinata da fibrille più sottili (tra $0.2\ \mu\text{m}$ e $0.3\ \mu\text{m}$) disposte parallelamente. Queste ultime sono composte a loro volta da microfibrille di spessore compreso tra $20\ \text{nm}$ e $100\ \text{nm}$ disposte parallelamente tra loro e striate trasversalmente [46].

Il costituente fondamentale delle fibre di collagene è il tropocollagene, una glicoproteina prodotta dai fibroblasti e costituita da una tripla elica determinata dall'avvolgimento di tre catene polipeptidiche di tipo α ricche di *glicina*, *prolina* ed *idrossiprolina*. L'elica è stabilizzata da legami ad idrogeno che si instaurano tra le catene stesse. Le molecole di collagene danno origine alle fibrille di collagene ($50 - 200\ \text{nm}$) associandosi tra loro sia longitudinalmente sia parallelamente, queste interazioni latero-laterali sono stabilizzate da legami covalenti intermolecolari [46].

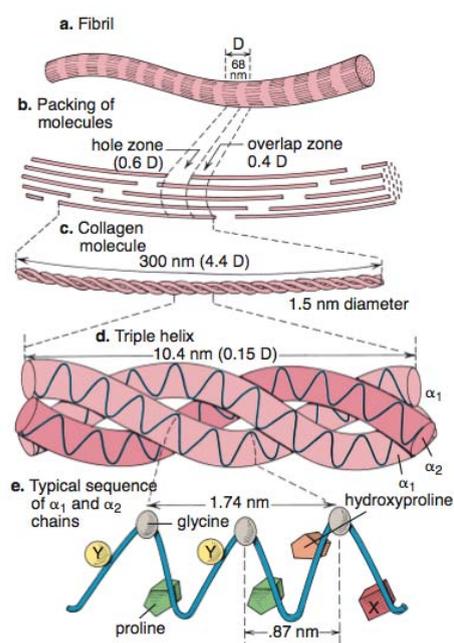


Figura 2.11: Il collagene. L'unità fondamentale del collagene è rappresentata dal tropocollagene costituito da tre catene polipeptidiche arranziate tra loro in modo tale da formare una tripla elica. Le molecole di tropocollagene a loro volta si associano tra loro formando delle file parallele e sfalsate, definite fibrille, all'interno delle quale tali molecole presentano tra loro la medesima distanza. L'associazione di più fibrille definisce la fibra di collagene (Ross et al. [47]).

Esistono circa 28 differenti tipi di collagene [47], determinati dall'assortimento di differenti catene α nella tripla elica, e possono essere prodotti da cellule differenti rispetto a quelle che popolano il tessuto connettivo. Si sud-

dividono in *collageni fibrillari*, che costituiscono la componente principale della ECM dei tessuti connettivali, *collageni associati a fibrille*, nei quali la tripla elica è interrotta da domini di natura non elicoidale, e *collageni laminari o reticolari*, come le membrane basali. Tra i collageni esistenti si ricordano il collagene di tipo I, che costituisce circa il 90% del collagene totale presente nel corpo e conferisce al tessuto resistenza alla trazione, il collagene di tipo III, il quale si trova arrangiato nella forma di una lassa rete di fibre di spessore ridotto, ed il collagene di tipo IV, caratteristico delle membrane basali.

L'organizzazione della matrice di collagene In accordo con quanto avviene per i muscoli scheletrici, la matrice di collagene a livello cardiaco presenta una struttura gerarchica ben definita. È possibile pertanto distinguere delle specifiche membrane:

endomisio è associato al singolo cardiomiocita, si compone principalmente da collagene di tipo III, il quale conferisce un'elevata capacità deformativa e permette la coesione tra cellule muscolari e capillari;

perimisio riveste i fasci di fibre muscolari ed è composto da quelle fibre di collagene (nello specifico di tipo I e III) che organizzano i fasci muscolari in lamine;

epimisio avvolge l'intero miocardio formando l'epicardio e l'endocardio.

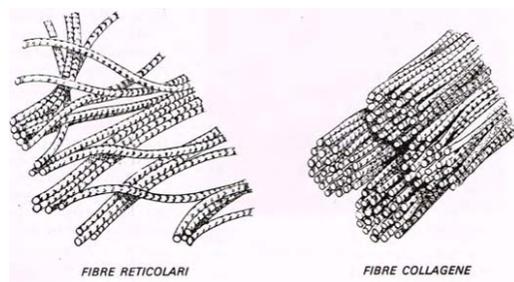


Figura 2.12: Confronto tra le fibre reticolari ed il collagene. Le fibre reticolari e le fibre di collagene sono strutturalmente simili in quanto sono entrambe costituite da fibrille elementari. Tuttavia, le prime decorrono isolate formando degli intrecci tra loro, le seconde sono organizzate ordinatamente in fasci (Adamo et al. [46]).

Le fibre reticolari Le fibre reticolari sono costituite da collagene di tipo III (Figura 2.12). Tali fibre presentano uno spessore ridotto (inferiore a 50 nm) e, anastomizzandosi tra loro, formano una struttura ad intreccio le cui lacune sono riempite dalla porzione amorfa della ECM.

Le fibre elastiche Le fibre e le lamine elastiche sono altamente deformabili e composte da due costituenti principali che presentano spessore inferiore alle fibre di collagene:

1. le microfibrille: si tratta di fibrille di spessore ridotto (11 nm [46]), ricche della proteina *fibrillina* e concentrate prevalentemente nelle regioni periferiche delle fibre;
2. la componente amorfa: costituita fundamentalmente da *elastina*, la quale deriva dalla polimerizzazione della *tropoelastina*, proteina ricca di glicina e precursore dell'elastina stessa.

L'elastina Questa proteina possiede una conformazione spiraliforme ad avvolgimento disordinato, le cui singole catene sono collegate tra loro mediante legami reticolari (Figura 2.13). In particolare, la molecola è povera di idrossiprolina, ma ricca di prolina e glicina. Quest'ultima è distribuita casualmente e rende la molecola idrofobica, permettendo l'avvolgimento casuale delle fibre e il libero scorrimento delle stesse durante le fasi di trazionamento.

2.3.1.3 La componente amorfa

La sostanza amorfa costituisce un ambiente a bassa densità e struttura morfologica non ben organizzata, ma contiene elevate quantità di acqua, nella quale si trovano immerse le cellule e le fibre di ogni tessuto connettivo. È costituita principalmente da GAG proteoglicani e glicoproteine (tra cui le proteine di adesione). Nel tessuto connettivo queste componenti sono sintetizzate principalmente dai fibroblasti (Figura 2.14).

La componente amorfa della matrice presenta una consistenza simile ad una soluzione colloidale molto viscosa od ad un gel semifluido ed è in grado di trattenere quantità variabili di molecole di acqua, la quale, congiunta ad altre sostanze e ai gas in essa disciolti, costituisce il liquido interstiziale. Tale fluido non si trova in forma libera nello spazio extracellulare, ma risulta vincolato alle componenti macromolecolari della matrice amorfa stessa.

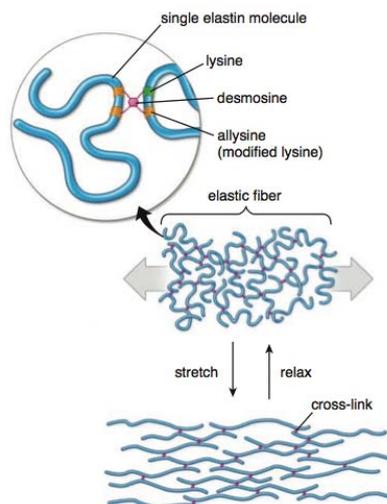


Figura 2.13: L’elastina. Le molecole di elastina sono legate covalentemente tra loro costituendo, in tale maniera, una rete disordinata, talvolta definita “gomitolo statistico”. Quest’ultima in seguito al tensionamento presenta un comportamento elastico, tendendo a ritornare alla configurazione indeformata iniziale (Ross et al. [47]).

I GAG Sono lunghe catene di polisaccaridi lineari i quali, pur costituendo una classe omogenea di macromolecole, presentano un’ampia varietà strutturale. Sono sintetizzati da numerosi tipi cellulari, anche di natura non connettivale, ed in generale non sono presenti come molecole libere, bensì si trovano legate covalentemente a proteine (formando i proteoglicani). I GAG possiedono un’elevata densità di carica negativa, in virtù della quale, a causa delle forze repulsive che si esercitano, le molecole assumono una conformazione estesa occupando, in relazione alla loro massa, volumi consistenti. Tale carica inoltre, attraendo elettrostaticamente le molecole d’acqua, è responsabile dell’elevata idratazione della matrice amorfa. Tra i differenti tipi di GAG, si ricordano l’eparan solfato, collocato nelle lamine basali, e l’eparina, la quale possiede proprietà anticoagulanti.

I proteoglicani I proteoglicani derivano dalla formazione di legami covalenti tra GAG e proteine e costituiscono dei complessi proteico-polisaccaridici di dimensioni molto consistenti. A loro volta, i proteoglicani possono legarsi ad altre macromolecole formando strutture di ordine superiore: gli *aggregati proteoglicanici* derivano dall’aggregazione di più proteoglicani e di una molecola di acido ialuronico. I proteoglicani costituiscono una percentuale limitata della ECM e non possiedono un’organizzazione strutturale

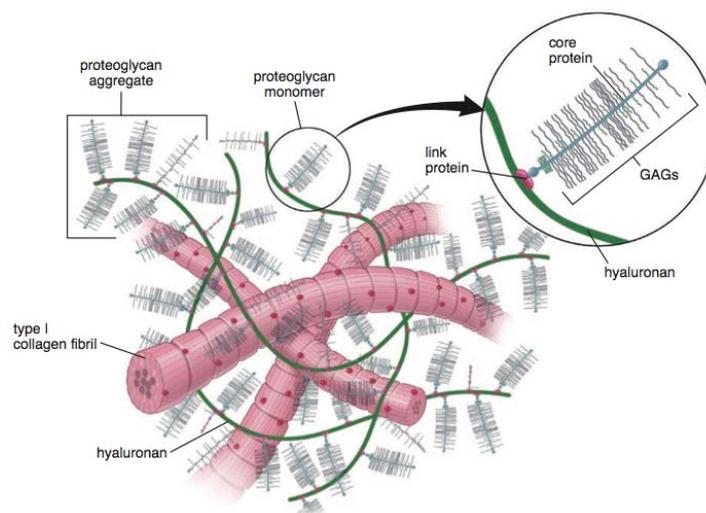


Figura 2.14: GAG e proteoglicani. I proteoglicani possiedono un cuore di natura proteica a cui sono legati covalentemente un numero variabile di GAGs. I proteoglicani possono inoltre formare degli aggregati legandosi covalentemente all'acido ialuronico (Ross et al. [47]).

preferenziale.

Le glicoproteine Le glicoproteine sono macromolecole composte da proteine legate a carboidrati (dal 10 al 40% [46]). Queste ultime, sebbene presenti in quantità inferiori rispetto ai GAG, costituiscono una componente importante della matrice amorfa (Figura 2.15).

La fibronectina La fibronectina è la glicoproteina maggiormente presente nel tessuto connettivo e svolge la funzione di fattore di adesione specifica per l'adesione cellulare e dei materiali extracellulari, quali collagene e GAG. In particolare, il legame tra il collagene e la fibronectina può essere mediato dai GAG stessi, formando complessi macromolecolari differenti a seconda del tipo di proteoglicano coinvolto.

La laminina Le laminine costituiscono una famiglia di grandi glicoproteine. Sono presenti nelle lamine basali e possiedono diversi siti di legame, tra i quali si ricordano quelli per il collagene di tipo IV e per l'eparan solfato. Analogamente alla fibronectina, regola la migrazione, la crescita ed il differenziamento cellulare.

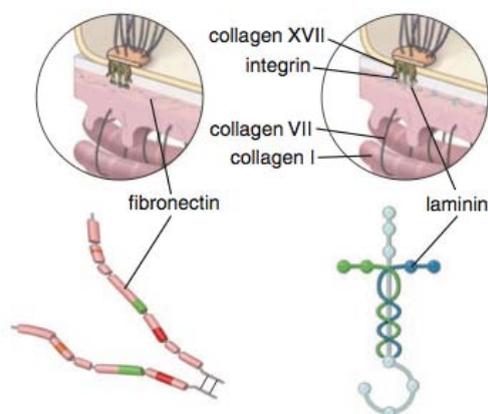


Figura 2.15: La fibronectina e la laminina. Sono glicoproteine presenti nella ECM, le quali svolgono le funzioni di stabilizzazione della matrice e di collegamento di quest'ultima alla superficie cellulare (Ross et al. [47]).

2.3.1.4 La membrana basale nel tessuto cardiaco

In corrispondenza dell'interfaccia tra tessuto connettivo ed un tessuto non connettivo rispetto al quale il primo fornisce supporto meccanico e trofico (quale ad esempio il tessuto muscolare), la ECM si organizza in maniera differente, costituendo assieme al tessuto limitrofo la *membrana basale*. Questa zona è priva di cellule, ma ricca di macromolecole della matrice ed è possibile distinguere la *lamina basale* nella porzione limitrofa al tessuto non connettivale e la *lamina reticolare* nella porzione adiacente al connettivo. La prima contiene laminina, microfibrille di collagene di tipo VII, fibrilline e molecole di fibronectina, la seconda collagene di tipo I e III. Le proprietà della membrana basale dipendono dalle molecole in essa presenti, ma in generale, assicura la coesione meccanica tra il connettivo ed il tessuto confinante, funge da filtro molecolare, determina la polarità cellulare e costituisce la via lungo la quale avvengono le migrazioni cellulari.

2.3.2 Le cellule del tessuto connettivo

Oltre ai cardiomiociti, nel tessuto connettivo sono presenti altri tipi cellulari (Figura 2.16), i quali possono essere classificate sulla base della funzione svolta:

- funzione di sintesi e mantenimento delle macromolecole che compongono la ECM (fibre e sostanza di base): *fibroblasti*, ...
- riserva e metabolismo lipidico: *adipociti*, ...

- difesa immunitaria e non immunitaria: *mastociti*, *macrofagi*, *globuli bianchi*, ...

Un'ulteriore classificazione è possibile sulla base della “mobilità” delle cellule stesse: è possibile distinguere *cellule fisse*, come fibroblasti e adipociti che trascorrono l'intero ciclo vitale nel connettivo, e *cellule libere* o *migranti*, le quali giungono al connettivo dal torrente circolatorio.

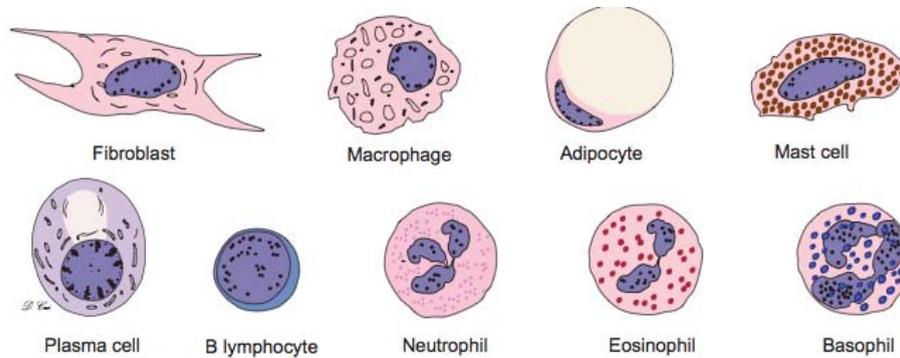


Figura 2.16: *Le cellule principali del tessuto connettivo propriamente detto. La componente cellulare del tessuto connettivo è variamente diversificate. Il tipo cellulare più rappresentato è costituito dai fibroblasti, cellule deputate alla sintesi delle fibre della ECM quali collagene, fibre elastiche e fibre reticolari (Cui et al. [41]).*

Capitolo 3

La decellularizzazione

La decellularizzazione è una metodica sperimentale sviluppata allo scopo di realizzare la completa e selettiva rimozione di tutte le componenti cellulari da un generico tessuto, avendo cura di minimizzare i danni che la procedura può cagionare alla ECM e lasciando, nel caso di organi totali, invariata la rete vascolare [14, 50, 51, 52, 53]. In questo modo, è possibile ricavare uno *scaffold* costituito unicamente dalla matrice propria del tessuto stesso, il quale può essere utilizzato come supporto di derivazione biologica in un'ampia varietà di applicazioni dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Tale tecnica è impiegata su differenti tipi di tessuti e, recentemente, anche su organi totali, quali il cuore come nel caso in esame. In generale, l'efficacia della procedura nella rimozione delle cellule native ed il grado di danneggiamento della matrice dipendono strettamente dal tipo di applicazione, dalla specie animale di origine e dai metodi utilizzati (scelta detergenti, metodo di decellularizzazione e complessità del protocollo adottato).

3.1 Metodiche di decellularizzazione

Gli approcci utilizzati per la decellularizzazione sono differenti ed, in particolare, è possibile suddividerli in metodi fisici, chimici ed enzimatici (Figura 3.1). Tali metodiche, nella maggior parte dei casi, vengono utilizzate in combinazione. Per la loro descrizione si farà riferimento, ove non esplicitato, ai seguenti articoli: [50, 52, 53]

In generale, i passaggi principali di un protocollo di decellularizzazione sono i seguenti [3, 50]:

1. **lisi delle membrane cellulari:** obiettivo che può essere raggiunto utilizzando differenti tipi di metodi fisici o per mezzo di soluzioni a diversa forza ionica;
2. **separazione delle componenti cellulari dalla ECM:** per favorire la rimozione cellulare è necessario interrompere i collegamenti presenti con la matrice, tale scopo viene realizzato per mezzo dei metodi enzimatici o attraverso soluzioni ipertoniche;
3. **solubilizzazione del citoplasma e delle componenti nucleari:** ottenuta attraverso l'uso di detergenti;
4. **rimozione dei detriti cellulari:** il debris cellulare può infine essere eliminato per mezzo di un insieme di lavaggi finali.

In generale, l'utilizzo di detergenti ed agenti caotropici (composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici ed i legami a idrogeno degli acidi nucleici e delle proteine) deve essere, nei limiti dello scopo stesso della rimozione cellulare, minimizzato al fine di ridurre le alterazioni ultrastrutturali e la composizione della matrice [14]. Un ulteriore passaggio prevede l'utilizzo di enzimi, come nucleasi specifiche per la rimozione dei residui di acidi nucleici.

3.1.1 I metodi fisici

I trattamenti fisici permettono la rottura meccanica della membrana cellulare. Tale rottura permette il rilascio delle componenti citoplasmatiche, ma è insufficiente al fine della realizzazione completa del processo di decellularizzazione. Pertanto questi metodi vengono utilizzati solitamente come step iniziale, in quanto favoriscono l'azione successiva dei metodi chimici, i quali possono essere utilizzati in combinazione. Tra questi metodi si ricorda l'agitazione meccanica o sonicazione, l'applicazione di forze meccaniche, quali la pressione idrostatica, ed il congelamento/scongelo.

Agitazione meccanica e sonicazione: questi metodi vengono generalmente utilizzati contemporaneamente all'utilizzo di metodi chimici, in quanto, facilitando l'esposizione dei detergenti, permettono la lisi cellulare e la rimozione dei detriti.

| Method | Mode of action | Effects on ECM | References |
|--|--|--|--|
| Physical | | | |
| Snap freezing | Intracellular ice crystals disrupt cell membrane | ECM can be disrupted or fractured during rapid freezing | [36–42] |
| Mechanical force | Pressure can burst cells and tissue removal eliminates cells | Mechanical force can cause damage to ECM | [33,35] |
| Mechanical agitation | Can cause cell lysis, but more commonly used to facilitate chemical exposure and cellular material removal | Aggressive agitation or sonication can disrupt ECM as the cellular material is removed | [19,21,33,35] |
| Chemical | | | |
| Alkaline; acid | Solubilizes cytoplasmic components of cells; disrupts nucleic acids | Removes GAGs | [33,43–46] |
| Non-ionic detergents | | | |
| Triton X-100 | Disrupts lipid–lipid and lipid–protein interactions, while leaving protein–protein interactions intact | Mixed results; efficiency dependent on tissue, removes GAGs | [2,21,28,29,35,43,58] |
| Ionic detergents | | | |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | Solubilize cytoplasmic and nuclear cellular membranes; tend to denature proteins | Removes nuclear remnants and cytoplasmic proteins; tends to disrupt native tissue structure, remove GAGs and damage collagen | [18,24,25,29,35,59,60] |
| Sodium deoxycholate Triton X-200 | | More disruptive to tissue structure than SDS Yielded efficient cell removal when used with zwitterionic detergents | [18,24,25,29,35,59,60] [18,24,25,29,35,59,60] |
| Zwitterionic detergents | | | |
| CHAPS | Exhibit properties of non-ionic and ionic detergents | Efficient cell removal with ECM disruption similar to that of Triton X-100 | [21] |
| Sulfobetaine-10 and -16 (SB-10, SB-16) | | Yielded cell removal and mild ECM disruption with Triton X-200 | [18,24,25,29,35,59,60] |
| Tri(<i>n</i> -butyl)phosphate | Organic solvent that disrupts protein–protein interactions | Variable cell removal; loss of collagen content, although effect on mechanical properties was minimal | [28,29] |
| Hypotonic and hypertonic solutions | Cell lysis by osmotic shock | Efficient for cell lysis, but does not effectively remove the cellular remnants | [21,29,61–63] |
| EDTA, EGTA | Chelating agents that bind divalent metallic ions, thereby disrupting cell adhesion to ECM | No isolated exposure, typically used with enzymatic methods (e.g., trypsin) | [13,68–70] |
| Enzymatic | | | |
| Trypsin | Cleaves peptide bonds on the C-side of Arg and Lys | Prolonged exposure can disrupt ECM structure, removes laminin, fibronectin, elastin, and GAGs | [13,68–70] |
| Endonucleases | Catalyze the hydrolysis of the interior bonds of ribonucleotide and deoxyribonucleotide chains | Difficult to remove from the tissue and could invoke an immune response | [18,21,29,82] |
| Exonucleases | Catalyze the hydrolysis of the terminal bonds of ribonucleotide and deoxyribonucleotide chains | | |

Figura 3.1: Tabella riassuntiva delle differenti metodiche di decellularizzazione. È possibile scegliere differenti approcci per la decellularizzazione del tessuto od organo di interesse. In particolare, è possibile suddividerli in metodi fisici, chimici ed enzimatici, i quali, nella maggior parte dei casi, vengono utilizzati in combinazione (Gilbert et al. [50]).

Forza meccanica: l'applicazione di forze meccaniche per mezzo di abrasione permette di separare le lamine di quei tessuti che presentano naturalmente piani di clivaggio, mentre l'applicazione di una pressione idrostatica può favorire la lisi cellulare in quei tessuti ed organi in cui la ECM è organizzata in maniera lassa.

Congelamento/scongelamento: la rapida formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula può portare alla rottura della membrana cellulare con conseguente liberazione, ma non rimozione, del materiale in essa contenuto. La velocità del processo può essere regolata al fine di limitare i danni alla ECM, che comunque possono essere numerosi.

Elettroporazione irreversibile non termica: si è verificato che l'applicazione di impulsi elettrici molto rapidi permette l'apertura di micropori sulla membrana cellulare del tessuto, i quali causano la morte cellulare in seguito alla perdita dell'omeostasi.

3.1.2 I metodi chimici

Acidi e basi: soluzioni acide e basiche causano o catalizzano la degradazione idrolitica delle biomolecole. Alcuni acidi rimuovono i residui nucleari lasciando inalterata la matrice, mentre altri possono danneggiare il collagene senza tuttavia influire sui GAG. Le basi, invece, possono agire eliminando i fattori di crescita e distruggendo la rete del collagene, modificando profondamente le proprietà meccaniche della matrice.

Shock osmotico: un altro passaggio spesso applicato nelle fasi iniziali del processo è l'utilizzo di soluzioni ioniche ad alta e bassa molarità in maniera alternata. Queste ultime possono indurre la rottura della membrana cellulare per shock osmotico, causando danni minimi alla matrice se applicate per tempi limitati.

Detergenti non ionici : sono detergenti molto utilizzati in quanto, rompendo le relazioni tra lipidi e tra proteine e lipidi, mantengono intatte le relazioni tra proteine, dimostrando una natura non troppo aggressiva e tale da permettere l'ottenimento di una struttura quasi inalterata della ECM. Un esempio di questo tipo di detergenti è rappresentato

dal Triton X-100, il quale rimuove efficacemente i residui cellulari di tessuti di spessore ridotto.

Detergenti ionici: agiscono solubilizzando le membrane citoplasmatiche e cellulari. Questi detergenti sono maggiormente aggressivi in quanto tendono ad eliminare anche le interazioni tra proteine, danneggiando maggiormente la matrice. Il sodio dodecilsolfato (SDS) ed il sodio deossicolato sono due esempi di detergenti appartenenti a questa classe. Il primo risulta particolarmente efficace nella rimozione delle componenti cellulari di tessuti densi ed organi, causando tuttavia un grande danneggiamento dell'ultrastruttura nativa del tessuto, la riduzione dei GAG e la perdita di integrità del collagene, il quale non viene rimosso, e l'eliminazione dei fattori di crescita; il secondo è molto efficace nella rimozione dei detriti, producendo maggiore danneggiamento della struttura complessiva rispetto all'SDS.

Detergenti zwitterionici: presentano caratteristiche intermedie rispetto ai due tipi di detergenti sopracitati. Sono efficaci se applicati a tessuti sottili, ma presentano una tendenza maggiore alla denaturazione delle proteine.

Alcoli: possono essere utilizzati per la disidratazione e la lisi cellulare. Inoltre sono più efficaci delle lipasi nella rimozione della componente lipidica.

3.1.3 I metodi biologici

Enzimi: i trattamenti enzimatici sono utilizzati principalmente per promuovere la separazione delle cellule dalla matrice e la conseguente rimozione delle stesse dal tessuto. L'enzima proteolitico più utilizzato in questo campo è la tripsina, la quale presenta massima attività a 37°C e a pH 8. Possono, inoltre, essere utilizzate le nucleasi e le endonucleasi, le quali dividono le catene di acidi nucleici e contribuiscono alla rimozione dei nucleotidi in seguito alla lisi cellulare, la collagenasi, utilizzata quando la preservazione della matrice non rappresenta un aspetto critico per le successive applicazioni, le lipasi, per l'idrolisi dei lipidi.

Metodi non enzimatici: tra questi si ricordano l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), il quale lega gli ioni bivalenti (Ca^{2+} e Mg^{2+}) necessari alle cellule per aderire fra se stesse ed al collagene ed alla fibronectina, ovvero alla ECM, facilitando la rimozione cellulare. Inoltre, la lisi della membrana cellulare causa la liberazione di grosse quantità di proteasi cellulari, le quali possono danneggiare la struttura della matrice interagendo con le molecole proteiche che la costituiscono. Per evitare questi problemi, è possibile inserire gli inibitori delle proteasi nel protocollo adottato.

3.1.4 Modalità di applicazione dei detergenti

I vari metodi vengono applicati al singolo tessuto od organo tenendo conto delle caratteristiche proprie del materiale da decellularizzare, quali lo spessore e la densità, e ponendo attenzione ai detergenti utilizzati e alla successiva applicazione clinica. Generalmente, la complessità di un protocollo è strettamente correlata, e direttamente proporzionale, alla complessità della geometria tridimensionale del tessuto o organo ed al grado di conservazione che si vuole ottenere per la matrice risultante [52].

3.1.4.1 Perfusioni di organi totali

Nel caso di organi totali la decellularizzazione può essere realizzata attraverso perfusione retrograda o anterograda dello stesso sfruttando la rete vascolare preesistente [14, 15, 52, 53]. Quest'ultima si è sviluppata nel corso dell'evoluzione al fine di costituire la via più efficace per il trasporto diffusivo di sostanze da e verso le cellule, minimizzando la distanza tra capillari sanguigni e cellule. Pertanto può essere utilizzata per fare penetrare efficacemente i detergenti all'interno del tessuto. È possibile inoltre, nel caso in cui la struttura d'organo lo permetta, sfruttare eventualmente altre vie d'accesso secondarie (come, ad esempio, le vie respiratorie nel caso dei polmoni). In questo modo è possibile ottenere scaffold di matrice a partire da organi interi e non solo parti di esso. La rete vascolare rimane intatta anche successivamente alla decellularizzazione e, per tale motivo, può essere utilizzata come mezzo efficace per la penetrazione di cellule e di elementi nutritivi al fine del ripopolamento [15].

3.1.4.2 Altre modalità

Per i tessuti ed organi che presentano geometria semplice è possibile indurre gradienti di pressione o realizzare l'immersione e l'agitazione degli stessi nelle soluzioni di trattamento decellularizzante [52].

3.2 Il danneggiamento della ECM

Ogni procedura adottata per la rimozione cellulare comporta necessariamente un certo grado di danneggiamento della matrice dal punto di vista dell'architettura tridimensionale, della composizione, dell'attività biologica e dell'integrità meccanica e strutturale [14, 50, 52]. Questo risultato non desiderato costituisce tuttavia un aspetto fondamentale del processo stesso in quanto è necessario che le cellule siano adeguatamente esposte al fine di poter entrare in contatto con i vari detergenti adottati, ed inoltre devono essere presenti delle vie affinché i detriti ed i materiali cellulari scomposti possano essere rimossi dalla loro sede ed eliminati dal tessuto.

In ogni caso, tutti i protocolli di decellularizzazione vengono elaborati allo scopo di realizzare un compromesso tra la necessità di rimuovere i costituenti cellulari indesiderati e l'imperativo di minimizzare il danneggiamento della matrice, le cui proprietà biologiche e strutturali si renderanno fondamentali per le successive applicazioni.

3.3 Variabilità dell'efficacia del processo

L'efficacia di un protocollo di decellularizzazione e le alterazioni indotte nella matrice dipendono da numerosi fattori, quali il particolare tipo di tessuto o organo, la densità, la composizione, lo spessore e la specie di derivazione [15, 50]: un protocollo efficace su un determinato tipo di organo, potrebbe non esserlo più variando la specie di origine oppure un detergente che causa gravi danni alla matrice in un tessuto potrebbe invece garantire una decellularizzazione altamente conservativa in un differente tessuto. A tale riguardo, si possono trovare in letteratura risultati talvolta contrastanti. Tuttavia, i dati non sono di facile interpretazione in quanto i detergenti vengono utilizzati in concentrazioni variabili e spesso combinati tra loro [50, 52]. Risulta, quindi, impossibile definire un metodo universale in grado di rispondere alle specifiche esigenze di ogni applicazione.

3.4 Verifica della rimozione cellulare

Per quanto auspicata, la rimozione totale di tutte le componenti cellulari presenti all'intero tessuto rappresenta un traguardo difficilmente raggiungibile. La matrice derivante può, infatti, trattenere residui di materiale nucleare (quale il DNA) e citoplasmatico [14, 50]. Questi residui potrebbero causare problemi di citocompatibilità *in vitro* e determinare risposte immunogeniche *in vivo*. Per tale motivo, alla fine del processo viene normalmente fatta una quantificazione del DNA per mezzo di specifici kit. I limiti accettabili non sono, tuttavia, ancora ben definiti in quanto variano in funzione della specie di provenienza della matrice e dei tessuti all'interno della quale la stessa è destinata ad essere impiantata [52].

3.5 I residui dei detergenti

In seguito alla decellularizzazione è necessario, inoltre, assicurare la rimozione completa dei residui dei detergenti impiegati, i quali potrebbero indurre una risposta immunogenica e/o presentare citotossicità, modificando la risposta delle cellule seminate sullo scaffold o quelle che in esso vi migrano in seguito all'impianto, rendendo quindi non utilizzabili i benefici derivanti da un'efficace procedura. Nel caso dell'SDS, per esempio, è presente un'alta affinità nei confronti delle proteine, anche se utilizzato in concentrazioni ridotte. Tuttavia, i residui di questo detergente possono essere ridotti utilizzando un lavaggio successivo in Triton X-100 [1].

3.6 La decellularizzazione totale del cuore: lo stato dell'arte

Nel 2008 Ott e al. [1] pubblicarono il primo lavoro riguardante la decellularizzazione totale di muscolo cardiaco di ratto realizzata per perfusione coronarica retrograda a pressione costante per mezzo dell'apparato di Langendorff modificato (Figura 3.2). Fu quindi dimostrata la possibilità di ottenere dei costrutti di ECM con un'intatta architettura tridimensionale, di poter ricostruire su questi ultimi il parenchima con una popolazione cellulare adeguata e di sviluppare la funzione di pompa tipica dell'organo. Da quel momento in poi sono stati testati differenti detergenti e metodi di de-

cellularizzazione al fine di migliorare la rimozione dei materiali cellulari e la conservazione della matrice cardiaca. Si è inoltre applicata la stessa tecnica ad animali e organi di dimensioni maggiori, quali ad esempio il maiale.

In generale, in tutti i protocolli è osservabile la perdita del colore rossastro-marrone caratteristico dell'organo nativo in favore di aspetto biancastro e traslucido, il quale, tuttavia, non è sempre sinonimo di una completa decellularizzazione e rimozione delle componenti indesiderate. Infatti, in tutti i costrutti è sempre rilevabile, seppure in quantità molto ridotte rispetto all'organo nativo, materiale nucleare e, nello specifico, DNA.

3.6.1 La decellularizzazione del cuore di ratto

In Ott e al. vengono confrontati tre tipi di detergenti (l'SDS, il glicole polietilenico (PEG) ed il Triton X-100) dimostrando la maggiore efficacia della procedura con SDS (Figura 3.2). Lo scaffold ottenuto, pur presentando uno spessore inferiore rispetto al nativo, possiede inalterata struttura, composizione (per quanto riguarda il collagene di tipo I e III, la laminina e la fibronectina) e orientazione delle fibre della matrice nelle pareti ventricolari, nelle pareti dell'aorta e nella valvola aortica (la quale rimane competente). Sono osservabili, mediante diverse tecniche istologiche ed immunocitochimiche, la mancanza di nuclei (la quantità di DNA quantificata è inferiore al 4%) e di elementi contrattili. Inoltre, la rete vascolare non è stata danneggiata dal processo.

In Akhyari et al. [2] sono stati testati quattro differenti protocolli di decellularizzazione realizzati mediante perfusione coronarica automatica a pressione costante e mantenendo il cuore di ratto immerso nella soluzione di perfusione. Il primo protocollo è analogo a quello presentato in [1]; il secondo prevede l'utilizzo di tripsina, EDTA, Triton X-100 e sodio deossicolato; il terzo venne introdotto inizialmente per la decellularizzazione dei nervi periferici ed impiega soluzioni contenenti glicerolo, azoturo di sodio, EDTA, acido deossicolico, SDS e Triton X-100; infine il quarto impiega, oltre a soluzioni contenenti reagenti citati in precedenza, anche la saponina, la quale permette la rottura dei legami tra lipidi e tra lipidi e proteine, contribuendo alla solubilizzazione delle membrane (Figura 3.3). L'analisi dei costrutti ha permesso di concludere che nessuno dei protocolli adottati costituisce il metodo ottimale per l'ottenimento di scaffold privi di materiale cellulare e con costituenti matriciali perfettamente conservati.

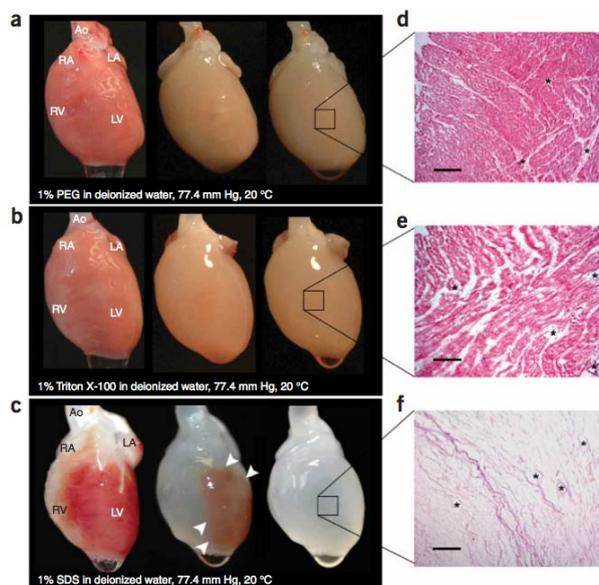


Figura 3.2: Risultati macroscopici dei tre protocolli proposti da Ott et al. La procedura più efficace delle tre proposte è quella realizzata con SDS (c) la quale consente di ottenere macroscopicamente un cuore dall'aspetto biancastro e traslucido. L'avvenuta decellularizzazione è dimostrata dall'analisi istologica riportata, la quale testimonia l'assenza di nuclei ed elementi contrattili (f), in contrapposizione ai risultati ottenuti con gli altri due protocolli (a-b, d-e) [1].

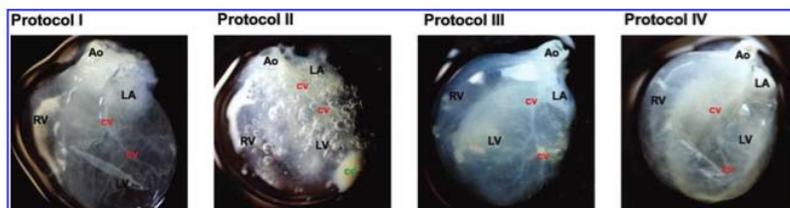


Figura 3.3: Risultati macroscopici del protocollo proposto da Akhyari et al. I risultati macroscopici evidenziano come tutti i protocolli adottati permettano di ottenere costrutti con geometria interna e vascolarizzazione coronarica intatte [2].

Infine in Aubin et al. [3] viene descritto un altro approccio realizzato con un software automatizzato per il controllo della perfusione coronarica (come in [2]), la quale viene realizzata mediante un circuito chiuso ed un protocollo molto articolato in cui sono utilizzati, oltre ai detergenti sopracitati quali SDS, azoturo di sodio EDTA, anche la saponina ed il glicerolo (Figura 3.4).



Figura 3.4: Risultati macroscopici del protocollo proposto da Aubin et al. L'organo privo di cellule acquista la classica trasparenza, la quale permette di intravedere conservate l'anatomia di base e la vascolarizzazione [3].

3.6.2 La decellularizzazione del cuore di maiale

Wainwright et al. [4] viene applicata la perfusione retrograda pulsatile per decellularizzare dei cuori porcini. Il protocollo prevede il preventivo congelamento dell'organo, al fine di favorire la lisi cellulare, e successivamente la perfusione a flussi consistenti (da 1 a 1.7 l/min) del cuore, immerso, con differenti soluzioni contenenti tripsina, EDTA, azoturo di sodio, ed alte concentrazioni di Triton X-100 (3%) e di acido deossicolico (4%) (Figura 3.5). La matrice derivante presenta intatta struttura e composizione molto simile all'organo nativo, con perdita della componente di DNA pari al 92%.

In Weymann et al. [5] la perfusione del cuore di maiale viene realizzata mediante un circuito chiuso costituito da una pompa, uno scambiatore di calore ed un controllo di pressione del sistema. La procedura consiste nell'utilizzare soluzioni riciclate contenenti elevate concentrazioni di SDS (4%) alla temperatura di 37 °C (Figura 3.6). Le prove istologiche suggeriscono che l'ultrastruttura e la composizione della ECM siano state conservate nonostante le elevate concentrazioni di SDS: l'orientazione delle fibre è stata mantenuta e considerazioni analoghe possono essere fatte riguardo alle due componenti più rilevanti dal punto di vista meccanico, ovvero il collagene e

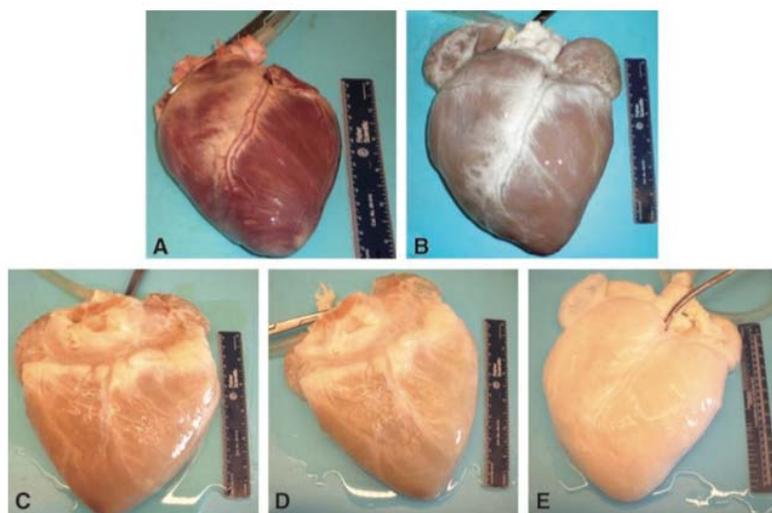


Figura 3.5: Risultati macroscopici del protocollo proposto da *Wainwright et al.* Le immagini riportano l'aspetto macroscopico di un cuore di maiale prima della decellularizzazione (a), dopo il trattamento con tripsina (b), dopo il trattamento con Triton X-100 (c), dopo il trattamento con sodio deossicolato (d) e dopo il trattamento con acido paracetico (e) [4].

le fibre elastiche. Per quanto riguarda la quantificazione del DNA, è stata rilevata una sensibile diminuzione rispetto a quanto valutato in [4].

Un'altra procedura di decellularizzazione per il cuore di maiale è stata proposta da Remlinger et al. [6]. Analogamente a [4], il cuore viene inizialmente congelato e successivamente immerso e perfuso nelle soluzioni di lavaggio contenenti tripsina, EDTA, azoturo di sodio, Triton X-100 e sodio deossicolato (Figura 3.7). La perfusione viene effettuata a flusso costante aumentando progressivamente l'entità dello stesso (da 400 ml/min fino a 2200 ml/min) e cambiando molto spesso le soluzioni di lavaggio, le quali ricircolando ricche di detriti cellulari potrebbero causare occlusioni dei vasi di calibro minore. Le colorazioni istologiche mostrano in forma qualitativa la completa rimozione cellulare. Questi ultimi sono stati quantificati e si attestano sotto la soglia di 50 ng.

In Merna et al. [7] viene posto l'obiettivo di valutare in maniera qualitativa e non invasiva l'impatto della decellularizzazione sulla microstruttura della matrice e sulle proprietà meccaniche, per mezzo della microscopia a multifotone e della spettroscopia di correlazione, con particolare attenzione alla relazione tra proprietà meccaniche e risposta cellulare. La ECM è stata preparata utilizzando diversi metodi di decellularizzazione i quali utilizzano soluzioni di tripsina/EDTA/azoturo di sodio e/o Triton X-

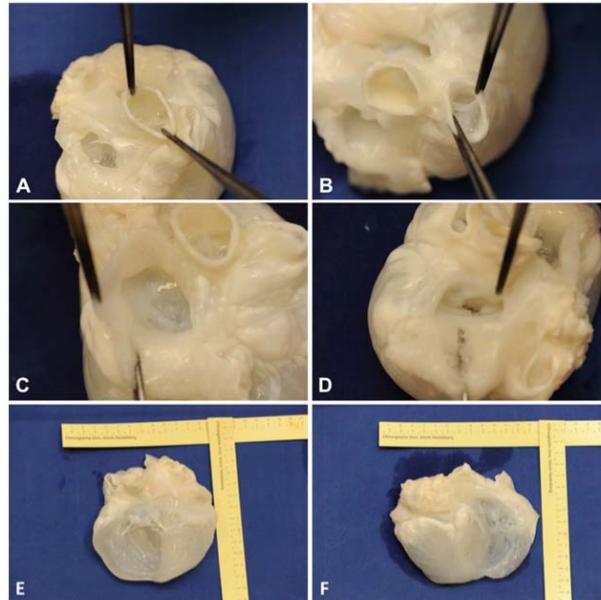


Figura 3.6: Risultati macroscopici del protocollo proposto da Weymann et al. Il cuore decellularizzato non sembra presentare difetti macroscopici nella struttura al termine della procedura di decellularizzazione. Nelle immagini riportate sono infatti riconoscibili la valvola aortica (A), la valvola polmonare (B), la valvola tricuspide (C) e la valvola mitrale (D). In (E) ed in (F) sono riportati il ventricolo sinistro e destro, rispettivamente [5].



Figura 3.7: Risultati macroscopici del protocollo proposto da Remlinger et al. Al fine del protocollo il cuore appare traslucido, indicando l'avvenuta perdita di materiale cellulare [6].

100/EDTA/azoturo di sodio come descritto in [4], dove la tripsina ed il Triton X-100 sono utilizzati in differenti combinazioni e tempi di incubazione (Figura 3.8). Al termine dei processi, la maggiore perdita di materiale nucleare si è verificata nei protocolli realizzati con le combinazioni (dove si sono verificati decrementi del 90% e 91%) rispetto ai metodi realizzati utilizzando solo la tripsina o solo il Triton X-100, nei quali risulta un'incompleta decellularizzazione pur presentando lo stesso aspetto macroscopico. In generale, in tutti i protocolli si osserva una perdita del contenuto di collagene ed elastina, la quale risulta più contenuta nel protocollo con solo Triton X-100. Considerando unicamente i protocolli che hanno prodotto una decellularizzazione efficace, si riscontra che la tripsina mantenuta per tempi prolungati causa il danneggiamento delle strutture collageniche compromettendo la stabilità meccanica, in quanto vi è una diminuzione della densità delle fibre e del grado di increspatura del collagene, mentre l'utilizzo del Triton X-100 permette di ottenere una matrice meglio conservata dal momento che, nonostante l'aumento della rigidezza, il crimping delle fibre di collagene viene mantenuto.

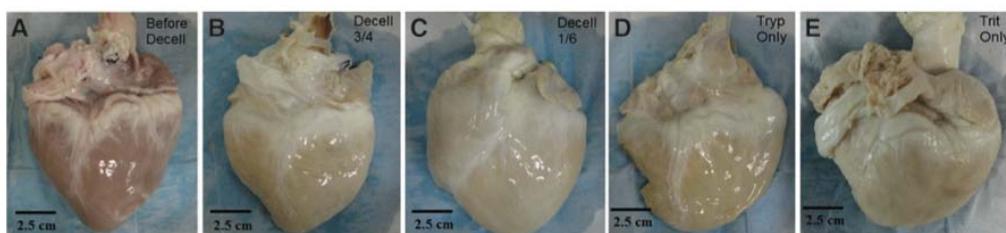


Figura 3.8: Risultati macroscopici dei protocolli proposto da Merna et al. Il cuore nativo (A) viene decellularizzato mediante perfusione coronarica con differenti protocolli: (B) protocollo con tripsina per 3 giorni e Triton X-100 per 4 giorni, (C) protocollo con tripsina per 1 giorno e Triton X-100 per 6 giorni, (D) protocollo con tripsina per 7 giorni e (E) protocollo con triton X-100 per 7 giorni [7].

In Methe et al. [9] il cuore, in seguito ad un ciclo di congelamento e scongelamento, viene incannulato sia tramite l'aorta sia tramite vena polmonare. L'organo viene, quindi, perfuso e posto in agitazione con soluzioni contenente sodio deossicolato a concentrazioni variabili e Triton X-100. In particolare, i cicli di lavaggio in Triton X-100 e in acqua deionizzata sono stati ripetuti più volte al fine di garantire la completa rimozione dei detriti cellulari. Tale procedura ha permesso di ottenere una matrice altamente conservata, nella quale le componenti di collagene, elastina e GAG non sono

significativamente differenti rispetto alla condizione nativa.

Capitolo 4

La meccanica dei tessuti biologici

I tessuti biologici presentano caratteristiche meccaniche fortemente differenziate e correlate al binomio struttura/funzione. Nel caso dei tessuti molli, come ad esempio il tessuto connettivo o il tessuto muscolare, sono presenti alcune proprietà comuni, ma in generale gli aspetti biomeccanici sono il risultato dell'azione delle varie componenti del tessuto e delle loro interazioni.

4.1 Considerazioni preliminari

Applicando ad un corpo vincolato e deformabile una sollecitazione esterna, vengono indotti nello stesso uno *stato deformativo* ed uno *stato tensionale*. Esistono diverse definizioni delle grandezze di deformazione (ϵ) e di tensione (σ), le quali riflettono la natura propria del problema che si vuole analizzare e, nello specifico, l'accuratezza con cui si vogliono descrivere i fenomeni osservati. Il legame matematico tra queste due misure definisce la *legge costitutiva* (f) che regola, fissate le condizioni al contorno, le condizioni di carico e la geometria del sistema, il comportamento meccanico del materiale:

$$\sigma = f(\epsilon)$$

Per quanto riguarda i riferimenti adottati nella presente sezione, ove non indicato esplicitamente, si faccia riferimento a [49, 54, 55].

4.1.1 La deformazione

La deformazione viene definita come il processo di cambiamento di forma di un corpo, a partire da una configurazione definita come iniziale e prescindendo dalle cause che l'hanno [54] (Figura 4.1).

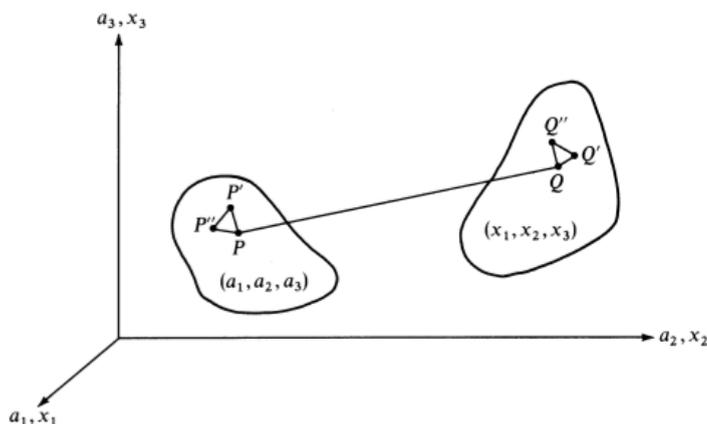


Figura 4.1: La deformazione di un corpo. La configurazione finale di un corpo soggetto a spostamenti e a stati deformativi può essere descritta per mezzo di un campo di spostamenti (Fung [55]).

La formulazione matematica della deformazione viene ricavata a partire dal calcolo del gradiente del campo degli spostamenti \mathbf{u} , il quale costituisce una mappa che associa ad ogni punto del corpo deformato lo spostamento subito rispetto ad una configurazione iniziale. In particolare, il tensore di deformazione (costituito dalle dilatazioni lineari e dagli scorrimenti angolari) rappresenta la componente simmetrica del gradiente di spostamento e descrive lo stato di deformazione del punto materiale considerato:

$$\epsilon = \frac{1}{2}(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T + \nabla \mathbf{u}^T \nabla \mathbf{u}).$$

Il termine del secondo ordine consente di considerare in maniera opportuna l'eventuale non linearità del campo degli spostamenti e delle deformazioni, che si verificano nel caso di materiali che presentino grandi deformazioni, ovvero deformazioni finite. Questi termini possono essere trascurati nel caso sia assumibile come vera l'ipotesi di piccoli gradienti di spostamento e quindi di linearità nella relazione di cui sopra.

4.1.2 La tensione

La suddivisione ideale in due parti di un corpo soggetto ad un insieme di sollecitazioni esterne permette di definire, sulla base dell'equilibrio delle forze agenti tra le stesse attraverso la superficie di separazione, il vettore della tensione \mathbf{t} (Figura 4.2). La formulazione matematica di quest'ultimo è costituita dal limite tra la risultante delle forze scambiate attraverso un elemento infinitesimo di area e l'area infinitesima stessa.

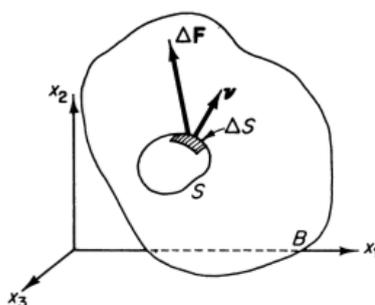


Figura 4.2: *La teoria della tensione.* Intuitivamente, la tensione può essere definita come il rapporto tra la forza applicata ad una superficie e l'area della superficie stessa (Fung [55]).

Il vettore delle tensioni, funzione della posizione e della superficie attraverso la quale viene valutato, è scomponibile in una componente normale alla superficie, σ , che rappresenta le tensioni normali, ed una componente tangenziale alla stessa, τ , che rappresenta le tensioni tangenziali. In particolare, per le tensioni normali si avrà:

$$\sigma = \mathbf{t} \cdot \mathbf{n}$$

dove \mathbf{n} è il vettore normale alla superficie considerata.

4.1.3 Il modulo elastico o modulo di Young

Il modulo elastico o modulo di Young, definito come il rapporto tra la tensione applicata e la deformazione derivante, costituisce una grandezza fondamentale per la caratterizzazione di un materiale che presenti stati deformativi infinitesimi e comportamento elastico, in quanto è correlato alla rigidità dello stesso:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad [Pa]$$

4.2 Aspetti fondamentali del comportamento dei tessuti biologici molli

Le caratteristiche meccaniche che accomunano la maggior parte dei tessuti molli sono la non linearità per struttura e per materiale, l'anisotropia e la viscoelasticità, le quali verranno brevemente descritte nel seguito (ove non citato esplicitamente si faccia riferimento a [49, 55, 56, 57, 58]).

4.2.1 Non linearità

I tessuti molli sono caratterizzati dal presentare deformazioni finite (ovvero superiori al 4%) e, pertanto, il processo deformativo deve essere descritto mediante una formulazione cinematica non lineare. In casi di questo tipo si parla comunemente di *non linearità per geometria*. Inoltre, la relazione tenso-deformativa stessa presenta non linearità, definendo quindi la *non linearità per materiale*.

Nel caso di materiali biologici, la non linearità dipende dalla struttura del collagene, il quale presenta configurazioni variamente arricciate (crimped) in funzione dell'entità del carico applicato: normalmente le fibre presentano un aspetto ondulato, il quale tuttavia scompare se il materiale viene posto in trazione [58].

4.2.2 Simmetria anisotropa

La simmetria di un materiale è fortemente correlata all'organizzazione microstrutturale che esso possiede. Nel caso di materiali biologici, questa organizzazione dipende soprattutto da come sono disposte tridimensionalmente le varie componenti fibrose della ECM e dalla loro interazione. Analizzando nello specifico le fibre di collagene, queste ultime si dispongono nel tessuto nella direzione prevalente di tensionamento a trazione, riflettendo specifiche necessità funzionali del tessuto [58]. Se il tessuto *in vivo* viene sollecitato maggiormente in una particolare direzione, le fibre di collagene si troveranno orientate in quella direzione conferendo caratteristiche di anisotropia, analogamente, se il tessuto viene sollecitato lungo più direzioni, le fibre non presenteranno un'unica orientazione, conferendo caratteristiche di isotropia. Nella maggior parte dei tessuti biologici gli stati di tensioni sono molto differenziati sia dal punto di vista direzionale sia di intensità,

pertanto tali disposizioni sono talmente complesse ed articolate da conferire al tessuto comportamenti meccanici altamente variabili in funzione della direzione considerata.

4.2.3 Viscoelasticità

Un materiale viene definito *viscoelastico* se lo stato di tensione non dipende unicamente dallo stato di deformazione corrente, in base all'equazione costitutiva caratteristica dello stesso, ma anche dalla precedente storia di carico e quindi dal fattore temporale. Questo particolare comportamento può dipendere dalle interazioni di scorrimento tra le fibre di collagene e i proteoglicani, i quali, trattenendo grandi quantità di acqua forniscono la lubrificazione delle fibre stesse [57]. Un biomateriale che soddisfa questa definizione presenta dipendenza della rigidezza dalla velocità di deformazione e i fenomeni di creep, rilassamento delle tensioni ed isteresi.

Il comportamento meccanico di questo tipo di materiali può essere descritto mediante alcuni modelli specifici come, ad esempio, il *modello di Maxwell*, il *modello di Voigt* ed il *modello di Kelvin* (Figura 4.3). Questi ultimi sono costituiti da una combinazione variabile di elementi elastici lineari e smorzatori viscosi, arrangiati in modo tale da descrivere, in forma più o meno approssimata a seconda dello schema reologico, il comportamento viscoelastico del materiale.

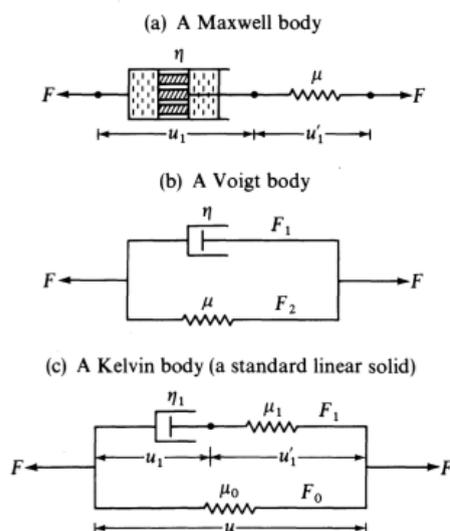


Figura 4.3: I modelli reologici per la viscoelasticità. I modelli più comuni sono costituiti dal modello di Maxwell, dal modello di Voigt e dal modello di Kelvin (Fung [55]).

Creep Si definisce creep il processo di variazione dello stato deformativo, in funzione del parametro temporale, in condizioni di tensione imposta costante (Figura 4.4). In particolare, la deformazione tende ad aumentare nel tempo, assumendo un andamento asintotico per tempi relativamente lunghi, cui corrisponde lo sviluppo completo del fenomeno viscoso.

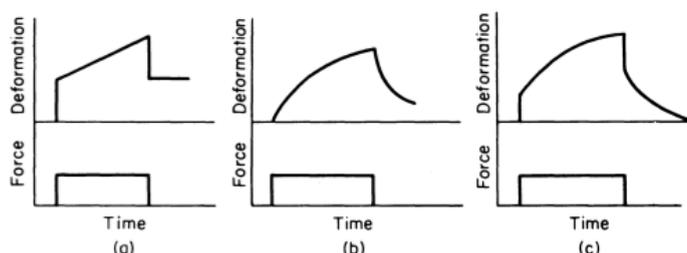


Figura 4.4: Il fenomeno di creep. Applicando una tensione costante ad un corpo viscoelastico è possibile osservare la progressiva deformazione dello stesso, la quale viene descritta con accuratezza differente a seconda del modello reologico considerato (Fung [55]).

Rilassamento delle tensioni Si definisce rilassamento delle tensioni il processo di variazione temporale dello stato tensione in condizioni di deformazione imposta costante (Figura 4.5). La tensione assume valore massimo in corrispondenza dell'istante di applicazione del carico ed in funzione del modulo elastico. Successivamente decade esponenzialmente nel tempo, sviluppando, per tempi relativamente lunghi, un comportamento asintotico. L'asintoticità è interpretabile come lo sviluppo completo del fenomeno viscoso.

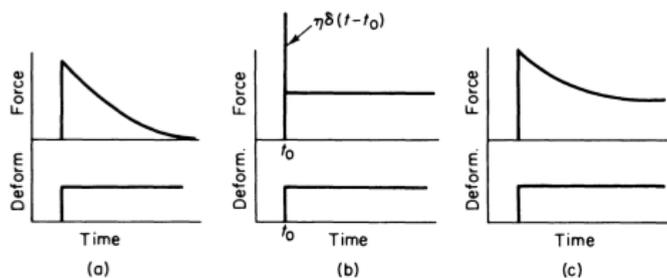


Figura 4.5: Il fenomeno di rilassamento delle tenzioni. Applicando una deformazione costante ad un corpo viscoelastico è possibile osservare la progressiva diminuzione delle tensioni ad esso applicate, le quali vengono descritte con accuratezza differente a seconda del modello reologico considerato (Fung [55]).

Isteresi Si definisce isteresi il processo in base al quale si ha dissipazione di energia per cicli successivi di carico e scarico del materiale. I cicli possono essere realizzati sia per deformazioni imposte sia per tensioni imposte e l'energia dissipata viene definita come l'area racchiusa dalla curva tenso-deformativa. L'ampiezza dell'isteresi è strettamente dipendente dalle caratteristiche del tessuto e varia molto al variare di quest'ultimo.

4.2.4 Pseudoelasticità

L'esistenza di cicli di isteresi nelle curve di tensione-deformazione di tessuti sottoposti a carichi ciclici, definisce un comportamento non elastico del materiale. Infatti un materiale viene definito elastico se lo stato tensionale dipende unicamente dallo stato deformativo, ovvero prescindendo completamente dal fattore temporale e dalla storia di carico. Per questo motivo, è frequente definire i tessuti biologici come *pseudo-elastici*, ovvero non sono elastici, ma durante cicli periodici di carico-scarico è possibile evidenziare una relazione tenso-deformativa stazionaria e non dipendente dalla velocità di deformazione [56]. Le due curve che compongono il ciclo possono, pertanto, essere considerate separatamente utilizzando la teoria dell'elasticità per descrivere le proprietà meccaniche del materiale.

4.2.5 Il comportamento tenso-deformativo

La risposta tenso-deformativa a trazione caratteristica dei tessuti molli è suddivisibile in tre fasi distinte [57, 58] (Figura 4.6):

Prima fase Partendo da una condizione iniziale di assenza del carico, nella quale le fibre di collagene non sono tensione ed appaiono naturalmente arricciate (crimped), l'applicazione di una forza comporta il progressivo uncrimping delle fibre e l'allineamento delle stesse nella direzione di tensionamento. In questa fase il tessuto va incontro a deformazioni consistenti, pur presentando stati tensionali ridotti. Il comportamento è approssimativamente lineare e a simmetria isotropa. È pertanto possibile definire un primo modulo elastico, il quale assume valori ridotti. In questa fase il contributo del collagene è parziale (si parla infatti di *fase dell'elastina*), in quanto la maggior parte delle fibre non presenta ancora la trazione ed il meccanismo di allungamento è determinato principalmente dall'elastina.

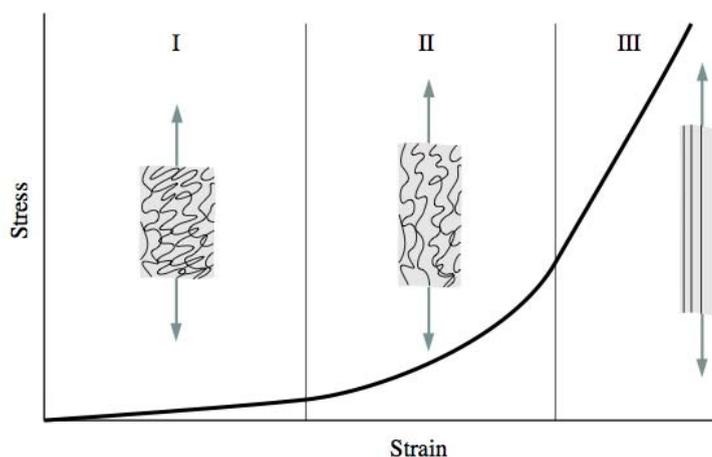


Figura 4.6: *Curva tenso-deformativa a trazione caratteristica dei tessuti molli.* Le curve di carico dei tessuti biologici molli presentano tre fasi distinte (corrispondenti alla fase dell'elastina, ad una fase intermedia e alla fase del collagene) associate ad ben determinata morfologia delle fibre di collagene (Lemaitre [57]).

Seconda fase In seguito al progressivo aumento del carico, un numero sempre maggiore di fibre di collagene viene allineato nella direzione considerata, allungandosi progressivamente ed interagendo con la ECM. Le fibre entrano in uno stato di tensionamento crescente.

Terza fase Le fibre sono totalmente allineate e tensionate, il materiale presenta nuovamente un comportamento approssimativamente lineare in cui è possibile definire un secondo modulo elastico associato alla fase collagenica vera e propria. Questa seconda regione di linearità viene considerata come la soglia della reversibilità del processo deformativo. Infatti, l'aumento ulteriore del carico applicato, comporta la progressiva rottura delle fibre. Questa fase di danno ha inizio in corrispondenza del raggiungimento della tensione di rottura, la quale rappresenta il punto massimo della curva tensione-deformazione del materiale.

4.3 Prove sperimentali di trazione

Per determinare le proprietà meccaniche di un materiale è necessario progettare dei test sperimentali tali da mettere in evidenza le caratteristiche che si intende osservare. In particolare, al fine di ottenere dati rappresentativi della reale natura del materiale, le prove dovrebbero essere allestite ponendo

molta cura nel realizzare condizioni al contorno (sia di carico che di natura chimico-fisica) effettivamente rappresentative dell'ambiente in cui il campione si colloca naturalmente [57]. I dati derivati, infatti, sono fortemente influenzati dal progetto di test, pur costituendo questi ultimi unicamente una condizione approssimata della realtà.

Anche nel caso di tessuto miocardico, le prove di trazione possono essere eseguite in diverse modalità a seconda del numero delle direzioni lungo le quali il campione viene caricato. Le prove di più semplice realizzazione sono le monoassiali, che permettono un maggior controllo delle condizioni al contorno. Tuttavia, dato il carattere anisotropo dei tessuti biologici, queste ultime non permettono la completa caratterizzazione tridimensionale del materiale [58].

4.3.1 Trazione monoassiale

Dal punto di vista matematico, le prove di trazione monoassiale rappresentano un caso particolare di prove biassiali [49]. Il campione utilizzato viene preparato in modo tale da presentare forma rettangolare, di lunghezza maggiore della larghezza. La direzione di applicazione del carico coincide con la direzione di dimensione prevalente del campione stesso. Per ottenere il comportamento complessivo del campione è possibile combinare le informazioni derivanti da prove monoassiali realizzate lungo più direzioni.

4.3.2 Trazione biassiale planare

Le prove biassiali rappresentano un tipo di prova molto più generale e che permette di ottenere informazioni più complete sul comportamento biomeccanico. Il campione viene preparato in forma quadrata o di croce e trazione lungo due direzioni (Figura 4.7).

4.3.3 Ancoraggio del campione

Nell'esecuzione delle prove meccaniche la continuità del tessuto viene necessariamente interrotta al fine di ottenere i campioni da testare. Pertanto, per garantire il trasferimento del carico, è necessario fissare il campione al sistema di test. Nel lavoro di Waldman et al. [59] viene eseguita un'analisi computazionale volta a valutare come differenti metodi di ancoraggio

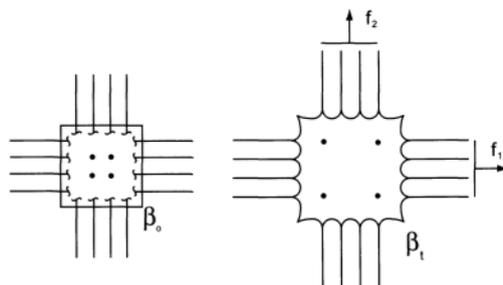


Figura 4.7: Schema di una prova a trazione biassiale. I singoli vincoli permettono di deformare ogni lato del campione in risposta al carico applicato ortogonalmente. Il campo delle deformazioni e delle tensioni risulta essere omogeneo nella regione centrale del campione ed eterogeneo nelle regioni limitrofe. (Humphrey [49])

(l'utilizzo di suture e di grip) influenzino le condizioni di vincolo e la trasmissione dei carichi nel tessuto in una prova di trazione biassiale (Figura 4.8). In particolare, risulta che questi metodi influenzano notevolmente il comportamento meccanico misurato: i campioni fissati per mezzo di grip presentano meno estensibilità, maggiore rigidità e si osserva la generazione di tensioni e deformazioni per scorrimento di entità inferiore. Questa osservazione potrebbe essere dovuta al fatto che l'utilizzo della grip permette di caricare con continuità le fibre di collagene che si trovano nei bordi del campione, mentre nel caso dell'uso di suture, il carico viene trasferito per mezzo di punti discreti e solo le fibre in prossimità di questi ultimi vengono caricate direttamente. Si presuppone che analoghe considerazioni possano essere ragionevolmente applicate anche al caso monoassiale.

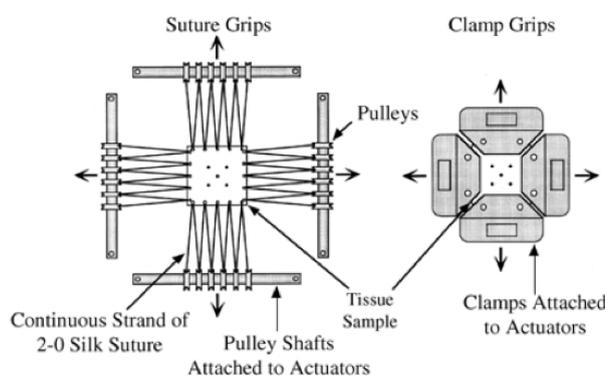


Figura 4.8: Differenti metodi di ancoraggio del campione in una prova biassiale. Il metodo di ancoraggio può influenzare i vincoli imposti alle fibre che si trovano sulle estremità del campione, e pertanto può avere effetti sul trasferimento del carico e sulle proprietà meccaniche misurate (Waldman et al. [59]).

4.4 La parete ventricolare cardiaca ed il tessuto miocardico

L'analisi dell'anatomia macroscopica (Capitolo 1) e microscopica (Capitolo 2) pone in evidenza le caratteristiche di eterogeneità, incomprimibilità, simmetria e possibile non linearità nella risposta al carico del cuore ed in particolare della parete ventricolare, in analogia a quanto accade nella maggior parte dei tessuti molli.

4.4.1 Le caratteristiche generali

Analizzando la struttura e la composizione delle pareti ventricolari e del tessuto miocardico che le costituisce (si veda Capitolo 2) è possibile rilevare particolari caratteristiche, che permettono di comprendere il comportamento meccanico dei vari elementi che costituiscono il cuore ed, eventualmente, mettere a punto dei modelli costitutivi del materiale.

Per questa sezione, ove non citati esplicitamente, si considerino i seguenti riferimenti: [49, 55, 60, 61, 62].

L'eterogeneità Considerando la funzione del muscolo cardiaco, i ventricoli, ed in particolare la loro struttura muscolare, costituiscono gli elementi fondamentali per lo svolgimento dell'azione di pompaggio. Il tessuto che li compone può essere definito come un materiale composito [58], nel quale convivono in stretto rapporto una componente cellulare di natura muscolare, preponderante (circa il 90% del peso a secco del miocardio), ed una componente di matrice (la ECM composta a sua volta da cellule, sostanza amorfa, ma soprattutto fibre in cui il collagene rappresenta dal 2 al 5% del peso a secco del miocardio). Analizzando le due pareti ventricolari, destra e sinistra, è possibile rilevare che lo spessore e l'organizzazione microstrutturale è drammaticamente diversa. Tale aspetto riflette il differente carico di lavoro (in termini anche di pressione interna alla cavità) cui sono sottoposte. Considerando la singola parete ventricolare sinistra, si può osservare che nello spessore miocardico è presente una maggiore quantità di collagene ed un più elevato impaccamento delle cellule cardiache nella regione esterna piuttosto che nella regione interna. Pertanto, il comportamento biomeccanico risulta essere fortemente differenziato non solo a livello globale, ma anche localmente in funzione della profondità nello spessore [49].

L'incomprimibilità La maggior parte dei tessuti molli contiene grandi quantità di acqua, che può trovarsi sia allo stato libero sia vincolato (ad esempio ai GAGs contenuti nella ECM). In particolare, analizzando separatamente i tessuti che compongono le pareti ventricolari, nell'epicardio e nell'endocardio i movimenti della fase liquida associata ai compartimenti interstiziale e cellulare risultano, nella maggior parte delle condizioni fisiologiche di interesse, limitati. Pertanto è possibile assumere l'ipotesi di incomprimibilità. Considerazioni analoghe sono valide anche per il miocardio, tuttavia è necessario considerare che quest'ultimo presenta un'estesa vascolarizzazione: la rete dei vasi contiene, infatti, liquidi caratterizzati da elevata mobilità. Questi aspetti modificano le proprietà di incomprimibilità del tessuto, evidenziando un comportamento differente a seconda che sia presente o meno la perfusione dell'organo [49].

La simmetria Il tessuto cardiaco presenta una struttura altamente complessa ed organizzata non riconducibile ad un continuo, in quanto composta da strati discreti di muscoli sovrapposti (Figura 4.9). Questi ultimi scorrono gli uni sugli altri, durante la contrazione dell'organo, seguendo i piani di clivaggio [63]. La descrizione accurata di queste conformazioni non è oggetto di questo lavoro, pertanto si rimanda ai seguenti lavori [64, 65, 66, 67, 68].

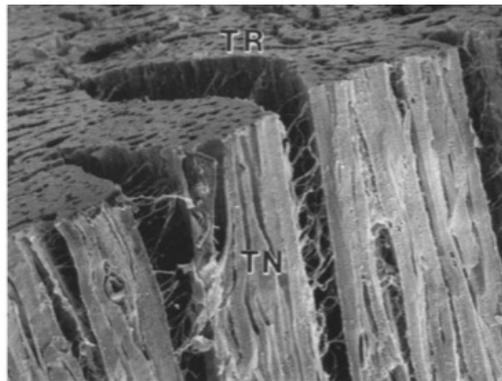


Figura 4.9: Organizzazione gerarchica in lamine del miocardio sinistro. Le immagini ottenute tramite microscopio elettronico a scansione mettono in evidenza l'organizzazione complessa della parete ventricolare composta dai cardiomiociti e dalle fibre di collagene comprese tra layer adiacenti (LeGrice et al. [63]).

Benché l'architettura dei singoli fasci muscolari suggerisca la presenza di una simmetria trasversalmente isotropa, considerando la struttura a lamine

è più corretto parlare di ortotropia con simmetria trasversalmente isotropa per ognuna di esse [49].

Nel ventricolo destro, inoltre, è riscontrabile un maggiore grado di anisotropia. Dal momento che il cuore, come ogni altra struttura biologica, costituisce un paradigma di efficienza, una possibile spiegazione potrebbe essere l'esistenza di una stretta correlazione tra l'orientazione media delle fibre che costituiscono il ventricolo e la direzione di massima contrazione sistolica [58].

Non linearità Il miocardio presenta caratteristiche meccaniche analoghe alla maggior parte dei tessuti biologici, quali non linearità per materiale e per geometria. Nello specifico, si osserva che la risposta del materiale è indifferente all'orientazione per piccole deformazioni, mentre la risposta si differenzia nella direzione longitudinale e trasversale per alti valori di deformazione, manifestando un comportamento non lineare e anisotropo [49].

4.4.2 Funzione meccanica delle diverse componenti

Come descritto in precedenza, il miocardio di lavoro è la componente funzionale del cuore che permette a quest'ultimo di esercitare la propria funzione di pompaggio del sangue attraverso i condotti che costituiscono la rete dei vasi del sistema cardiocircolatorio. È costituito da un tipo specifico di cellule muscolari, le cellule muscolari cardiache. Queste ultime, congiuntamente ai fibroblasti del tessuto connettivo, costituiscono i due tipi cellulari prevalenti nel miocardio e si trovano incluse nella complessa rete di fibre che compongono la ECM. Tali fibre comprendono prevalentemente collagene, nello specifico il collagene di tipo I, arrangiato localmente nella forma di fasci tra loro disposti parallelamente, ed elastina. Queste due componenti sono strettamente correlate tra loro e svolgono funzioni differenti, permettendo di definire il tessuto connettivo come *materiale composito fibro-rinforzato*, il cui comportamento è fortemente influenzato dalla concentrazione e dall'arrangiamento dei suoi costituenti [57].

4.4.2.1 Il collagene

La componente collagenica fornisce al cuore la propria integrità strutturale, influenzando la contrazione ed il rilassamento dei cardiomiociti da essa

interconnessi [49, 58]. La presenza di legami crociati intermolecolari tra le molecole di tropocollagene e l'associazione gerarchica dei fasci ondulati di collagene di tipo I e III, conferiscono resistenza a trazione al tessuto (direttamente proporzionale alla sezione trasversale delle fibre), preservando le cellule muscolari dall'eccessivo allungamento e permettendo la trasmissione di carichi, anche consistenti, all'intero tessuto (Figura 4.10). Per analoghe motivazioni, queste fibre non presentano una buona resistenza alla torsione ed alla flessione.

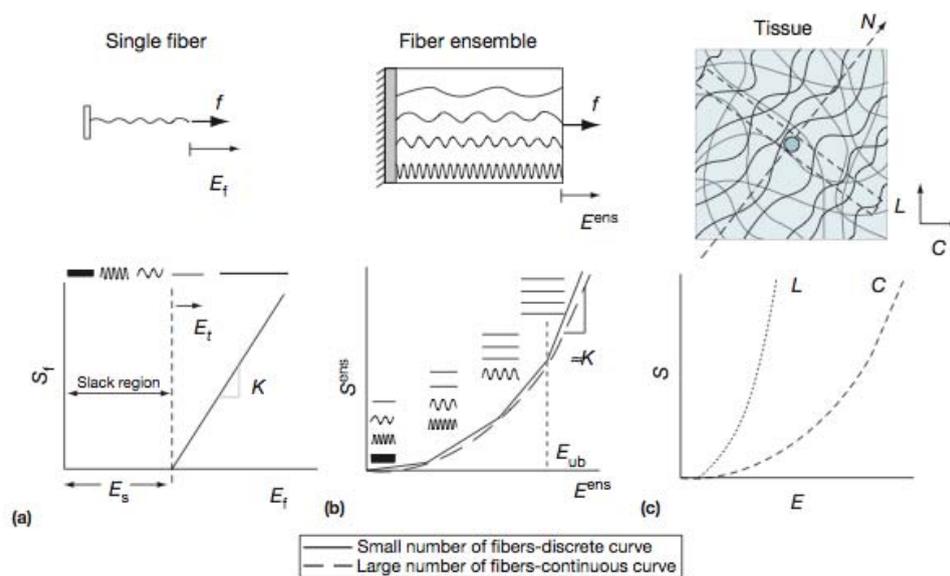


Figura 4.10: Caratteristiche tenso-deformative delle fibre di collagene. La presenza nel tessuto di fibre di collagene cui sono associate livelli differenziati di crimping, ha come conseguenza la generazione di curve tenso-deformative non lineari. Le fibre conferiscono, a seconda della loro distribuzione, le caratteristiche di anisotropia che spesso si riscontrano nei tessuti biologici (Ducheyne et al. [58]).

4.4.2.2 L'elastina

L'elastina non possiede un'organizzazione strutturale gerarchica, ma presenta una conformazione di riposo a gomitolato statistico, corrispondente ad uno stato a minima energia e massimo entropia. Le fibre di elastina possono scorrere le une sulle altre permettendo la distensione ed il ritorno delle stesse allo stato iniziale [47]. La conformazione randomica e, conseguentemente l'entropia, variano in funzione dello stato deformativo del materiale [55, 57]. In particolare, questa proteina conferisce caratteristiche di elasticità al tessuto e la possibilità di realizzare grandi deformazioni [58].

4.5 Le prove meccaniche sul tessuto cardiaco decellularizzato per perfusione: stato dell'arte

Le caratteristiche meccaniche della matrice ottenuta in seguito all'applicazione di processi di decellularizzazione sono correlate al grado di degradazione delle varie componenti della stessa. La modifica di queste componenti e delle conseguenti proprietà meccaniche può influenzare il processo di differenziamento cellulare ed, in generale, il risultato del costrutto ingegnerizzato *in vivo* [2]. In particolare, in alcuni studi citati in [7] si è osservato che la rigidità dello scaffold influenza significativamente la maturazione ed il differenziamento dei cardiomiociti, lo sviluppo dell'allineamento dei sarcomeri e la generazione della forza contrattile. Inoltre, le proprietà meccaniche della matrice contribuiscono al mantenimento della quiescenza dei fibroblasti.

In letteratura sono presenti diversi tipi di prove (a trazione [1, 8, 9], di indentazione [4, 7] e di insufflazione [5]) realizzate per comparare le proprietà del tessuto nativo e decellularizzato con differenti protocolli.

4.5.1 Prove sul tessuto cardiaco di ratto

I primi test meccanici realizzati su pareti ventricolari decellularizzate per perfusione totale dell'organo vennero eseguite in Ott e al. [1]. In particolare, in questo lavoro vengono ricavati campioni di ventricolo sinistro di ratto nella forma di croce, in modo che i due bracci della stessa siano allineati nelle direzioni longitudinale e trasversale.

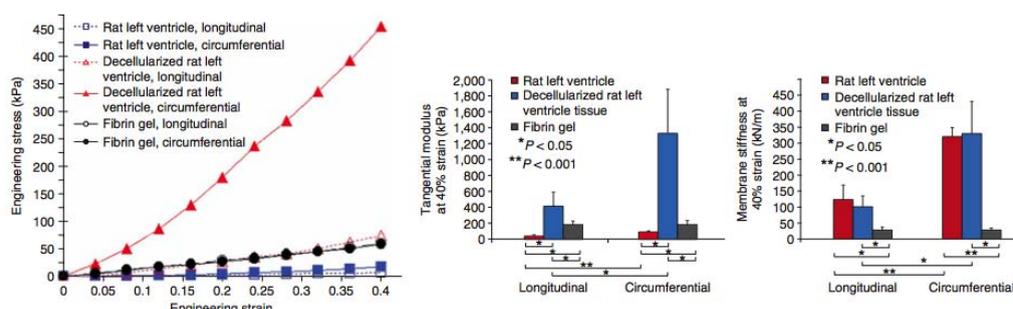


Figura 4.11: Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Ott et al. Le prove a trazione realizzate evidenziano caratteristiche di anisotropia del tessuto ed un aumento del modulo elastico, in entrambi i ventricoli, nel caso di tessuto decellularizzato [1].

I campioni, immersi in PBS vengono sottoposti a prove di trazione (imponendo una deformazione del 40%) e di rilassamento delle tensioni (trazionandoli ad incrementi del 4% della deformazione e osservando il fenomeno per 60 s). Viene inoltre calcolato il modulo tangenziale (Figura 4.11). Quello che si osserva è un comportamento anisotropo: il modulo calcolato risulta essere significativamente maggiore nel caso di tessuto decellularizzato rispetto al caso nativo ed, inoltre, quest'ultimo è differente nelle due direzioni considerata, presentando valori maggiori nella direzione circonferenziale.

Un altro riferimento per le prove realizzate su tessuto decellularizzato di ratto con protocollo analogo a [1], è rappresentato dal lavoro di Witzenburg et al. [8] (Figura 4.12). In quest'ultimo vengono valutate, mediante prove di trazione biassiale ed un complesso protocollo di test, la rigidità del ventricolo destro nelle direzioni longitudinale e circonferenziale, l'anisotropia e l'eterogeneità. È stato quindi messo nuovamente in evidenza l'aumentata rigidità della parete ventricolare decellularizzata, mentre gli indici di anisotropia e di eterogeneità non hanno dimostrato variazioni rispetto alla condizione di tessuto nativo (Figura 4.12).

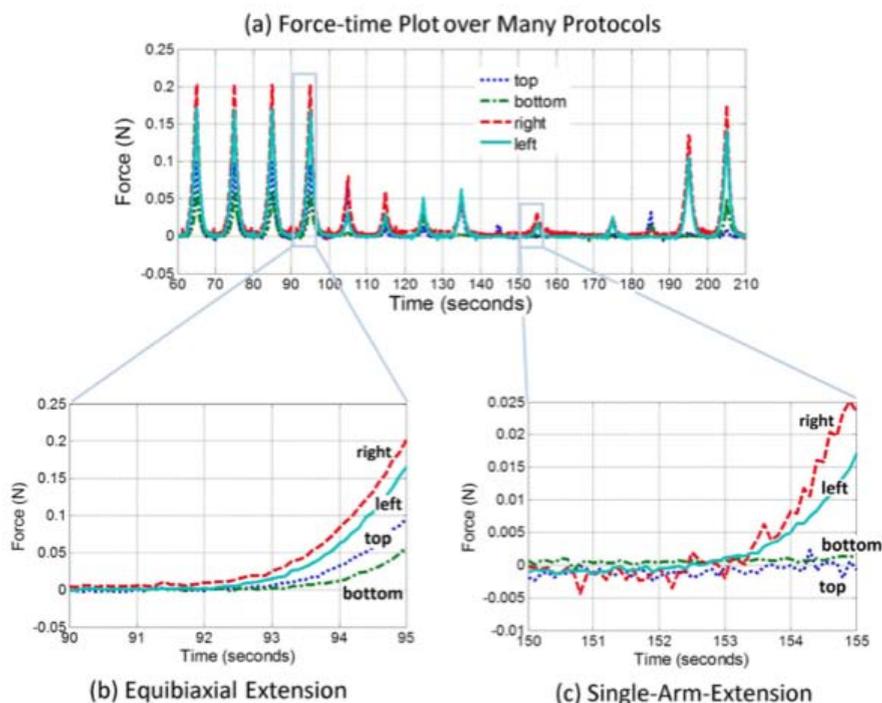


Figura 4.12: Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Witzenburg et al. Nelle curve riportate si verifica che le forze maggiori vengono registrate nella direzione circonferenziale [8].

4.5.2 Prove sul tessuto cardiaco di maiale

In Wainwright et al. [4] le caratteristiche meccaniche del tessuto porcino vengono testate mediante prove di indentazione realizzate per mezzo di un indentatore sferico, il quale viene fatto avanzare con una velocità costante fino alla lacerazione dello strato epicardico. Da questo test è risultato che il massimo della forza o l'estensione della parete in corrispondenza dello stesso, non presenta differenze tra il tessuto nativo e il tessuto decellularizzato. L'estensione media risulta invece maggiore nei nativi (Figura 4.13).

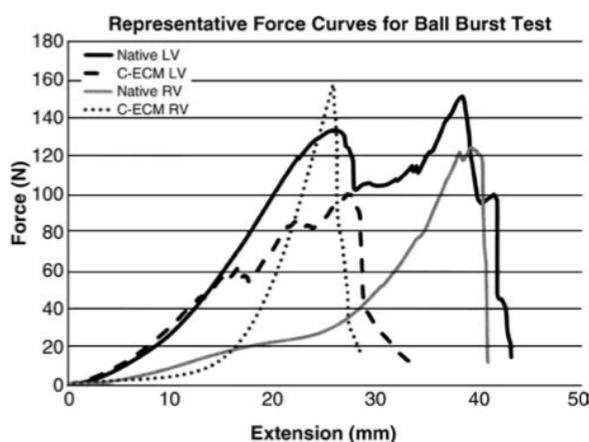


Figura 4.13: Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Wainwright et al. L'indentazione della parete ventricolare produce delle curve con picchi multipli nel caso di tessuto nativo e andamenti più regolari nel caso di tessuto decellularizzato. Queste osservazioni possono essere giustificate da fatto che, nel primo caso ci possono essere delle rotture a differenti livelli degli stati che costituiscono la parete, mentre nel secondo le curve sono consistenti con il movimento di rotazione ed estensione delle fibre risultante dalla dilatazione del cuore durante la decellularizzazione [4].

Un esempio di prova di indentazione è quella realizzata in Weymann et al. [5]. In particolare, viene utilizzato un pallone di lattice introdotto nel ventricolo sinistro di maiale attraverso l'aorta e gonfiato misurandone la pressione risultante per mezzo di un manometro. Rispetto a campioni decellularizzati seguendo il protocollo presentato in [4] non vi sono differenze sostanziali tra le pressioni rilevate nel ventricolo sinistro nativo e nel decellularizzato con questo nuovo protocollo (Figura 4.14).

Un'analisi più approfondita sullo stato delle fibre principali che compongono la ECM (il collagene e l'elastina) viene presentato in Merna et al. [7]. Tali fibre vengono studiate con metodi ottici in maniera non invasiva. Le osservazioni derivate sono state utilizzate per chiarire i risultati dei test

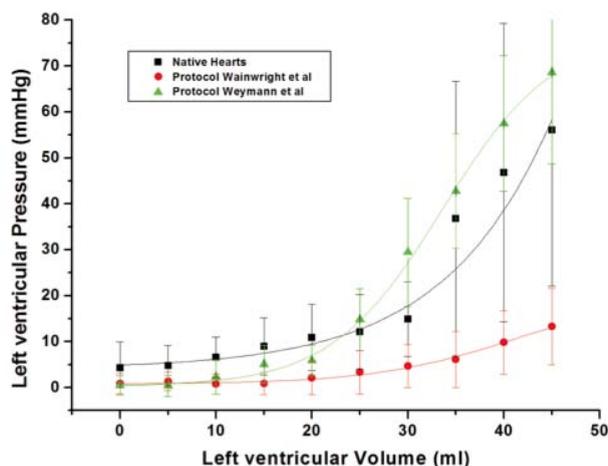


Figura 4.14: Prove meccaniche realizzate su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Weymann et al. Il protocollo presenta profili di pressione molto simili a quelli misurati nella camera ventricolare nativa [5].

meccanici realizzati per indentazione con una piastra incollare di raggio pari a 5 mm, fatta avanzare alla velocità costante di 0.02 mm/s. I campioni sono stati posti a compressione realizzando una deformazione del 20%. I risultati (Figura 4.15) mostrano che il modulo di compressione è ridotto rispetto al caso nativo nella maggior parte dei casi. Si registra, tuttavia, un aumento del modulo solo nel caso del protocollo realizzato unicamente con il Triton X-100. Questo incremento può esser dovuto all'incremento della densità dell'elastina e del crimping del collagene.

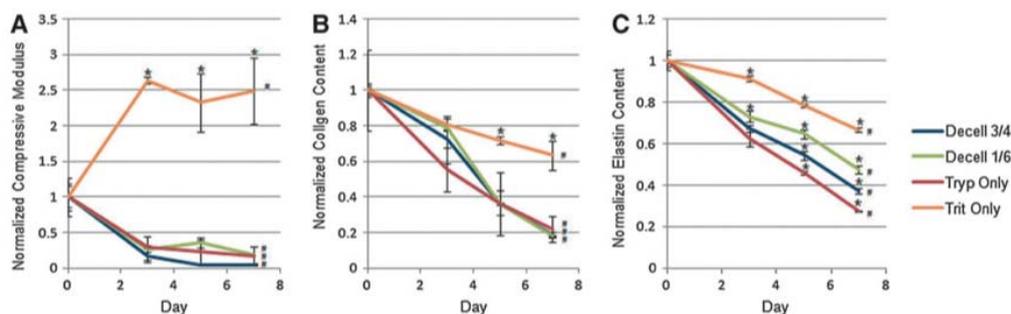


Figura 4.15: Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in Merna et al. Il modulo di compressione risulta essere maggiore, rispetto al caso nativo e agli altri protocolli realizzati, nel protocollo in cui viene utilizzato solo Triton X-100. Nello stesso si riscontra un maggiore contenuto di collagene ed elastina [7].

In Methe et al. [9] vengono invece realizzate prove di trazione monoassiale: i campioni, prelevati da quattro differenti parti del cuore (ventricoli

ed auricole entrambi destri e sinistri) in direzione sagittale, vengono preparati in sezioni sottili e trazionati fino alla rottura degli stessi. Nonostante la variabilità tra campioni appartenenti allo stesso gruppo, è possibile fare le seguenti osservazioni: il modulo elastico è maggiore nel ventricolo destro) il processo di decellularizzazione incrementa la rigidezza nel ventricolo sinistro (ma non nel destro, le tensioni misurate nel ventricolo destro nativo sono maggiori del sinistro corrispondente, mentre nel decellularizzato sono entrambe maggiori rispetto al nativo (Figura 4.16).

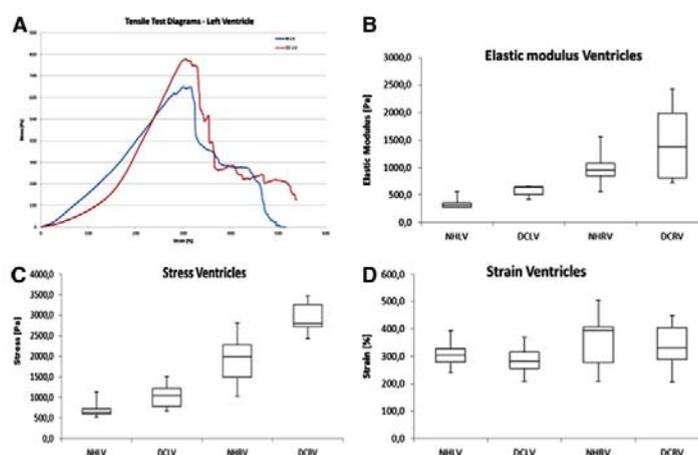


Figura 4.16: Prove meccaniche su pareti ventricolari decellularizzate realizzate in *Methe et al.* Sono riportati le curve rappresentative del comportamento tenso-deformativo dei ventricoli sinistri nel caso di tessuto nativo e decellularizzato, i valori del modulo elastico e delle tensioni e deformazioni misurate [9].

Parte II

Sperimentazione

Capitolo 5

Materiali e metodi

Nel presente capitolo verranno descritti i protocolli adottati per la decellularizzazione totale mediante perfusione del cuore, le metodiche di analisi istologiche ed immunoistochimiche utilizzate per verificare l'efficacia della procedura a livello microscopico ed infine i test biomeccanici realizzati per verificare le proprietà meccaniche della ECM cardiaca così ottenuta.

5.1 Preparazione degli organi cardiaci decellularizzati

La decellularizzazione è stata eseguita su cuori isolati di ratto e realizzata mediante l'incannulazione dell'aorta e perfusione coronarica retrograda del muscolo cardiaco per mezzo di detergenti e soluzioni secondo i tre differenti protocolli adottati. In questo modo è stato possibile ottenere scaffold di matrice extracellulare cardiaca (cECM) che possiedono la geometria tridimensionale tipica dell'organo nativo e una vascolarizzazione intatta.

5.1.1 Preparazione e sacrificio degli animali sperimentali

Gli animali utilizzati sono stati stabulati in ambiente controllato, con alimentazione ed abbeveraggio *ad libitum*. Tutte le procedure chirurgiche e farmacologiche usate nella sperimentazione sono state effettuate in accordo ai regolamenti espressi nelle linee guida del Ministero Italiano della Salute, nel Decreto Legislativo 116, art. 12 del 21/01/1992 e nella Direttiva Euro-

pea 2010/69/EU sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali, entrata in vigore dal 1° gennaio 2013.

Per gli esperimenti sono stati sacrificati 54 ratti maschi albini adulti di ceppo Wistar, di età compresa tra 5 e 7 settimane e peso compreso tra 150 ed 175 g (Figura 5.1). Di questi, sono stati utilizzati 24 cuori per il dimensionamento dell'apparato di perfusione e la definizione dei protocolli di decellularizzazione, e 30 organi per le prove meccaniche.

Al fine di evitare la formazione e l'accumulo post-mortem di coaguli nel circolo coronarico, nelle cavità cardiache e nei grossi vasi del cuore, gli animali sono stati preventivamente trattati mediante eparinizzazione sistemica (circa 0.9 μ l di eparina per unità di peso corporeo), somministrata attraverso iniezione intraperitoneale. Dopo un'attesa di circa 20 minuti, i ratti sono stati anestetizzati mediante iniezione di xilor (xilazina 0.4 mg / 100 g per via sottocutanea, Bio 98 Srl, Italia) e di zoletil (associazione al 50% di tilemina e zolazepan, 9 mg / 100 g per via intramuscolare, Virbac, Italia) e soppressi mediante dislocazione cervicale.

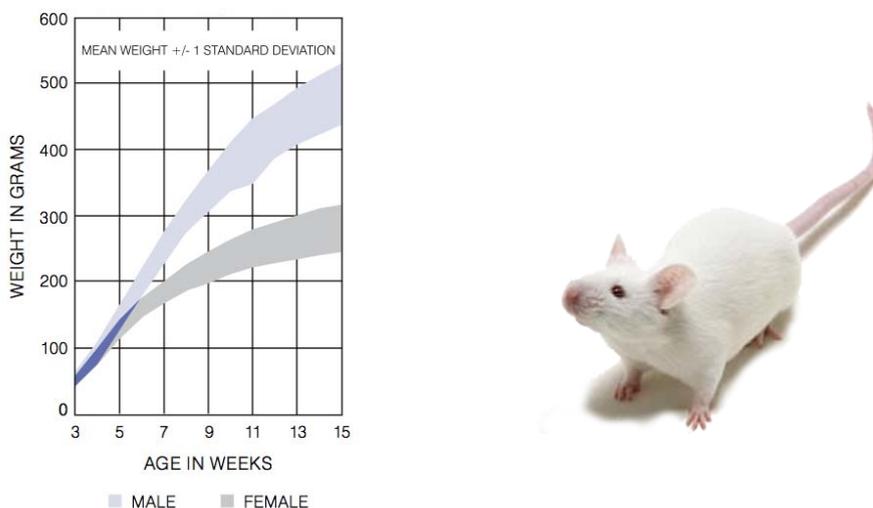


Figura 5.1: Il ratto Wistar. Nell'immagine viene riportata la tabella inerente alle relazioni tra peso ed età dell'animale.

5.1.2 Espianto dell'organo ed incannulazione dell'aorta

L'isolamento del cuore viene effettuato dopo soppressione dell'animale. Nello specifico, l'accesso al diaframma viene effettuato mediante un'incisione transaddominale, tagliando i tessuti sovrastanti ed esponendo la cavità toracica. Il torace viene aperto per mezzo di un'incisione bilaterale, lungo

il margine inferiore delle ultime costole fino alle prime. La cassa toracica viene quindi riflessa al di sopra della testa dell'animale, esponendo il cuore. Quest'ultimo viene sorretto con estrema delicatezza, evitando lesioni o contusioni, e sollevato in modo tale da permettere l'incisione dell'aorta, delle vene cave e dei vasi polmonari. L'organo viene immediatamente immerso nella soluzione di perfusione (nel caso in esame PBS e 5 UI/ml di eparina) a +4 °C e posto in ghiaccio [69, 70, 71, 72].

Avendo cura di non tensionare o lacerare la parete, il tratto ascendente dell'aorta viene montato sull'estremità finale di una cannula (Figura 5.2) e fissata con un doppio nodo utilizzando filo di seta intrecciata (SSC, DISTREX S.p.a, Italia). Generalmente, nel caso di animali di piccola taglia, il vaso presenta calibro molto ridotto e consistenza fragile, pertanto l'incannulazione viene realizzata allo stereomicroscopio ZEISS Stemi 2000 (Edmund Optics, Barrington, USA). In particolare, si deve avere l'accortezza di non inserire la cannula eccessivamente in profondità, in modo tale da non occludere gli osti coronarici o danneggiare meccanicamente la parete aortica o la valvola sottostante. Per il tipo di perfusione realizzata si rende infatti necessario che la valvola rimanga competente, al fine di ottenere una pressione sufficiente in corrispondenza degli osti coronarici. Nel caso in cui questa condizione non sia soddisfatta, può verificarsi una riduzione del flusso coronarico a causa della perdita di pressione nel ventricolo sinistro e attraverso la valvola mitrale [69].

Una volta che la cannula è stata fissata, è possibile collegare il cuore all'apparato di Langendorff, procedendo alla rimozione dei tessuti in eccesso (quali porzioni di timo, polmoni, pericardio e grasso che possono essere stati prelevati dall'animale assieme al cuore) ed alla perfusione dell'organo (Figura 5.3).

5.1.3 L'apparato di perfusione

Come accennato in precedenza, tutti i processi di decellularizzazione vengono realizzati per perfusione coronarica retrograda utilizzando l'apparato di Langendorff modificato [74] (l'originale è riportato in Figura 5.4). Il cuore incannulato viene, pertanto, montato sull'apparato e connesso, per mezzo di tubi in teflon aventi diametro di 4mm e di una pompa peristaltica (MINIPULS 2 e MINIPULS 3, Gilson), al reservoir contenente le soluzioni di lavaggio. Il flusso retrogrado e la pressione risultante dalla colonna di per-



Figura 5.2: Le pompe ed i supporti utilizzati per la perfusione. La cannula utilizzata può essere costituita di diversi materiali (metallo, vetro o plastica). Per quanto riguarda il diametro esso è simile o leggermente maggiore del calibro dell'aorta, in quanto deve permettere l'inserimento nell'aorta e presentare un diametro sufficiente da non costituire un impedimento al flusso. Per la perfusione, il cuore viene collegato ad una pompa peristaltica a cui viene imposto un funzionamento a flusso costante.

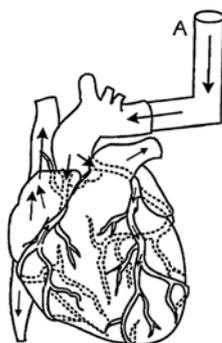


Figura 5.3: Schema della perfusione coronarica retrograda. Per realizzare la decellularizzazione dell'organo, il cuore viene incannulato attraverso l'aorta e ivi perfuso in maniera retrograda con i detergenti designati per il processo. I rimanenti vasi di grosso calibro, quali l'arteria polmonare, le vene cave e le vene polmonari, vengono rimossi in corrispondenza delle emergenze sulla parete cardiaca (Immagine tratta e modificata da [73]).

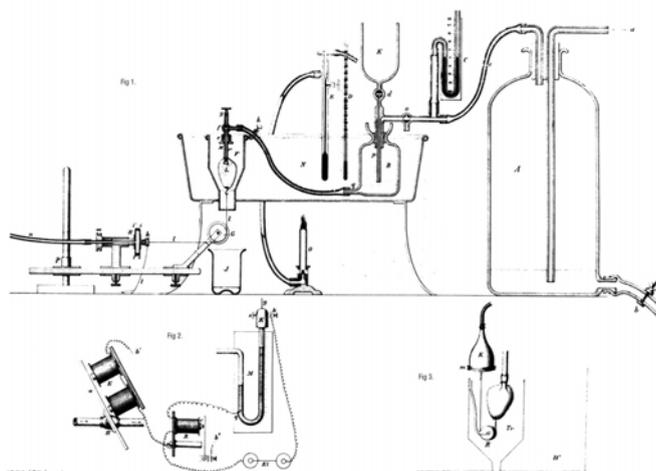


Figura 5.4: Allestimento originale dell'apparato di Langendorff. Originariamente l'apparato consta di una cameretta (F) nella quale viene collocato il cuore incannulato attraverso l'aorta. La cannula permette di collegare lo stesso a reservoir che contengono le soluzioni da perfondere (B e K) e che possono essere riscaldati mediante degli scambiatori di calore (heater, O). La pressione di perfusione viene controllata mediante un manometro (C). Rispetto all'apparato originale, per la decellularizzazione non sono stati utilizzati gli scambiatori di calore ed il controllo della pressione (Langendorff [74]).

fusato che riempie l'aorta, forzano i lembi della valvola aortica a chiudersi, non permettendo l'ingresso dei detergenti all'interno del ventricolo sinistro. Il fluido di perfusione è, pertanto, totalmente diretto verso gli osti coronarici in corrispondenza della radice aortica, attraverso i quali avviene la perfusione dell'intero miocardio. Dopo aver attraversato la circolazione coronarica, il perfusato esce attraverso la circolazione coronarica venosa, dove viene drenato verso l'atrio destro attraverso i seni coronarici.

In questo caso, viene utilizzata la modalità a flusso costante ¹, imponendo flussi tali da permettere la corretta perfusione dell'organo ed un contatto prolungato tra detergenti e pareti (Figura 5.5). Si sceglie quindi di applicare il flusso di 1.5 ml/min per le soluzioni di lavaggio e 2.5 ml/min per le soluzioni costituite dai detergenti principali (si veda il Paragrafo 5.1.4), i quali effettuano la decellularizzazione vera e propria. I due lavaggi iniziali,

¹La perfusione con l'apparato di Langendorff può essere realizzata a pressione costante oppure a flusso costante. Dal punto di vista matematico, i due metodi non presentano differenze: il raggio medio dell'ostio coronarico può fungere da discriminante in quanto è correlato alla resistenza del flusso e risulta direttamente proporzionale alla pressione di perfusione coronarica ed inversamente proporzionale al flusso. Pertanto, non ha importanza quale di queste due grandezze sia costante. Tuttavia vi sono differenze dal punto di vista fisiologico, ad esempio nel caso di studi su stati patologici, quali l'ischemia [70].

inoltre, vengono realizzati per i primi 2 minuti con un flusso elevato (10 ml/min), in quanto, non potendo controllare la pressione di perfusione, si vuole assicurare la corretta apertura degli osti coronarici.

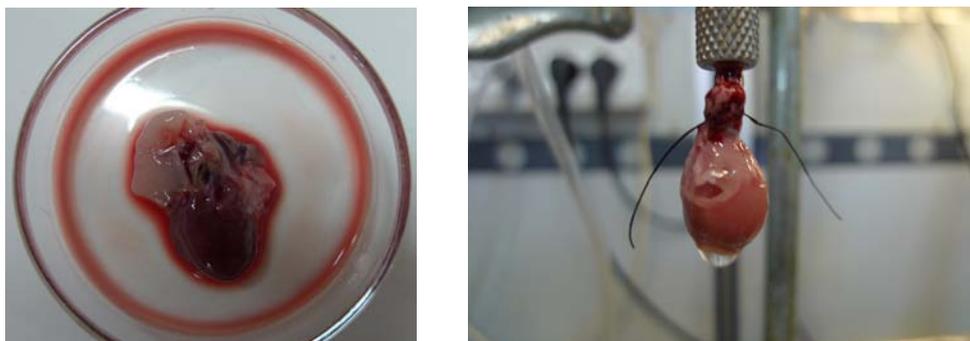


Figura 5.5: *Il cuore nativo espianato ed incannulato. Il cuore espianato dall'animale viene rapidamente incannulato attraverso l'aorta e montato sull'apparato di Langendorff per essere perfuso con le soluzioni di lavaggio.*

5.1.4 I protocolli di decellularizzazione

Allo scopo di estrarre le componenti cellulari endogene dalla matrice cardiaca sono stati impiegati tre differenti protocolli di decellularizzazione: il primo, tratto dalla recente letteratura, è basato principalmente sull'utilizzo, per un periodo di tempo prolungato, di un detergente ionico (l'SDS); il secondo, introdotto originariamente per la decellularizzazione di radici aortiche, utilizza inibitori di proteasi, successioni alternate di lavaggi ipotonici ed ipertonici ed un lavaggio principale con un detergente ionico (il sodio colato o acido colico); il terzo si pone in maniera intermedia tra i due precedenti, in quanto coniuga l'utilizzo di ridotte concentrazioni di SDS all'impiego degli inibitori di proteasi. Inoltre è stata adottata, per l'ultimo protocollo, una metodologia differente di decellularizzazione, ovvero l'immersione completa dell'organo nel perfusato.

Tutti i protocolli presentano un lavaggio iniziale in tampone fosfato salino ² (PBS) eparinizzato (eventualmente contenente un miirilassante) il quale consente di rimuovere il sangue residuo presente all'interno dei vasi coronarici e delle cavità cardiache, e di preparare il cuore alla successiva perfusione con i detergenti.

²Per realizzare il PBS 1x vengono disciolti cloruro di sodio (NaCl, Sigma-Aldrich) 137mM, cloruro di potassio (KCl, Ashland Inc.) 2.7mM, diidrogenofosfato di sodio (Na₂HPO₄, Sigma-Aldrich) 10mM e diidrogenofosfato di potassio (KH₂PO₄, Sigma-Aldrich) 10mM in acqua deionizzata

Tutte le soluzioni di lavaggio sono state preparate immediatamente prima del loro utilizzo e non viene eseguito il ricircolo delle stesse (ovvero la perfusione viene realizzata a perdita). Tale scelta è stata intrapresa al fine di evitare la possibile occlusione dei vasi di calibro minore a causa di residui e detriti cellulari che inevitabilmente costituiscono uno dei prodotti del processo di decellularizzazione.

I lavaggi finali sono realizzati in soluzione fisiologica.

Protocollo con SDS 1% Al protocollo originale proposto da Ott et al. [1] sono state apportate alcune modifiche relative alla modalità di utilizzo dell'apparato di Langendorff (nell'articolo di riferimento viene imposta la pressione costante) e l'adenosina utilizzata nel lavaggio preliminare viene sostituita con il 2,3-butanedione monossime (BDM, Sigma-Aldrich), avente effetto miorilassante analogo.

1. Lavaggio in PBS eparinizzato (5 UI/ml di eparina, Hospira, Lake Forest, IL, USA) contenente BDM 20 mM
(45 minuti, 2 ml/min, in ghiaccio)
2. Soluzione di SDS 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in acqua deionizzata
(15 ore, 2.5 ml/min, RT)
3. Lavaggio in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)
4. Soluzione di Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich) in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)
5. Lavaggio finale in PBS 1x o in soluzione fisiologica
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)

Protocollo TriCol Il protocollo TriCol permette di rimuovere efficacemente le cellule ed i residui cellulari da tessuti planari (pericardio e lembi valvolari) o caratterizzati da geometria più complessa (ad esempio le radici aortiche) [75]. Come tale, viene realizzato immergendo gli stessi nelle soluzioni di lavaggio e ponendo i contenitori in agitatori piani o circolari, in base alla tipologia ed alla struttura del tessuto stesso. Per realizzare la decellularizzazione per perfusione si è reso necessario modificare il protocollo stesso, in modo tale da renderlo adatto alla procedura su organi totali.

Soluzioni principali Il protocollo TriCol si compone di due soluzioni principali le quali permettono di prevenire l'ossidazione dei tessuti ed il danneggiamento della matrice ad opera degli enzimi che vengono liberati in seguito alla lisi cellulare.

Tampone madre "A" (TmA):

- ascorbato di sodio 100 mM (Sigma-Aldrich)
- acido etilendiamminotetraacetico 50mM (Sigma-Aldrich)

diluite in PBS 1x e portato a pH fisiologico 7.4.

Inibitori di proteasi:

- Tipo A (IpA):
fenilmetilsulfonil fluoruro 400 mM (PMSF, Sigma-Aldrich)
N-etilmaleimide 1M (NEM, Sigma-Aldrich)
- Tipo B (IpB):
benzamidina 1 M (Panreac AppliChem, Gatersleben, Saxony-Anhalt, Germania)
iodoacetammide 200mM (Panreac AppliChem)

entrambi portati a volume con dimetilsulfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e conservati aliquotati a -20°C.

Soluzioni specifiche La procedura è stata realizzata tenendo conto che, ove venisse richiesta una temperatura di +4 °C, le soluzioni sono state immerse in ghiaccio. Le stesse non sono state degassate e non sono state rispettate le condizioni di sterilità, ovvero non sono state filtrate. Le soluzioni, inoltre, non contengono azoturo di sodio, in quanto potrebbe causare problemi di citotossicità in vista di un futuro ripopolamento dei costrutti. I tubi utilizzati per la procedura ed il cuore perfuso sono stati mantenuti al buio utilizzando fogli di alluminio.

1. Lavaggio in PBS eparinizzato (5 UI/ml di eparina)
(45 minuti, 2 ml/min, in ghiaccio)
2. Step con inibitori di proteasi: soluzione contenente IpA 0.5%, IpB 0.5%, DMSO 10%, Triton X-100 1% e TmA 10% in acqua deionizzata
(7 ore, 1.5 ml/min, + 4 °C)

3. Lavaggio ipotonico: soluzione contenente TmA 10% in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, +4 °C)
4. Lavaggio ipertonico: soluzione contenente Triton X-100 0.1%, cloruro di sodio 0.5M e TmA 10% in acqua deionizzata
(14 ore, 1.5 ml/min, +4 °C)
5. Lavaggio ipotonico I: soluzione contenente Triton X-100 0.1% e TmA 10% in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, +4 °C)
6. Lavaggio ipotonico II: soluzione contenente Triton X-100 0.1% e TmA 10% in PBS 1x
(30 minuti, 1.5ml/min, RT)
7. Lavaggio con colato di sodio (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) o acido colico (Sigma-Aldrich): soluzione contenente sodio colato 10 mM o acido colico 10 mM in PBS 1x portata a pH 7.4 con idrossido di sodio
(8 ore, 2.5ml/min, RT)
8. Lavaggio in PBS 1x
(30 minuti, 1.5 ml/min, +4 °C)
9. Lavaggio in soluzione fisiologica
(30 minuti, 1.5 ml/min, +4 °C)
10. Lavaggio in soluzione fisiologica e isopropanolo 10% (Panreac Appli-Chem)
(30 minuti, 1.5 ml/min, + 4 °C)
11. Lavaggio in soluzione fisiologica
(30 minuti, 1.5 ml/min, +4 °C)

Protocollo con SDS 0.5% Il nuovo protocollo sviluppato presenta una fase iniziale di lavaggi con inibitori di proteasi e soluzione ipotonica, ed una seconda fase di effettiva decellularizzazione in cui viene utilizzato, per un intervallo di tempo prolungato, l' SDS a concentrazione ridotta rispetto al protocollo di Ott (0.5% invece di 1%). Queste variazioni hanno come razionale l'ottenimento di una matrice maggiormente conservata pur rispettando

l'esigenza di conseguire la completa decellularizzazione. Il cuore nativo, inoltre, viene immerso nelle soluzioni di lavaggio, con lo scopo di garantire il contatto dei detergenti anche con l'intera parete esterna, non solo attraverso la fuoriuscita del perfusato attraverso l'emergenza dell'arteria polmonare, delle due vene cave e delle quattro vene polmonari.

1. Lavaggio in PBS eparinizzato (5 UI/ml di eparina) contenente BDM 20 mM
(45 minuti, 1.5 ml/min, in ghiaccio)
2. Step con inibitori di proteasi: soluzione contenente IpA 0.5%, IpB 0.5%, DMSO 10%, Triton X-100 1% e TmA 10% in acqua deionizzata
(7 ore, 1.5 ml/min, RT)
3. Lavaggio ipotonico: soluzione contenente TmA 10% in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)
4. Soluzione di SDS 0.5% in acqua deionizzata
(15 ore, 2.5 ml/min, RT)
5. Lavaggio in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)
6. Soluzione di Triton X-100 1% in acqua deionizzata
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)
7. Lavaggio finale in PBS 1x o in soluzione fisiologica
(30 minuti, 1.5 ml/min, RT)

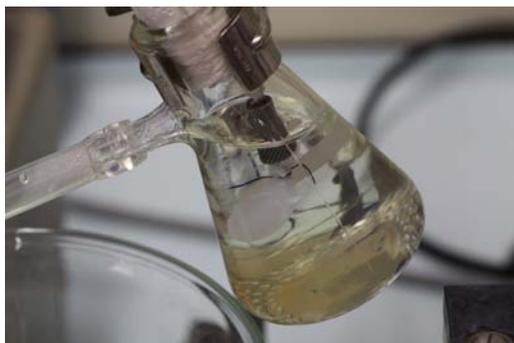


Figura 5.6: Il cuore perfuso ed immerso nel protocollo con SDS 0.5%.

5.2 Pesatura dei campioni

Tutti i campioni incannulati sono stati pesati precedentemente e successivamente all'esecuzione della decellularizzazione. La pesatura viene realizzata mediante una bilancia digitale (PLS/PLJ, Kern, Balingen, Germania) dopo aver mantenuto il campione 2 minuti sulla carta assorbente in maniera tale da eliminare i liquidi in eccesso in esso contenuti.

5.3 Analisi istologiche e tecniche immunologiche

Lo studio della struttura del tessuto decellularizzato ed il conseguente confronto con il tessuto nativo di riferimento si basa sulla preparazione di campioni i quali permettono di rendere osservabili le caratteristiche strutturali degli stessi nello spettro del visibile, sfruttando i fenomeni di riflessione e assorbimento (microscopia ottica) o la fluorescenza indotta nel campione (microscopia a fluorescenza).

In particolare, la realizzazione di questi preparati risponde ad una serie di esigenze:

- la fonte di illuminazione del microscopio deve attraversare delle sezioni di spessore molto ridotto (dell'ordine di alcuni μm), pertanto il tessuto deve essere sezionato mediante appositi strumenti, quali ad esempio i criostati;
- i tessuti presentano un consistenza cedevole e richiedono, per essere tagliati, fasi di fissaggio, inclusione e congelamento;
- le sezioni così ottenute sono normalmente prive di colore e presentano basso contrasto rendendo necessario, al fine dello studio, la processazione delle stesse con coloranti particolari che presentano affinità differente per le diverse struttura che compongono il tessuto.

5.3.1 Fissazione del tessuto ed inclusione

La fissazione contribuisce alla preservazione della struttura del tessuto e permette di evitare possibili danni indotti dalla morte cellulare e da manipolazioni successive degli operatori, assicurando minime variazioni nella

struttura (artefatti). Tale tecnica, utilizzata di norma nella pratica istologica, consiste nell'utilizzo di composti chimici, quali ad esempio le aldeidi (nel caso in esame paraformaldeide, PFA), che bloccano le componenti tissutali nello stato chimico e nella posizione in cui si trovavano *in vivo*, interrompendo i processi cellulari, rendendo le strutture cellulari insolubili e precipitando le proteine ed altri componenti [46].

Una volta effettuata la fissazione, si procede alla rimozione dell'acqua contenuta nel campione e all'embedding ovvero l'infiltrazione con un materiale (quali ad esempio resine) che indurisce il campione in modo tale da permetterne il sezionamento.

5.3.1.1 Protocollo di fissazione

Data la particolare conformazione dell'organo in esame e la delicata consistenza dei campioni decellularizzati, la stessa fissazione è stata realizzata per mezzo di perfusione coronarica ed immersione nelle soluzioni riciclate. In questo maniera, si è potuta garantire una migliore penetrazione delle soluzioni nell'intero spessore delle pareti e non solo il contatto con la porzione esterna del cuore, evitando il collassamento delle varie strutture non più sostenute dalla turgidità della componente cellulare. Il processo è stato realizzato al buio e, data la tossicità del reagente, sotto aspirazione chimica. Sono inoltre stati utilizzati dei tubi dedicati, analoghi a quelli utilizzati per i protocolli di decellularizzazione.

La percentuale di PFA (AppliChem) utilizzata costituisce un compromesso tra la necessità di fissare il tessuto e l'esigenza di non mascherare i siti di legame degli anticorpi utilizzati nell'immunofluorescenza.

Il protocollo adottato è il seguente:

1. PFA al 2% in tampone fosfato 0.2 M
(1 ora, 10 ml/min, RT)
2. Lavaggio in PBS 1x
(10 minuti, 10 ml/min, RT)
3. Lavaggio in PBS 1x
(10 minuti, 10 ml/min, RT)
4. Lavaggio in soluzione fisiologica
(10 minuti, 10 ml/min, RT)

dove per realizzare 500 ml di tampone fosfato 0.2 M è stata preparata una soluzione a pH7.4 costituita da 0.06 M di diidrogenofosfato di sodio anidro (NaH_2PO_4 , Sigma-Aldrich) e 0.14 M di diidrogenofosfato di sodio anidro (Na_2HPO_4) disciolti in acqua distillata.

La PFA 2% è stata ottenute come segue:

1. si sciolgono 2g di PFA in 45 ml di acqua distillata;
2. la soluzione viene portata a 60°C;
3. la soluzione viene posta in ghiaccio, si aggiungono 1.5 ml di idrossido di sodio (NaOH) 1 M, ponendo in agitazione fino al raggiungimento della completa solubilizzazione;
4. si aggiungono 50 ml di tampone fosfato 0.2 M;
5. si porta al volume di 100 ml con acqua distillata;
6. si filtra utilizzando filtri da 0.22 μm (GVS).

5.3.1.2 Protocollo di inclusione

Analogamente alla fissazione, l'inclusione viene realizzata attraverso perfusione del mezzo utilizzato. In particolare, la disidratazione viene realizzata effettuando dei lavaggi in soluzioni di saccarosio a concentrazione crescente (dal 10 al 30%), mentre l'infiltrazione viene realizzata utilizzando una soluzione di O.C.T. Compound (Optimal cutting temperature, Tissue-Tek, Sakura Finetek, Netherlands) e saccarosio (Sigma-Aldrich) al 30% in uguali quantità, riscaldata alla temperatura di 30°C per renderla meno viscosa e facilitarne la perfusione.

Il protocollo adottato è il seguente:

1. saccarosio 10% in soluzione fisiologica
(1 ora, 10 ml/min, RT)
2. saccarosio 30% in soluzione fisiologica
(ON, 10 ml/min, RT)
3. O.C.T. Compound e saccarosio al 30% in soluzione fisiologica (1:1)
(5 minuti, 2.5 ml/min, RT)

Al termine della perfusione, si procede scollegando il campione dalla pompa e rimuovendo il supporto metallico utilizzato per la perfusione. Il cuore viene quindi posizionato all'interno di un piccolo contenitore polimerico (embedding device, 24x24x5 mm, Bio-Optica, Milano, Italia) immerso in O.C.T. Compound e saccarosio 30%. Il campione viene congelato in isopentano ai fumi d'azoto. L'utilizzo dell'isopentano permette di ottenere un congelamento più uniforme del campione, evitando sbalzi termici. Il campione così ottenuto viene conservato a - 80 °C fino alle successive fasi di analisi.

5.3.2 Sezionamento

I campioni crioconservati vengono, quindi, sezionati alla temperatura di - 30 °C utilizzando un criostato (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Germany) ad uno spessore di circa 7 - 8 μm (Figura 5.7).



Figura 5.7: Il criostato. Questo strumento viene utilizzato per tagliare sezioni sottili di tessuto a temperature molto basse.

5.3.3 Colorazioni istologiche

Le colorazioni istologiche permettono di evidenziare le varie componenti del tessuto aumentando il contrasto tra le varie strutture. In particolare, utilizzando opportune molecole, che contengono gruppi che assorbono la luce visibile oppure che permettono l'attacco delle stesse agli elementi che compongono cellule e tessuti.

5.3.3.1 Ematossilina ed Eosina

In questa colorazione standard i nuclei cellulari e gli organelli acidi vengono colorati in viola, mentre le componenti basiche, quali il citoplasma e le fibre di collagene, ad esempio, assumono varie tonalità di rosa. Per realizzarla è stato utilizzato un kit specifico (Bio-Optica) seguendo le istruzioni del produttore.

5.3.3.2 Tricromica di Masson

La tricromica di Masson permette di colorare in nero gli elementi nucleari, in rosso il citoplasma e le fibre muscolari, in blu il collagene ed in giallo gli eritrociti. Viene realizzata utilizzando un kit specifico (Bio-Optica) seguendo le indicazioni del produttore.

5.3.4 Immunofluorescenza indiretta

Le tecniche di immunofluorescenza permettono la localizzazione in modo altamente specifico di molecole intra- ed extracellulari riconosciute come antigeni e rilevati da anticorpi (Figura 5.8).

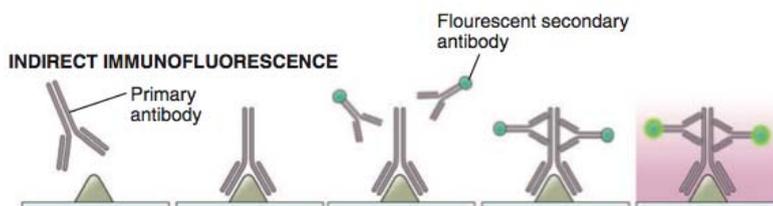


Figura 5.8: L'immunofluorescenza indiretta. Nel metodo indiretto, l'anticorpo per l'antigene specifico che si intende localizzare viene rilevato con un secondo anticorpo marcato in grado di riconoscerlo (anticorpo antianticorpo).

In particolare, la molecola che si intende localizzare funge da antigene e viene iniettata in un animale, solitamente di specie differente, il quale produrrà anticorpi specifici contro l'antigene somministrato. Gli anticorpi (immunoglobuline) così prodotti vengono quindi purificati dal siero sanguigno e utilizzati a loro volta come antigeni per ottenere un anticorpo antiimmunoglobulina (ovvero anti IgG), il quale viene coniugato *in vitro* con specifiche molecole di colorante fluorescente.

Il tessuto viene quindi fatto reagire in un primo momento con l'anticorpo non marcato, il quale combinandosi con il rispettivo antigene produrrà

il complesso primario antigene-anticorpo, e successivamente con l'anticorpo antiglobulina marcato, formando il complesso secondario. L'opportuna eccitazione dei fluorofori permetterà, mediante conseguente emissione, di rilevare questo complesso secondario e quindi localizzare la proteina o la molecola di interesse. Questo effetto non può essere totalmente evitato, ma può essere corretto mediante tecniche di elaborazione dell'immagine (ad esempio la sottrazione digitale) oppure trattato chimicamente. Un esempio di fluorescenza naturale è quella costituita dal collagene e dall'elastina, i quali, colpiti da luce UV, emettono nel verde-giallo anche in assenza di fluorofori ad essi legati.

5.3.4.1 Protocollo per l'immunofluorescenza indiretta

Gli anticorpi vengono diluiti in un buffer costituito da sieroalbumina bovina (BSA) all'1% (Sigma) in PBS 1x (soluzione A) e svolge la funzione di mascheramento dei siti non specifici. Non viene eseguita la permeabilizzazione delle sezioni. Gli anticorpi e le loro diluizioni vengono mantenute in ghiaccio fino al loro utilizzo, mentre le sezioni sono poste in una camera umida per tutta la durata della procedura. Vengono preparate delle sezioni di controllo per verificare la presenza di autofluorescenza del tessuto o problemi dovuti alla presenza di legami aspecifici tra anticorpo e tessuto alla base di falsa positività. Il protocollo adottato è il seguente:

1. le sezioni di tessuto vengono circondate con PAP-pen (Dako, Glostrup, Danimarca), in modo da creare un film idrofobico per mantenere adeguatamente coperte le sezioni durante l'incubazione con la soluzione anticorpale;
2. gli anticorpi primari in soluzione madre vengono diluiti in soluzione A e centrifugati a 13000 rpm per 2 minuti;
3. gli anticorpi primari diluiti vengono quindi posti sulle sezioni e incubati per 30 minuti a 37°C;
4. due lavaggi in PBS 1x da 5 e 10 minuti;
5. gli anticorpi secondari marcati con i fluorofori vengono diluiti in soluzione A, centrifugati a 13000 rpm per 2 minuti. Essendo i fluorofori fotosensibili, le soluzioni madri e diluite vengono protette mediante fogli di alluminio;

6. gli anticorpi secondati diluiti vengono quindi posti sulle sezioni e incubati al buio per 30 minuti a 37°C;
7. due lavaggi in PBS 1x da 5 e 10 minuti;
8. si procede al montaggio del vetrino con montante acquoso contenente 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI, Fluoroshield, Sigma-Aldrich) per contrastare i nuclei.

Sono stati utilizzati anticorpi primari per il collagene di tipo IV (rabbit polyclonal, ab6586, Abcam, Cambridge, Regno Unito) in diluizione 1:100 e per la laminina (rabbit polyclonal, Z0097, Dako) in diluizione 1:30. Come secondario è stato usato Rabbit IgG (H+L) Antibody (FITC) (GeneTex, Irvine, CA, USA) in diluizione 1:100. È stata, inoltre, utilizzata la falloidina (Alexa Fluor 488 Conjugate, Lonza, USA) in diluizione 1:40.

5.3.5 **Acquisizione ed elaborazione delle immagini**

Le immagini istologiche sono state acquisite con microscopio ottico Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Giappone). Mentre le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite con microscopio Leica DM 6000CS. Tutte sono infine state elaborate mediante il software Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

5.4 **Le prove meccaniche**

Le prove a trazione realizzate hanno lo scopo di mettere in evidenza le differenti caratteristiche a rottura delle pareti ventricolari destre e sinistre, appartenenti a cuori nativi e a cuori decellularizzati ottenuti mediante i tre protocolli descritti. Sono stati testati almeno tre campioni per ogni tipo di ventricolo e per ogni direzione di interesse (longitudinale e trasversale).

5.4.1 **Il sistema Bose ElectroForce**

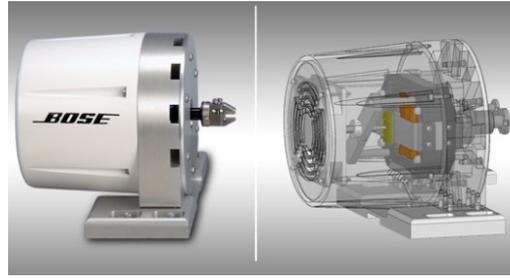
La strumentazione Bose[®] planar biaxial TestBench (Bose Corporation, Eden Prairie, Minnesota, USA) permette la caratterizzazione meccanica di tessuti biologici molli, attraverso la stima di proprietà caratteristiche quali l'anisotropia, relazioni tenso-deformative non lineari, grandi deformazioni e viscoelasticità per lo sviluppo, ad esempio, di modelli costitutivi (Figura

5.9). Tale scopo viene raggiunto per mezzo di questo sistema di test, il quale incorporando la tecnologia dei motori Bose ed il software di controllo WinTest[®], presenta un'elevata versatilità. È utilizzabile con un'ampia gamma di materiali (dai tessuti biologici ai biomateriali e tessuti ingegnerizzati) e di applicazioni (dalla caratterizzazione meccanica di base alla possibilità di realizzare condizioni ambientali particolari, quali il controllo in temperatura, la presenza di bagni salini o la sterilità) [76].



Figura 5.9: Il sistema Bose[®] planar biaxial TestBench.

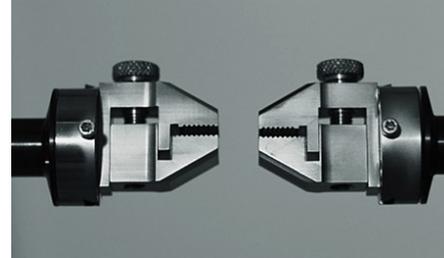
È costituito da quattro motori lineari a magnete permanente collocati su un banco metallico traforato orizzontale e due celle di carico, una per ogni asse di esecuzione della prova. La possibilità di libera disposizione di questi sul piano di lavoro permette di realizzare prove differenziate (trazione monoassiale e biassiale) a seconda della configurazione desiderata per l'esperimento. Due motori sono in grado di esercitare una forza di 200N ed i restanti due una forza di 400 N, con spostamento massimo consentito di 6.25 mm ciascuna. Sono disponibili due tipi di celle di carico, con differenti capacità e sensitività (220 N e 22 N). Queste ultime fungono da "sensori" per la rilevazione delle forze che si sviluppano durante i test e sono interfacciate con il software di controllo. I campioni vengono montati sui motori del sistema per mezzo di morse (*grip*) metalliche specifiche in dotazione (Figura 5.10).



(a) Motore lineare



(b) Celle di carico



(c) Grip

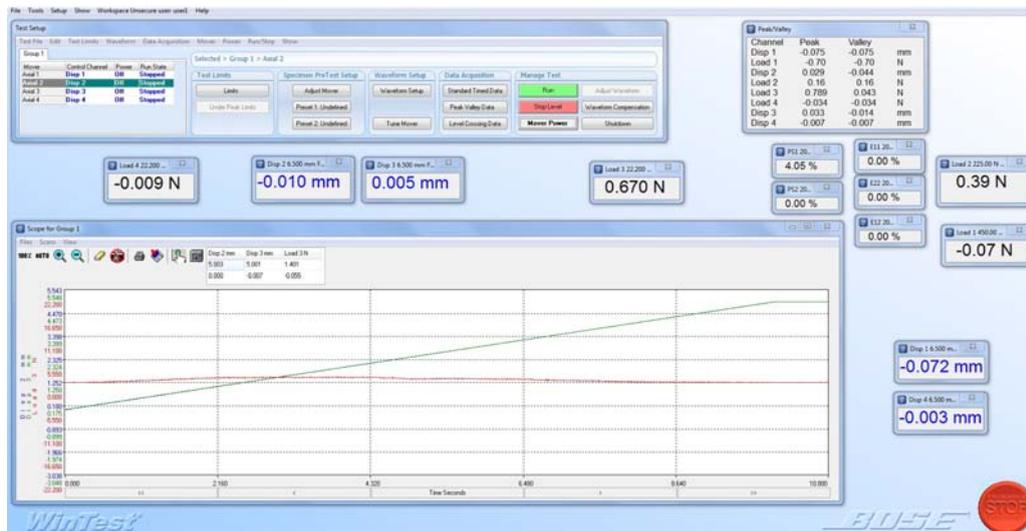
Figura 5.10: Componenti del sistema Bose[®] planar biaxial TestBench.

5.4.2 Il software WinTest[®]

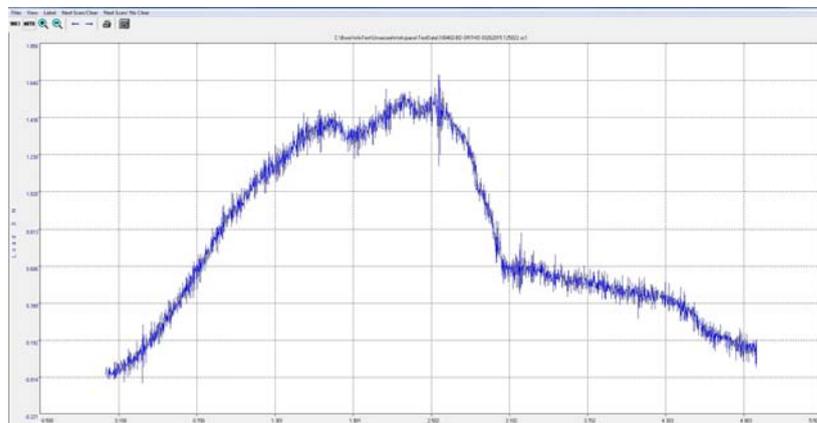
Il pacchetto WinTest consente di interfacciare il calcolatore con i motori e le celle di carico (Figura 5.11). In particolare è costituito da un software integrato e da un controllore PCI e permette l'acquisizione sincronizzata dei dati, la generazione delle forme d'onda da fare eseguire ai motori ed, in generale, il controllo dello strumento. Attraverso l'interfaccia utente (*Project window*) è possibile programmare le varie operazioni di test, impostare i parametri della prova, fornire le istruzioni a motori e trasduttori (*Group windows*) e valutare in tempo reale l'evoluzione temporale di grandezze specifiche (*Scope window*). Inoltre è possibile visualizzare congiuntamente i canali che rappresentano lo spostamento ed il carico misurato. Le specifiche sperimentali possono essere conservate per l'eventuale replicazione degli esperimenti e i dati acquisiti possono essere esportati in formato .csv per le successive elaborazioni.

5.4.3 Configurazione del sistema

Le prove di trazione monoassiale sono state realizzate utilizzando i due motori lineari da 200 N, disposti allineati ed affacciati, consentendo uno spostamento massimo di 12.5 mm. Su di essi sono state montate le grip in modo



(a) La Project window



(b) Esempio di curva di carico

Figura 5.11: Il software WinTest®.

tale da avere la stessa orientazione (assicurando la presenza unicamente delle componenti normali della forza e non delle componenti tangenziali) ed una distanza di 5 mm. È stata utilizzata la cella di carico da 22N, la quale permette di avere una maggiore sensibilità alle variazioni misurate, ed è stata montata sul braccio di uno dei due motori. I campioni vengono quindi montati sulle morse e, per migliorarne l'ancoraggio, sono stati utilizzati dei supporti di balsa di dimensioni ridotte, interposti tra il tessuto e la morsa. Questi ultimi permettono di non lacerare, a causa del contatto diretto, la porzione di tessuto fissata e di aumentare l'attrito tra dispositivo di ancoraggio e campione al fine di evitare lo scivolamento dello stesso durante il trazionamento.

5.4.4 Preparazione dei campioni

Per le prove meccaniche sono state utilizzate le pareti ventricolari, destra e sinistra, le quali vengono isolate dal cuore avendo cura di conservare la maggior quantità di tessuto possibile.

Nello specifico, il cuore mantenuto incannulato, viene montato sull'apparato di Langendorff con la superficie antero-superiore rivolta all'operatore e perfuso con PBS 1x al fine di consentirne la distensione delle camere. L'organo decellularizzato mediante i protocolli con SDS presenta un'aspetto biancastro e traslucido. Per tale motivo viene transilluminato mediante una lampada posta posteriormente, per favorire il riconoscimento anatomico delle strutture cardiache ed in particolare l'individuazione del setto interventricolare. Inizialmente viene eseguita auriculoectomia bilaterale e si provvede a rimuovere eventuali residui di pericardio, timo e vasi mediastinici. Il cuore viene ruotato sul piano trasversale di 180° in modo da rivolgere la superficie postero-diaframmatica all'operatore. Nel punto di incontro tra il solco interventricolare posteriore ed il solco coronario destro si esegue un accesso tramite forbice oftalmica. Si introduce quindi il braccio di una pinzetta chirurgica, al fine di individuare il confine tra il margine posteriore del setto interventricolare e la parete ventricolare posteriore destra. A questo punto si procede alla ventricolectomia destra mediante 3 incisioni, la prima lungo il solco interventricolare posteriore condotta fino all'apice, la seconda lungo il solco coronario destro estesa fino all'angolo tra parete anteriore del ventricolo destro ed il margine anteriore del setto interventricolare, la terza scendendo lungo la linea di incontro tra margine anteriore del set-

to interventricolare e faccia anteriore del ventricolo destro. Quest'ultima è agevolata, anche in questo caso, dall'introduzione di una pinzetta chirurgica. Il cuore viene quindi rimosso dall'apparato di perfusione ed adagiato su una piastra di Petri. Rimossa l'aorta e ciò che residua dell'atrio sinistro, si introduce il braccio della pinzetta chirurgica in cavità ventricolare sinistra. Per mezzo di uno stereomicroscopio si individua il limite tra il margine anteriore del setto interventricolare e la faccia anterosuperiore del ventricolo sinistro e si procede a tagliare con forbice oftalmica lungo questo confine, procedendo in direzione base apice. Il ventricolo sinistro viene disteso progressivamente e adagiato sulla piastra, concludendo con la rimozione del setto interventricolare.

Nel caso di cuori nativi, l'intera procedura può essere realizzata utilizzando unicamente lo stereomicroscopio, senza l'apparato di perfusione.

I campioni ottenuti vengono conservati in PBS 1x (nel caso di tessuto nativo o decellularizzato mediante protocolli con SDS) o in soluzione fisiologica (nel caso di tessuto decellularizzato mediante protocollo TriCol) e posti a 4°C o in ghiaccio fino al momento della prova. Tutti i campioni sono stati testati entro 24 ore dall'isolamento.

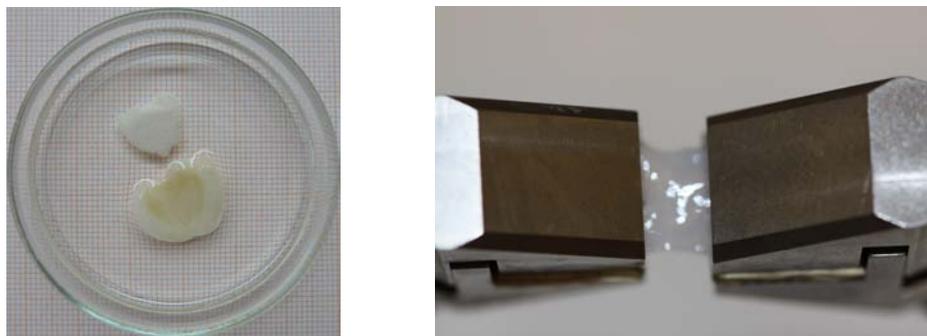


Figura 5.12: I campioni per i test biomeccanici.

5.4.5 Protocollo di test

Per la caratterizzazione meccanica sono state implementate delle prove di trazione monoassiale a completa rottura (UTS). Per ogni protocollo di decellularizzazione e per il tessuto nativo di controllo sono stati testati tre ventricoli sinistri nella direzione circonferenziali e tre nella direzione longitudinale, tre ventricoli destri nella direzione circonferenziali e tre nella direzione longitudinale.

Data la particolare natura dei campioni, per quanto concerne le dimensioni ridotte, la grande variabilità intersoggetto e la consistenza estremamente delicata, si è deciso di non ridimensionarli, ma di testarli nella loro interezza. Come elemento discriminante tra i campioni è stato misurato, tramite calibro elettronico, lo spessore medio. In particolare, qualora l'estensione del campione lo abbia consentito, sono stati registrati e mediati tre spessori: il primo in posizione centrale della parete ventricolare, il secondo in prossimità della base ed il terzo in corrispondenza della regione apicale.

I campioni non hanno subito preconditionamento e le prove di trazione vengono realizzate imponendo, a ciascuno dei due motori, uno spostamento di 5 mm alla velocità costante di 0.5 mm/s. La forza esercitata dal campione durante la trazione viene registrata dal sistema di controllo per mezzo della cella di carico.

5.4.6 Elaborazione dei dati

I dati acquisiti vengono importati in MATLAB®[77].

Nei file salvati durante le prove sono contenute le misure di forza effettuate dalla cella di carico, gli spostamenti e la griglia temporale. In particolare, per ogni prova vengono acquisiti 2000 punti.

5.4.6.1 Pre-elaborazioni

Analizzando, nel file dei dati importati, le colonne relative agli spostamenti misurati, è possibile riscontrare che, talvolta, questi non sono compresi nell'intervallo 0 (si assume come condizione iniziale un spostamento imposto nullo) e 10 (valore massimo dello spostamento imposto, dato dalla somma dei singoli spostamenti dei due motori) a causa di errori di misura. Si procede pertanto alla normalizzazione dell'asse, mediante le seguenti due operazioni:

$$u = u - \min(u)$$
$$u = 10 \cdot \frac{u}{\max}$$

5.4.6.2 Filtraggio

La curva di carico viene ottenuta graficando la forza in funzione dello spostamento. In tali grafici è possibile verificare come il segnale acquisito sia

molto rumoroso (Figura 5.13). Al fine dell'estrazione successiva delle caratteristiche di interesse, è necessario smorzare le fluttuazioni contenute nei dati delineando un andamento più regolare e riconoscibile, ovvero filtrare il segnale. Per effettuare questa operazione sono stati analizzati differenti tipi di filtro passa-basso zero-phase-shift ed il migliore è stato selezionato in base all'ispezione visiva dei risultati.

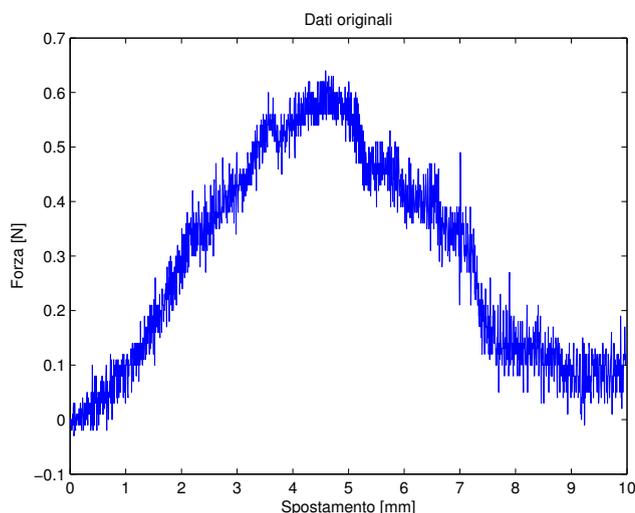


Figura 5.13: Esempio di curva originale non filtrata. Le curve originali sono molto rumorose. Pertanto, al fine di estrarre caratteristiche di interesse in elaborazioni successive, è necessario filtrare il segnale.

Filtro ellittico passa-basso La risposta in frequenza è data dalla seguente relazione:

$$|H(j\omega)| = \frac{1}{\sqrt{1 + \epsilon^2 R_n(\omega)^2}}$$

dove R_n è la funzione razionale di Chebyshev di n-esimo ordine ed ϵ è legato alla massima attenuazione nella banda passante (Figura 5.14). Questi filtri permettono di realizzare un insieme di specifiche richiesto (come ad esempio la banda di transizione o i ripple) con il valore minimo dell'ordine. In MATLAB possono essere realizzati in maniera automatica mediante due funzioni:

`ellipord` date le specifiche desiderate del filtro, restituisce l'ordine ottimo e la frequenza di taglio naturale;

`ellip` fornite le specifiche, l'ordine ottimo e la frequenza naturale costruisce il filtro.

Il filtro ellittico è stato costruito imponendo la banda passante a 0.01Hz, la banda di transizione pari a dieci volte la banda passante, ripple del 95% in banda passante e ripple del 5% in banda oscura (Figura 5.14).

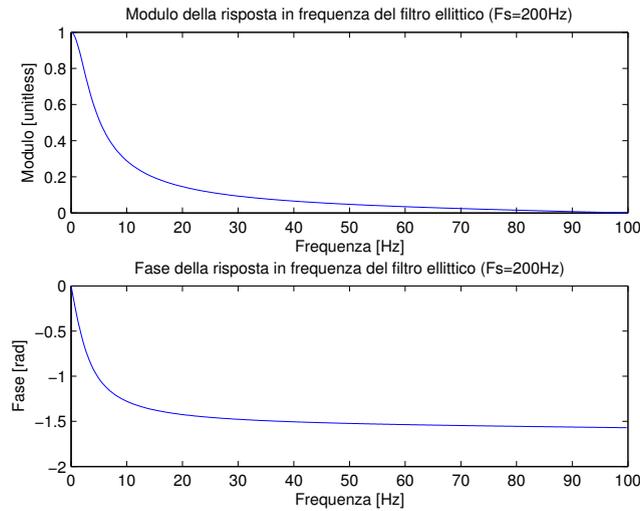


Figura 5.14: Modulo e fase del filtro ellittico. Il filtro ellittico è stato determinato in maniera automatica, utilizzando le funzioni *MATLAB* predisposte.

Filtro a media mobile Questi tipi di filtri permettono di sostituire ad ogni campione la media dei campioni ad esso adiacenti, contenuti in una finestra di dimensioni specificate. Viene definita media “mobile” in quanto il numero degli elementi mediati rimane costante, ma l’intervallo temporale avanza. L’equazione alle differenze che lo definisce è la seguente:

$$y_n = \sum_{k=0}^q b_k u_{n-k}$$

dove b_k è un coefficiente reale e q è l’ampiezza della finestra su cui vengono mediati i campioni.

La funzione che in *MATLAB* realizza la media mobile è `smooth` ed è stata utilizzata con le condizioni di default (la finestra ha 5 punti), oppure con finestre di 200 e 400 punti e imponendo un fit quadratico (Figura 5.16).

Filtro di Butterworth passa-basso [78, 79] È definito dalla seguente funzione di trasferimento:

$$|H(j\omega)| = \frac{1}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{2n}}$$

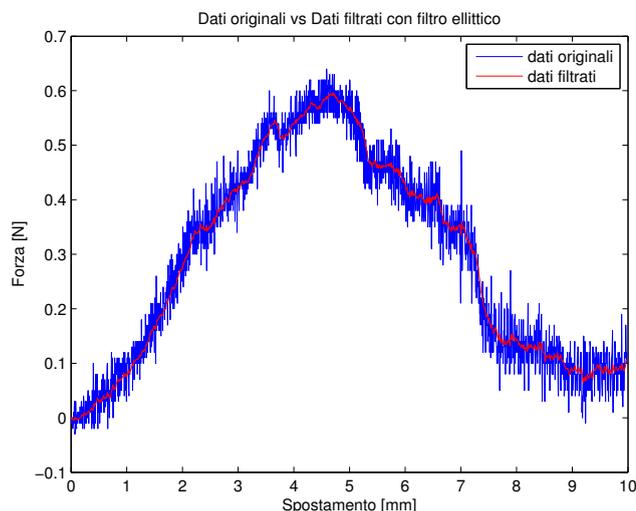


Figura 5.15: Filtraggio del segnale originale con filtro ellittico. Risultato del filtraggio del segnale originale con un filtro ellittico di banda passante a 0.01Hz, la banda di transizione pari a dieci volte la banda passante, ripple del 95% in banda passante e ripple del 5% in banda oscura.

la quale viene definita a partire dai valori dell'ordine del filtro n e della frequenza di taglio ω_0 . Il filtro di Butterworth presenta risposta massimamente piatta nella banda passante e ripidità della banda di transizione dipendente dall'ordine del filtro in maniera direttamente proporzionale (Figura 5.17). Nel caso in esame l'ordine del filtro è stato fissato a 4 e la frequenza di taglio a $\frac{1}{F_s/2}$ dove F_s è la frequenza di campionamento.

Scelta del filtro In base ai risultati ottenuti, è stato scelto il filtro di Butterworth in quanto permette di ottenere una curva filtrata che descrive bene il segnale originario, presentando un andamento regolare e con minima perdita di informazione. Questa ispezione visiva è stata eseguita su tutte le curve ottenute dalle prove a trazione.

5.4.6.3 Normalizzazioni

Effettuato il filtraggio del segnale, è stato possibile osservare che non tutte le curve presentavano origine in corrispondenza di valori nulli della forza (Figura 5.18). I valori positivi diversi da zero, in particolare, potrebbero essere stati dovuti ad un non corretto posizionamento del campione sul sistema di ancoraggio. Lo stesso pertanto potrebbe essere stato soggetto ad uno stato di pretensionamento iniziale indesiderato non dovuto all'applicazione

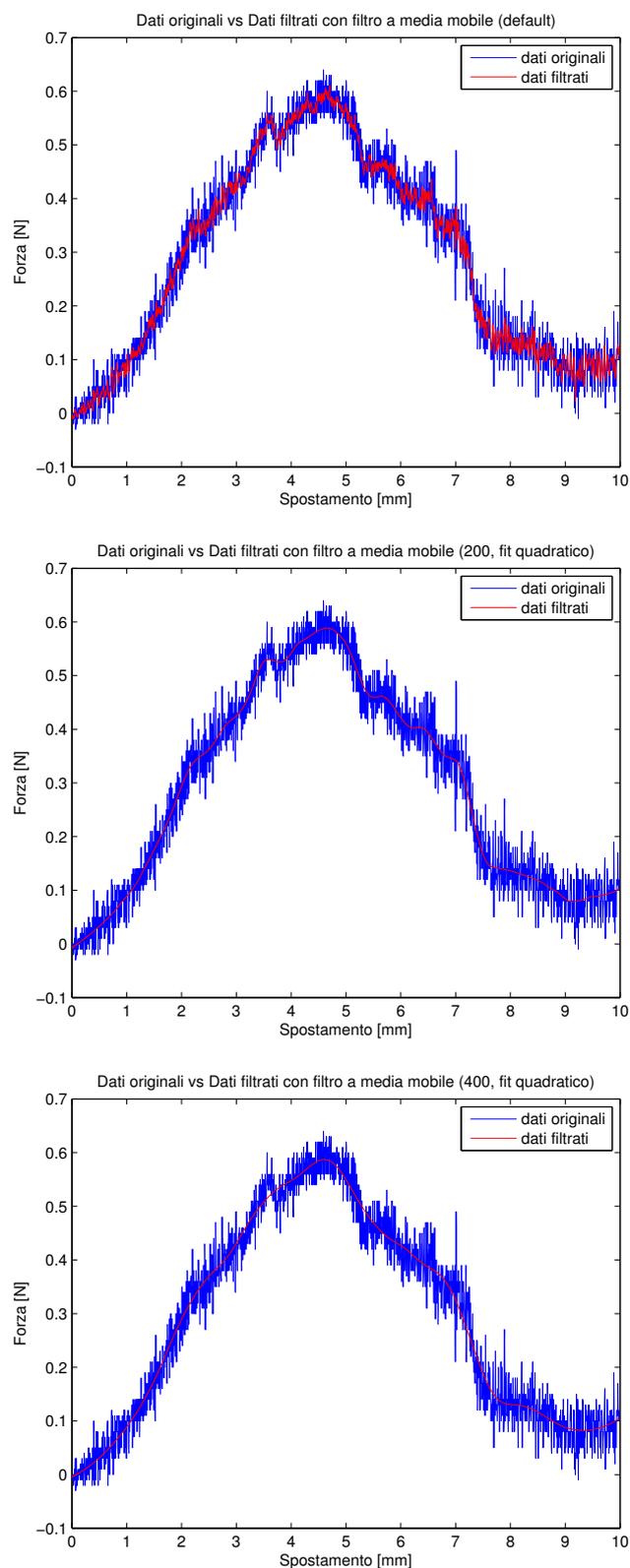


Figura 5.16: *Filtraggio del segnale originale con filtro a media mobile. Risultati del filtraggio del segnale originale con filtri a media mobile con finestre di 5, 200 e 400 punti rispettivamente. Gli ultimi due grafici sono interpolati con un fit quadratico.*

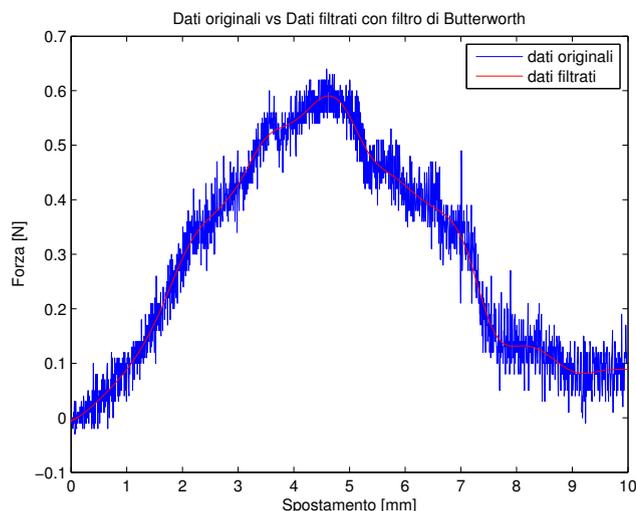


Figura 5.17: Filtraggio del segnale originale con filtro di Butterworth. Risultati del filtraggio del segnale originale con filtro di Butterworth di ordine 4 frequenza di taglio pari a $\frac{1}{F_s/2}$.

del carico sperimentale. Si è quindi provveduto a verificare che il primo valore della curva assumesse valore nullo ed, in caso contrario, la curva è stata traslata.

In alcune curve sono stati riscontrati anche dei valori negativi, in corrispondenza delle porzioni iniziali e finali del grafico, ovvero immediatamente all'inizio o alla fine della prova, e sono dovute a fluttuazioni fittizie della cella di carico (Figura 5.19). Questi valori, costituendo degli artefatti di misura, vengono posti a zero.

È assolutamente doveroso precisare che non è stato possibile definire la tensione ingegneristica, la quale è determinata dal rapporto tra la forza misurata e l'area trasversale del campione all'inizio della prova:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad [\text{Pa}]$$

in quanto le dimensioni dei campioni, non essendo stati tagliati in modo uniforme, presentavano una forte eterogeneità. In prima approssimazione, al fine di non trascurare del tutto le diverse dimensioni dei campioni, la forza è stata divisa per il loro spessore iniziale medio. Infine, non è stata calcolata la deformazione come rapporto tra la variazione di lunghezza e la

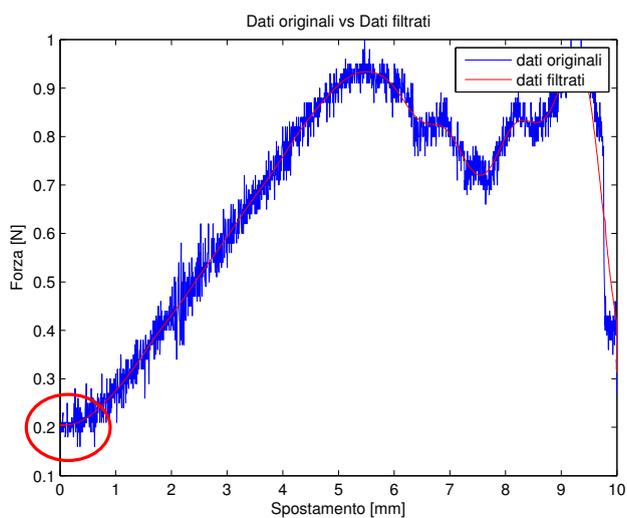


Figura 5.18: Esempio di curva con valore non nullo della forza nell'origine.

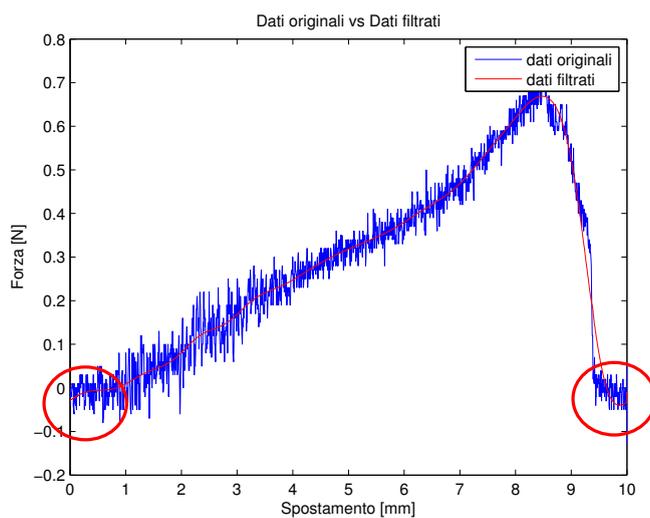


Figura 5.19: Esempio di curva con valori minori di zero della forza.

lunghezza iniziale del campione:

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad [\emptyset]$$

ma viene mantenuta l'informazione relativa allo spostamento.

Pur avendo ben presente che la meccanica del continuo richiede, nel caso in cui si stiano trattando materiali soggetti a stati deformativi finiti (ovvero superiori al 3-4%), l'utilizzo di specifiche misure di tensione e deformazione (quali la tensione di Piola e la deformazione di Green-Lagrange rispettivamente), si è deciso, data la particolare natura del problema in esame, di elaborare il meno possibile i dati ottenuti durante le prove.

5.4.6.4 Determinazione dei massimi

La determinazione del massimo della curva di carico è fondamentale, in quanto dal punto di vista ideale, rappresenta il punto di rottura del materiale e pertanto fornisce informazioni riguardo la sua resistenza ed, in particolare, permette di calcolare i valori a rottura della deformazione e della tensione. Nel caso in esame, nel materiale si verificano spesso rotture multiple, dovute all'organizzazione strutturale delle fibre muscolari ed in particolare delle trabecole carnee che popolano le pareti ventricolari (Figura 5.20). Questo fa sì che non sia possibile evidenziare un unico punto di massimo. Si è deciso di considerare, pertanto, tutti i massimi locali che presentassero valori adeguati e spostamenti consistenti. Le curve sono state analizzate singolarmente e sono stati costruiti dei cluster di massimi locali per ogni ventricolo e per ogni direzione, calcolando per ciascuno di essi il centroide della distribuzione. In corrispondenza di ciascun massimo locale è stata infine calcolato il corrispondente valore di spostamento, e sono stati costruiti dei cluster analoghi per il confronto.

5.4.6.5 Determinazione della pendenza

La pendenza della curva misurata sperimentalmente nel suo tratto iniziale, viene utilizzata come stima del modulo elastico, ovvero della rigidità del materiale, ma viene calcolata singolarmente per ogni curva. Si considera, pertanto, la porzione di salita della curva di carico, la quale viene fittata con una retta i cui parametri (coefficiente angolare e intercetta) sono stati stimati mediante stimatori ai minimi quadrati lineari (Figura 7.3). Non sono

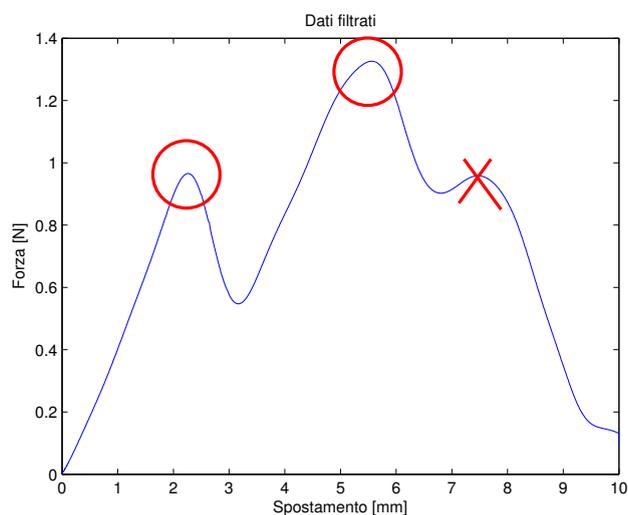


Figura 5.20: Esempio di massimi locali delle curve di carico.

presenti, come nel caso di altri tessuti, quali ad esempio il pericardio, due pendenze di salita differenti (la prima riconducibile alla fase dell'elastina e la seconda alla fase del collagene vera e propria).

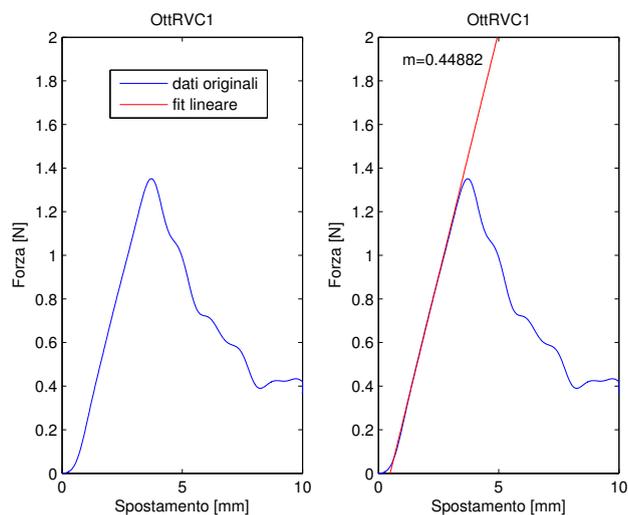


Figura 5.21: Esempio di stima della pendenza di una curva di carico.

Capitolo 6

Risultati

6.1 Il cuore nativo

6.1.1 Analisi macroscopiche

A livello macroscopico il cuore nativo presenta colore rossastro-marroncino ed una consistenza turgida. L'albero coronarico non è direttamente osservabile sulla superficie dello stesso in quanto, successivamente alla sua origine, si approfonda rapidamente nel miocardio. L'organo pesa in media, al termine del lavaggio con PBS eparinizzato, 1.1324 ± 0.0307 g. Lo spessore medio ventricolare è pari a 0.5210 ± 0.0071 mm per la parete destra e 1.3609 ± 0.0553 mm per la parete sinistra.

6.1.2 Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche

A livello microscopico, ed in particolare analizzando le sezioni istologiche longitudinali realizzate (Figura 6.1), è possibile apprezzare l'orientamento differenziato dei cardiomiociti negli strati epicardico e miocardico che compongono la parete cardiaca. I fasci muscolari sono intervallati dal collagene del connettivo cardiaco, il quale circonda anche i frequenti vasi del circolo coronarico presenti nel tessuto stesso. È inoltre osservabile la valvola aortica e l'innesto dei suoi lembi nella parete cardiaca estremamente ricchi di matrice stromale. A differenza delle valvole cardiache, il collagene del miocardio appare più scuro e lasso, non presentando una trama di sostegno vera e propria.

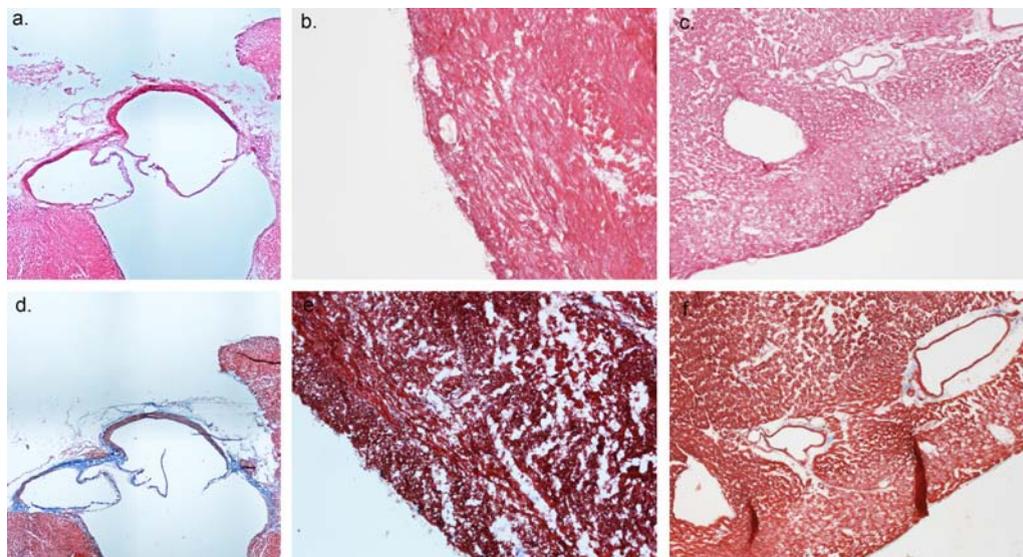


Figura 6.1: Istologie del cuore nativo. Vengono riportate nella prima riga le immagini ottenute tramite H&E e nella seconda riga con tricromica di Masson: (a-d) valvola aortica, (b-e) epicardio e miocardio ventricolari destri, (c-f) epicardio e miocardio ventricolari sinistri. Ingrandimento 4x in (a,d) e 10x in (b-c,d-e).

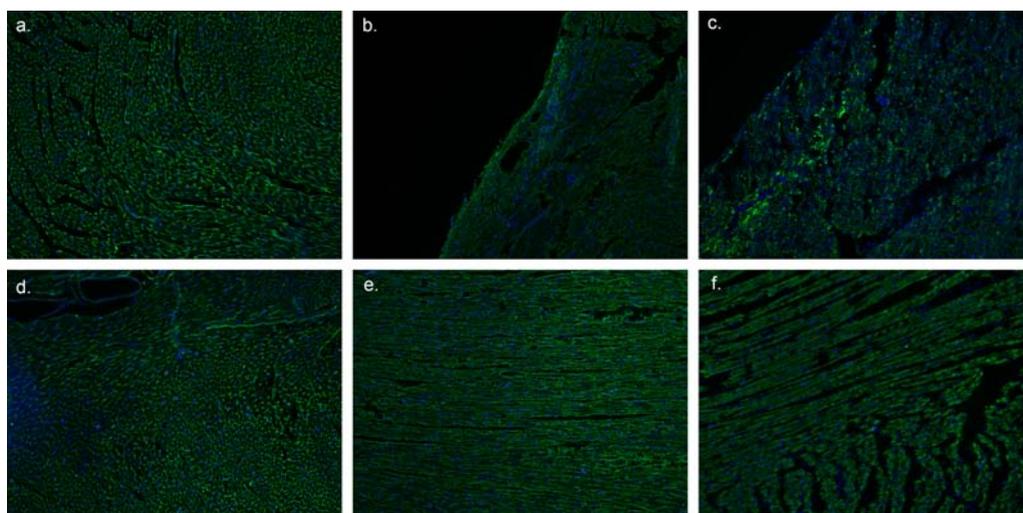


Figura 6.2: Immunofluorescenza del cuore nativo. Nella prima riga vengono riportate le immagini del ventricolo destro e nella seconda le immagini del sinistro: (a-d) collagene IV + DAPI, (b-e) laminina + DAPI, (c-f) falloidina + DAPI. Ingrandimento 10x.

L'immunofluorescenza (Figura 6.2) evidenzia la distribuzione reticolare del collagene IV, il quale circonda i cardiomiociti seguendone l'orientazione, quasi come una guaina di avvolgimento. Ad esso è legata la laminina, la quale, ben presente sia a livello miocardico che epicardico, si distribuisce in modo analogo. L'espressione di entrambe le proteine reticolari è uniforme su tutte le pareti ventricolari. Mediante il reagente intercalante del DNA, il DAPI, è possibile apprezzare l'abbondante presenza di nuclei e quindi densità cellulare tipica del tessuto miocardico e valvolare nativo. Molte di queste cellule residenti risultano positive alla falloidina. Questa tossina estratta da funghi del genere *Amanita* polimerizza e blocca l'actina, rendendo visibile il sarcomero del cardiomiocita con la sua usale bandeggiatura, oltre che la parete muscolare dei vasi arteriosi di piccolo e medio calibro.

6.2 Prove biomeccaniche

Le curve tenso-deformative valutate per il tessuto ventricolare nativo sono riportate in Figura 6.3. È possibile osservare che gli andamenti più riproducibili sono stati registrati nel caso di ventricolo destro longitudinale e sinistro circonferenziale. Da queste curve è stato possibile ricavare il valore medio della pendenza (indicata con E^* , in quanto non rappresenta il modulo elastico in senso stretto, ma ne fornisce una stima approssimata), il centroide della distribuzione dei massimi delle stesse (correlato alla forza a rottura, F_s) ed il corrispondente spostamento (correlato a sua volta allo spostamento a rottura, u_s). I valori vengono riportati nella Tabella 6.1. Da qui in avanti si indicherà con RVC il ventricolo destro in direzione circonferenziale, con RVL il ventricolo destro in direzione longitudinale, con LVC il ventricolo sinistro in direzione circonferenziale e con LVL il ventricolo sinistro in direzione longitudinale.

L'analisi delle curve medie permette di evidenziare qualitativamente le caratteristiche di anisotropia proprie delle pareti ventricolari. In particolare, il comportamento nelle due direzioni considerate si differenzia maggiormente nel caso di ventricolo sinistro, ma tale aspetto è osservabile anche nel ventricolo destro (Figura 6.4). Inoltre, quest'ultimo appare più rigido nella direzione longitudinale e la pendenza media risulta maggiore rispetto a quelle calcolate per il ventricolo sinistro, il quale appare leggermente più rigido nella direzione circonferenziale. Le tensioni di rottura sono maggiori

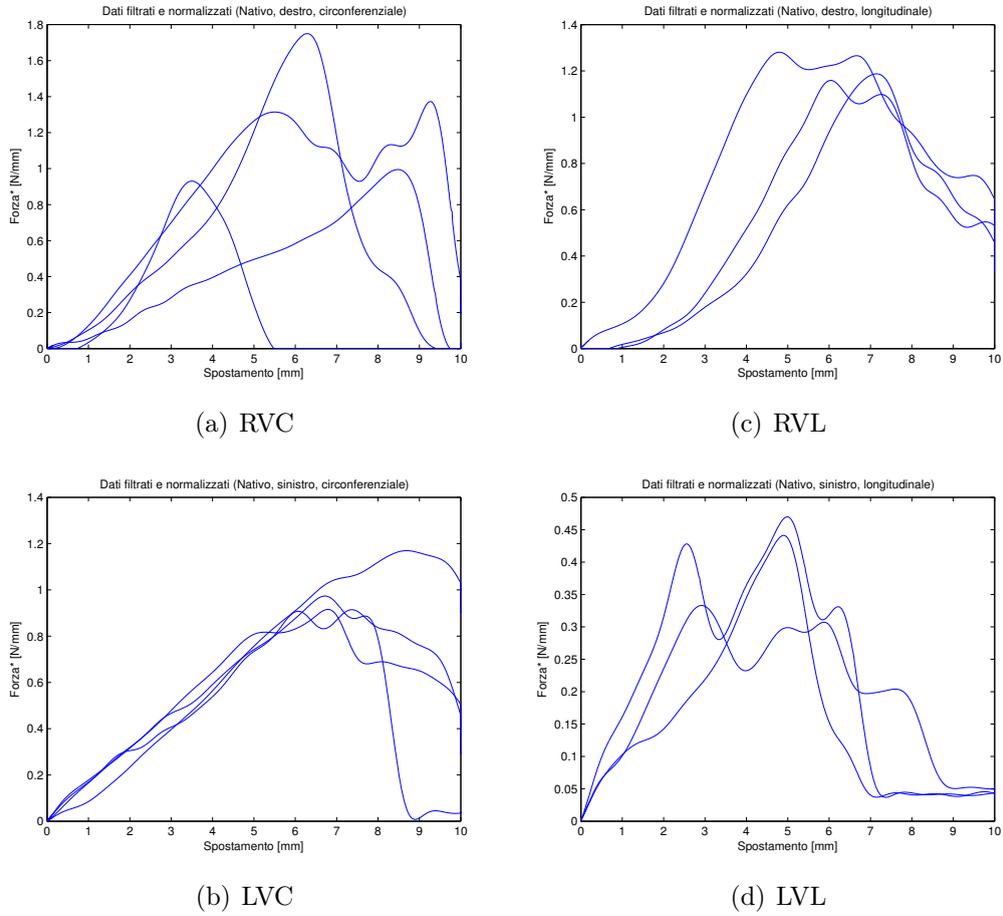


Figura 6.3: Curve tenso-deformative del cuore nativo. Vengono riportate nella prima riga le curve ottenute per il ventricolo destro (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, e nella seconda riga le curve per il ventricolo sinistro (b, d), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente.

| | E^* (\pm SD) [F/mm/mm] | F_s [F/mm] | u_s [mm] |
|-----|-----------------------------------|-----------------|---------------|
| RVC | 0.2694 (\pm 0.1635) | 1.2475 | 5.9421 |
| RVL | 0.3189 (\pm 0.0132) | 1.1983 | 6.3801 |
| LVC | 0.1586 (\pm 0.0198) | 0.9406 | 6.9412 |
| LVL | 0.1145 (\pm 0.0318) | 0.3797 | 4.3722 |

Tabella 6.1: Dati quantitativi delle prove meccaniche su tessuto nativo.

nella parte destra, variando poco nelle due direzioni; nel ventricolo sinistro si differenziano maggiormente.

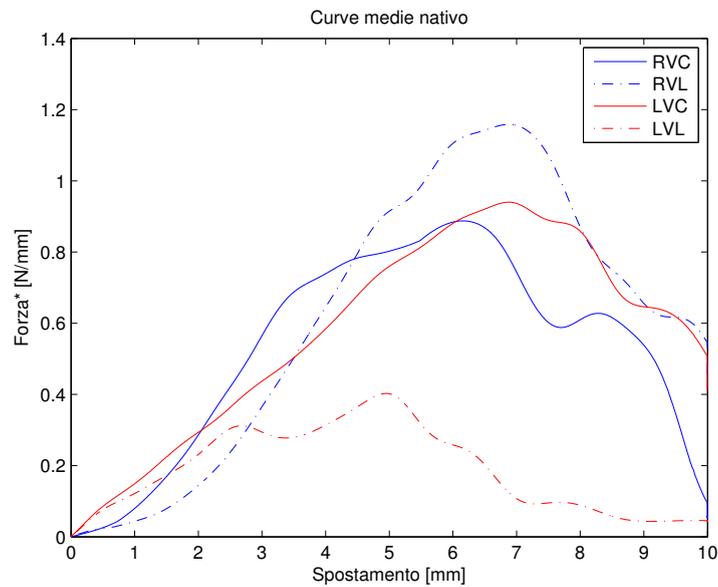


Figura 6.4: Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore nativo.

6.3 Il cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%

6.3.1 Analisi macroscopiche

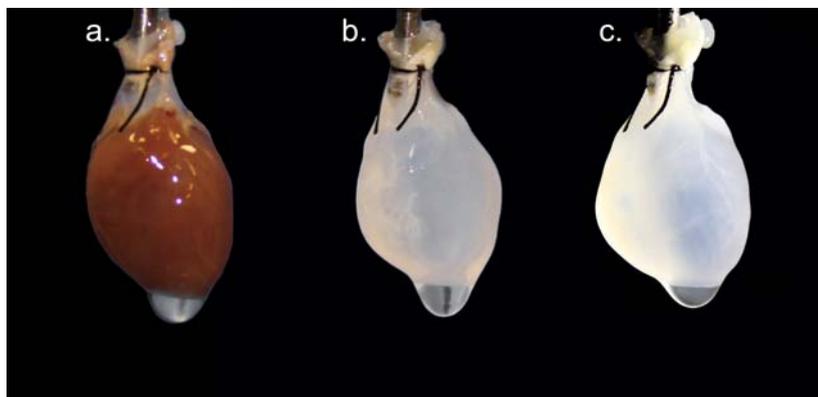


Figura 6.5: Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. (a) cuore nativo, (b) dopo trattamento con SDS 1%, (c) dopo lavaggio con Triton X-100.

Il cuore decellularizzato con questo protocollo perde la caratteristica colorazione nativa (Figura 6.5), diventando bianco e traslucido. L'organo, inoltre, presenta una consistenza inferiore e tende leggermente ad appiattirsi, se adagiato su un piano. L'albero coronarico risulta perfettamente visibile sia sulla parete anteriore sia sulla posteriore e, mediante retroilluminazione, è possibile individuare con estrema facilità il setto interventricolare e le due camere ventricolari. In seguito al processo di decellularizzazione, il peso medio misurato risulta pari a 0.6151 ± 0.0105 g, mentre lo spessore medio delle pareti ventricolari è pari a 0.0737 ± 0.0004 mm per il ventricolo destro e 0.1255 ± 0.0002 mm per il ventricolo sinistro.

In questo protocollo si sono verificati alcuni casi di parziale decellularizzazione dovuta ad una non corretta perfusione dell'organo o ad un lavaggio non efficace delle pareti esterne. Questi esperimenti non sono stati considerati al fine delle valutazioni istologiche e meccaniche.

6.3.2 Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche

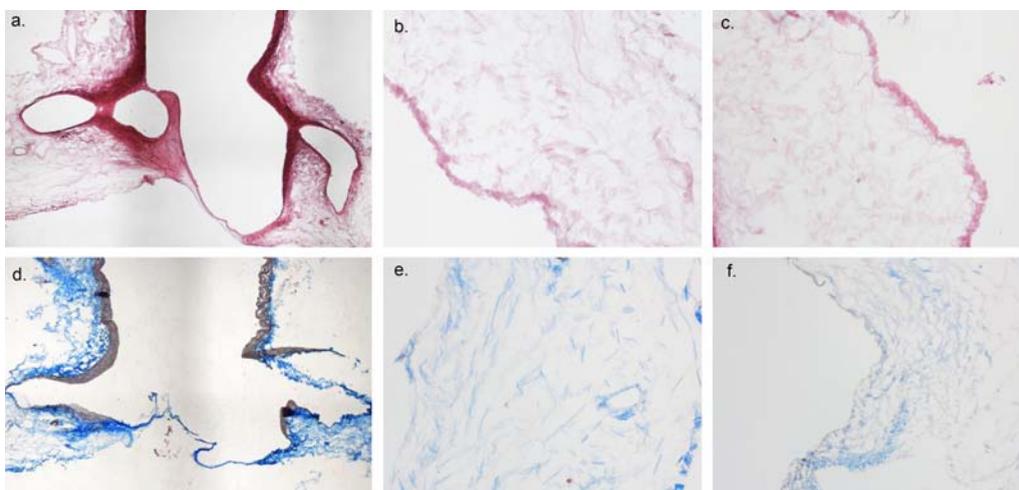


Figura 6.6: *Istologie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. Vengono riportate nella prima riga le immagini ottenute tramite H&E e nella seconda riga con tricromica di Masson: (a-d) valvola aortica, (b-e) epicardio ventricolare destro, (c-f) epicardio ventricolare sinistro. Ingrandimento 4x in (a,d) e 10x in (b-c,d-e).*

Le osservazioni microscopiche riguardanti gli effetti dell'applicazione di tale protocollo di decellularizzazione sono compatibili con le osservazioni riportate in Ott et al. [1]. I vasi coronarici, che hanno permesso la per-

fusione dell'intero organo cardiaco con le soluzioni di decellularizzazione, presentano una parete dalla struttura integra, come apprezzabile in Figura 6.6 (a), nella regione prossimale alla radice aortica da cui originano. Come evidenziato dalle analisi di ematossilina-eosina e tricromica di Masson, la componente muscolare liscia non è stata completamente rimossa dalla media aortica (sono presenti tracce di colorazione rosso magenta ben visibili nella tricromica). Inoltre, la stessa valvola aortica è rimasta competente, i lembi non sono danneggiati e qualitativamente non si rilevano alterazioni nella struttura. Le colorazioni istologiche non sembrano mettere in evidenza la presenza di elementi nucleari a livello miocardico. Nel ventricolo destro è possibile notare il mantenimento dell'architettura reticolare della matrice extracellulare miocardica. Sono infatti individuabili delle lacune a struttura tridimensionale ben definita che rappresentano l'inalterata guaina di avvolgimento delle cellule cardiache rimosse dalla decellularizzazione. In alcune porzioni del miocardio sinistro è stata osservata un'elevata frammentazione delle fibre di collagene. Queste zone, non presentano la struttura alveolata originale, ma in esse si denotano fibre interrotte e danneggiate, talora ad andamento aghiforme (Figura 6.7). Sono presenti, infine, delle zone di matrice ben conservata, dove l'andamento e la distribuzione delle fibre non sono stati modificati dal processo e sono riconoscibili le lacune lasciate dai cardiomiociti rimossi.

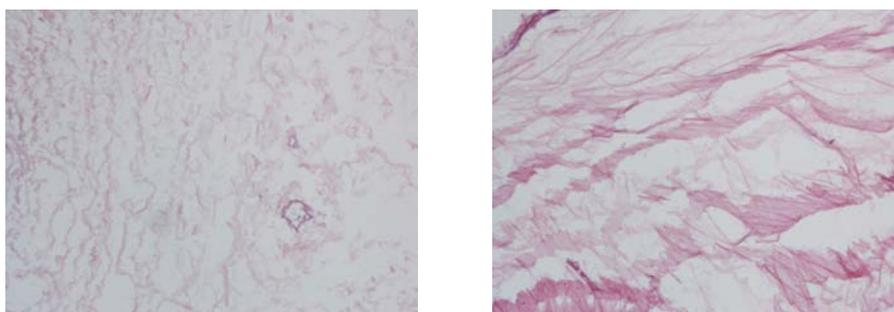


Figura 6.7: *Miocardio decellularizzato con protocollo SDS.* Nel ventricolo destro (prima immagine) è visibile l'alveolatura delle proteine reticolari ben conservata dopo l'estrazione cellulare. Nel sinistro (seconda immagine) sono invece riscontrabili discontinuità nella distribuzione delle fibre e l'impaccamento delle stesse in strutture allungate.

Inoltre è possibile riscontrare, sempre in corrispondenza della parte sinistra del cuore, un progressivo assottigliamento della parete ventricolare (Figura 6.8).

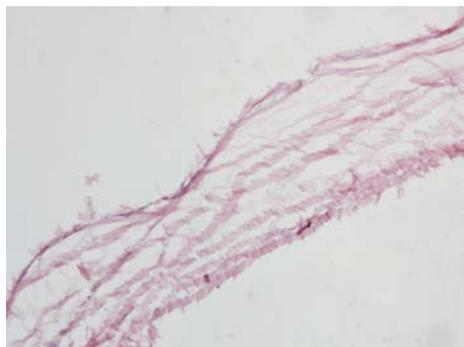


Figura 6.8: Assottigliamento della parete ventricolare con protocollo SDS 1%. Nella parete ventricolare sinistra è rilevabile un assottigliamento, il quale sembra essere verosimilmente dovuto alla perdita e/o collassamento della matrice extracellulare.

Le immunofluorescenze eseguite su questi campioni (Figura 6.9) confermano alcuni aspetti visti con i metodi istologici in entrambe le pareti ventricolari. È osservabile una frammentazione diffusa di collagene IV e lamina i quali non presentano più un'organizzazione tridimensionale riconoscibile. In alcune sezioni è presente, inoltre, del materiale nucleare, sia nella forma di nucleo vero e proprio, sia come acido nucleico libero. Nelle pareti ventricolari non è presente segnale per la falloidina, a supporto della rimozione delle altre componenti cellulari.

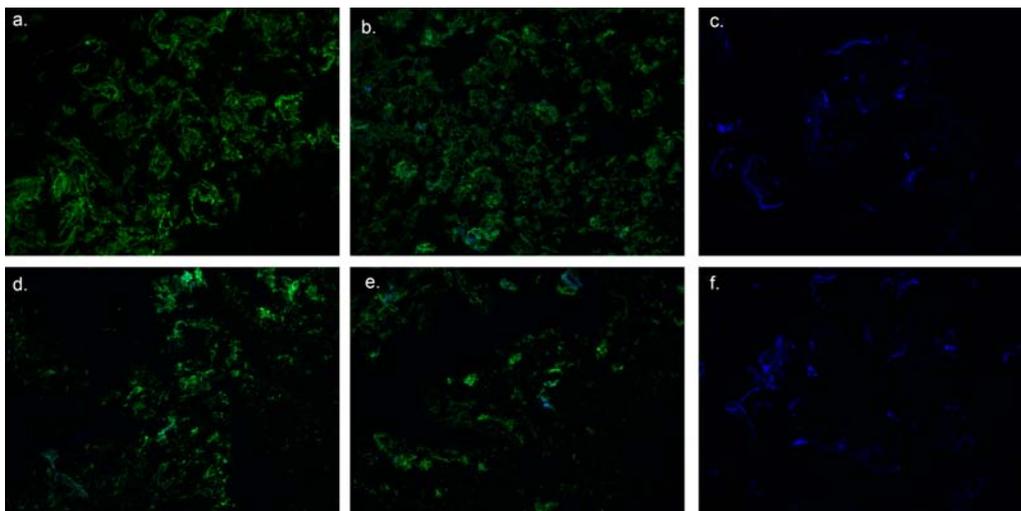


Figura 6.9: Immunofluorescenza del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. Nella prima riga vengono riportate le immagini del ventricolo destro e nella seconda le immagini del sinistro: (a-d) collagene IV, (b-e) laminina, (c-f) falloidina. Ingrandimento 10x.

6.4 Prove biomeccaniche

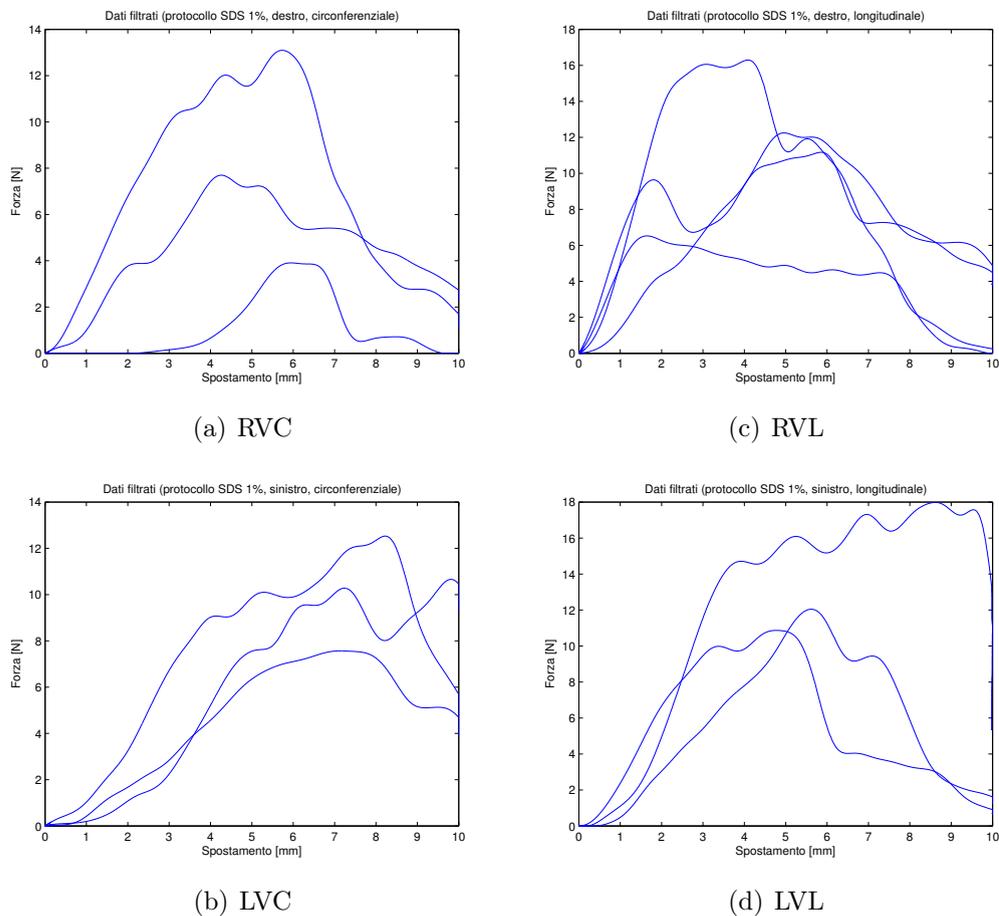


Figura 6.10: Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%. Vengono riportate nella prima riga le curve ottenute per il ventricolo destro (a-c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, e nella seconda riga le curve per il ventricolo sinistro (b, d), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente.

Le prove meccaniche eseguite per le due pareti ventricolari decellularizzate sono riportate in Figura 6.10. I dati medi quantificati sono riportati in Tabella 6.2. Per quanto concerne le curve, queste ultime presentano, in alcuni casi, andamenti fortemente variabili e la maggiore regolarità e ripetibilità sono riscontrabili nel caso di ventricolo sinistro circonferenziale. Entrambi i ventricoli appaiono più rigidi nella direzione longitudinale e la rottura avviene per valori di forza più elevati rispetto alla direzione circonferenziale.

Qualitativamente, l'anisotropia di ciascuna parete ventricolare viene mantenuta ed è osservabile valutando gli andamenti delle curve medie (Figura 6.11).

| | E^* (\pm SD) [F/mm/mm] | F_s [F/mm] | u_s [mm] |
|-----|-----------------------------------|-----------------|---------------|
| RVC | 2.9646 (\pm 0.5542) | 8.7916 | 5.0923 |
| RVL | 5.9129 (\pm 2.4313) | 11.9886 | 3.5706 |
| LVC | 2.7837 (\pm 0.9064) | 10.2582 | 8.1011 |
| LVL | 4.3311 (\pm 2.0064) | 12.7189 | 5.6011 |

Tabella 6.2: Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto decellularizzato con protocollo SDS 1%.

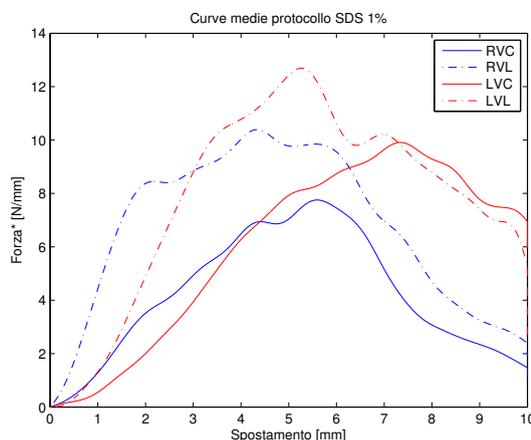


Figura 6.11: Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 1%.

6.5 Il cuore decellularizzato con protocollo TriCol

6.5.1 Analisi macroscopiche

L'aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con questo protocollo presenta un colore bianco ed opaco (Figura 6.12) e, talvolta, è possibile evidenziare degli aloni giallastri variamente diffusi. La consistenza e la turgidità appaiono leggermente attenuate rispetto alla condizione nativa. Non erano visibili le strutture interne, neppure utilizzando retroilluminazione. Il peso medio dell'organo al termine del processo è pari a 0.8930 ± 0.1598 g ed in

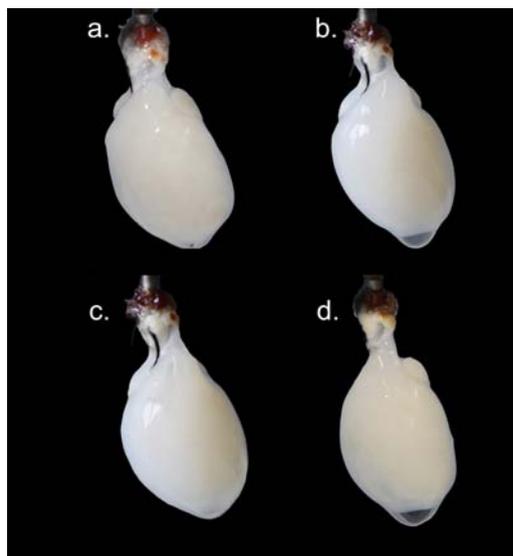


Figura 6.12: *Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo TriCol. (a) Cuore dopo lavaggio con inibitori di proteasi, (b) dopo soluzione ipertonica, (c) dopo soluzione ipotonica, (d) dopo trattamento con sodio colato.*

alcuni casi è stata osservata una ritenzione di liquidi da parte delle pareti, in quanto il peso finale misurato risulta superiore al peso posseduto precedentemente al processo. Le pareti ventricolari rimosse presentano, invece, uno spessore medio di 0.3760 ± 0.0473 mm per il lato destro e 0.9025 ± 0.0499 per il lato sinistro.

6.5.2 Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche

Nell'analisi microscopica della valvola aortica (Figura 6.13), i lembi appaiono ben definiti ed integri, facendo supporre la conservata competenza. Tuttavia, le colorazioni istologiche mettono in evidenza la presenza di materiale cellulare. L'impalcatura generale delle cellule è stata conservata, ma le stesse appaiono svuotate del loro contenuto. Analoghe considerazioni possono essere fatte nel caso degli acidi nucleici, i quali risultano ancora presenti. La componente di matrice extracellulare appare ben conservata sia sulla superficie epicardica (ben visibile), sia nel miocardio, sia per quanto riguarda il connettivo valvolare. Nella tricromica di Masson, in particolare, è ben apprezzabile la non efficiente rimozione del muscolo cardiaco.

Le sezioni di immunofluorescenza dimostrano l'inalterata distribuzione

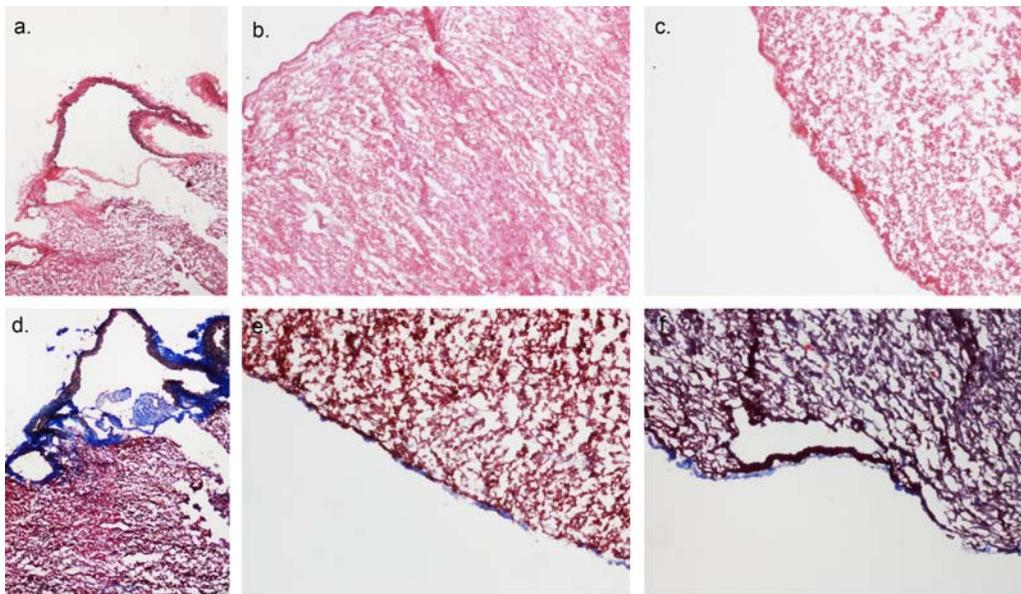


Figura 6.13: *Istologie del cuore decellularizzato con protocollo TriCol.* Vengono riportate nella prima riga le immagini ottenute tramite H&E e nella seconda riga con tricromica di Masson: (a-d) valvola aortica, (b-e) epicardio ventricolare destro, (c-f) epicardio ventricolare sinistro. Ingrandimento 4x in (a,d) e 10x in (b-c,d-e).

di collagene IV e laminina. Dopo il trattamento TriCol il sarcomero appare intatto, come confermato dal pattern della falloidina. Considerazioni analoghe possono essere fatte il segnale rilevato dalla fluorescenza del DAPI.

6.6 Prove biomeccaniche

Le prove meccaniche hanno fornito curve molto variabili tra loro in ognuna delle combinazioni acquisite (Figura 6.15). I dati qualitativi medi (Tabella 6.3) mostrano una maggiore rigidezza per il ventricolo destro in direzione circonferenziale rispetto all'altra direzione considerata ed al ventricolo sinistro. Considerando ciascun ventricolo separatamente, le tensioni di rottura non si discostano molto nelle due direzioni.

Le curve medie riportate in Figura 6.16 sembrano mostrare un'uniformizzazione del comportamento delle parete ventricolari nelle due direzioni. Si può, pertanto, ritenere che l'anisotropia venga perduta in favore di una simmetria tendenzialmente isotropa.

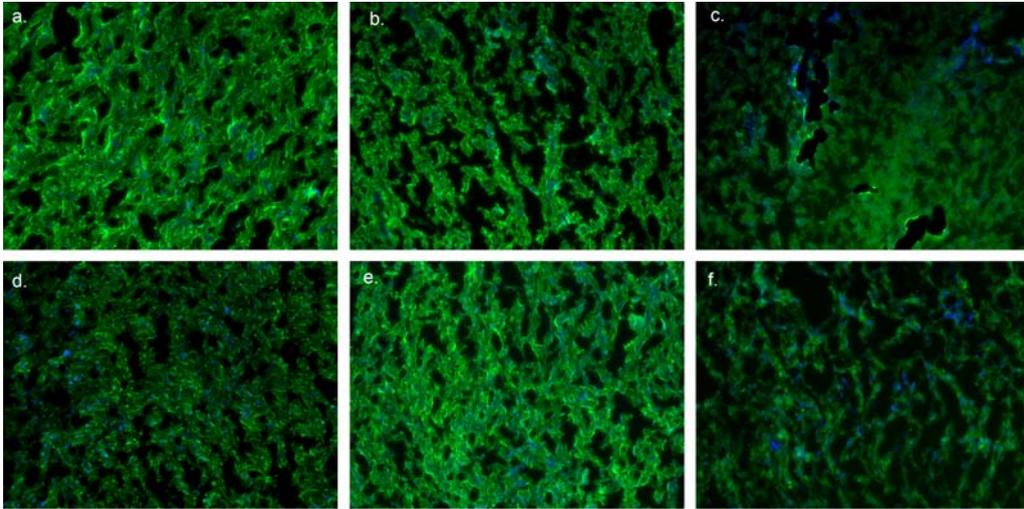


Figura 6.14: Immunofluorescenza del cuore decellularizzato con protocollo TriCol. Nella prima riga vengono riportate le immagini del ventricolo destro e nella seconda le immagini del sinistro: (a-d) collagene IV, (b-e) laminina, (c-f) falloidina. Ingrandimento 10x.

| | E^* (\pm SD) [F/mm/mm] | F_s [F/mm] | u_s [mm] |
|-----|-----------------------------------|-----------------|---------------|
| RVC | 1.5428 (\pm 0.3480) | 4.2196 | 3.8651 |
| RVL | 1.4922 (\pm 0.7452) | 3.7143 | 3.0694 |
| LVC | 0.4444 (\pm 0.2827) | 1.8420 | 6.2420 |
| LVL | 0.5775 (\pm 0.2105) | 1.4834 | 4.1038 |

Tabella 6.3: Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto decellularizzato con protocollo TriCol.

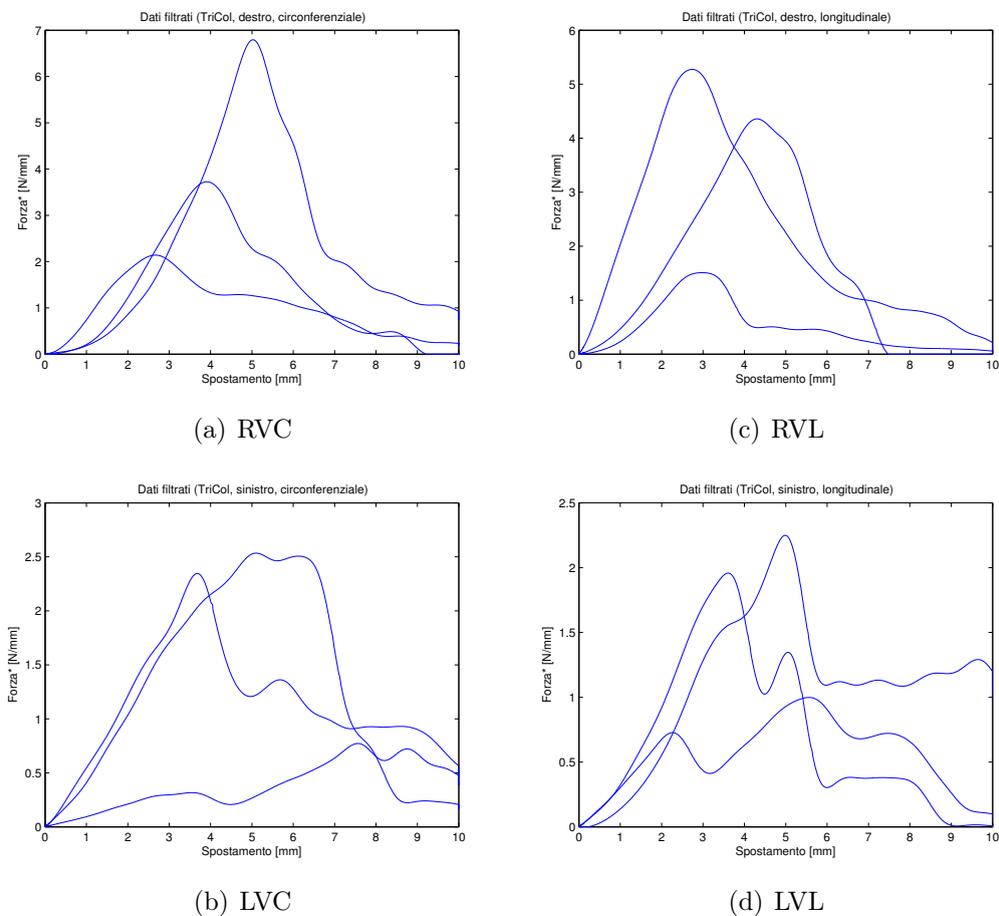


Figura 6.15: Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con protocollo TriCol. Vengono riportate nella prima riga le curve ottenute per il ventricolo destro (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, e nella seconda riga le curve per il ventricolo sinistro (b, d), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente.

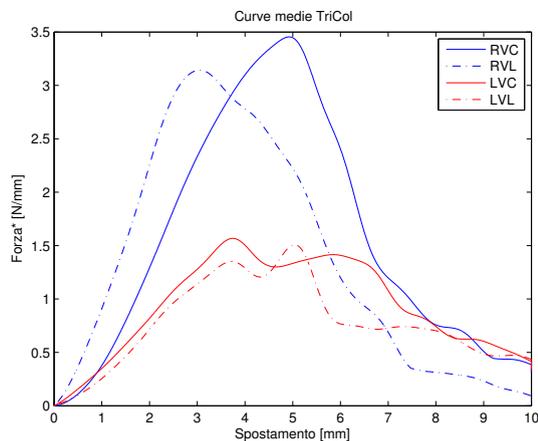


Figura 6.16: Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decellularizzato con protocollo TriCol.

6.7 Protocollo con SDS 0.5%

6.7.1 Analisi macroscopiche

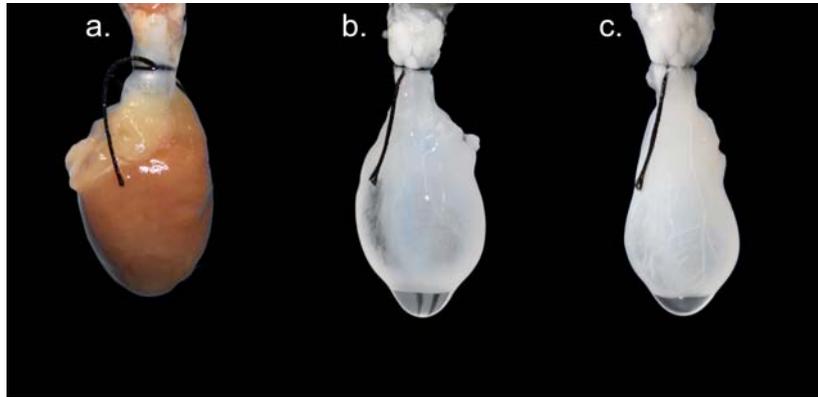


Figura 6.17: *Aspetto macroscopico del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5%. (a) cuore nativo, (b) dopo trattamento con SDS 0.5%, (c) dopo lavaggio con Triton X-100.*

L'aspetto macroscopico dei cuori decellularizzati con questo protocollo ricalca considerazioni effettuate in precedenza con l'altra metodica basata sul detergente SDS (Figura 6.17). Tuttavia, la traslucidità risulta essere maggiore, permettendo di distinguere il setto, e conseguentemente le camere ventricolare, senza l'utilizzo di retroilluminazione dei campioni. Lo stesso albero coronarico appare ben visibile e perfettamente conservato. Le camere ventricolari, perduta la maggior parte della loro consistenza in seguito al processo di decellularizzazione, collassano e l'organo si appiattisce totalmente se appoggiato su un piano. Il peso medio è pari a 0.6508 ± 0.0665 g, mentre lo spessore medio della parete ventricolare destro è pari a 0.0902 ± 0.0026 mm e per la parete sinistra 0.1575 ± 0.0027 mm.

Per testare la competenza della valvola aortica e l'integrità del circolo coronarico, il cuore è stato perfuso con del colorante alimentare. Tale prova ha messo in evidenza che la soluzione colorata non oltrepassa la valvola, ma entrando nelle coronarie perfonde le pareti dell'organo andando infine a riversare, tramite il seno coronarico, nell'atrio destro (Figura 6.18).



Figura 6.18: Verifica della competenza della valvola aortica.

6.7.2 Analisi microscopiche, istologiche ed immunoistochimiche

Nelle indagini microscopiche si evidenzia l'adeguata estrazione delle componenti cellulari, come apprezzabile in Figure 6.19, dove la valvola polmonare appare completamente decellularizzata e conservata nella struttura. Le pa-

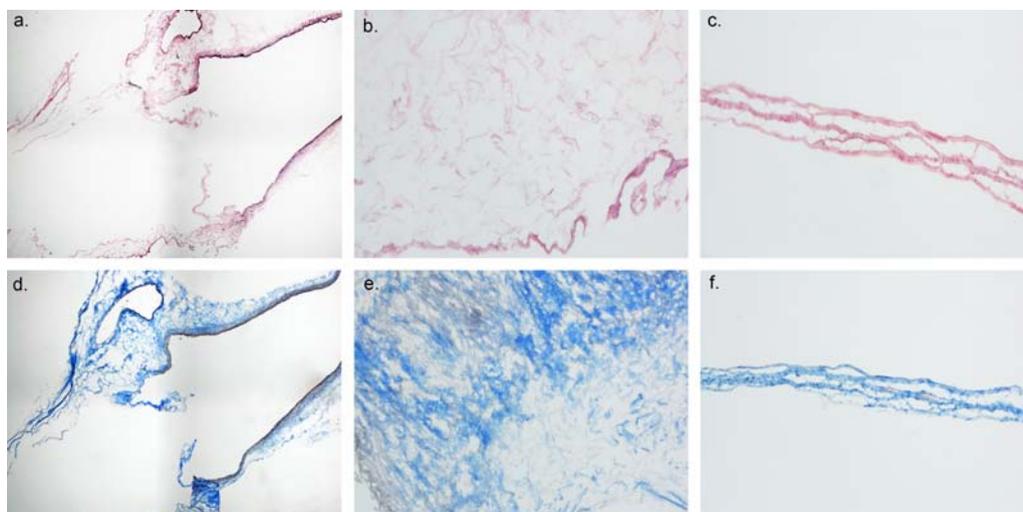


Figura 6.19: Istologie del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5%. Vengono riportate nella prima riga le immagini ottenute tramite H&E e nella seconda riga con tricromica di Masson: (a-d) valvola polmonare, (b-e) epicardio ventricolare destro, (c-f) epicardio ventricolare sinistro. Ingrandimento 4x in (a,d) e 10x in (b-c,d-e).

reti ventricolari appaiono anch'esse prive di cellule, ma presentano diversi

livelli di danno alla ECM. In particolare, nella parete destra sono riscontrabili delle zone la cui componente extracellulare appare intatta: talora è visibile il crimping delle fibre e la matrice presenta la struttura alveolata. Queste zone si alternano ad altre in cui invece sono presenti fibre interrotte e non è più visibile l'aspetto reticolare, né intuibile un'organizzazione tri-dimensionale. Una zona di transizione è riportata nella Figura 6.19. Gli effetti negativi maggiori del processo sono visibili nel ventricolo sinistro, dove la parete risulta essere drammaticamente assottigliata e le fibre appaiono collassate su se stesse, costituendo delle lamine distaccate tra loro.

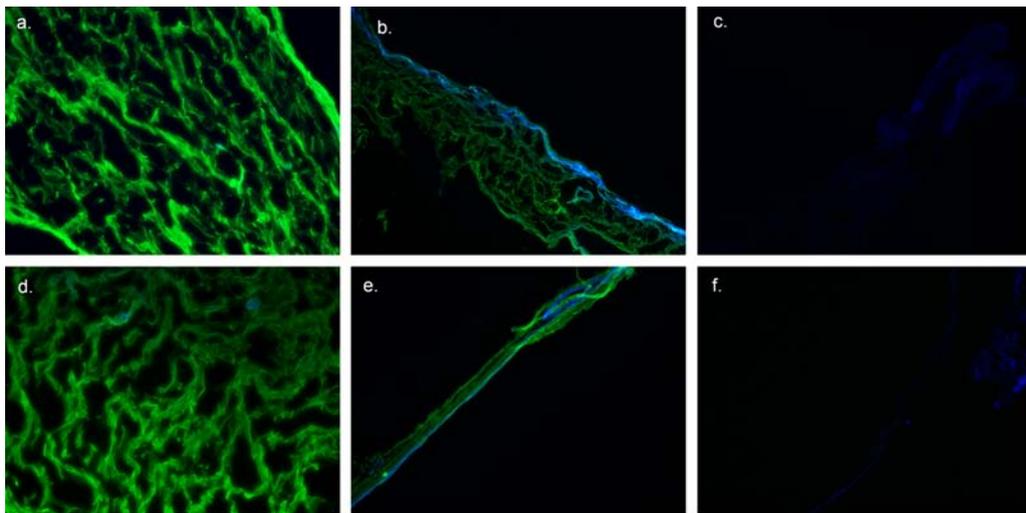


Figura 6.20: *Immunofluorescenza del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5%. Nella prima riga vengono riportate le immagini del ventricolo destro e nella seconda le immagini del sinistro: (a-d) collagene IV, (b-e) laminina, (c-f) falloidina. Ingrandimento 10x.*

Nelle sezioni di immunofluorescenza (Figura 6.20) sono visibili delle fessurazioni anomale non riconducibili alla lacune cellulari e ben evidenziabili sia nel caso del collagene IV sia nella laminina. la presenza di DNA libero adeso alla ECM è estremamente limitato, come evidenziato dalla scarsa e filamentosa positività per il DAPI. L'avvenuta rimozione cellulare è confermata, inoltre, dall'assenza di segnale per la falloidina.

6.8 Prove biomeccaniche

Per quanto riguarda le prove meccaniche, appare molto evidente (Figura 6.21) la forte variabilità presente, sia nella forma sia nella distribuzione, delle curve appartenenti anche a campioni dello stesso gruppo. I dati medi

qualitativi (Tabella 6.4) riportano che il ventricolo sinistro presenta rigidezza maggiore nella direzione longitudinale, mentre il destro nella direzione circonferenziale presenta la rigidezza massima. Gli stessi raggiungono forze di rottura maggiori rispetto alle altre direzioni considerate.

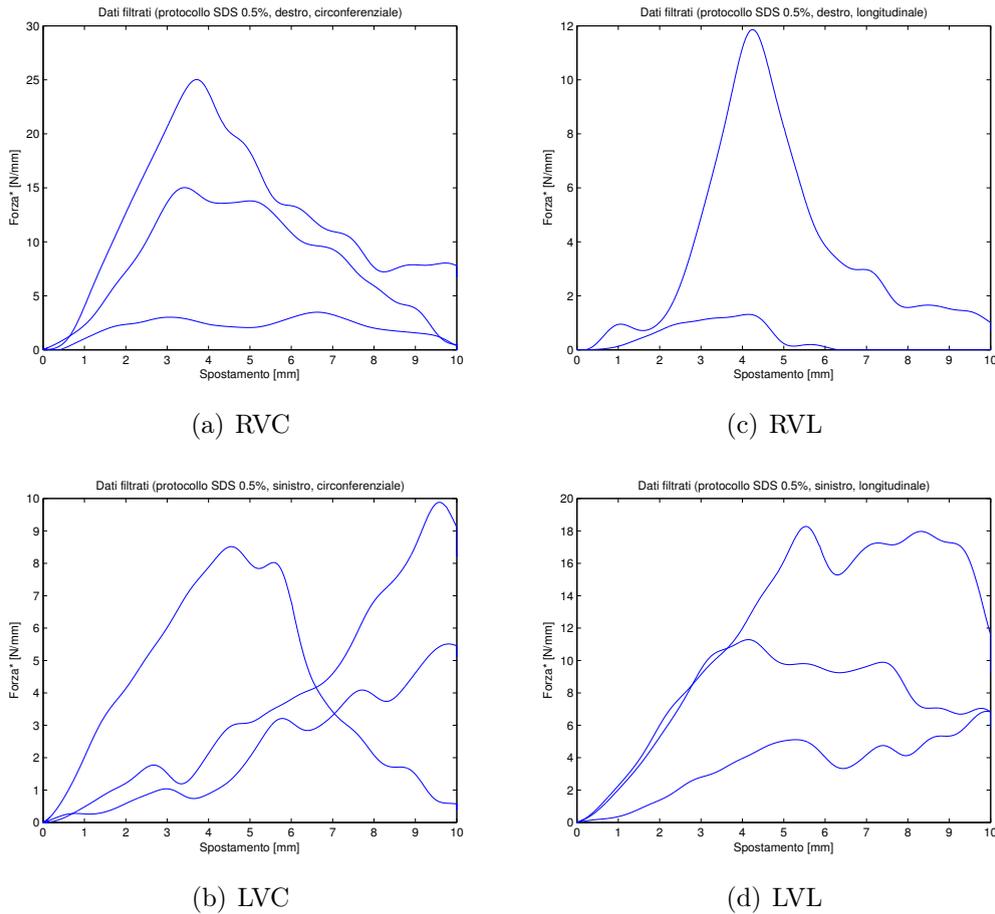


Figura 6.21: Curve tenso-deformative del cuore decellularizzato con protocollo SDS 0.5%. Vengono riportate nella prima riga le curve ottenute per il ventricolo destro (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, e nella seconda riga le curve per il ventricolo sinistro (b, d), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente.

Comparando le curve medie per ogni ventricolo e direzione (Figura 6.22) è più facilmente apprezzabile la mantenuta anisotropia delle pareti ventricolari in quanto le due direzioni presentano comportamenti nettamente differenti.

| | E^* (\pm SD) [F/mm/mm] | F_s [F/mm] | u_s [mm] |
|-----|-----------------------------------|-----------------|---------------|
| RVC | 5.0308 (\pm 3.3260) | 12.0677 | 4.3681 |
| RVL | 3.2513 (\pm 3.7780) | 6.5861 | 4.1943 |
| LVC | 1.2690 (\pm 1.1791) | 7.9832 | 7.3701 |
| LVL | 2.5948 (\pm 1.3721) | 13.5986 | 6.9755 |

Tabella 6.4: Dati medi quantitativi delle prove meccaniche su tessuto decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

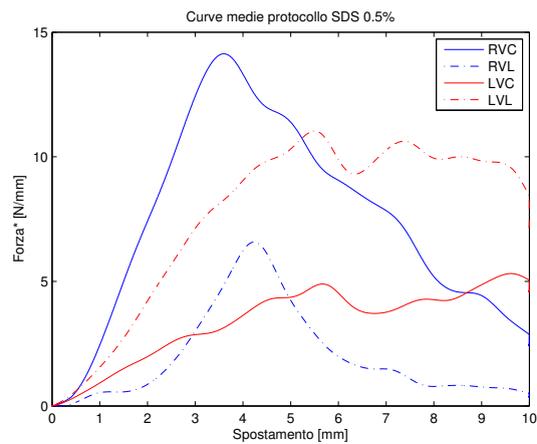


Figura 6.22: Confronto tra curve tenso-deformative medie del cuore decellularizzato con protocollo con SDS 0.5%.

Capitolo 7

Discussione

Al fine dell'impiego nell'ambito dell'ingegneria tessutale, la matrice extracellulare deve essere completamente scevra della componente cellulare, la quale funge da stimoli immunogenici, infiammatori e calcifici. Tale scopo viene realizzato mediante l'applicazione di protocolli di decellularizzazione, i quali permettono di eliminare e rimuovere selettivamente non solo le cellule, ma anche gli antigeni presenti sulla loro superficie, arrecando il minor danno possibile alla matrice. Quest'ultima deve essere in grado di mantenere gli aspetti biologici e meccanici che la rendono il substrato ottimale per la semina cellulare. Per quest'ultimo aspetto è particolarmente importante la presenza di lamine basali intatte le quali hanno funzione di regolazione e supporto alla rigenerazione cellulare.

Nel presente lavoro, le indagini istologiche ed immunoistochimiche hanno permesso di verificare se fossero riscontrabili alterazioni della struttura extracellulare in seguito al processo di decellularizzazione, consentendo inoltre di valutare qualitativamente l'entità residuale di elementi cellulari (proteine ed acidi nucleici). Mentre le prove biomeccaniche hanno fornito indicazioni sulla resistenza a trazione degli scaffold ottenuti.

7.1 Analisi macroscopica

L'analisi macroscopica non permette, se utilizzata da sola, di affermare con certezza se il processo di decellularizzazione sia o meno andato a buon fine. Tuttavia, fornisce un'utile indicazione predittiva. Le matrici tridimensionali ottenute utilizzando i protocolli con SDS presentano un aspetto biancastro e traslucido ed una consistenza simile, permettendo di presupporre un mag-

gior grado di decellularizzazione rispetto a quanto realizzato con il protocollo TriCol. Infatti, gli scaffold ottenuti con questo protocollo si avvicinavano di più alla condizione nativa (per colorazione, turgidità della struttura e consistenza delle pareti). Se si analizzano le camere ventricolari dopo l'applicazione di protocolli con SDS, esse non mantengono la forma tridimensionale che si riscontra nell'organo nativo, in quanto, venendo a mancare la componente cellulare le pareti perdono di robustezza. Queste osservazioni sono più accentuate nel protocollo con SDS 0.5% e potrebbero essere indice macroscopico di una maggiore aggressività del processo di decellularizzazione realizzato riducendo le concentrazioni di SDS, ma mantenendo immerso l'organo perfuso.

Confrontando tra loro i pesi degli organi decellularizzati, è possibile osservare che rispetto al tessuto nativo vi è una perdita circa del 45.8% nel caso di protocollo SDS 1%, del 21.3% nel caso di protocollo TriCol e del 51.2% nel caso di protocollo SDS 0.5%. Il calo di peso più consistente si ha nel caso di protocolli con SDS ed è ragionevolmente correlabile ad una maggiore eliminazione di materiale biologico dovuto al processo. In particolare, confrontando questi ultimi due metodi, il protocollo con SDS 0.5% realizza una diminuzione di peso maggiore di circa il 10% rispetto all'SDS 1%, confermando un effetto di rimozione maggiore da parte del primo.

Considerazioni analoghe possono essere fatte nel caso dello spessore delle pareti ventricolari. In particolare, il ventricolo destro presenta, rispetto alla condizione nativa, una perdita di spessore dell'85.9% nel caso di protocollo con SDS 1%, del 27.8% nel protocollo TriCol e dell'82.7% nel protocollo con SDS 0.5%. Invece, nel ventricolo sinistro la perdita è del 90%, 33.7% e 88.4% rispettivamente. L'assottigliamento maggiore si verifica, pertanto, nel primo protocollo adottato ed, in generale, è maggiore nel ventricolo sinistro a parità di metodica adottata. Le variazioni più consistenti si riscontrano, nuovamente, nei protocolli con SDS e comparando questi ultimi, la diminuzione dello spessore è del 22% per il ventricolo destro decellularizzato con SDS 1% e 25.5% per il ventricolo sinistro rispetto al tessuto decellularizzato con SDS 0.5%.

7.2 Analisi microscopica

7.2.1 La ECM

Tra i protocolli testati, quelli che determinano la più efficace decellularizzazione dell'organo, sono gli stessi ad arrecare maggiori danni alla matrice. In particolare, l'azione denaturante dell'SDS nei confronti della componente proteica della ECM viene riconosciuta in diversi lavori [50, 52, 53] come confermato dai risultati sperimentali ottenuti. Frammentazione e collasso delle fibre della ECM si sono verificati in seguito all'utilizzo di protocolli con SDS e sembrano interessare maggiormente il ventricolo sinistro. Nel protocollo con concentrazione più elevata, la direzionalità delle fibre appare, in generale, meglio conservata e sono apprezzabili le lacune lasciate dai cardiomiociti rimossi, tuttavia sono presenti delle zone fortemente alterate, nelle quali gli orientamenti vengono persi e sono riscontrabili fessurazioni irregolari. Nel protocollo a ridotta concentrazione di SDS e totale immersione dell'organo, le analisi evidenziano una parete ventricolare sinistra estremamente danneggiata e assottigliata. Per la parete destra è stata comunque riscontrata la frammentazione delle fibre, seppure vi sia una conservazione migliore. Il protocollo TriCol non ha prodotto un'adeguata decellularizzazione dell'organo, dando origine a scaffold variamente popolati dai citotipi posseduti dal tessuto nativo. L'alternanza delle soluzioni ipotoniche ed ipertoniche è stata efficace nel provocare la lisi della membrana cellulare (si osserva un aspetto "svuotato" delle cellule), ma i lavaggi successivi non sono stati sufficienti alla completa rimozione delle stesse e dei detriti. Questo trattamento basato sull'utilizzo di detergenti meno aggressivi, quali il Triton X-100 ed il sodio colato, hanno premesso di ottenere una matrice extracellulare altamente conservata e di apparenza molto simile a quella del tessuto nativo.

7.2.2 Le componenti cellulari

Ai fini della rigenerazione cardiaca è altresì fondamentale la completa rimozione degli acidi nucleici, in quanto presentano proprietà pro-infiammatorie e pro-calcifiche. Per quanto riguarda la loro rimozione, questa è avvenuta in maniera più efficace nel protocollo con SDS 0.5%. In particolare, sono riscontrabili dei residui di DNA libero adesi alle fibre, i quali potrebbero essere facilmente rimossi mediante digestione enzimatica con endonucleasi specifiche. Invece, nel protocollo SDS 1% è possibile individuare delle zone in cui

sono presenti rari nuclei intatti e materiale nucleare libero, a determinare un minor grado qualitativo di decellularizzazione. Nel caso del protocollo TriCol, si rileva una situazione molto vicina alla condizione nativa, in quanto la maggior parte del materiale nucleare si trova ancora localizzato e ben organizzato nelle cellule lisate e “svuotate”. L’assenza di segnale per la falloidina, inoltre, mette in evidenza la completa rimozione delle proteine sarcomeriche e muscolari lisce in entrambi i protocolli con SDS, a differenza del trattamento TriCol.

7.3 Prove meccaniche

La scelta di testare le pareti ventricolari è dovuta all’importanza che queste rivestono nell’ambito della contrazione cardiaca del cuore. La verifica delle prove meccaniche della matrice ventricolare decellularizzata è rilevante non solo dal punto di vista della funzione svolta macroscopicamente, ma anche dalle proprietà biologiche che la stessa possiede. Come già discusso in precedenza, le caratteristiche meccaniche del substrato influenzano fortemente le cellule che lo popolano promuovendone o inibendone la funzionalità. Pertanto, ad esse bisogna porre adeguata attenzione nell’obiettivo del ripopolamento degli scaffold matriciali.

7.3.1 Le curve tenso-deformative

Pur con i limiti precedentemente osservati, le prove a trazione realizzate consentono di confrontare il comportamento medio dei ventricoli nativi e decellularizzati nelle due direzioni testate (Figura 7.1). In tutte le prove eseguite si rileva che i ventricoli decellularizzati con protocollo TriCol presentano curve con andamento intermedio tra quanto rilevato per i nativi ed i decellularizzati con SDS, mostrando un comportamento molto affine al primo nel caso di ventricolo sinistro in entrambe le direzioni. Questo aspetto è confermato dalle analisi microscopiche svolte in precedenza, le quali permettono di stimare per quest’ultimo caratteristiche ibride più vicine a quelle di un tessuto nativo che di un decellularizzato. Tuttavia, poiché il ventricolo destro si differenzia meccanicamente dal nativo più del sinistro, ciò suggerisce che in questo lato dell’organo la procedura possa avere indotto modificazioni maggiori, pur non essendo risultate completante efficaci. Nei casi di ventricoli trattati con SDS, le curve si differenziano molto dal

controllo, assumendo caratteristiche variabili a seconda della direzione considerata. Ad esempio, per il ventricolo sinistro longitudinale gli andamenti sono molto simili, mentre negli altri casi sono totalmente differenti sia per sviluppo che per entità dei massimi.

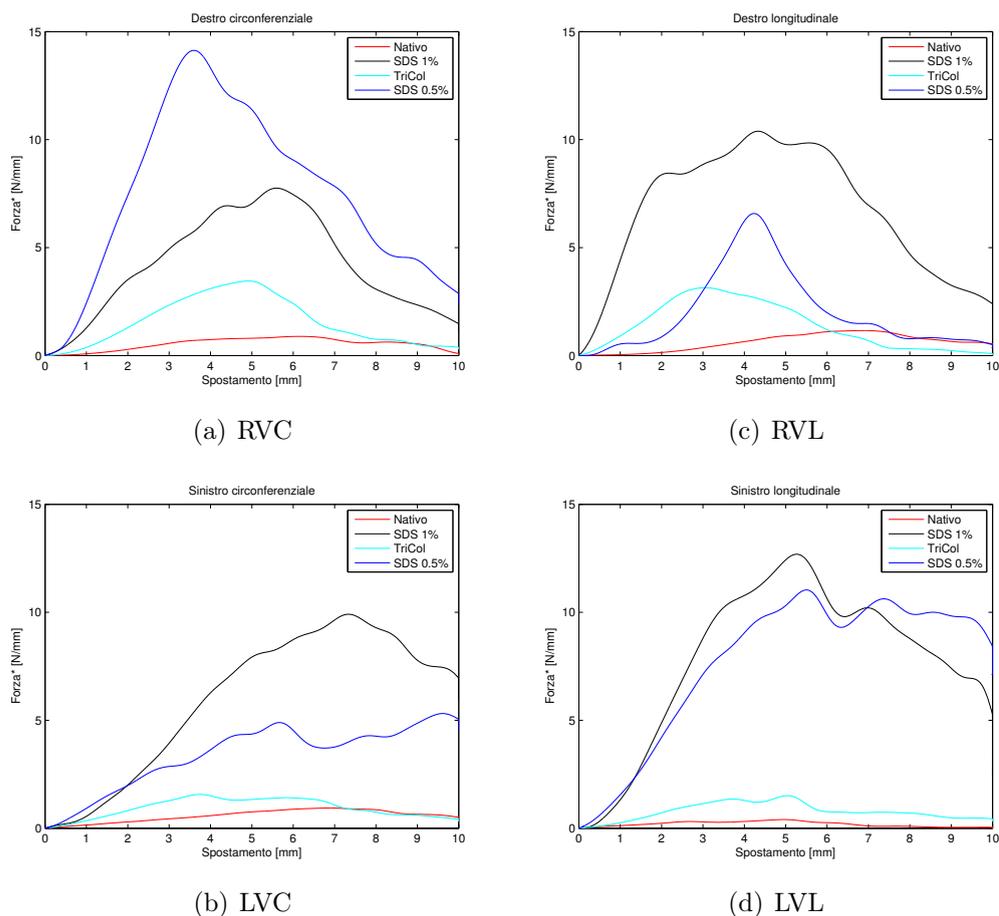


Figura 7.1: Confronto tra curve tenso-deformative medie suddivise per ventricolo e direzione. Nella prima riga sono riportati i ventricoli destri (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, mentre nella seconda i ventricoli sinistri (b, d), in direzione longitudinale e circonferenziale rispettivamente.

7.3.2 Stima delle proprietà di anisotropia

Per quanto riguarda la valutazione delle caratteristiche di anisotropia, valutate in maniera qualitativa in questa sede, si richiamano le immagini in Figura 7.2. L'anisotropia dei tessuti biologici risponde a specifiche necessità funzionali, cui l'evoluzione ha soddisfatto mediante adattamenti strutturali ben definiti. Tale proprietà determina la presenza di comportamenti dif-

ferenziati a seconda della direzione di sollecitazione del materiale dovute a direzioni prevalenti di orientazione delle fibre che compongono lo stesso. Nei risultati ottenuti, l'anisotropia della parete ventricolare sembra essere conservata nei due protocolli con SDS ed è più marcata nel caso di concentrazioni inferiori, fornendo indicazioni sulla mantenuta direzionalità della componente fibrosa della matrice. Nel caso di protocollo TriCol si osserva, al contrario, un processo inverso di uniformità degli andamenti nelle due direzioni di carico, rivelando caratteristiche più vicine alla simmetria isotropa. Le cellule lisate e svuotate del citoplasma, ma rimaste adese alle fibre della ECM, potrebbero avere causato un processo di omogeneizzazione che fa rispondere il tessuto in maniera simile indipendentemente dalla direzione di sollecitazione.

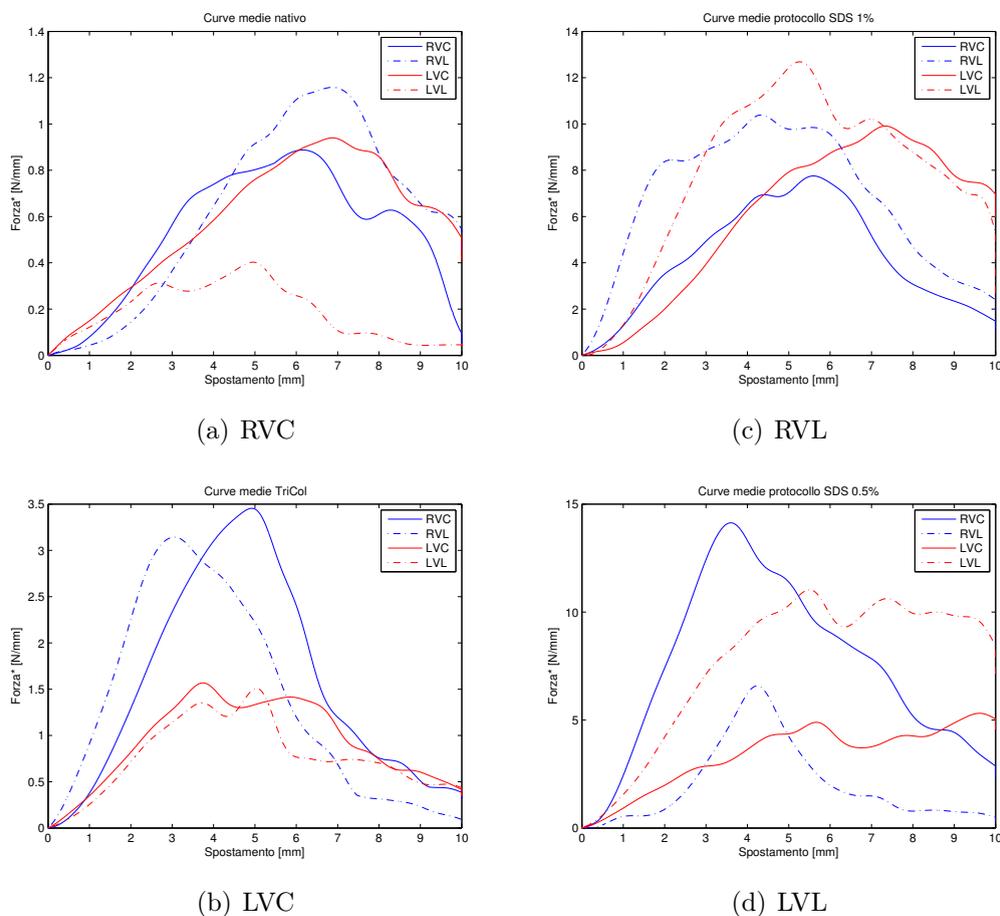


Figura 7.2: *Confronto tra curve tenso-deformative medie suddivise per protocollo. Nella prima riga sono riportati i ventricoli destri (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, mentre nella seconda i ventricoli sinistri (b, d), in direzione longitudinale e circonferenziale rispettivamente.*

7.3.3 Analisi delle pendenze delle curve di carico

Per le pendenze delle curve di carico, il confronto viene riportato in Figura 7.3.

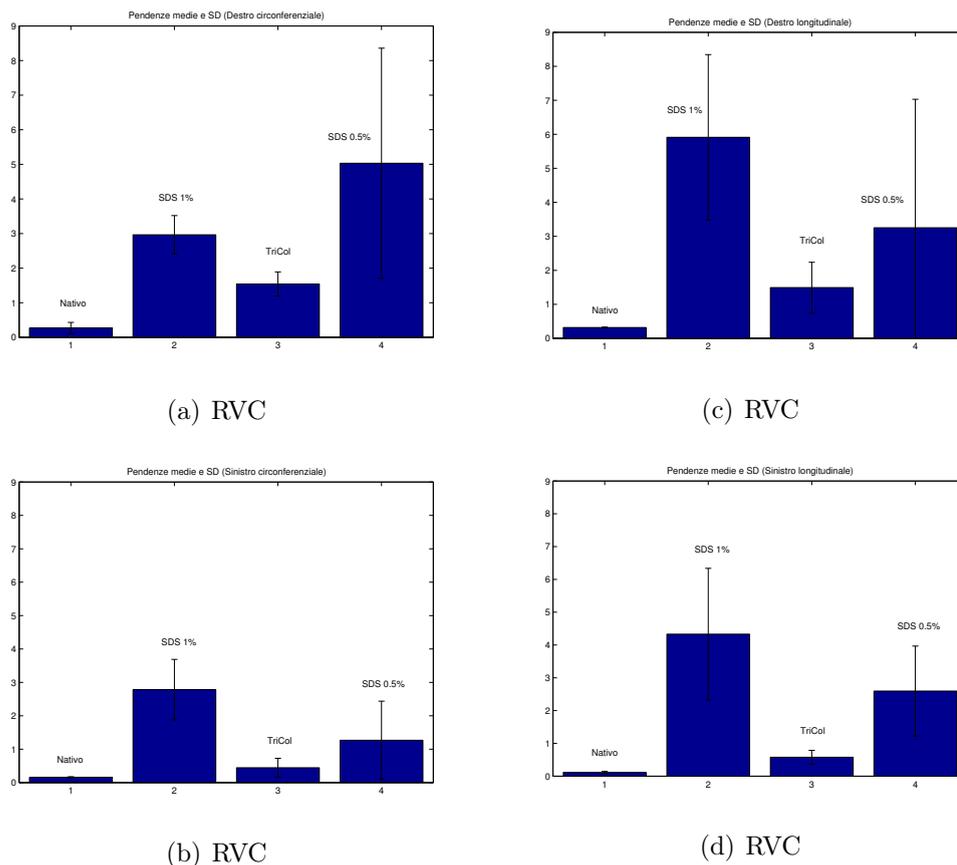


Figura 7.3: Confronto tra le pendenze medie delle curve di carico. Nella prima riga sono riportati i ventricoli destri (a, c), in direzione circonferenziale e longitudinale rispettivamente, mentre nella seconda i ventricoli sinistri (b, d), in direzione longitudinale e circonferenziale rispettivamente.

I valori minimi di rigidezza calcolati riguardano il tessuto nativo e, per lo stesso, la rigidezza risulta essere maggiore nella direzione circonferenziale per entrambi i ventricoli. I ventricoli ottenuti mediante decellularizzazione con SDS presentano rigidezze maggiori rispetto al riferimento nativo: nel protocollo ad alta concentrazione di detergente la rigidezza è maggiore nella direzione longitudinale per entrambi i ventricoli, mentre nel caso di protocollo a bassa concentrazione la rigidezza è maggiore nella direzione circonferenziale, per la parete destra, e nella direzione longitudinale per la parete sinistra. In particolare, quest'ultimo protocollo sembra generare (con eccezione della parete destra circonferenziale) curve con una pendenza

inferiore rispetto a quanto indotto dal protocollo con SDS 1%. Tuttavia, è necessario tenere presente che le deviazioni standard assumono, in alcuni casi, valori molto elevati, riducendo l'affidabilità della stima. Analogamente a quanto visto in precedenza, anche in questo caso le pareti ventricolari ottenute con protocollo TriCol presentano pendenze intermedie tra le condizioni nativa e decellularizzata, più vicine alla prima nel caso di ventricolo sinistro. L'aumento della rigidità nei tessuti decellularizzati potrebbe essere dovuto al fatto che, mancando le cellule, le fibre di collagene si trovano maggiormente addensate: è possibile che il maggior grado di impaccamento permetta al tessuto di conseguire deformazioni inferiori a parità di deformazione. Inoltre, queste ultime considerazioni forniscono indicazioni sul grado di crimping delle fibre di collagene, in quanto la pendenza può essere interpretata in termini di velocità di sollecitazione. Nel protocollo con SDS 0.5% il crimping delle fibre può considerarsi maggiore di quanto non sia nel protocollo con SDS 1%: la presenza di una pendenza minore indica che sono stati necessari fenomeni deformativi maggiori per ottenere una determinata misura di forza in quel campione, la quale è a sua volta determinata dalla scomparsa del crimping che permette al campione di entrare in trazione. I campioni realizzati con SDS ad alta concentrazione raggiungono quella misura di forza per stati deformativi inferiori, dimostrando una condizione più avanzata di uncrimping del collagene.

7.3.4 Analisi dei massimi delle curve di carico

L'analisi dei massimi è stata svolta costruendo dei cluster di punti (Figura 7.4) di cui sono stati ricavati i centroidi delle distribuzioni. Questi ultimi permettono alcune considerazioni relativamente all'entità delle forze e degli spostamenti che portano il campione alla rottura. A causa della natura delle curve, le distribuzioni sono molto varie ed è difficile definire delle proprietà valide complessivamente. Tuttavia, è possibile osservare che i tessuti decellularizzati con SDS presentano rottura per forze molto più consistenti, di quanto avviene nel nativo, e per spostamenti inferiori nel caso di ventricolo destro e maggiori nel sinistro. I ventricoli ottenuti con protocollo TriCol presentano l'usuale carattere intermedio, giungendo a rottura per valori di forza leggermente maggiori rispetto al nativo e per spostamenti più piccoli. Le differenze dal riferimento non decellularizzato sono più marcate nel caso di ventricolo destro, come già rilevato in precedenza.

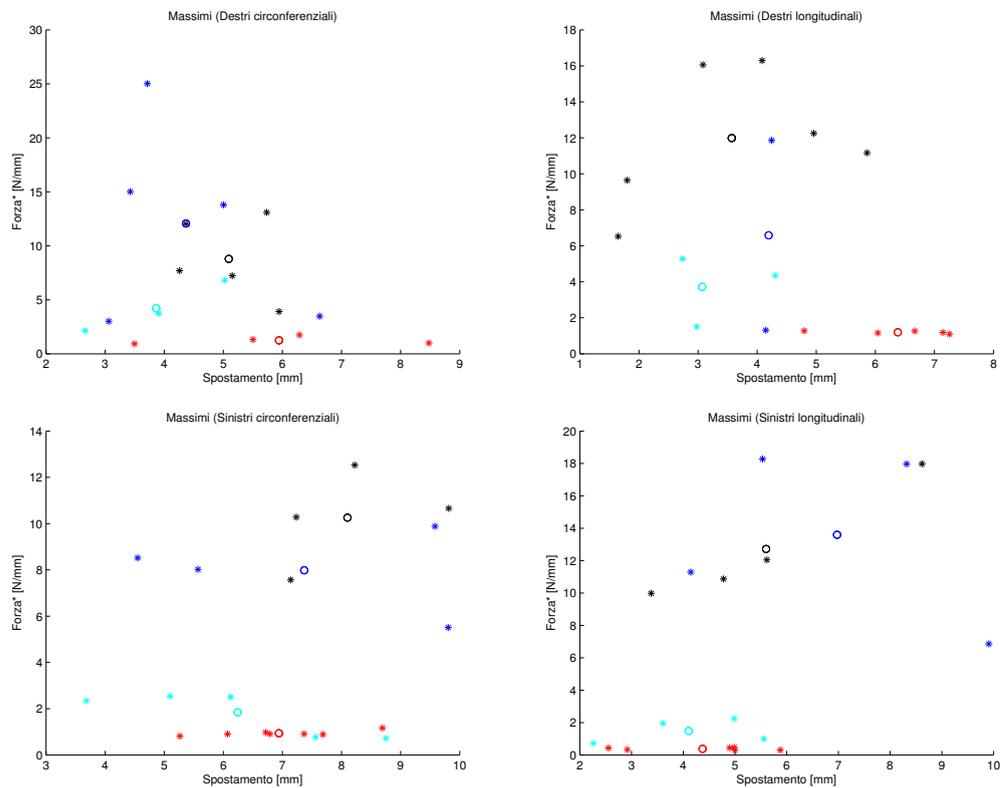


Figura 7.4: Confronto tra i massimi delle curve di carico. Gli asterischi rappresentano i punti massimo selezionati, mentre i cerchi i costituiscono i centroidi delle distribuzioni.

Le alterazioni microscopiche di danneggiamento della matrice ed interruzione delle fibre che si riscontrano nei protocolli con SDS, non sembrano avere inficiato le caratteristiche a trazione dei campioni. L'arrangiamento interno dei componenti è in grado di raggiungere stati di forza molto maggiori di quanto si riscontra nel tessuto nativo, correlabili con l'aumentata rigidità dovuta, probabilmente, ad maggiori densità e orientamenti prevalenti delle fibre di collagene.

Capitolo 8

Conclusioni

Nelle prove sono stati messi a confronto diversi protocolli di decellularizzazione totale di cuore per perfusione coronarica retrograda dello stesso: le procedure adottate hanno permesso di ottenere, nel caso di protocolli con SDS, uno scaffold costituito da ECM cardiaca e con triviale componente cellulare endogena, in una geometria tridimensionale analoga all'organo nativo, dotata di camere atriali e ventricolari, delle rispettive valvole atrioventricolari e arteriali ed una rete vascolare intatta e funzionale.

Tuttavia, nessuno dei protocolli trattati fornisce il supporto matriciale ottimale per la successiva rigenerazione mediante ripopolamento con elementi cellulari cardiovascolari. Nonostante l'avvenuta rimozione cellulare (con presenza di nuclei e DNA libero variabile a seconda del protocollo) la matrice possiede alcune zone fortemente danneggiate a seconda delle pareti ventricolari analizzate. Fessurazioni dello scaffold e frammentazione delle fibre dimostrano la non adeguata preservazione della matrice ad inficiare (e limitare) le successive applicazioni in approcci rigenerativi. Anche le proprietà meccaniche confermano tali alterazioni, vista la rigidità nettamente maggiore delle matrici ottenute rispetto al tessuto nativo: la rottura avviene per forze maggiori e spostamenti differenti a seconda del ventricolo considerato. Il protocollo TriCol, dal punto di vista della decellularizzazione in particolare, rappresenta la soluzione meno efficace, in quanto è riscontrabile un'elevata presenza di residui cellulari e nucleari, sebbene fornisca una matrice altamente conservata e più vicina alla situazione originale.

I prossimi studi avranno come obiettivo l'ottenimento di una matrice più conservata al fine di produrre scaffold funzionali, attivi dal punto di vista biologico e con caratteristiche meccaniche comparabili a quelle riscontrabili

in un tessuto nativo. Pertanto, verrà proseguito il lavoro utilizzando il protocollo con SDS 0.5%, in quanto comporta benefici sia in termini di minore aggressività del trattamento sia in termini di inferiore quantità di residui di detergenti lasciati negli scaffold al termine della procedura. Questi ultimi, infatti, risultano citotossici e la loro presenza potrebbe interferire con l'attecchimento ed engraftment cellulari nello scaffold. Per aumentare la conservazione della matrice si diminuiranno le tempistiche di perfusione previste per la soluzione principale con il detergente ionico. Infatti, già dopo alcune ore dall'inizio della procedura sono riscontrabili, dal punto di vista macroscopico, lo sbiancamento dell'organo immerso e regioni traslucide in corrispondenza del ventricolo destro, facendo presupporre uno stadio già avanzato del processo.

Appendice A

Pannelli

A.1 Protocollo con SDS 1%

Le immagini riportano il cuore

- a. nativo
- b. dopo lavaggio con SDS 1%
- c. dopo lavaggio con Triton X-100

Sono stati riportati anche i casi di parziale decellularizzazione.

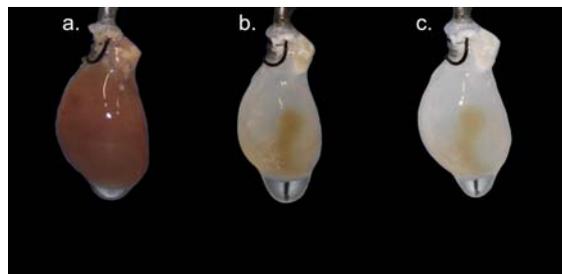


Figura A.1: Cuore 1 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

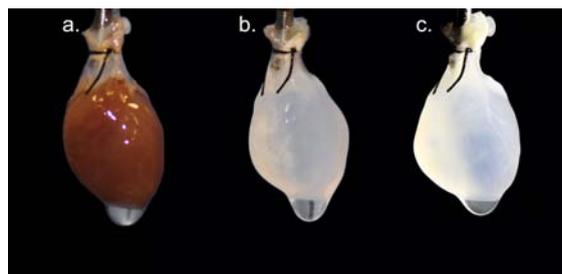


Figura A.2: Cuore 2 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

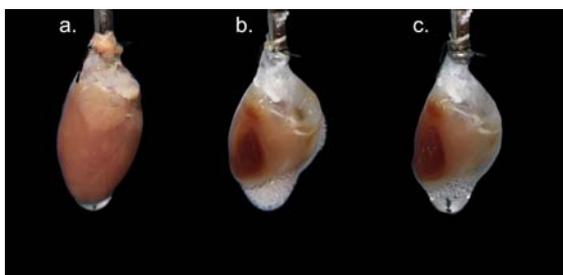


Figura A.3: Cuore 3 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

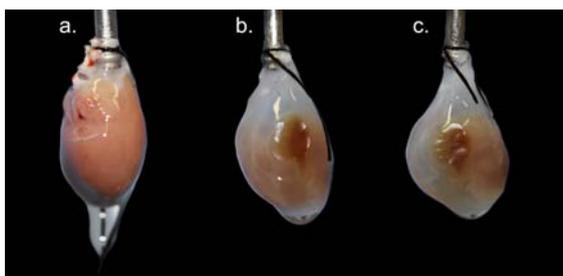


Figura A.4: Cuore 4 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

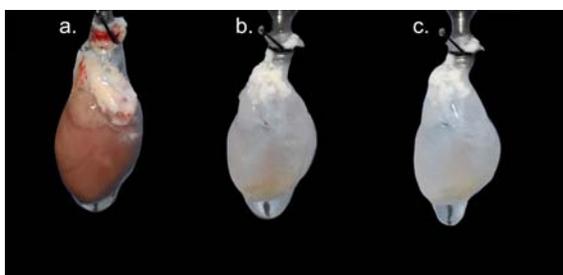


Figura A.5: Cuore 5 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

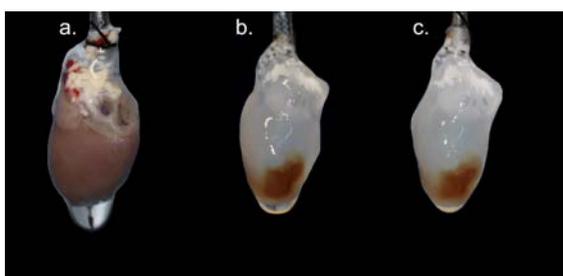


Figura A.6: Cuore 6 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

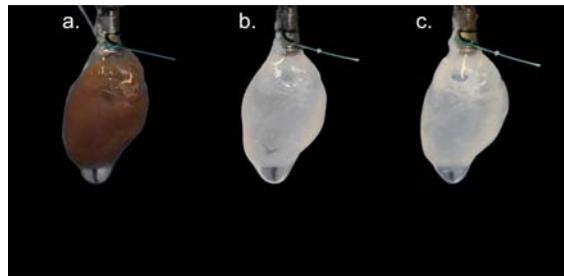


Figura A.7: Cuore 7 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

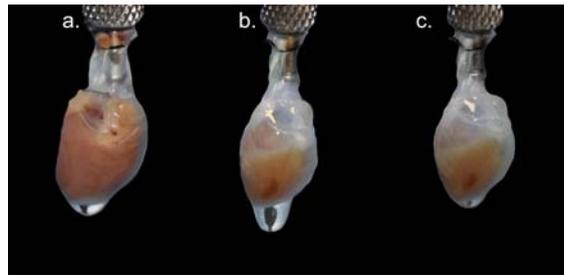


Figura A.8: Cuore 8 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

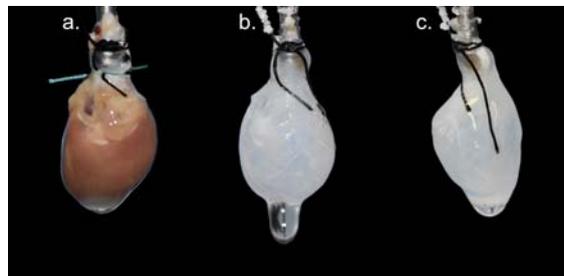


Figura A.9: Cuore 9 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

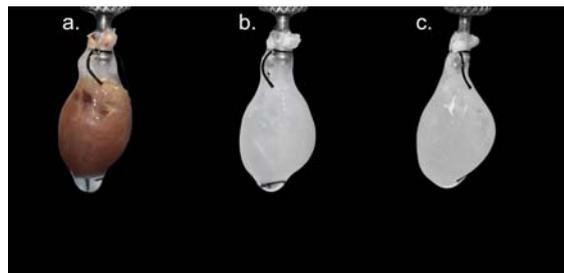


Figura A.10: Cuore 10 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

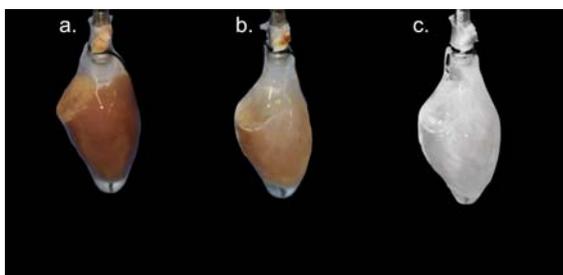


Figura A.11: Cuore 11 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

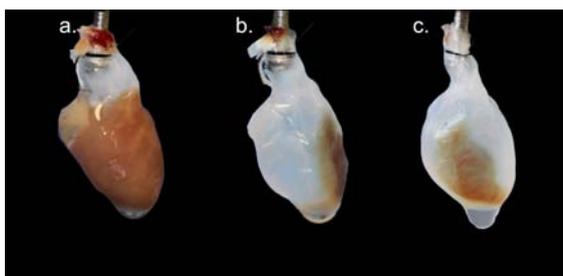


Figura A.12: Cuore 12 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

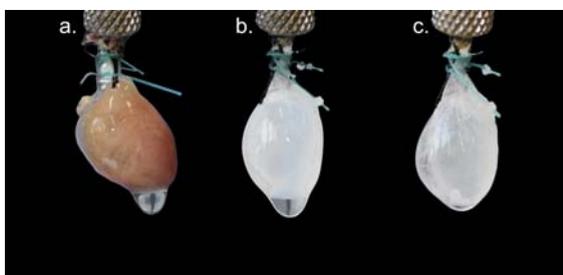


Figura A.13: Cuore 13 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

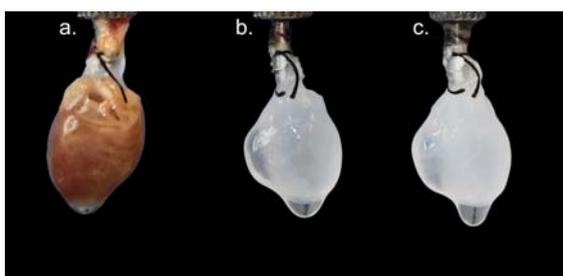


Figura A.14: Cuore 14 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

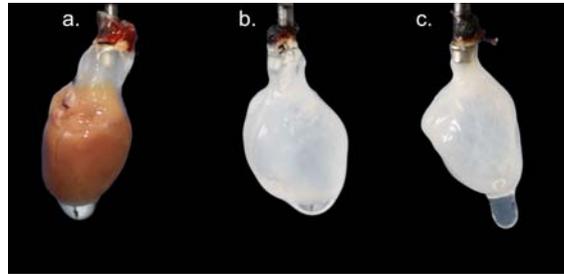


Figura A.15: Cuore 15 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

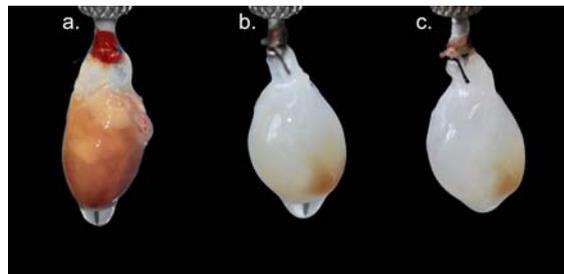


Figura A.16: Cuore 16 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

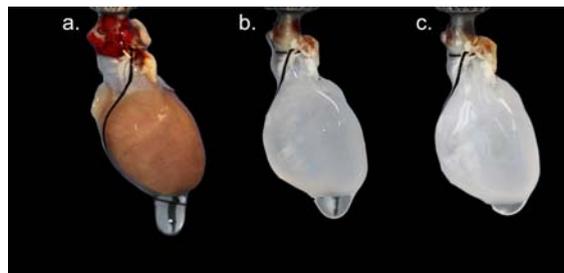


Figura A.17: Cuore 17 decellularizzato con protocollo SDS 1%.

A.2 Protocollo TriCol

Le immagini riportano il cuore

- a. dopo lavaggio con inibitori di proteasi
- b. dopo soluzione ipertonica
- c. dopo soluzione ipotonica
- d. dopo lavaggio con colato di sodio

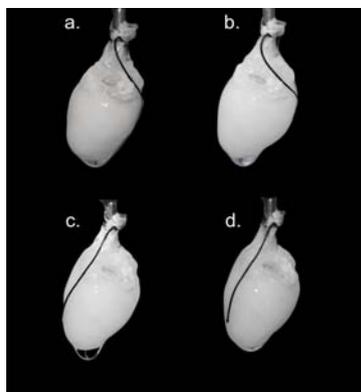


Figura A.18: Cuore 1 decellularizzato con protocollo TriCol.

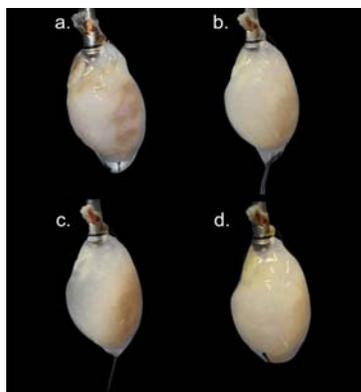


Figura A.19: Cuore 2 decellularizzato con protocollo TriCol..

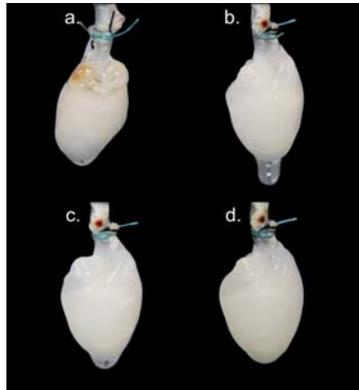


Figura A.20: Cuore 3 decellularizzato con protocollo TriCol..

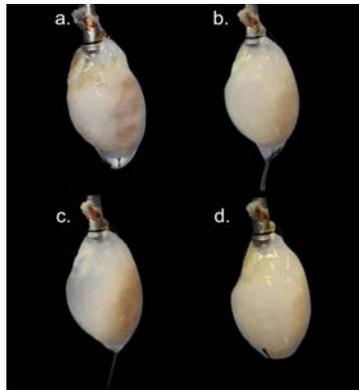


Figura A.21: Cuore 4 decellularizzato con protocollo TriCol..

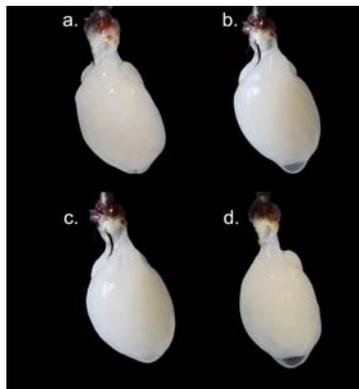


Figura A.22: Cuore 5 decellularizzato con protocollo TriCol..

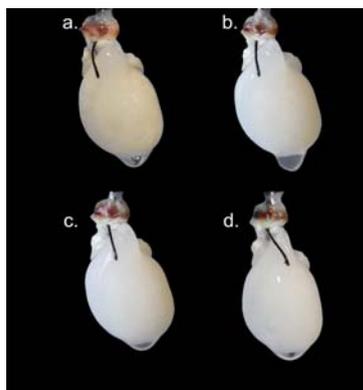


Figura A.23: Cuore 6 decellularizzato con protocollo TriCol..

A.3 Protocollo con SDS 0.5%

Le immagini riportano il cuore

- a. nativo
- b. dopo lavaggio con SDS 0.5%
- c. dopo lavaggio con Triton X-100

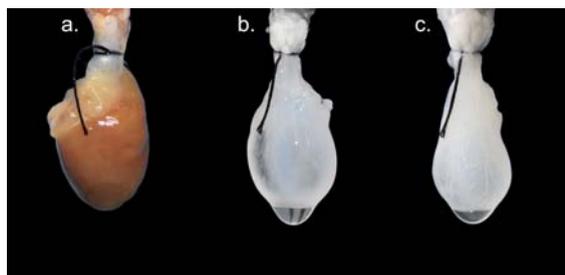


Figura A.24: Cuore 1 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

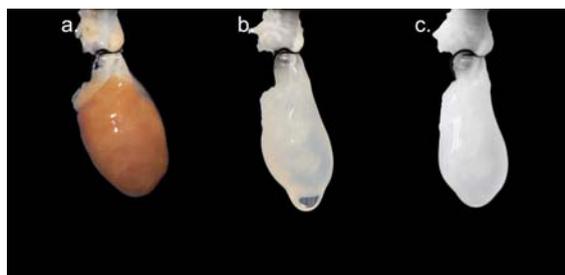


Figura A.25: Cuore 2 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

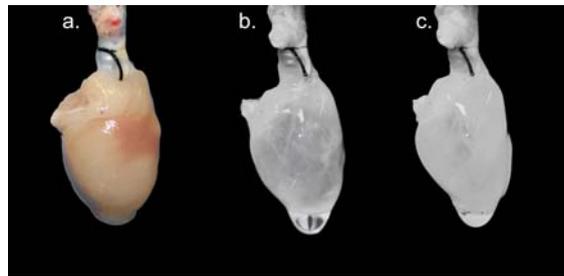


Figura A.26: Cuore 3 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

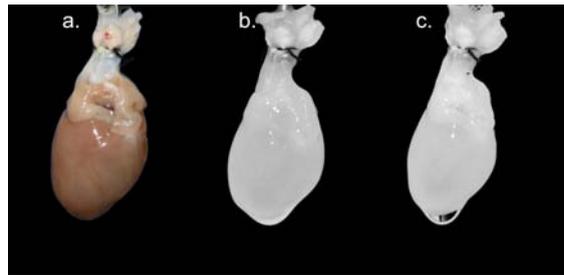


Figura A.27: Cuore 4 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

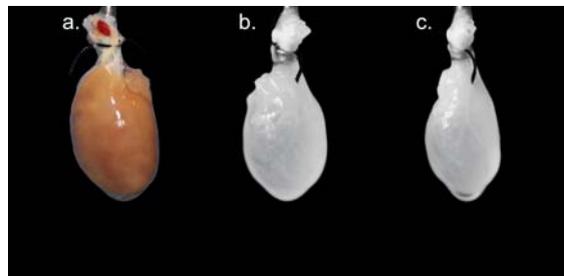


Figura A.28: Cuore 5 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

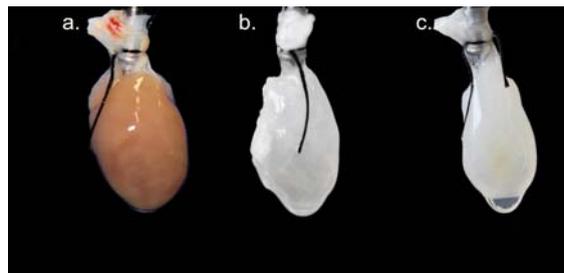


Figura A.29: Cuore 6 decellularizzato con protocollo SDS 0.5%.

Bibliografia

- [1] Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S.K., Black L. D., Kren S. M., Netoff T. I., and Taylor D. A. [Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart.](#) *Nature Medicine*, 14(2):213–221, February 2008.
- [2] Akhyari P., Aubin H., Gwanmesia P., Barth M., Hoffmann S., Huelsmann J., Preuss K., and Lichtenberg A. [The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities.](#) *Tissue Engineering Part C: Methods*, 7(9):915–26, September 2011.
- [3] Aubin H., Kranz A., Hülsmann J., Lichtenberg A., and Akhyari P. [Decellularized whole heart for bioartificial heart.](#) *Cellular Cardiomyoplasty Cellular Cardiomyoplasti: Methods in Molecular Biology*, 1036:163–178, June 2013.
- [4] Wainwright J.M., Czajka C.A., Patel U.B., Freytes D.O., Tobita K., Gilbert T.W., and Badylak S.F. [Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart.](#) *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(3):525–32, June 2010.
- [5] Weymann A., Loganathan S., Takahashi H., Schies C., Claus B., Hirschberg K., Soós P., Korkmaz S., Schmack B., Karck M., and Szabó G. [Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model—generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds.](#) *Circulation Journal*, 75(4):852–60, February 2011.
- [6] Remlinger N. T., Wearden P. D., and Gilbert T. W. [Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion.](#) *Jove*, 6(70), December 2012.

- [7] Merna N., Robertson C., La A., and George S. C. [Optical imaging predicts mechanical properties during decellularization of cardiac tissue.](#) *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10):802–9, October 2013.
- [8] Witzenburg C., Raghupathy R., Kren S. M., Taylor D. A., and Barocas V. H. [Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization.](#) *Journal of Biomechanics*, 45(5):842–9, March 2012.
- [9] Methe K., Bäckdahl H., Johansson B. R., Nayakawde N., Dellgren G., and Sumitran-Holgersson S. [An alternative approach to decellularize whole porcine heart.](#) *BioResearch Open Access*, 3(6):327–38, December 2014.
- [10] [American Heart Association.](#)
- [11] [Epicentro: il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica.](#)
- [12] Mozaffarian D., Benjamin E. J., and Go A. S. et al. [Heart disease and stroke statistics—2015 Update: a report from the american heart association.](#) *Circulation*, 131, 2015.
- [13] Taylor D. A. [From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs.](#) *Current opinion in biotechnology*, 20:598–605, 2009.
- [14] Badylak S. F., Taylor D., and Uygun K. [Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds.](#) *Annual Reviews of Biomedical Engineering*, 13:27–53, 2011.
- [15] He M. and Callanan A. [Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs.](#) *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(3):194–208, June 2013.
- [16] Atala A. [Engineering organs.](#) *Current opinion in biotechnology*, 20:575–592, 2009.
- [17] Song J. J. and Ott H. C. [Organ engineering based on decellularized matrix scaffold.](#) *Trends in molecular medicine*, 17(8):424–432, August 2011.
- [18] Hunt S. A., Baker D. W., Chin M. H., and Cinquegrani M. P. et al. [ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic](#)

-
- heart failure in the adult: executive summary. *Journal of the American College Cardiology*, 38(7):2101–2113, 2001.
- [19] Van Langen H., Van Driel V. J., Skotnicki S. H., and Verheugt F. W. Alterations in the peripheral circulation in patients with mild heart failure. *European Journal of Ultrasound*, 13(1):7–15, April 2001.
- [20] Newby D. E. Triggering of acute myocardial infarction: beyond vulnerable plaque. *Heart*, 96:1247–1251, 2010.
- [21] Elliott P., Andersson B., and Arbustini E. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, 29:270–276, January 2008.
- [22] Leslie T. and Cooper Jr. M. D. Myocarditis. *The new England Journal of Medicine*, 360:1526–1538, April 2009.
- [23] Vahanian A., Baumgartner H., and Bax J. et al. Guidelines on the management of valvular heart disease. *Revista española de cardiología*, 60(6), 2007.
- [24] Perloff J. K. Marelli A. *Perloff's Clinical Recognition of Congenital Heart Disease*. Elsevier, 6th edition, 2012.
- [25] Kannel W. B. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study. *American Journal of Hypertension*, 13(1):S3–S10, January 2000.
- [26] Bojar R. M. *Manual of perioperative care in adult cardiac surgery*. Wiley, 5th edition, 2010.
- [27] Gardner T. and Spay T. L. *Operative cardiac surgery*. Rob and Smith Series, 5th edition, 2004.
- [28] Arenas-Herrera J. E., Ko I. K., Atala A., and Yoo J.J. Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomedical Materials*, 8(1), January 2013.
- [29] Gálvez-Montón C., Prat-Vidal C., Roura S., Soler-Botija C., and Bayes-Genis A. Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart. *Revista española de cardiología*, 66(5):391–399, May 2013.
-

- [30] Iyer R. K., Chiu L. L. Y., Reis L. A., and Radisic M. [Engineered cardiac tissues](#). *Current opinion in biotechnology*, 22(5):706–714, 2011.
- [31] Faulk D. M., Johnson S. A., Zhang L., and Badilak S. F. [Role of the extracellular matrix in whole organ engineering](#). *Journal of cellular physiology*, 229(8):984–989, August 2013.
- [32] Cattaneo L. [Compendio di anatomia umana](#). Monduzzi, 2nd edition, 1986.
- [33] Anastasi G., Capitani S., Carnazza M. L., Cinti S., De Caro R., Donato R. F., Ferrario V. F., Fonzi L., Franzi A. T., Gaudio E., Geremia R., Lanza G. G., Grossi C. E., Gulisano M., Manzoli F. A., Mazzotti G., Michetti F., Miscia S., Mitolo V., Montella A., Orlandini G., Paparelli A., Renda T., Ribatti D., A. Ruggeri Sirigu, P., Soscia A., Tredici G., Vitale M., Zaccheo D., Zauli G., and Zecchi S. [Trattato di anatomia umana](#), volume I. Edi-Ermes, 4th edition, 2006.
- [34] Standring S. [Grey’s anatomy](#). Elsevier, 39th edition, 2004.
- [35] Martini F. H., Timmons M. J., and Tallitsch R. B. [Human anatomy](#). Pearson Education, 7th edition, 2011.
- [36] F. H. Netter. [Atlas of human anatomy](#). Elsevier, 4th edition, 2006.
- [37] R. Putz and R. Pabst. [Sobotta: atlas of human anatomy](#), volume II. Elsevier, 14th edition, 1982.
- [38] [Encyclopedia Britannica](#).
- [39] Guyton A. C. and Hall J. E. [Textbook of medical physiology](#). Elsevier, 12th edition, 2011.
- [40] Klabunde R. E. [Cardiovascular physiology concepts](#). Lippincott Williams and Wilkins, 2nd edition, 2012.
- [41] Cui D., Daley W., Fratkin J. D., Haines D. E., Lynch J. C., Naftel J. P., and Yang G. [Atlas of histology with functional and clinical correlations](#). Wolters Kluwer, 1st edition, July 2010.
- [42] Krstić R. V. [Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology](#). Springer-Verlag, 2nd edition, 1994.

- [43] Krstić R. V. *General histology of the mammal: an atlas for students of medicine and biology*. Springer-Verlag, 1st edition, 1985.
- [44] Kuehnel W. *Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy*. Thieme, 4th edition, May 2003.
- [45] Johnson K. E. *Histology and cell biology*. National Medical Series for Independent Study. Harwal Pub. Co., 2nd edition, January 1991.
- [46] Adamo S., Carinci P., Molinaro M., Siracusa G., Stefanini M., and Ziparo E. *Istologia di V. Monesi*. Piccin, 5th edition, 2009.
- [47] Ross M. H. and Pawlina W. *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. Wolters Kluwer, 6th edition, 2011.
- [48] Di Bello C. and Bagno A. *Interazioni tra biomateriali e tessuti*, volume 14, Collana di Ingegneria Biomedica. Pátron editore, 4th edition, 2012.
- [49] Humphrey J. D. *Cardiovascular solid mechanics: cells, tissue, and organs*. Springer-Verlag, 2002.
- [50] Gilbert T. W., Sellaro T. L., and Badylak S. F. [Decellularization of tissues and organs](#). *Biomaterials*, 27(19):3675–3683, 2006.
- [51] Baptista P. M., Orlando G., Mirmalek-Sani S. H., Siddiqui M., Atala A., and Soker S. [Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering](#). *Conference Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pages 6526–6529, 2009.
- [52] Crapo P. M., Gilbert T. W., and Badylak S.F. [An overview of tissue and whole organ decellularization processes](#). *Biomaterials*, 32(12):3233–43, April 2011.
- [53] Gilbert T. W. [Strategies for tissue and organ decellularization](#). *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(7):2217–2222, July 2012.
- [54] Di Tommaso A. *Fondamenti di scienza delle costruzioni*, volume I. Patron Editore, 3rd edition, 2013.
- [55] Fung Y. C. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. Springer, 2nd edition, 1993.

- [56] Fung Y. C. Structure and stress strain relationship of soft tissues. *American Zoologist*, 24:13–22, 1984.
- [57] Lemaitre J. *Handbook of materials behavior models*. Academic Press, 1st edition, 2001.
- [58] Ducheyne P., Healy K., Hutmacher D. E., Grainger D. W., and Kirkpatrick C. J. *Comprehensive biomaterials*, volume 5. Elsevier Science, 1st edition, 2011.
- [59] Waldman S. D. and Lee J. M. [Boundary conditions during biaxial testing of planar connective tissues. Part 1: dynamic behavior](#). *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 13:993–938, 2002.
- [60] Cowin S. C. and Humphrey J. D. *Cardiovascular soft tissue mechanics*. Kluwer Academic Publishers, 1st edition, 2000.
- [61] Glass L., Hunter P., and McCulloch A. *Theory of the heart: bio-mechanics, biophysics and nonlinear dynamics of cardiac function*. Springer-Verlag, 1st edition, 1991.
- [62] Hori M., Suga H., Baan J., and Yellin E. L. *Cardiac mechanics and function in the normal and diseased*. Springer-Verlag, 1st edition, 1989.
- [63] LeGrice I. J., Smaill B. H., Chai, Edgar S. G., Gavin J. B., and Hunter P. J. [Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog](#). *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 269(2):H571–H582, August 1995.
- [64] Schmid P., Niederer P., Lunkenheimer P.P., and Torrent-Guasp F. [The anisotropic structure of the human left and right ventricles](#). *Technology and Health Care*, 5:29–43, January 1997.
- [65] Lunkenheimer P. P., Redmann K., Scheld H., Dietl K. H., Cryer C., Richter K. D., Merker J., and Whimster W. [The heart muscle’s putative secondary structure’. Functional implications of a band-like anisotropy](#). *Technology and Health Care*, 5(1-2):53–64, April 1997.
- [66] Wang K., Ho S. Y., Gibson D. G., and Anderson R. H. [Architecture of atrial musculature in humans](#). *British Heart Journal*, 73(6):559–565, June 1995.

- [67] Greenbaum R. A., Ho S. Y., Gibson D. G., Becker A. E., and Anderson R. H. [Left ventricular fibre architecture in man](#). *British Heart Journal*, 45:248–263, 1981.
- [68] Mall F. P. [On the muscular architecture of the ventricles of the human heart](#). *American Journal of Anatomy*, 11(3):211–266, March 1911.
- [69] Bell R. M., Mocanu M. M., and Yellon D. M. [Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion](#). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), June 2011.
- [70] Skrzypiec-Springa M., Grotthusa B., Szeląga A., and Schulzb R. [Isolated heart perfusion according to Langendorff: still viable in the new millennium](#). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), April 2007.
- [71] Sutherland F. J. and Hearse D. J. [The isolated blood and perfusion fluid perfused heart](#). *Pharmacological Research*, 41(6):613–627, June 2000.
- [72] Sutherland F. J., Shattock M. J., Baker K. E., and Hearse D. J. [Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions](#). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(11), November 2003.
- [73] H. Ott and D. Taylor. [Decellularization and recellularization of organs and tissues](#). United States Patent Application Publication, August 2009.
- [74] Langendorff O. [Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen](#). *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 61(6):291–332, August 1895.
- [75] Spina M., Ortolani F., El Messlemani A., Gandaglia A., Bujan J., Garcia-Honduvilla N., Vesely I., Gerosa G., Casarotto D., Petrelli L., and Marchini M. [Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprosthesis: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features](#). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(4):1338–50, December 2003.
- [76] [Bose ElectroForce](#).

- [77] [MathWorks](#).
- [78] Christodoulakis G., Busawon K., Caplan N., and Stewart S. [On the filtering and smoothing of biomechanical data](#). *IEEE Xplore*, 2010.
- [79] Giakas G. and Baltzopoulos V. [A comparison of automatic filtering techniques applied to biomechanical walking data](#). *Journal of Biomechanics*, April 1997.
- [80] Guyette J. P., Gilpin S. E., Charest J. M., Tapias L. F., Ren X., and Ott H. C. [Perfusion decellularization of whole organs](#). *Nature Protocols*, 9(6):1451–68, May 2014.
- [81] Schechter M. A., Southerland K. W., Feger B. J., Linder Jr. D., Ali A. A., Njoroge L., Milano C. A., and Bowles D. E. [An isolated working heart system for large animal models](#). *Jove*, (88), 2014.
- [82] Hirt M. N., Hansen A., and Eschenhagen T. [Cardiac tissue engineering: state of the art](#). *Circulation Research*, 113:933–943, 2013.
- [83] Lee A. Y., Mahler N., Best C., Lee Y. U., and Breuer C. K. [Regenerative implants for cardiovascular tissue engineering](#). *Translational research*, 163(4):321–341, April 2014.
- [84] Moroni F. and Mirabella T. [Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering](#). *American journal of stem cells*, 3(1):1–20, March 2014.
- [85] Fu R. H., Wang Y. C., Liu S. P., Shih T. R., Lin H. L., Chen Y. M., Sung J. H., Lu C. H., Wei J. R., Wang Z. W., Huang S. J., Tsai C. H., Shyu W. C., and Lin S. Z. [Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering](#). *Cell transplantation*, 23(4-5):621–630, April 2014.
- [86] Chiu L. L. Y. and Radisic M. [Cardiac tissue engineering](#). *Current opinion in chemical engineering*, 2(1):41–52, February 2013.
- [87] Murphy S. V. and Atala A. [Organ engineering: combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation](#). *Bioessays*, 35(3):163–172, September 2012.

- [88] Badilak S. F. [The extracellular matrix as scaffold for tissue reconstruction](#). *Cell and developmental biology*, 13:377–383, 2002.
- [89] Koeppen B. M. and Stanton B. A. *Berne and Levy: physiology*. Elsevier, 6th edition, 2008.
- [90] Pappano A. J. and Wier W. G. *The Mosby physiology monograph series: Cardiovascular physiology*. Elsevier, 10th edition, 2013.

Elenco degli acronimi

SMA actina muscolare liscia

BDM 2,3-Butanedione monoxime

BSA sieroalbumina bovina

cECM matrice extracellulare cardiaca

DAPI 4',6-diamidin-2-fenilindolo

DMSO dimetilsulfossido

ECM extracellular matrix, matrice extracellulare

EDTA acido etilendiamminotetraacetico

GAG glicosaminoglicani

IpA inibitore di proteasi d tipo A

IpB inibitore di proteasi d tipo B

LVC ventricolo sinistro in direzione circonferenziale

LVL ventricolo sinistro in direzione longitudinale

MATLAB Matrix Laboratory

NEM N-etilmaleimida

ON Overnight

PBS Buffer fosfato salino

PEG glicole polietilenico

PFA paraformaldeide

PMSF fenilmetilsulfonil fluoride

SDS Sodio dodecilsolfato

RVC ventricolo destro in direzione circonferenziale

RVL ventricolo destro in direzione longitudinale

TmA Tampone madre "A"

RT Temperatura ambiente

UTS ultimate tensile strength