



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN :
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO:
ENDOCRINOLOGIA COMPARATA

CICLO:
XXII

Applicazione di tecniche di reverse engineering per la visualizzazione e
prototipazione di strutture anatomiche nel ratto e nell'uomo.

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier. Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Lorenzo Colombo

Supervisore :Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottorando : Ing. Michele Parnigotto

Indice

I Abbreviazioni

II Riassunto

1 Scopo della tesi

2 Tecniche di ricostruzione

2.1 Applicazioni biomediche del *reverse engineering*

2.2 la TAC

2.3 la risonanza magnetica

3 Applicazioni

3.1 Ghiandole Salivari

3.2 Studio della degenerazione del piede diabetico

3.2.1 Il tessuto adiposo

3.2.1.1 Citologia ed istologia

3.2.1.2 Istogenesi

3.2.1.2.1 Controllo endocrino dell'adipogenesi

3.2.1.3 Distribuzione anatomica

3.2.1.4 Fisiologia e funzioni

3.2.1.4.1 Controllo del metabolismo lipidico nel tessuto adiposo

3.2.1.4.2 Funzioni meccaniche del tessuto adiposo

3.2.2 Anatomia e funzione del *fat pad*

3.2.3 Proprietà meccaniche

3.2.3.1 Moduli di Young

3.2.3.2 Dissipazione Energetica

3.2.3.3 Isterisi del ciclo di carico

3.2.3.4 Inomogeneità

3.2.4 Tecniche usate per lo studio del *fat pad*

3.2.4.1 Test *in vivo*

3.2.4.2 Test *in vitro*

3.2.5 Il paradosso del *fat pad*

3.2.6 Il diabete mellito

3.2.7 Patologie correlate al diabete mellito

3.2.7.1 La Microangiopatia

3.2.7.2 La Neuropatia diabetica

3.2.7.3 La Macroangiopatia

3.2.8 Il piede diabetico

3.2.8.1 La definizione di piede diabetico

3.2.8.2 Il piede neuropatico

3.2.8.3 Il piede di Charcot

3.2.8.4 Il piede ischemico o vasculopatico

4 Materiali e metodi

4.1 Istologia in vivo

- 4.1.1 Analisi in risonanza magnetica
- 4.1.2 Preparazione dei prodotti chimici
- 4.1.3 Analisi Virtuale: Segmentazione
- 4.1.4 Conversione dei dati
- 4.1.5 *Mesh Smoothing*
- 4.1.6 Stampa Stereolitografica

4.2 Analisi del *fat pad*

- 4.2.1 Analisi in TAC multislice a spirale
- 4.2.2 Analisi Virtuale: Segmentazione
- 4.2.3 Misurazioni
- 4.2.4 L'analisi TAC del piede diabetico
- 4.2.5 la degenerazione del *fat pad*

5 Risultati e discussione

5.1 Risonanza magnetica con traccianti: l'idea dell'istologia in vivo

- 5.1.1 Anatomia
- 5.1.2 Descrizione anatomica microscopica
- 5.1.3 Anatomia alla RMN

5.2 Analisi del *fat pad*

- 5.2.1 Confronto tra *fat pad* soggetto sano Vs diabetico

5.3 Discussione

Bibliografia

I Abbreviazioni

“TAC”	tomografia assiale computerizzata
“RMN”	risonanza magnetica nucleare
“SSC”	<i>Submandiboular sublingual complex</i>
“SMC”	<i>Submandiboular complex</i>
“SLC”	<i>Sublingual complex</i>
“ <i>fat pad</i> ”	Cuscinetto di grasso calcaneare
“T1W1”	Acquisizione in risonanza T1 pesata
“RE”	<i>Reverse Engineering</i>

1 Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è utilizzare le tecniche del *reverse engineering* per lo studio di tessuti ed organi profondi. Verranno riportati due studi eseguiti durante il corso di dottorato: lo studio nel ratto delle ghiandole salivari tramite risonanza magnetica e lo studio nell'uomo del *fat pad* calcaneare tramite tomografia assiale computerizzata. Lo scopo della tesi è altresì permettere l'analisi di questi particolari anatomici usando tecniche attuali, ma non solitamente usate nella normale pratica di laboratorio.

2 Tecniche di ricostruzione

2.1 Applicazioni biomediche del *reverse engineering* (RE)

Il RE è il processo che mira a capire e ad analizzare i principi tecnologici alla base di un dispositivo fisico e si basa sullo studio delle sue strutture, delle sue funzioni e del modo in cui funziona. Spesso si tratta di prendere un oggetto (sia esso un dispositivo meccanico, un software, un componente elettronico) disassemblarlo ed analizzarne in dettaglio la costruzione ed il funzionamento al fine di poter costruire un nuovo dispositivo o programma che assolva alla stessa funzione senza copiare o duplicare pari pari l'oggetto originale. Man mano che il *computer aided design* (CAD) si è diffuso, il RE è diventato il metodo usuale per creare modelli 3D virtuali di oggetti fisici descritti tramite 3D CAD, CAM, CAE, ed altri software. Il RE riguarda anche la costruzione di un modello 3D virtuale a partire dalle dimensioni di un oggetto fisico reale. L'oggetto reale può essere misurato ed acquisito usando metodi di scansione 3D come CMMs, scanner laser, digitalizzatori a luce strutturata o tomografia computerizzata. I dati originali sono di solito rappresentati da nuvole di punti e mancano di informazioni topologiche. Necessitano quindi di una strutturazione in un formato più usabile, per esempio superfici formate da triangoli, gruppi di superfici normali o un modello CAD. Il modello CAD, in particolare, è usato per processare la nuvola di punti in formati utilizzabili anche da altre applicazioni come CAD 3D, CAM, CAE, o visualizzatori. In medicina le applicazioni del RE stanno rapidamente crescendo, in particolare in ortopedia ed in medicina rigenerativa. Il RE e la prototipizzazione rapida sono stati usati per produrre nuovi dispositivi ortopedici. In questi campi l'approccio del RE è principalmente basato sulla possibilità attuale di acquisire dati in maniera non invasiva e di usarli successivamente per modellare biomateriali e generare bioprotesi.

2.2 la TAC



TAC 64 Slice General Electric

In radiologia la tomografia computerizzata, indicata con l'acronimo TC o CT (dall'inglese computed tomography), è una metodica diagnostica per immagini che sfrutta radiazioni ionizzanti (raggi X) e consente di riprodurre sezioni (tomografia) corporee del paziente ed elaborazioni tridimensionali. Per la produzione delle immagini è necessario l'intervento di un elaboratore di dati (da cui computerizzata).

È nota anche come tomografia assiale computerizzata o TAC (in inglese CAT da computed axial tomography). Nelle TAC l'acquisizione avviene in sequenza: il lettino si sposta, si ferma, avviene l'acquisizione di un numero di strati corrispondenti al numero di barrette di sensori e così via. Nelle TAC di nuova generazione oltre a questa possibilità esiste un'acquisizione detta a spirale, dove il lettino è in continuo movimento. Con la tecnica a spirale vengono acquisiti dei volumi, ai quali corrispondono dei Voxel.

Storia della TAC

Negli anni trenta il radiologo italiano Alessandro Vallebona propose una metodica per rappresentare un solo strato del corpo sulla pellicola radiografica: questo esame porta il nome di stratigrafia.

Sfruttando principi di geometria proiettiva, con la pendolazione del tubo radiogeno, tutti i piani al di sopra e al di sotto dello strato di interesse vengono eliminati.

La stratigrafia ha rappresentato fino alla metà degli anni ottanta uno dei pilastri della diagnostica radiologica, ma grazie all'avvento del calcolatore è stata progressivamente soppiantata.

La metodica circolare alla base della TC fu ideata e realizzata dall'ingegnere inglese Godfrey Hounsfield e dal fisico sudafricano Allan Cormack, che per le loro scoperte vinsero il premio Nobel per la medicina nel 1979. Il primo tomografo computerizzato consentiva esclusivamente lo studio delle strutture del cranio e fu installato all'Atkinson Morley Hospital di Londra nel 1971. Nel 1974 furono create le prime apparecchiature per lo studio del torace e dell'addome.

Fino ai primi anni settanta la TAC era un'indagine diagnostica impiegata esclusivamente per la ricerca e lo studio delle sole patologie cerebrali. Era opinione comune e fortemente radicata che l'innovativa tecnica non potesse in alcun modo travalicare questo specifico ambito. Fu un radiologo americano di origine italiana, il professor Ralph Alfidi, ad avere l'intuizione che tale metodica diagnostica potesse essere estesa all'intero corpo umano.

Alfidi, allora direttore dell'Istituto di Radiologia dell'Università di Cleveland, già noto per i suoi studi sull'angiografia, era convinto che il principio della tomografia computerizzata fosse destinato ad avere una ben più ampia utilizzazione. Circondato da un'atmosfera di scetticismo, Alfidi, con l'appoggio di Hounsfield, inizialmente titubante ma via via sempre più convinto della validità di questa idea, iniziò un lungo periodo di ricerche. Gli esperimenti vennero attuati utilizzando macchinari appositamente realizzati nel 1972 dalla Technicare e culminarono nel 1975 con l'effettuazione della prima TAC "ufficiale" dell'addome. Allo storico evento erano presenti pochi colleghi, fra i quali l'italiano Giovanni Simonetti che in passato era stato suo allievo ed attualmente è direttore dell'Istituto di Radiologia dell'Università di Tor Vergata di Roma.

L'immagine del corpo da studiare viene creata misurando l'attenuazione di un fascio di raggi X che attraversa tale corpo. Questa varia in modo proporzionale alla densità elettronica dei tessuti attraversati, cioè alla distribuzione spaziale degli elettroni nello strato corporeo in esame. Poiché le immagini prodotte sono di tipo digitale, il corpo studiato viene suddiviso in una serie discreta

di elementi di volume (voxel), ai quali corrisponde un elemento unico d'immagine (pixel), seguente la scala dei grigi. Quanto più piccolo è il volume rappresentato da un singolo pixel tanto maggiore è la risoluzione spaziale. L'attenuazione è direttamente proporzionale alla densità elettronica dei tessuti presenti nel voxel: il suo valore è detto "densitometrico". Un voxel con alta densità viene rappresentato con una gradazione di grigio più chiara. L'unità di misura della densità elettronica è l'UH (unità di Hounsfield), la cui scala comprende 2001 diverse tonalità di grigio, dal nero al bianco. La densità dell'aria assume un valore di -1000 UH, l'acqua vale 0 HU e l'osso compatto vale +1000. Le dimensioni di una singola immagine sono normalmente di 512×512 pixel, per una profondità di 8 bit/pixel. La metodica TC consente risultati migliori della radiologia tradizionale, per quanto riguarda la differenziazione dei tessuti molli. La dose di radiazioni ionizzanti fornita al paziente è molto più elevata rispetto ad una radiografia tradizionale, tanto più nel caso dei tomografi multistrato, pertanto si dovrebbe ragionevolmente ricorrere alla TC solo se strettamente necessario, soprattutto se i tessuti irradiati sono in accrescimento (per es. nei bambini). Lo studio TC può essere migliorato dall'infusione di mezzo di contrasto endovenoso organo-iodato che consente una migliore differenziazione di strutture con densità simile, o della stessa struttura in tempi diversi, programmabili attraverso un iniettore a flusso variabile.

Come funziona la TAC

L'emettitore del fascio di raggi X ruota attorno al paziente ed il rivelatore, al lato opposto, raccoglie l'immagine di una sezione del paziente; il lettino scorre in modo molto preciso e determinabile all'interno di un tunnel di scansione, presentando a ogni giro una sezione diversa del corpo. Le sequenze di immagini, assieme alle informazioni dell'angolo di ripresa, sono elaborate da un computer, che presenta il risultato sul monitor. Tale risultato è costituito da una serie di sezioni, non necessariamente contigue, di spessore preimpostato. L'insieme delle sezioni calcolate costituisce il dato inerente il volume di scansione che può essere ricostruito tramite un software di rendering tridimensionale in grado di produrre immagini tomografiche di qualsiasi piano spaziale (frontale, sagittale, assiale) o, in alternativa, di ottenere immagini tridimensionali o endoscopiche. Per ottenere le immagini tomografiche del paziente, a partire dai dati "grezzi" (RAW Data) della scansione, il computer dedicato alla ricostruzione impiega complessi algoritmi matematici di ricostruzione dell'immagine. I processi più importanti per ottenere le immagini dai dati grezzi sono la convoluzione e la retroproiezione (backprojection) (trasformata di Radon). Le immagini di partenza di tutte le sezioni vengono normalmente registrate su un sistema di archiviazione (PACS) e le sezioni più importanti vengono talvolta stampate su pellicola. Il

rivelatore ad alta efficienza è normalmente costituito da cesio ioduro, calcio fluoruro o cadmio tungstato.

Il tomografo di I generazione si basava sull'emissione di un fascio lineare di raggi X da un tubo radiogeno in movimento di traslazione e di rotazione e rilevato da un rivelatore solidale nel movimento. Il tempo di esecuzione dello studio era dell'ordine dei minuti.

Nel tomografo di II generazione il fascio di raggi X ha una geometria a ventaglio di 20-30° connesso con un gruppo di 20-30 detettori: il tempo di esecuzione era ridotto a decine di secondi.

I tomografi di III generazione impiegano un fascio di raggi X a ventaglio di 30-50° che possono comprendere tutta la sezione corporea in esame, attraverso centinaia di detettori contrapposti, che compiono una rotazione completa attorno al paziente in 1-4 secondi. Nei primi modelli, ad una rotazione ne seguiva un'altra nel senso inverso, in modo che i cavi di alimentazione ritornassero nella posizione di partenza, senza attorcigliarsi. Tale metodica obbligava all'acquisizione di un solo strato per volta.

I tomografi di IV generazione presentavano sensori fissi e sono stati abbandonati. I tomografi moderni derivano da quelli di terza generazione ma hanno una caratteristica fondamentale, quella di acquisire a spirale: nei tomografi a rotazione continua unidirezionale infatti il tubo radiogeno e i detettori sono montati su un anello rotante che si alimenta a "contatti striscianti", senza più il problema dei cavi che si attorcigliano. Questa metodica consente l'acquisizione delle immagini in modo continuo: mentre il tavolo che porta il paziente si muove su un piano di scorrimento, i piani di scansione descrivono un'elica attorno al paziente, ottenendo una scansione a "spirale". I tomografi spiroidei più comuni compiono una rotazione in più o meno un secondo e consentono un'acquisizione completa di un volume corporeo in 40 secondi - un minuto: questa avviene in un'unica apnea, riducendo gli artefatti dovuti al movimento del paziente. I moderni tomografi multistrato possono impiegare anche solo pochi secondi, ottenendo decine di scansioni per ogni singola rotazione. Tomografi superveloci possono consentire lo studio del cuore. Recentemente è stata ideata anche una tecnica che consente l'esecuzione di una vera e propria colonscopia virtuale. Sempre recentemente si assiste alla comparsa di TC con doppio tubo radiogeno, dette "dual energy". Queste TC dispongono per l'appunto di due tubi radiogeni che funzionano a differenti energie, in questo modo, a causa della differente attenuazione dei tessuti sulle radiazioni a energia differente si riesce ad avere una risoluzione di contrasto migliore.

2.2 La Risonanza magnetica



RMN General Electric

Il principio di funzionamento si basa sul sottoporre il paziente ad un forte campo magnetico statico. L'intensità del campo magnetico può variare dai decimi di tesla (T), per piccole macchine dedicate allo studio delle articolazioni, a 3 T per le macchine attualmente in commercio per scopi diagnostici. Alcune macchine per la risonanza magnetica funzionale attualmente in commercio raggiungono campi di 7 T, mentre nell'ambito sperimentale sono in sviluppo dispositivi da 8 e 9 T.

Nel campo magnetico statico, gli spin dei protoni all'interno dei tessuti tendono ad allinearsi alle linee di forza (in modo parallelo o antiparallelo); poiché gli spin allineati in senso parallelo sono in numero superiore, i tessuti vengono a possedere una leggera magnetizzazione totale. Questo allineamento non è mai completo, ma piuttosto gli spin dei vari protoni incominciano a mostrare una precessione attorno alla direzione del campo magnetico.

Questa precessione mostra una frequenza tipica detta frequenza di Larmor che si trova nell'ordine dei MHz e quindi nel campo delle radiofrequenze (con un campo di 1 T, la frequenza per l'atomo di idrogeno è di 42 MHz); se allora sul paziente viene applicato un campo magnetico rotante a questa esatta frequenza e di energia sufficiente, è possibile ruotare la magnetizzazione dei protoni di un angolo arbitrario (detto flip angle) che dipende dal tipo di immagini che si desidera ottenere.

Il fornire questa energia alla stessa frequenza di precessione è il fenomeno che dà il nome "risonanza" al metodo; si tratta dello stesso principio per cui fornendo la spinta al momento

giusto, si può aumentare l'ampiezza delle oscillazioni di un'altalena, seppur applicato a livello atomico.

Dopo l'impulso, man mano gli spin dei protoni tenderanno a tornare al loro stato iniziale di allineamento lungo il campo (fenomeno di rilassamento); tramite una bobina ricevente viene misurato l'andamento della magnetizzazione nel piano perpendicolare al campo magnetico principale (Free Induction Decay, o FID). Tale rilassamento avviene con due costanti di tempo distinte: la prima, indicata con T_1 , indica la rapidità con cui si ricostruisce la magnetizzazione diretta lungo la direzione del campo principale ($T_1\rho_1$), e dipende dall'interazione tra i protoni e le molecole circostanti (rilassamento spin-reticolo), la seconda, indicata con T_2 , indica la rapidità con cui si distrugge la componente di magnetizzazione trasversale in condizioni ideali, e dipende dall'interazione mutua di protoni vicini (rilassamento spin-spin). In situazioni reali, la componente trasversa viene distrutta a causa della perdita di coerenza di fase tra i vari protoni del campione osservato, con un tempo chiamato $T_2^* < T_2$. Essendo espressione di proprietà fisiche diverse, queste costanti sono in generale indipendenti l'una dall'altra, e funzioni dell'intensità del campo magnetico.

In teoria, sarebbe possibile effettuare misurazioni rilevando il segnale emesso da una grande varietà di nuclei atomici, come ad esempio il sodio, il fosforo, il carbonio e l'idrogeno, impostando la frequenza di risonanza delle bobine a radiofrequenza al valore appropriato. Tuttavia in campo diagnostico viene attualmente usato quasi esclusivamente l'idrogeno come fonte di segnale.

Come funziona la RMN

Uno scanner commerciale è principalmente formato da elementi che creano campi magnetici statici oppure variabili nel tempo e nello spazio, coordinati da una complessa elettronica di controllo. Tali elementi sono:

1. Il magnete principale, la cui funzione è creare un campo magnetico statico e omogeneo di elevata intensità per permettere la polarizzazione dei nuclei.
2. Le bobine a radiofrequenza, che generano il campo magnetico rotante alla frequenza di Larmor.
3. Le bobine di gradiente, che generano campi magnetici che variano linearmente nello spazio, indispensabili alla generazione di immagini.

4. Varie bobine ausiliarie, che servono a compensare le eventuali disomogeneità o per modificare in altro modo le geometrie dei campi principali.

Magnete principale

Il magnete principale è il componente più grande e costoso dello scanner, e tutto il resto dello scanner può essere considerato ausiliario ad esso. La sua funzione è quella di creare un campo magnetico costante nello spazio e nel tempo. La specifica più importante di un magnete per l'imaging a risonanza magnetica è l'intensità del campo prodotto. Campi magnetici di maggiore intensità aumentano il rapporto segnale rumore (SNR) dell'immagine, permettendo risoluzioni più alte o scansioni più rapide. Tuttavia, intensità più alte richiedono magneti più costosi e con costi di manutenzione più elevati, oltre ad avere bisogno di misure di sicurezza più accurate. Al momento (2007), campi magnetici di 1,5 T sono considerati un buon compromesso tra costo e prestazioni per l'uso clinico generale. Sta comunque iniziando l'introduzione di campi magnetici a 3T soprattutto per applicazioni di risonanza magnetica funzionale cerebrale o per l'imaging cardiaco. Alcuni studi sono in corso per ciò che riguarda l'imaging sull'uomo con campi magnetici a 7T ed è attualmente in costruzione uno scanner whole-body (cioè in grado di effettuare l'imaging di ogni distretto corporeo) a 11,7 T (Progetto Neurospin[2], Francia). Per esperimenti su cavie e piccoli animali sono attualmente usati campi magnetici fino a 17 T.

Un parametro altrettanto importante per valutare la qualità di un magnete è la sua omogeneità: le fluttuazioni nell'intensità del campo all'interno della regione osservata dovrebbero essere inferiori allo 0,001%.

Tre tipologie di magneti sono usate:

- **Magnete permanente.** Magneti convenzionali fatti di materiali ferromagnetici (ad esempio acciaio) possono essere usati per ottenere il campo principale. Magneti di questo tipo sono estremamente ingombranti (con un peso che può superare le 100 tonnellate), ma una volta installati necessitano di pochi costi di manutenzione. I magneti permanenti possono raggiungere solo intensità di campo limitate (normalmente inferiori a 0,4 T) ed hanno stabilità nel tempo ed omogeneità non eccellenti. Pongono inoltre problemi di sicurezza, in quanto il campo magnetico non può essere mai disattivato.
- **Elettromagnete resistivo.** Si tratta di un solenoide di cavo di rame. I vantaggi di questo tipo di magnete sono il basso costo, ma l'intensità di campo è limitata e la stabilità scarsa. L'elettromagnete richiede una corrente elettrica notevole per mantenere attivo il campo, il

che lo rende costoso da utilizzare. Questa soluzione è in generale obsoleta.

- Elettromagnete a superconduttore. Quando una lega di niobio-titanio è raffreddata da elio liquido a 4 K, essa diventa superconduttiva, cioè riduce la propria resistenza elettrica a zero. Costruendo un elettromagnete con cavo superconduttivo, è possibile ottenere intensità di campo molto alte con ottime caratteristiche di stabilità. La costruzione di un tale magnete è estremamente costosa, e l'elio per il raffreddamento è costoso e molto difficile da maneggiare. Tuttavia, nonostante il costo, magneti a superconduttore raffreddati ad elio sono i più comunemente usati negli scanner moderni. Nonostante l'isolamento termico, il calore presente nell'ambiente attorno allo scanner causa una lenta ebollizione ed evaporazione dell'elio liquido. Di conseguenza è necessario rabboccare regolarmente l'elio. Per questo motivo, un criostato può essere usato per ricondensare l'elio che evapora. Sono anche attualmente disponibili scanner privi di raffreddamento ad elio, in cui il cavo del magnete è direttamente raffreddato dal criostato.

I magneti principali sono disponibili in diverse forme. I magneti permanenti sono più frequentemente fatti a forma di ferro di cavallo, mentre quelli a superconduttore sono in genere toroidali. Tuttavia, magneti a superconduttore a ferro di cavallo e magneti permanenti quadrati sono a volte usati.

Bobine di gradiente

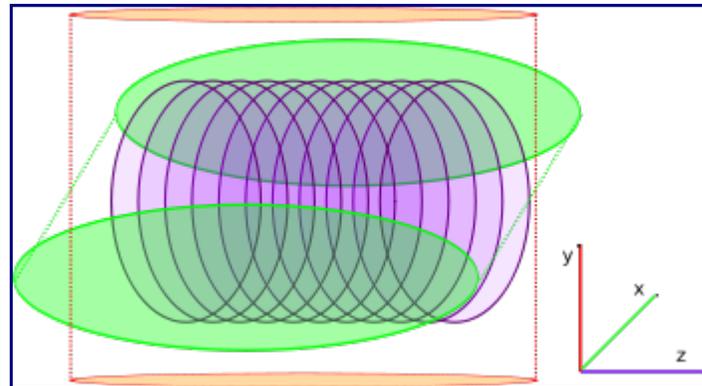
Componente fondamentale di uno scanner per l'imaging sono le bobine di gradiente, avvolgimenti in cui la corrente che vi scorre è modulata a seconda delle direttive della sequenza di eccitazione, e che hanno lo scopo di modificare l'intensità del campo magnetico lungo i tre assi spaziali. La loro caratteristica principale è la generazione di campi magnetici che variano linearmente di intensità lungo una direzione, e sono uniformi rispetto alle altre due.

Ad esempio, attivando solo la bobina di gradiente lungo l'asse Z (convenzionalmente la direzione in cui è orientato il campo magnetico principale), si avrà all'interno del magnete un campo uniforme in ogni piano XY, mentre nella direzione Z varierà secondo la formula $B_0 + Gz$, dove B_0 è l'intensità iniziale del campo magnetico, e Gz è l'intensità del gradiente, misurata in T/m. Valori tipici per i sistemi di gradienti degli scanner attualmente in commercio vanno da 20 mT/m fino a 100 mT/m. In pratica considerando uno scanner che abbia una zona utile per l'imaging (field of view) lunga 50cm, ed una intensità di campo di 1,5 T, quando una bobina di gradiente

da 20mT/m è attiva alla massima intensità, si avranno 1,495 T ad una estremità e 1,505 T all'altra.

L'effetto delle bobine di gradiente è quello di modificare la frequenza di risonanza dei nuclei in maniera dipendente dalla posizione spaziale. Questo concetto è alla base della generazione di immagini.

Geometria delle bobine di gradiente



Geometria delle bobine di gradiente

Rappresentazione schematica della geometria delle bobine di gradiente in uno scanner toroidale. In viola, la bobina agente lungo l'asse Z, in verde e arancio le bobine agenti lungo gli assi X e Y

La maggior parte degli scanner attualmente in commercio hanno un magnete a superconduttore di forma toroidale. Per questo motivo le bobine di gradiente hanno geometrie diverse a seconda della direzione spaziale in cui sono attive (vedi figura), così da poter essere integrate nella struttura dello scanner. A causa della diversa forma geometrica, le prestazioni delle bobine non sono uguali. In generale la bobina diretta lungo l'asse Z produce un campo magnetico più omogeneo e lineare, in quanto è solenoideale e le equazioni che regolano il campo in queste condizioni sono di soluzione relativamente semplice.

Tuttavia, a causa delle proprietà fisiche del campo magnetico, è impossibile ottenere un campo perfettamente lineare ed orientato in una unica direzione. In particolare, la terza equazione di Maxwell:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0$$

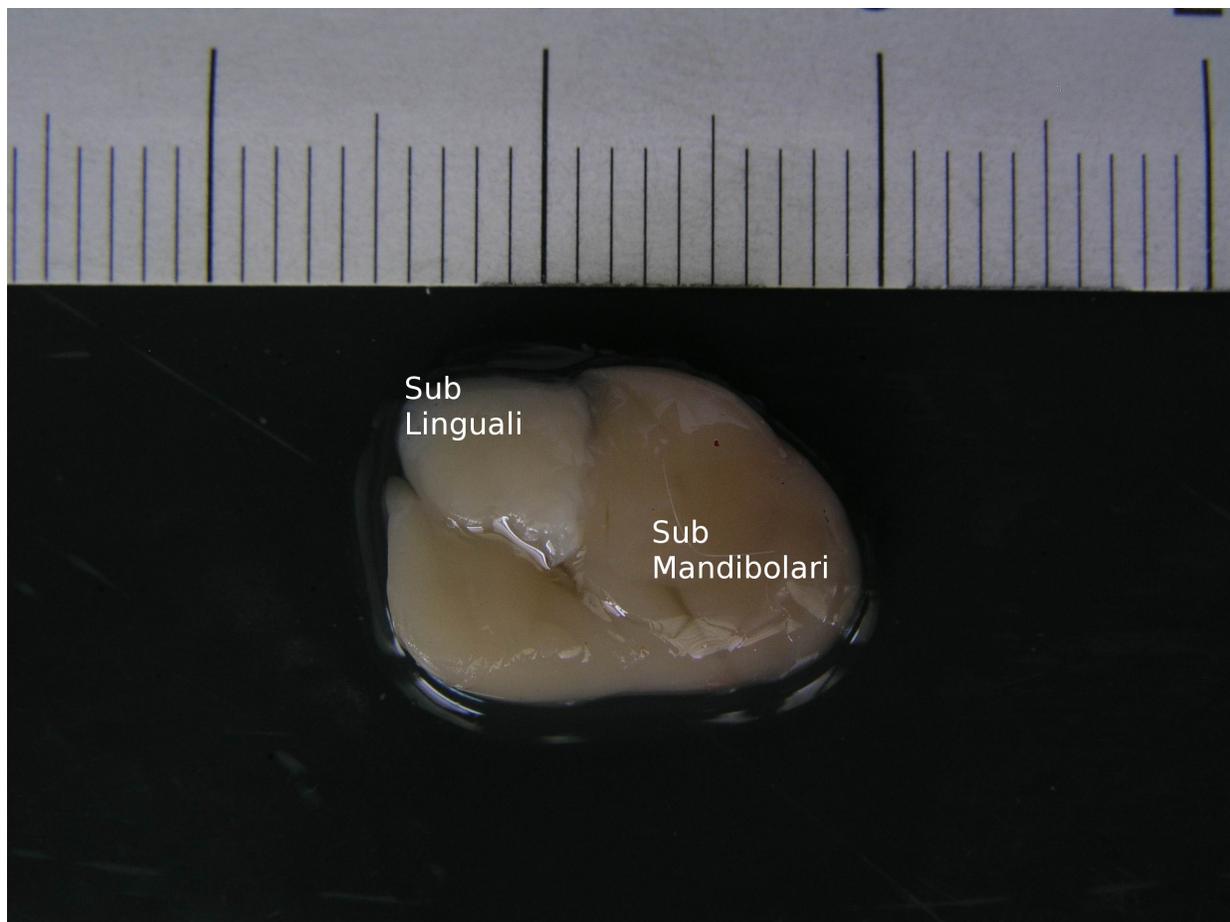
nega la possibilità di creare un campo variabile linearmente nello spazio senza che si formino

campi varianti in modo diverso orientati nelle altre direzioni spaziali (detti campi concomitanti o campi di Maxwell). Per questo motivo, le bobine di gradiente, per quanto ben progettate, non possono mantenere una qualità uniforme in tutto lo spazio disponibile per l'imaging, e nella pratica sono necessari alcuni interventi di correzione dell'immagine finale che tengano conto della non idealità del campo. In particolare, i campi concomitanti aumentano di intensità in maniera proporzionale al quadrato della distanza dal centro del magnete, e sono soprattutto visibili nelle immagini di fase.

3.1 Ghiandole Salivari

Le ghiandole salivari giocano un ruolo essenziale nel mantenere la integrità della mucosa dell'apparato digerente (Llena Puy, 2006). Nella cavità orofaringea, la saliva è essenziale per preparare il cibo alla deglutizione operando una funzione di lubrificazione e pulizia. Ha una funzione antimicrobica, capacità tamponante, ed ha un ruolo nella determinazione del gusto. A parte le sue azioni nella cavità orofaringea, la saliva è importante nella fonazione e nella digestione. Variazioni nel flusso della salivazione possono essere affette, in modo reversibile o irreversibile, da numerosi fattori fisiologici o patologici.

Il fenomeno secretorio è un meccanismo complesso di controllo in larga parte stimolato da input esterni. La saliva è prodotta da varie ghiandole, ognuna di esse con un ruolo specifico, quindi è una miscelanza di prodotti di strutture esocrine differenti in istologia e funzione.



Fotografia del complesso SSC, (ghiandola sublinguale e submandibolare)

Nel ratto e nel topo, le ghiandole sottomandibolari e sottolinguali formano una singola struttura

correntemente chiamata complesso sottomandibolare-sottolinguale locato nella regione cervicale ventrale (Jacoby and Leeson, 1959; Brocco and Tamarine, 1979; Hebel and Stromberg, 1986; Lorber, 1991).

Sarebbe molto utile possedere una procedura di imaging capace di studiare l'attivazione funzionale in un contesto di localizzazione spaziale (il contrasto con manganese si distribuisce solo in determinati tessuti). Negli studi clinici, le tecniche moderne forniscono dati preliminari utili alle analisi funzionali in vivo (Thoeni et al., 2005; Arndt et al., 2006). Malgrado l'importanza, gli studi in vivo che facciano uso di moderne tecniche di imaging su piccoli animali da laboratorio sono sorprendentemente scarsi. Nel passato è stato dimostrato che l'attivazione funzionale delle ghiandole salivari può essere visualizzata in risonanza magnetica dotata di magnete da 4,7 Tesla (Sbarbati et al., 1994). Questo non è sorprendente, considerando che un magnete di questa potenza può essere usato per valutare eventi secretori in differenti modelli animali (Sbarbati et al., 1995, 1996). In ogni caso, l'incrementata risoluzione spaziale della moderna strumentazione permette un'analisi più dettagliata anche delle strutture ghiandolari più piccole.

Per ottenere un rapporto segnale rumore sufficientemente elevato rispetto alle strutture limitrofe abbiamo usato un agente di contrasto a base di manganese ($MnCl_2$), che era stato precedentemente usato anche per evidenziare l'ipofisi nel cervello. Le nostre osservazioni hanno rivelato che l'agente di contrasto determina una forte e specifica colorazione delle ghiandole salivari in modalità T1W1 rispetto alle sezioni serose. Per eseguire i necessari controlli istologici alcuni degli animali perfusi con il mezzo di contrasto sono stati sacrificati; sono stati estratti i complessi SSC, isolati, trattati e colorati con metodologie istologiche standard. Lo scopo del lavoro è di ricavare una metodica allo stato dell'arte per l'organo salivare, ed in particolare l'SSC, usando l'opportunità unica che le tecniche di imaging possono offrire. La descrizione è il primo passo nell'esplorazione molecolare e funzionale di questo organo che, nei piccoli mammiferi, rappresenta una grande porzione della regione della testa e del collo.

Istologia:

Al fine di preparare i controlli istologici, è stato estratto da alcuni animali perfusi il complesso SSC e successivamente lo si è post-fissato ponendolo in una soluzione contenente 4% paraformaldeide.

Successivamente le due ghiandole sono state separate usando un microscopio tridimensionale,

deidratate, pulite ed infine incluse in paraffina. Dopo i passaggi sovraesposti, le sezioni ottenute con microtomo sono state colorate con ematosina-eosina ed esaminate al microscopio binoculare. (Olympus BX51, Olympus optical c.o., Hamburg, Germany)

3.2 Studio degenerazione fat pad nel piede diabetico

3.2.1 Il tessuto adiposo

Per molti anni il tessuto adiposo venne considerato semplicemente come un tessuto metabolicamente inerte, il cui ruolo fisiologico principale, oltre alla termogenesi e alla funzione di isolante termico passivo, era quella di immagazzinare energia, in modo tale da assicurare nei momenti di bisogno un rifornimento energetico continuo a tutte le cellule dell'organismo.

Studi realizzati negli ultimi decenni (Cinti, 2001), hanno dimostrato che il tessuto adiposo è un organo a sé stante ed oltre ad essere soggetto all'azione ormonale, produce esso stesso degli ormoni che concorrono a controllare complesse attività metaboliche e comportamentali legate all'alimentazione e all'immagazzinamento di energia.

3.2.1.1 Citologia ed istologia

Il tessuto adiposo è un tipo di tessuto connettivo lasso costituito soprattutto da cellule adipose (Monesi, 1992), chiamate adipociti, circondate da una matrice di fibre di collagene, vasi sanguigni e da cellule immunitarie. Esistono nei mammiferi due tipi di tessuto adiposo che differiscono per colore, caratteri citologici, distribuzione, vascolarizzazione ed attività funzionale: il tessuto adiposo bianco ed il tessuto adiposo bruno. Il tessuto adiposo bianco (fig. 3.2.1.1(1)) è costituito da adipociti uniloculari, caratterizzati da un'unica grande goccia lipidica (costituita principalmente da una miscela di trigliceridi) che schiaccia il nucleo eccentrico, e da scarso citoplasma, ridotto ad un singolo anello periferico. Nel ridotto citoplasma si riscontrano un piccolo apparato di Golgi, pochi mitocondri filamentosi, tubuli di reticolo endoplasmatico liscio e scarsi ribosomi liberi (Bloom et al., 1996). Tali cellule adipose possono raggiungere un diametro di 120 µm, con un colore che varia dal bianco al giallo a seconda dei lipidi accumulati e in relazione al contenuto di carotenoidi assunti con la dieta. Gli adipociti hanno generalmente forma sferica, ma possiamo trovarli anche fittamente accostati tra loro e per effetto della reciproca pressione assumono forma ovale o poliedrica. La loro forma varia anche in funzione dello stato alimentare: durante il digiuno prolungato, i lipidi sono mobilizzati ed abbandonano la cellula, la goccia lipidica scompare e gli elementi diventano stellati o fusiformi, assumendo l'aspetto di fibroblasti; con la ripresa dell'alimentazione la goccia lipidica si riforma riempiendosi nuovamente di trigliceridi provenienti dalle lipoproteine plasmatiche.

Il tessuto adiposo bruno (fig. 3.2.1.1(2)) viene anche detto multiloculare perché contiene numerose goccioline lipidiche. Questo tipo di tessuto adiposo presenta un colore variabile dal marrone chiaro al rosso mattone a causa della ricca vascolarizzazione, assai più ricca di quella del tessuto adiposo bianco, ed anche per la presenza di una serie di pigmenti.

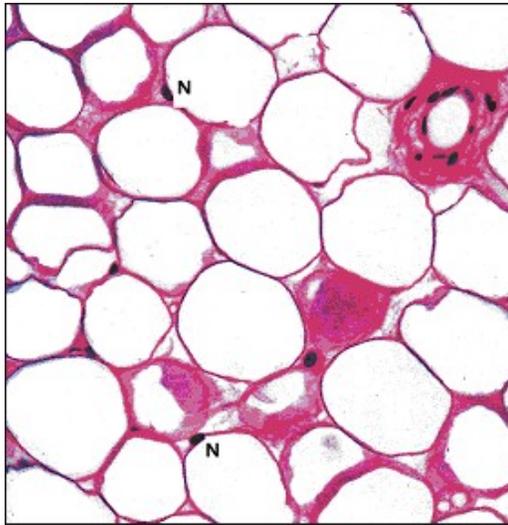


Fig. 3.2.1.1(1) Tessuto adiposo bianco

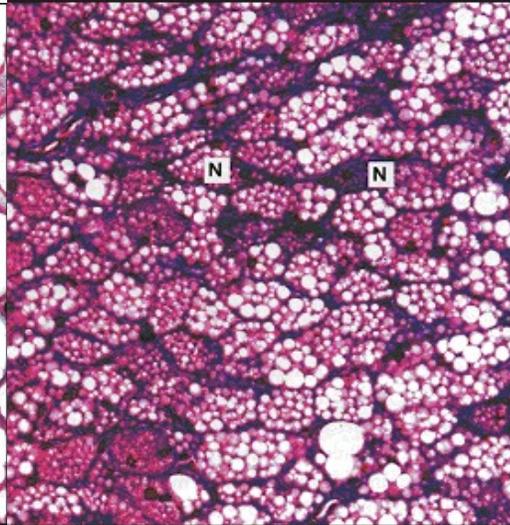


Fig. 3.2.1.1(2) Tessuto adiposo bruno

Le cellule di tale tessuto, gli adipociti bruni, sono più piccole di quelle del grasso bianco: in genere non superano i 30 μm , hanno forma poligonale ed i lipidi, anziché accumularsi in un'unica goccia, sono distribuiti in numerose goccioline non avvolte da membrana ma libere nel citoplasma. Il nucleo non è sospinto alla periferia della cellula ma occupa una posizione lievemente eccentrica ed è sferico (Monesi, 1992). Gli organuli presenti sono: i mitocondri e i piccoli vacuoli, l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, i perossisomi, le vescicole di pinocitosi, ribosomi e poliribosomi. Questo tessuto è abbondante nei roditori e negli animali ibernanti, mentre negli altri mammiferi e nell'uomo adulto è assai scarso. Nell'uomo gli adipociti bruni si trovano solo in certe zone dell'organismo (come il grasso sottocutaneo interscapolare, quello sottocutaneo toracico, la capsula renale e il grasso della parete addominale posteriore). Diversi studi hanno evidenziato che il grasso bruno non svolge un ruolo rilevante nel metabolismo lipidico, ma è un tessuto specializzato nella produzione di calore. Esso è, infatti, caratterizzato dalla presenza di un elevato numero di mitocondri che gli forniscono la capacità di generare calore attraverso l'ossidazione degli acidi grassi. Inoltre, nel particolare tipo di mitocondri, grossi e ricchi di creste, è presente una proteina protonofora, la UCP1. Questa proteina dissipa il gradiente elettrochimico esistente tra la matrice mitocondriale e il compartimento interno con conseguente liberazione di grandi quantità di calore (Klaus et al., 1991). Dopo la cessazione dello stimolo termogenico, l'adipocita bruno perde le sue

caratteristiche e assume la morfologia e l'attività tipica dell'adipocita bianco. Dato che è possibile anche il contrario, la transdifferenziazione di adipociti bianchi in adipociti bruni (Himms-Hagen et al., 2000), si pensa oggi che il tessuto adiposo nel suo insieme non sia costituito da una percentuale fissa di adipociti bianchi e bruni, ma che cambi sotto l'influenza della stimolazione nervosa.

3.2.1.2 Istogenesi

Lo stadio iniziale di tale processo differenziativo corrisponde al cosiddetto adipoblasto che, subendo una serie di differenziazioni, ciascuna influenzata da diversi fattori, lo fa evolvere dapprima in preadipocita e, in seguito, in cellula adiposa matura, che perde la capacità di dividersi. I preadipociti sono cellule a forma stellata o fusiforme e sono difficilmente distinguibili dai fibroblasti in base ai criteri morfologici (Bloom et al., 1996). Le fasi successive della deposizione di grasso, durante la differenziazione della cellula mesenchimale in cellula adiposa, prevedono la comparsa nel citoplasma di piccole e numerose gocce lipidiche, tanto che il tessuto adiposo embrionale è in apparenza di tipo multiloculare. Successivamente, tali gocce si uniscono formandone un'unica grande che riempie quasi tutto il volume della cellula facendole assumere la forma rotonda e determinando la dislocazione del nucleo e del citoplasma. (Monesi, 1992).

Sadowski e collaboratori (Sadowski et al., 1992) hanno stimato che l'espressione di più di 100 geni cambia durante la differenziazione di pre-adipociti in adipociti. La differenziazione in adipociti comporta l'aumento di espressione di geni caratteristici degli adipociti, quali ad esempio i fattori di trascrizione PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor), C/EBP- β (CCAT enhancer-binding protein), SCD1 (stearoyl-coenzyme A desaturase 1) ed AFABP (adipocyte fatty acid-binding protein).

I fattori che intervengono nei vari stadi di differenziazione si dividono in:

- fattori precoci che intervengono nella differenziazione da adipoblasto in preadipocita.
- fattori tardivi che stimolano la trasformazione da preadipociti in cellule adipose immature.
- fattori molto tardivi che determinano la differenziazione finale in cellule adipose mature.

Il tessuto adiposo è, inoltre, regolato da numerosi ormoni e fattori di crescita che possono stimolare o inibire le diverse fasi della differenziazione e della crescita.

3.2.1.2.1 Controllo endocrino dell'adipogenesi

Le origini delle cellule adipose e del tessuto adiposo sono attualmente poco conosciute e devono essere ancora caratterizzati gli eventi molecolari che indirizzano i precursori staminali embrionali verso la differenziazione adipocitica. Nella maggior parte delle specie la formazione del tessuto adiposo bianco inizia prima della nascita e prosegue rapidamente dopo di essa in termini di un aumento sia delle dimensioni che del numero di cellule adipose. Anche nell'età adulta è possibile la formazione di nuove cellule adipose partendo da precursori che si differenziano in uno stadio cellulare intermedio, i preadipociti. La crescita e la differenziazione dei preadipociti sono regolate da numerosi ormoni e fattori di crescita che possono presentare effetti stimolatori o inibitori. Per esempio l'ormone della crescita (GH), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) e i glucocorticoidi sono necessari per indurre la differenziazione dei preadipociti *in vitro* (Wabitsch et al, 1996). Al contrario il fattore I dei preadipociti (pref-1) esercita un'azione inibitoria sull'adipogenesi (Sul et al, 1993). Recentemente è stato dimostrato che l'endotelina-1 inibisce *in vitro* la differenziazione di preadipociti umani (Hauner et al., 1994) e aumenta l'espressione della leptina nel tessuto adiposo agendo attraverso il recettore ETA (Xiong et al, 2001).

Ricerche condotte in topi e bovini indicano che anche un altro peptide, denominato miostatina, può essere coinvolto nel processo dell'adipogenesi e nella regolazione dell'ormone leptina. La miostatina è una proteina dimerica appartenente alla superfamiglia dei TGF- β . Il precursore monomero ha un peso molecolare di 42 kDa e forma omodimeri intracellularmente che, al momento della secrezione, vengono scissi in un dimero N-terminale di 26 kDa, che è appunto la miostatina, ed un dimero C-terminale detto LAP (Latent Associated Peptide). La miostatina è prodotta soprattutto dal tessuto muscolare e funziona come un regolatore negativo della crescita muscolare nei mammiferi. Topi e bovini con mutazioni inattivanti il gene della miostatina mostrano una crescita muscolare sia ipertrofica che iperplastica (McPherron *et al.*, 2002). Un analogo

aumento della miogenesi è stato osservato in topi knockout per il gene della miostatina (Heather *et al.*, 2002,).

Mediante analisi Northern, si è dimostrato che, nel topo, la miostatina è debolmente espressa anche nel tessuto adiposo (Lee e McPherron, 2002). Inoltre, si è riscontrato che l'inattivazione della miostatina per mutazione o soppressione del gene comporta una marcata riduzione della adipogenesi, la cui regolazione appare quindi inversamente correlata a quella della miogenesi. Con la riduzione della massa adiposa si è osservata pure una diminuita produzione e secrezione di leptina (Heather *et al.*, 2002; Zimmers *et al.*, 2002).

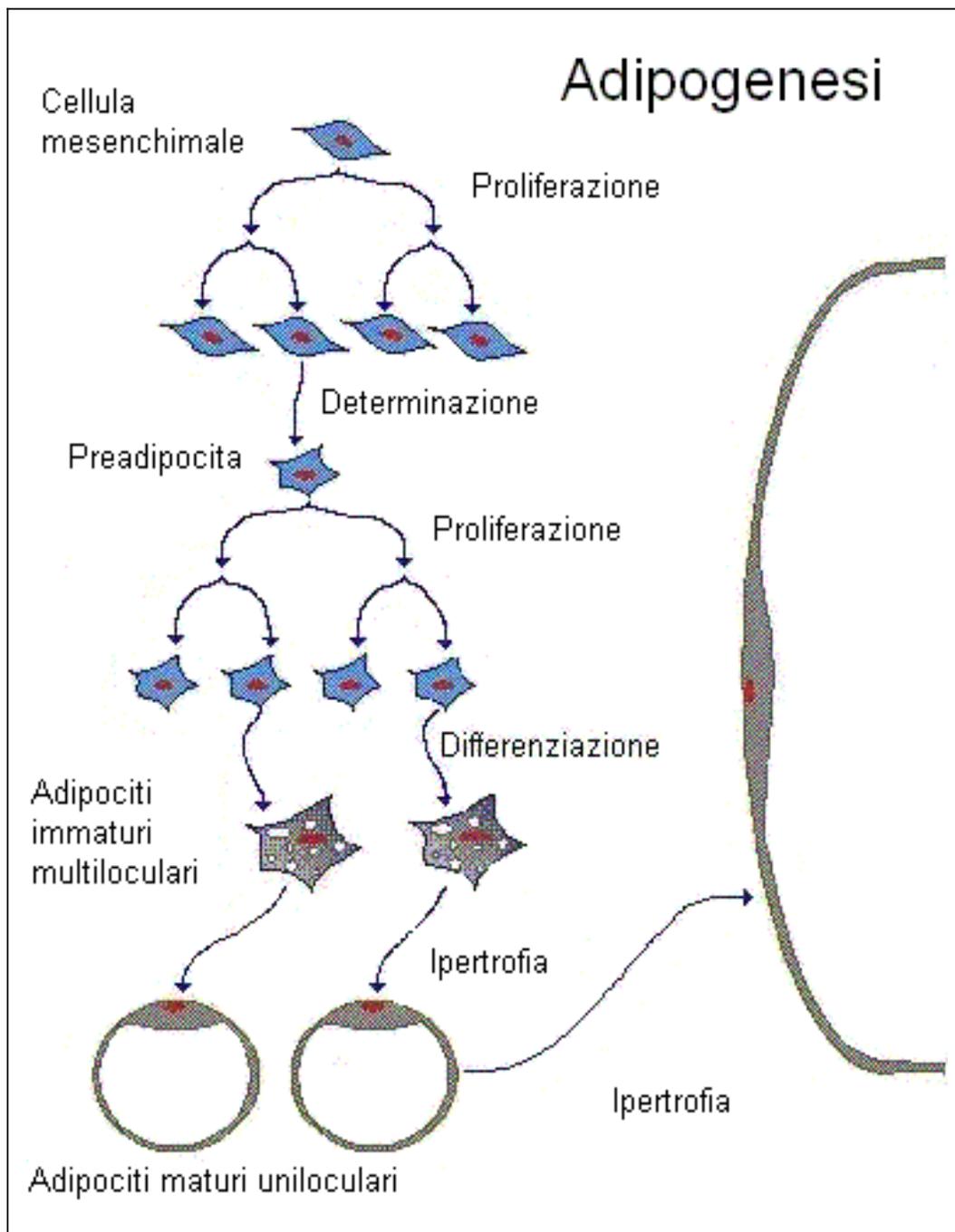


Fig. 3.2.1.1(3) Adipogenesi

3.2.1.3 Distribuzione anatomica

Dal punto di vista anatomico si distinguono due tipi di tessuto adiposo: tessuto adiposo sottocutaneo e tessuto adiposo viscerale. I depositi viscerali si trovano nella cavità addominale, a stretto contatto con i visceri, e vengono a loro volta suddivisi in intraperitoneali (omentale e mesenterico) ed extraperitoneali (Cinti, 2001). Circa il 50% dei depositi adiposi formano il tessuto adiposo sottocutaneo, il 45% costituisce quello viscerale e il restante 5% rappresenta il grasso di infiltrazione del tessuto muscolare (Rosati et al., 1997).

Nell'uomo la distribuzione del tessuto adiposo é un carattere associato ad una predisposizione genetica e presenta notevoli differenze tra i due sessi, ed in funzione dell'età. In un maschio normale, il 12-14% del peso corporeo è costituito da grasso mentre nelle femmine è il 25% o più, quantità che in queste ultime rappresenta circa due mesi di riserva energetica (Bloom et al., 1996). Il maschio ha meno grasso totale della femmina, ma presenta un deposito viscerale maggiore rispetto a quello femminile; ovverosia, nel maschio il grasso è per lo più localizzato nell'addome, mentre nella femmina in periferia (deposito sottocutaneo gluteofemorale) (Bjorntorp et al., 1991).

Ciò indica un ruolo degli ormoni sessuali nell'omeostasi energetica. In realtà, il tessuto adiposo è non soltanto un bersaglio, ma anche un sito di sintesi e secrezione di ormoni steroidei. L'attività steroidogenica più evidente è quella aromatasica, che consiste nella conversione ad estrogeni di precursori androgeni circolanti soprattutto di origine surrenalica. La produzione di estrogeni nel tessuto adiposo aumenta con l'obesità e l'età in entrambi i sessi. Nella donna in menopausa, la principale sorgente di estrogeni è costituita proprio dal tessuto adiposo.

Gli estrogeni hanno un ruolo nell'adipogenesi in quanto esercitano un'azione stimolativa sulla proliferazione dei pre-adipociti, mentre il cortisolo promuove la differenziazione di questi in adipociti. L'attività aromatasica risulta maggiore nel grasso sottocutaneo rispetto al tessuto adiposo omentale. Il cortisolo aumenta l'attività aromatasica nel tessuto adiposo sottocutaneo nelle donne ma la inibisce nell'uomo, mentre stimola l'enzima nel grasso omentale di entrambi i sessi (McTernan *et al.*, 2002).

Alla nascita la massa adiposa del neonato è già ben sviluppata e costituisce il 10% del suo peso corporeo. L'aumento di tale massa può verificarsi in seguito ad incremento di volume (ipertrofia) o di numero (iperplasia) delle cellule adipose. Fattori genetici e stimoli attivi durante le prime fasi di sviluppo del tessuto adiposo, durante la vita intrauterina e infantile, possono determinare aumento del numero delle cellule adipose e quindi costituire il primo passo verso l'obesità iperplastica. Nell'individuo adulto invece fattori ormonali e nutrizionali determinano soprattutto un'obesità ipertrofica incrementando quindi il volume delle cellule adipose.

L'obesità ipertrofica che insorge in genere in età adulta e in entrambi i sessi mostra una distribuzione dell'adipe sia sottocutanea che viscerale. In questi soggetti le complicanze metaboliche e cardiovascolari sono frequenti e precoci anche se fortunatamente la sensibilità alle misure dietetiche è buona.

L'obesità iperplastica insorge in età giovanile, prevalentemente nel sesso femminile, ed è

associata in modo rilevante ad una distribuzione di tipo familiare. La disposizione dell'adipe è sottocutanea e le complicanze metaboliche e cardiovascolari, se si presentano, sono tardive. Sfortunatamente la sensibilità alle misure dietetiche in questi soggetti è molto limitata (Tiengo, 1990).

Si sono, quindi, finora identificate grosse differenze fra il tessuto adiposo di tipo sottocutaneo e viscerale, sia per quanto riguarda la distribuzione sia per quanto riguarda l'origine e la predisposizione genetica in un soggetto allo sviluppo di un tipo o di un altro.

Una terza distinzione di tipo anatomico-funzionale è emersa da recenti studi (Lotte et al., 2001) che suddividono il tessuto adiposo sottocutaneo, in particolare quello addominale, in uno strato più profondo ed in uno più superficiale. Lo strato più profondo appare maggiormente variabile da individuo a individuo in relazione al grado di obesità; è inoltre strettamente correlato all'insulino-resistenza come lo è il tessuto adiposo viscerale. Sembra quindi che il tessuto adiposo viscerale e quello sottocutaneo profondo, anche per ciò che riguarda l'attività lipolitica, possano essere correlati dal punto di vista metabolico.

3.2.1.4 Fisiologia e funzioni

Considerato un vero e proprio organo, il tessuto adiposo è irrorato da una complessa rete di capillari ed è percorso da sottili setti di tessuto connettivo che lo suddivide in lobuli.

Il tessuto adiposo è innervato dal sistema nervoso simpatico (SNS) che stimola la lipolisi attraverso la liberazione di noradrenalina. Il neurotrasmettitore, interagendo con i recettori β_1 -adrenergici presenti sull'adipocita, dà inizio ad una cascata di eventi che portano all'attivazione della lipasi intracellulare che idrolizza i trigliceridi immagazzinati nella cellula, trasformandoli in acidi grassi liberi (FFA) e glicerolo (Ganong, 1991).

A livello del tessuto adiposo sono presenti anche dei linfonodi, il cui numero varia secondo il deposito di grasso: il grasso mesenterico è ricco di linfonodi mentre quello sottocutaneo e perirenale ne risultano praticamente privi. I fattori di crescita secreti dai linfonodi sembrano, inoltre, influenzare la lipolisi (Pond., 1996) e la vascolarizzazione (Macqueen et al., 1999) del tessuto adiposo.

Il ruolo principale del tessuto adiposo è quello di partecipare attivamente al metabolismo lipidico intervenendo nella sintesi dei lipidi e nel processo di mobilizzazione di questi nel sangue, in risposta a stimoli ormonali e nervosi. Accumulando lipidi in periodi di eccessiva assunzione di cibo e rilasciando acidi grassi in periodi di digiuno, il tessuto adiposo riesce a mantenere un

apporto costante di combustibile ad elevato contenuto energetico. Questi processi sono regolati da due diversi tipi di lipasi. Situata sulla superficie endoteliale dei capillari esiste un enzima, la lipoproteina-lipasi, che idrolizza i trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL, fornendo FFA (free fatty acids) e glicerolo, che poi sono risintetizzati in trigliceridi nuovi nelle cellule adipose. I trigliceridi immagazzinati all'interno dell'adipocita possono essere sintetizzati anche a partire dal glucosio, prelevato dal sangue, e dagli aminoacidi derivanti rispettivamente dalla digestione dei carboidrati e delle proteine della dieta. Durante il digiuno, invece, la richiesta energetica attiva la lipasi intracellulare ormone-sensibile del tessuto adiposo; questa catalizza la scissione dei trigliceridi di deposito e gli FFA così formati vengono rilasciati nel torrente sanguigno dove si legano ad albumine plasmatiche. Adrenalina, ormoni tiroidei, glucocorticoidi, GH e glucagone aumentano l'attività della lipasi ormone-sensibile; l'insulina e la prostaglandina E invece la diminuiscono (Ganong, 1991).

3.2.1.4.1 Controllo del metabolismo lipidico nel tessuto adiposo

È noto inoltre che gli adipociti uniloculari comunicano con i centri nervosi della sazietà secernendo un ormone proteico chiamato leptina (Xiong et al, 2001). Questa consta di una sequenza lineare di 146 aminoacidi derivata da una preproleptina di 167 aa dopo taglio del peptide segnale di 21 aa ad opera di una signalasi. La molecola è molto stabile e non presenta omologie significative con altre proteine. Tuttavia, la sua struttura terziaria consta di quattro α -eliche presenti anche nelle citochine elicoidali, quali l'ormone somatotropo e le interleuchine 2 e 4, per cui viene inclusa tra le adipochine, cioè le citochine del tessuto adiposo.

Per un meccanismo non ancora completamente chiarito la secrezione di leptina è regolata dall'adeguatezza delle riserve di grasso. In presenza di riserve abbondanti e sotto l'influenza di corticosteroidi ed estrogeni, è stimolata la secrezione di leptina che raggiunge l'ipotalamo, dove si lega a specifici recettori appartenenti alla famiglia dei recettori citochinici di classe I a forma lunga, OB-Rb, ed a forma corta, OB-Ra, OB-Rc e OB-Re. L'interazione produce molteplici effetti: una marcata diminuzione della produzione del neuropeptide Y (NPY) e del neuropeptide di tipo agouti (agouti-related protein, AgRP) che sono potenti stimolatori dell'appetito e l'aumentata sintesi di peptidi anoressigenici, quali il neuropeptide α -MSH, derivato dalla proopiomelanocortina

(Cowley et al., 2001), e il neuropeptide CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) (Ludvigsen et al., 2001). Inoltre negli animali da esperimento la attivazione dei recettori della leptina aumenta il consumo di energia, l'attività fisica e la termogenesi. Quest'ultima è stimolata mediante il rilascio di norepinefrina dai nervi simpatici che terminano nel tessuto adiposo. Le cellule adipose esprimono recettori β 3-adrenergici che, quando stimolati dalla norepinefrina, provocano idrolisi degli acidi grassi e la loro β -ossidazione con dissipazione dell'energia rilasciata sotto forma di calore (Huang e Li, 2000).

Altri effetti catabolici della leptina sono mediati attraverso il suo controllo su ghiandole endocrine, quali la tiroide e la corteccia surrenale, lungo l'asse ipotalamo-adenipofisario. Sebbene la leptina tenda ad aumentare il dispendio energetico e a ridurre la massa adiposa, in realtà il suo ruolo fisiologico, stabilitosi per selezione naturale, non sembra quello di ormone anti-obesità, quanto piuttosto di ormone protettivo nella condizione di digiuno, tendente quindi a spostare l'omeostasi energetica verso il risparmio al diminuire della disponibilità di cibo. Del resto l'obesità cronica da eccessivo apporto alimentare è una situazione inusuale in natura e quindi la sua riduzione non risulta selezionabile. La leptina è inefficiente nel contrastare l'obesità cronica anche perché questa comporta l'insorgere di resistenza leptinica dovuta alla riduzione dei recettori leptinici nei tessuti bersaglio. Quindi, con l'aumento della massa adiposa, l'aumento della secrezione leptinica non riesce ad aumentare il consumo energetico con conseguente ulteriore incremento della adiposità.

L'obesità, e particolarmente l'obesità centripeta con accumulo di grasso a livello del tronco e della cavità addominale, aumenta il rischio di gravi patologie, quali il diabete mellito di tipo 2, insulino-indipendente, l'ipertensione e l'aterogenesi favorita da ipertrigliceridemia e basso colesterolo HDL, con relativo aumento del rischio di patologie vascolari, tra cui l'infarto coronarico e l'ictus cerebrale. Infatti l'obesità determina una condizione di resistenza insulinica con iperglicemia e progressivo danno al microcircolo vascolare per ispessimento della membrana basale degli endoteli. Il quadro è aggravato dal fatto che un'altra adipochina, la adiponectina, che esercita sia un'azione antidiabetogena, migliorando la sensibilità all'insulina e riducendo la glicemia, sia

un'attività antiinfiammatoria e antiaterogena, è secreta in rapporto inversamente correlato alla massa adiposa. Al contrario, la secrezione di una terza adipochina, la resistina, che tende ad aumentare i processi infiammatori, è invece proporzionale alla massa adiposa (McTernan et al., 2002; Koerner et al., 2005). L'obesità tende quindi ad incrementarsi in una sorta di circolo vizioso associato ad un correlato di patologie destinate a peggiorare con l'aumento del peso corporeo. Questo predispone anche allo sviluppo di malattie degenerative delle articolazioni, come l'osteoartrite, anticipandone la comparsa rispetto ai soggetti di normopeso, in quanto il sovraccarico corporeo di grasso, nel corso degli anni, determina una traumatizzazione delle articolazioni, soprattutto degli arti inferiori e in particolare del piede. Qualora il quadro dismetabolico dell'obesità determini la manifestazione conclamata della sintomatologia del diabete mellito di tipo 2 con la progressiva compromissione del circolo a livello dei piedi, è evidente che il sommarsi di questo danno a quello osteoartritico può compromettere la capacità deambulatoria e, in mancanza di una adeguata terapia, portare alla sua perdita per interventi di amputazione volti a prevenire il diffondersi di necrosi tissutale e gangrena.

3.2.1.4.1 Funzioni meccaniche del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo svolge in alcune sedi funzioni meccaniche e di sostegno formando uno strato o una capsula adiposa che funge da cuscinetto protettivo e che serve ad attenuare azioni traumatizzanti. Esempio di ciò sono gli accumuli di grasso nelle grandi articolazioni, nell'orbita, nella pianta del piede e nel palmo della mano. Questi depositi sono meno soggetti a variazioni quantitative, e non scompaiono mai completamente, anche se possono diminuire in caso di forte dimagrimento (Rosati e Colombo, 1997)

Se non ci fosse tessuto adiposo nel piede, in una condizione di sopportazione di pesi, chiunque potrebbe capire che la superficie dell'osso, in contatto con il terreno, sarebbe molto piccola, e la superficie arrotondata delle cinque teste metatarsali e del tubercolo calcaneare (Fig 3.2.1.4(1)), senza nessun meccanismo di distribuzione del peso corporeo sarebbero danneggiate molto rapidamente.



Fig 3.2.1.4(1)



Fig 3.2.1.4(2)

Se prendiamo una impronta del fondo del piede (Fig 3.2.1.4(2)), si realizza immediatamente che il calcagno è più grande della superficie ossea a contatto con il terreno. Questo è dovuto al pannicolo adiposo plantare (plantar fat pad), che ridistribuisce il peso, aumentando la superficie dell'impronta con il terreno, ed attenuando la pressione locale avvertita dal piede. Il dispositivo naturale di distribuzione del carico è il cuscinetto di grasso sotto il tallone (Heel fat pad) e sotto le teste metatarsali (Metatarsal fat pad). Queste due strutture sono uno dei pochi esempi nel corpo umano dove il grasso assolve ad un ruolo funzionale ad elevata specificità. Questa abilità risulta dalla sua configurazione anatomica unica in cui globuli di grasso sono incapsulati da un reticolato fibroelastico. Per capire il ruolo del fat pad durante la camminata ci siamo concentrati sul comportamento anatomico meccanico dello stesso. Questa è la prima parte del piede che incontra il terreno durante l'andatura e, conseguentemente, è la parte che sopporta la maggiore pressione. Il cuscinetto calcaneare assorbe circa il 30% della forza al contatto del calcagno. Per un uomo di 70 Kg, l'area media del cuscinetto è di 23 cm² e la pressione del carico è calcolata 3.3 Kg/cm², 5 Kg/cm² all'impatto, e 10 Kg/cm² durante la corsa (Ozdemir, H. Soyuncu, Y. Ozgorgen, M. Dabak, K., 2004. Effects of changes in Heel Fat Pad Thickness and Elasticity on Heel Pain. Journal of the American Podiatr Medical Association 94(1), 47-51.)

3.2.2 Anatomia e funzione del *fat pad*

Il cuscinetto calcaneare risiede tra il tubercolo del calcagno e la pelle e consiste in una struttura complessa con componenti neuronali, vascolari, fibrosi ed elastici, intervallati da cellule di grasso (Jahss *et al.*, 1992) Il cuscinetto calcaneare umano ha uno spessore di sezione medio di 18mm, variando da un minimo di 12 ad un massimo di 22 mm. Questo valore massimo è misurato nella parte posteriore della struttura, dove la pressione sviluppata durante l'andatura è massima (Aerts *et al.*, 1996). Istologicamente, il cuscinetto di grasso calcaneare è composto da

una matrice di globuli di grasso specializzato separati in camere per mezzo di setti di elastina e collagene, progettati per resistere a carichi di compressione. Questi setti fibrosi sono attaccati alla tuberosità calcaneare ed esiste a forma di U con un'apertura verso l'alto diretta verso il calcagno (Levy *et al.*, 1992.) I setti sono progettati per impedire ogni fuoriuscita di grasso dal singolo compartimento, mentre il cuscinetto è deformato dallo sforzo del carico. I setti si avvolgono a forma di spirale l'uno sull'altro, impedendo che i globuli possano mescolarsi tra loro. Quindi la pressione idraulica creata nelle cellule di grasso è in ogni direzione, propagandosi alle celle limitrofe distribuendo la pressione. Questo effetto minimizza la compressione del cuscinetto calcaneare aumentando la sua abilità di attenuare le forze. La configurazione particolare dei cuscinetti di grasso e dei setti fibrosi conferisce al cuscinetto le sue capacità di assorbire gli urti (D'Andrea *et al.*, 1997). Il cuscinetto calcaneare è diviso anatomicamente in due principali compartimenti sottocutanei, immediatamente sotto il reticolato dermico si trova uno strato superficiale di microcamere, separato da uno strato prominente fibroso (coppa calcaneare) si trova poi uno strato più profondo di macrocamere (Buschmann *et al.*, 1995). Lo strato di microcamere è circa del 30% ed è composto da cellule grasse molto piccole, racchiuse da setti sia sottili sia spessi, fissati superiormente alla coppa calcaneare e inferiormente alla pelle. Lo strato di macrocamere è composto da cellule di grasso più grosse e setti più grandi. Questi grandi setti contengono in egual misura collagene e tessuto elastico. Le fibre di collagene contornano le più centrali fibre elastiche che connettono le pareti esterne dei setti più grandi. Mano a mano che i setti si dividono in strutture più piccole ed in strati più sottili essi contengono prevalentemente tessuto elastico e solo poche fibre di collagene. Quindi basandosi sulla diversa composizione tissutale si ipotizza che si abbiano differenti comportamenti biomeccanici tra i due strati (Hsu *et al.*, 2007). Inclusi nel setto si trovano i rami calcaneari mediali del nervo tibiale, il cuscinetto di grasso calcaneare è innervato anche da due grandi gruppi di germinazioni nervose provenienti dal nervo mediale e latero plantare. Nel fat pad sono state identificate sia terminazioni nervose che corpuscoli del Paccini. Nel cuscinetto calcaneare si trova anche una fitta rete venosa che drena il sangue attraverso i bordi mediali e laterali alle vene marginale e safena. Il cuscinetto riceve il flusso arterioso dalla tibiale anteriore, dalla tibiale posteriore e dall'arteria peroneale, che attraversa nel setto il cuscinetto per andare a portare nutrimento alla pelle. Il grasso ha la sua fornitura di sangue indipendente che entra in modo mediale e laterale come dimostrato in precedenti studi (Spears *et al.*, 2006).

3.2.3 Proprietà meccaniche

Il cuscinetto calcaneare, essendo la parte più distale dell'apparato locomotore umano, è la prima porzione del piede che colpisce il terreno (Spears *et al.*, 2006). Le iterazioni tra il cuscinetto calcaneare e il terreno si manifestano in due modi complementari. Primo, con l'incremento di conformità della superficie di contatto che riduce il picco della forza esercitata; secondo dissipando l'energia meccanica sotto forma di calore al momento dell'impatto (Aerts *et al.*, 1995). Al fine di capire il ruolo del cuscinetto calcaneare nel ridurre ed assorbire lo shock dell'impatto durante la camminata e la corsa sono stati utilizzati vari approcci per studiarne le proprietà meccaniche. In generale tutti i test hanno evidenziato:

-Deformazioni non lineari: comportamento con una regione iniziale di alta conformità a forza bassa ed una regione più rigida successiva con l'aumento di forza, dovuto ai setti fibrosi. Dopo una dislocazione iniziale le fibre di collagene vengono tese limitando il movimento del tessuto grasso ed aumentando la rigidità del cuscinetto lungo la normale (Miller-Young *et al.*, 2002).

-Visto che il cuscinetto contiene sia materiale viscoso, sia elastico, corrispondente al grasso ed ai setti, si può affermare che il cuscinetto calcaneare è una struttura visco elastica (D'Andrea *et al.*, 1997). Questa assunzione è stata ricavata dalla relazione di distribuzione del carico in cui si nota isteresi fra carico e scarico (Miller-Young *et al.*, 2002). La presenza di isteresi indica che rispetto all'intera energia necessaria per deformare il cuscinetto calcaneare solo una parte è utilizzata nel conseguente rimbalzo, la parte rimanente viene dissipata sotto forma di calore.

-Il gradiente di distribuzione di carico rappresenta la misura più comune della rigidità del cuscinetto calcaneare. I test di Miller e di Young asseriscono che in termini di distribuzione delle forze, la rigidità del cuscinetto non dipende soltanto dalla sua composizione, ma anche dalla sua geometria, per esempio dallo spessore, e dal modo in cui viene sottoposto al carico. Nei loro studi è stato creato un modello agli elementi finiti del cuscinetto calcaneare, poi validato, al fine di trovare un metodo per misurare la rigidità dello stesso indipendentemente dalle proprietà geometriche.

I risultati indicano che le caratteristiche di forza/spostamento nel calcagno dove lo strato è più sottile, sottoposto a rapidi carichi-scarichi e spostamenti rapidi, è probabile riscontrare curve più ripide forza-deformazione, dando così l'impressione di avere una maggiore rigidità. Per Spears e Miller-Young, il carico di deformazione dà una misura verosimile della rigidità del fat pad,

quindi usando carichi distribuiti applicati lentamente, dovremo ottenere dati che sono meno dipendenti dallo spessore dei provini di fat pad calcaneare, trovando la via migliore per identificare cambiamenti nei tessuti interni del fat pad.

3.2.3.1 Moduli di Young

- Stabilire il modulo di Young può essere difficile per due differenti ragioni. Per prima cosa dai test di stress e sforzo sono apparsi comportamenti non lineari, seconda cosa il cuscinetto calcaneare è una struttura visco-elastica, quindi il suo comportamento dipende anche dalla frequenza. Quindi, anche se fosse possibile identificare qualche sezione lineare, nelle caratteristiche non lineari dello stress e dello sforzo, e trovare una media del modulo di compressione, questo dato può cambiare a sua volta se cambia la frequenza della compressione. Gefen ha sviluppato un metodo basato sulla fluoroscopia digitale applicato ad un display a pressione di contatto per fornire un metodo capace di misurare la deformazione del tessuto rispettivamente allo sforzo al contatto con il suolo del piede del soggetto, durante la camminata a piedi scalzi (Gefen *et al.*,2001). In questo studio è stato misurato il modulo di compressione a 2,5 Hz, ed è risultato essere circa 105 kPa. Mentre con uno sforzo del 30%, esso ha raggiunto approssimativamente 306 kPa, una variazione del 65%. Quindi è stato trovato un modulo medio di 176 kPa (Gefen *et al.*,2001) laddove Hsu et al. nei loro studi sulle microcamere e sulle macrocamere, usando gli ultrasuoni ,hanno trovato un modulo elastico di 50,7 kPa, meno di quanto trovato da Gefen (Hsu *et al.*, 2007)

-Sforzo: lo sforzo nel cuscinetto calcaneare è generalmente calcolato come il rapporto tra deformazione assoluta (massima differenza di spessore tra cuscinetto scarico e cuscinetto carico) e spessore scarico. Gefen et al. hanno detto che durante l'impatto del tallone con il terreno (test condotti ad andatura da 0,5 a 0,9 m/s) il cuscinetto calcaneare si è compresso fino a uno sforzo massimo medio di circa il 40% (circa il 60% durante la corsa) in circa 150 ms. una compressione più lenta del cuscinetto calcaneare avviene poi per la durata di 50 ms, dopodichè inizia la fase di scarico (Gefen *et al.*,2001).

3.2.3.2 Dissipazione Energetica

L'assorbimento dell'energia del cuscinetto calcaneare deriva dalla relazione stress-sforzo visto che

è presente isteresi nel ciclo di carico scarico. L'attenuazione energetica in termini di energia di

impatto totale è definita come: $energy_{dissipation} = \frac{loop_{area}}{loadingcurve_{area}}$

Il numeratore specifica che l'area sottesa alla curva di carico – scarico indica l'energia assorbita grazie alle proprietà viscosse del tessuto. Il denominatore specifica l'area sotto la curva di carico, ed indica l'energia applicata al tallone dall'impatto con il suolo (Gefen *et al.*,2001).

3.2.3.3 Isteresi del ciclo di carico

Quando il *fat pad* è ripetutamente caricato, scaricato, la curva di carico cambia sensibilmente. Le proprietà meccaniche visualizzate durante il primo ciclo di carico sono significativamente differenti da quelle durante i cicli successivi. Il più grande cambiamento si verifica fra il primo ed il secondo ciclo e diventa minore per ogni ciclo successivo, attenuandosi con le ripetizioni fino a portarsi all'equilibrio dopo 5 o 6 cicli. Molti autori definiscono questo come ennesimo ciclo. L'area di loop della caratteristica stress-sforzo tende a ridursi dopo pochi cicli, questo perchè la ripetizione continua tende a modellare il tessuto del fat pad, e quindi l'energia dissipata per ciclo si abbassa. Aerts *et al.* Danno il valore medio della percentuale di energia dissipata: a 11 Hz è del 48% per il primo ciclo e del 31% per l'ennesimo ciclo (figura). Inoltre l'energia assorbita nell'ennesimo ciclo è indipendente dalla frequenza della sollecitazione, mentre l'energia dissipata nel primo ciclo aumenta con l'aumentare della frequenza (Ker *et al.*, 1996).

3.2.3.4 Inomogeneità

Nel passato si pensava che il fat pad fosse un materiale isotropo ed omogeneo. La scoperta che il fat pad è diviso in microcamere superficiali e macrocamere profonde con differente composizione lo rende un materiale disomogeneo. Lo strato di spesse macrocamere contiene prevalentemente materiale grasso e un ugual numero di collagene e fibre elastiche; mentre lo strato di microcamere contiene meno grasso e cellule di dimensione più piccola, unitamente a fibre più sottili contenute in setti di fibre prevalentemente elastiche. Differenti proprietà biomeccaniche afferiscono ai due diversi compartimenti sottocutanei. Hsu *et al.* evidenziano le differenze biomeccaniche utilizzando gli ultrasuoni. Gli studi svelano una significativa differenza tra la proporzione di deformazione media tra macrocamere e microcamere: le macrocamere si deformano di più, mentre le microcamere hanno un grado di rigidità più elevato. Il modulo elastico delle microcamere è di 450 kPa che è dieci volte quello delle macrocamere. In conclusione lo strato a macrocamere aumenta la resilienza, facendo un effetto cuscino durante la

camminata (assorbe l'urto), mentre le microcamere evitano un'eccessiva deformazione dello strato di macrocamere (9); questa particolare struttura serve a variare la rigidità in modo progressivo dalla pelle che è più rigida fino alle più interne macrocamere, passando dalle microcamere che hanno una rigidità intermedia.

3.2.4 Tecniche usate per lo studio del *fat pad*

Nello studio delle proprietà meccaniche del cuscinetto calcaneare sono stati usati differenti set di esperimenti, in seguito sono descritti gli esperimenti in vivo ed in vitro.

3.2.4.1 Test *in vivo*

- Test di impatto: il tallone è stato deformato da una massa strumentale per simulare il contatto tallone terreno. Questo test può essere fatto come test del pendolo o come test di caduta. Comunemente il banco di test si serve di un accelerometro attaccato alla massa che impatta, fornendo l'ampiezza della decelerazione all'impatto. La doppia integrazione dell'accelerazione registrata ha fornito la compressione come funzione del tempo (la prima integrazione dà la velocità, la seconda lo spostamento $m/s^2 \rightarrow m/s \rightarrow m$) Il tempo di decelerazione e la massa danno il corrispondente carico ($F=ma$). Quindi i cicli di deformazione sotto carico possono essere dedotti. L'affidabilità del metodo del pendolo può essere testata sperimentalmente impattando contro una molla di acciaio con una rigidità nota (Aerts *et al.*, 1996).
- Test ad ultrasuoni: un trasduttore ed una cella di carico sono necessari per questo test. Questo test permette di determinare le proprietà a riposo del cuscinetto calcaneare umano. Invece, nelle condizioni di carico, l'analisi ad ultrasuoni risulta più complessa visto che è difficile trovare un modo di esercitare la pressione sul tallone, ed allo stesso tempo, monitorarlo con la sonda ad ultrasuoni. Hsu *et al.* nei loro studi sulle microcamere hanno usato un trasduttore ultrasonico annegato in un cilindro di plexyglas usato per esercitare la pressione e, al contempo, misurare. Sul fondo del cilindro è stata applicata una cella di carico. J. Tong *et al.* (2003) hanno invece sviluppato un banco prove in cui il soggetto è in posizione orizzontale. Il banco include un alloggiamento plasmato sul piede per tenerlo a riposo fissato ad una barra filettata con una maniglia rotante, alla fine della stessa un piatto ad L, con un porta sonda e il trasduttore ultrasonico. Un trasduttore di

forza e spostamento le rileva contemporaneamente, girando la manopola la maschera fissata alla barra filettata avanza fino a che non entra in contatto con il tallone del soggetto. La parte posteriore del piatto a L eserciterà quindi una forza sul trasduttore di forza posto alla fine del dispositivo (Wang *et al.*, 1999). In generale, l'indagine ad ultrasuoni permette di determinare lo spessore del cuscinetto sia scarico, sia in compressione, misurando la distanza minima tra la tuberosità calcaneare e la superficie della pelle. L'indice di comprimibilità che determina la resilienza del cuscinetto

calcaneare ($\frac{T_L}{T_U} \cdot 100$); il modulo elastico medio è calcolato come il valore della massima compressione diviso per la percentuale del massimo spostamento.

$P_{\max} \times 1 / \left(\frac{T_U - T_{L\max}}{T_U} \right)$; L'energia dissipata durante un ciclo di carico scarico rappresenta l'assorbimento all'urto del cuscinetto calcaneare.

3.2.4.2 Test *in vitro*



Fig. 3.2.4.2(1) Test di compressione fat pad, tratto da Miller-Young

-Macchina per il test dei materiali: il cuscinetto sub calcaneare è soggetto a carichi compressivi in una macchina servo idraulica per il test dei materiali, con l'attuatore a movimento sinusoidale. Le proprietà meccaniche del cuscinetto di grasso umano sono state misurate variando la frequenza di carico/scarico e la forza utilizzata (Fig. 3.2.4.2(1)). I test di compressione sono stati effettuati non solo nel fat pad preso singolarmente ma anche su campioni di osso, grasso e pelle. Benner e Ker nel 1990 hanno installato dei rulli nella macchina di test per assicurarsi che il carico fosse esclusivamente compressivo senza strappi al tessuto. Anche se questo principio è corretto, qualche autore non ha osservato differenza nell'utilizzare rulli o meno durante il test meccanico (Wang, *et al.*, 1999). La prova con la macchina per il test dei materiali permette di

misurare la relazione fra carico e deformazione, e, di conseguenza, la dissipazione di energia; la dipendenza dalla frequenza nel comportamento visco elastico (Miller-Young, *et al*, 2002). in questi modi: con il test stress-rilassamento (compressione costante, decremento nella forza), con il test di compressione rapida (carico costante, aumento dello spostamento).

-Test di impronta: un punzone di forma definita, fatto con un materiale ad altissima durezza è fatto penetrare nella superficie del pezzo da testare. Mentre la forza di test F viene aumentata, la profondità dello stampo h è misurata di continuo, sia per l'applicazione della forza, sia per la rimozione della stessa. Come risultato si ottiene una relazione tra F ed h per il materiale utilizzato. Dal test di impronta possono essere derivate molte grandezze. Questo tipo di test ha il vantaggio di essere sia facile da fare, che economico, che non distruttivo, e permette di misurare le proprietà locali del campione. J. Gales *et al.* hanno dimostrato la validità del dispositivo per le prove di impronta hand-held (HHI) per determinare le proprietà meccaniche del cuscinetto calcaneare umano, confrontando i risultati del test di identificazione con quelli di un dispositivo di compressione servo idraulico (MTS). I ricercatori non hanno trovato grosse differenze tra i due dispositivi, sia per la deformazione, che per la rigidità. Le differenze appaiono durante la misura dell'isteresi, probabilmente a causa del controllo impreciso del dispositivo hand held, dopo che si è avuta la massima deformazione (Gales *et al.*, 2007).

3.2.5 Il paradosso del fat pad

Anche se le proprietà meccaniche del fat pad sono relativamente facili da capire, l'energia meccanica assorbita dal tallone durante la fase di impatto, e la rigidità del cuscinetto calcaneare sono state trovate con molte discrepanze.

Le misurazioni in vivo danno una rigidità di approssimativamente 150 kN/m con un carico di un peso corporeo medio, una perdita energetica del 95%, e forze di picco di 800N, dipendenti dalla frequenza (Cavanagh *et al.*, 1984; Valiant *et al.*, 1984).

Gli esperimenti in vitro mostrano una rigidità, sempre con lo stesso peso applicato, tra i 900 ed i 1445 kN/m (Bennet e Ker, 1990; Aerts *et al.*,1995), una perdita energetica del 30%, e forze di picco di 1800 N, risultati indipendenti dalla frequenza.

Gli esperimenti in vivo ed in vitro hanno mostrato discrepanze che si palesano nel paradosso del fat pad.

Risolvere i conflitti è di vitale importanza per capire la riduzione e l'assorbimento dello shock che il fat pad è in grado di attuare.

Molti autori (Cavanagh *et al.*, Bennet e Ker) spiegano la diversità dei risultati tra le misurazioni in vivo ed in vitro assumendo che l'assorbimento energetico addizionale avvenga nel complesso piede, caviglia, ginocchio che è inevitabilmente preso in causa dai test in vivo. Secondo Aerts *et al.*(1996) testando l'ipotesi “della gamba inferiore” ,le grandi differenze tra isteresi e rigidità possono essere causati solo dall'influenza della parte inferiore della gamba. quindi in entrambi gli esperimenti di impatto ed MTS, dovrebbero palesare uguali caratteristiche di carico/deformazione quando eseguiti sugli stessi campioni isolati di cuscinetto calcaneare. Lo studio ha mostrato che, quando è effettuato correttamente, il test del pendolo mostra le stesse caratteristiche del test MTS sul cuscinetto isolato. Sono state trovate le stesse rigidità non lineari di circa 900 kN/m sotto carico di un peso corporeo medio, e dissipazione energetica dal 46.5 al 65,5 %. Questi valori differiscono di molto dai risultati *in vivo*, quindi l'ipotesi “della gamba inferiore” è stata supportata da questo studio (Aerts *et al.*, 1996). Pain et al. hanno testato l'ipotesi che il movimento del tessuto molle della tibia contribuisca significativamente all'attenuazione delle forze durante l'impatto del tallone. Per studiare questa ipotesi hanno effettuato una simulazione a computer del modello di impatto del pendolo che permette di separare l'effetto del cuscinetto calcaneare, le proprietà visco-elastiche dell'interfaccia del ginocchio, ed il movimento relativo dell'osso e dei tessuti molli che lo ricoprono. Lo studio ha trovato che l'introduzione di una massa oscillante, oltre all'ipotesi della gamba inferiore, nel modello, incrementa la perdita di energia durante l'impatto a quella trovata in vivo, e riduce la rigidità del fat pad, quindi la capacità della massa oscillante della tibia di assorbire energia durante l'impatto si è dimostrata significativa (Pain *et al.*, 2001). Infine Aerts et al. hanno testato l'ultima incertezza tra le misurazioni in vivo ed in vitro, comparando i risultati dei differenti test di compressione, eseguiti su di un piede successivamente liberato dai tessuti circostanti, e dimostrando che rimuovendo il fat pad da strutture come il calcagno e la pelle non se ne modificano le proprietà meccaniche (Aerts, *et al.*, 1995).

Un altro punto è la considerazione della dipendenza nel tempo delle proprietà meccaniche del cuscinetto calcaneare umano. Aerts et al. hanno notato variazioni delle proprietà del cuscinetto in compressione durante una sequenza di test.

La perdita di energia durante un ciclo di carichi e scarichi ha dato risultati contrastanti, come il test di impatto singolo (perdita 48%) contro le oscillazioni costanti (perdita 30%)(Ker, 1996) F.

Ker ha studiato questa discrepanza inserendo un periodo di riposo tra singoli cicli di compressione, applicando carichi intermittenti come avviene nella locomozione. Egli ha determinato la percentuale di dissipazione di energia in relazione al logaritmo del tempo di riposo trovando che l'energia dissipata è del 33% quando il tempo di riposo è di un secondo, mentre se il tempo di riposo aumenta di un fattore 10 la dissipazione di energia aumenta del 3,7%.

3.2.6 Lo studio del fat pad con i metodi di ricostruzione 3D

Il fat pad è organizzato sia in struttura che in composizione per sopportare gli stress di una normale attività fisica, inoltre permette di poter trasportare pesi senza particolari precauzioni. Questa abilità proviene dalla sua configurazione anatomica unica, quindi anche se le sue dimensioni sono relativamente piccole, il fat pad calcaneare gioca un ruolo importante nella riduzione delle forze di impatto generate dal contatto del tallone con il terreno.

Il cuscinetto calcaneare è implicato nella patogenesi di dolori acuti e cronici, in eventi traumatici, degenerativi o infiammatori, in malattie come il diabete e nelle sue complicanze, oggetto di questa tesi.

Quindi è probabile che ci sia un cambiamento della struttura anatomica del fat pad in una grande percentuale di questi pazienti. Oltre a questo il fat pad deve essere considerato nel design di una calzatura in grado di alleviare questi disagi, generati nel lungo periodo. Anche a fronte di questi importanti aspetti biomeccanici sono stati condotti solo pochi studi. Quindi in questa tesi ci occuperemo, con le tecniche di ricostruzione 3D di analizzare la struttura anatomica del fat pad sano e confrontarla con quella di un fat pad compromesso dalla malattia diabetica.

3.2.7 Il diabete mellito

Il diabete mellito è un disordine metabolico caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo dei carboidrati, dei grassi, e delle proteine risultanti dalla difettosità della secrezione insulinica, dell'azione insulinica, o di entrambe (Screening for type 2 diabetes, report of WHO and international Diabetes foundation meeting 2003). E' quindi una malattia metabolica cronica, molto complessa, che non permette all'organismo di trarre il giusto nutrimento dagli alimenti, nonostante questi siano regolarmente ingeriti. Ne consegue che le sostanze nutritive inutilizzate, ed in particolare il glucosio, si accumulano nel sangue. Le cellule, non potendo aver

accesso al glucosio, utilizzano altri nutrienti per produrre energia. Questi due meccanismi sono la causa dell'insorgenza delle complicanze, acute e croniche, tipiche del diabete mellito.

Il termine diabete fu coniato da Areteo di Cappadocia (81 - 133 d.C.). In greco antico il verbo *diabainein* significa "attraversare" (*dià*: attraverso; *baino*: vado) (F. Bernoville e Paolo Beck-Peccoz, 1999) alludendo al fluire dell'acqua, poiché il sintomo più appariscente è l'eccessiva produzione di urina. Nel Medioevo la parola fu "latinizzata" in *diabètés*. Il suffisso *mellito* (dal latino *mel*: miele, dolce) è stato aggiunto dall'inglese Thomas Willis nel 1675 per il fatto che il sangue e le urine dei pazienti diabetici avevano un sapore dolce, caratteristica peraltro conosciuta da lungo tempo da Indiani, (Ahmed AM. (aprile 2002) Greci, Cinesi ed Egiziani. La malattia era chiamata *Shoukachi* (malattia della sete) fino al XVIII secolo in Giappone.

Il diabete si manifesta con una serie di sintomi e segni quali iperglicemia, polidipsia, ovvero una sensazione di sete intensa, secondaria alla poliuria, dispepsia, stanchezza, perdita di peso, cefalea e nausea.

Per confermare un sospetto clinico di DM, è necessario che sia soddisfatto uno dei seguenti criteri varati dall'OMS (American Diabetes Association. (gennaio 2009). *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.. Diabetes Care. 32*).

- glicemia a digiuno superiore o uguale a 126 mg/dl (o 7 mmol/l);
- glicemia maggiore o uguale a 200 mg/dl (o 11,1 mmol/l) 2 ore dopo aver assunto per *os* 75 g di glucosio (*test di tolleranza al glucosio*);
- glicemia random maggiore o uguale a 200 mg/dl (o 11,1 mmol/l) e presenza di sintomi di iperglicemia (tra i quali poliuria e polidipsia). (American Diabetes Association)

3.2.7 Patologie correlate al diabete mellito

La storia clinica del diabete mellito è caratterizzata dalla comparsa di gravi e specifiche complicazioni, spesso inabilitanti, di natura cardiovascolare, neurologica e infettiva che interessano molteplici organi e apparati, tra cui i vasi sanguigni, i nervi, i reni e gli occhi.

Le complicazioni croniche, cioè quelle che insorgono nel corso di anni della malattia, sono molto frequenti nei diabetici di tipo 2 e si verificano principalmente a carico del sistema nervoso e

cardiocircolatorio. In particolare la compromissione dei vasi sanguigni, sia di piccolo che di grosso calibro, porta a danni che riguardano specifici organi: malattie cardiovascolari con fenomeni arteriosclerotici soprattutto a livello degli arti, alterazioni nella funzionalità renale, complicazioni oculari, disturbi ai nervi periferici e maggiore sensibilità alle infezioni cutanee e non. Esse dipendono dalla durata della malattia diabetica, dalla qualità del controllo glicemico, lipidico e dalla pressione arteriosa.

Quelle acute, invece, sono complicanze metaboliche e sono espressione dello scompenso glucidico nel paziente diabetico, cioè di uno stato di iperglicemia o di ipoglicemia. Riguardano principalmente i diabetici di tipo 1 e in molti casi sono la manifestazione di esordio della malattia stessa.

Le principali complicanze acute sono: la chetoacidosi diabetica, il coma iperosmotico e il coma ipoglicemico. Si tratta quindi di situazioni di grave pericolo per la stessa vita del paziente diabetico, che necessita del ricovero ospedaliero e di cure immediate ed efficaci.

3.2.7.1 La Microangiopatia

La microangiopatia diabetica interessa i piccoli vasi di diversi organi, i capillari, a livello dei quali il sangue cede ossigeno e sostanze nutritive ai vari tessuti. La causa di insorgenza delle patologie dovute alla microangiopatia è l'elevata concentrazione di glucosio nel sangue (iperglicemia) che, mediante l'esaltazione della vita dei polioli e la glicazione non enzimatica delle proteine, causa l'ispessimento ialino della membrana basale di arteriole e capillari. I piccoli vasi, e soprattutto i capillari della retina, dei glomeruli e dei *vasa nervosa*, acquistano quindi una struttura irregolare e rigida, che non assicura l'adeguata perfusione di tutti i tessuti. L'alterata produzione di proteine glicosilate favorisce inoltre l'aumento della permeabilità vasale con conseguente accumulo patologico di materiale plasmatico a livello dello spazio pericapillare, con conseguente edema cronico.

Numerosi ed importanti trial clinici hanno ormai confermato il ruolo eziopatogenico dell'iperglicemia cronica nell'incidenza delle complicanze microvascolari nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 e 2. Le possibili cause dell'iperglicemia sono legate all'eccessiva assunzione di alimenti ricchi di zuccheri, all'errore terapeutico, all'esercizio fisico e allo stress fisico o psicologico. Anche i farmaci possono essere causa di iperglicemia: alcuni antipsicotici atipici, come la clozapina e la olanzapina inducono un'iperglicemia reversibile e non dipendente dalla dose di farmaco somministrata; il trattamento con fluoroxetina, un antidepressivo, può causare

invece una alterazione del controllo glicemico ed iperglicemia in seguito alla sospensione del trattamento.

In particolare l'incidenza di complicazioni a livello vascolare risulta correlata ai valori di emoglobina glicata, cioè l'emoglobina a cui il glucosio circolante si è legato grazie ad una glicosilazione non enzimatica, dipendente solo dalla concentrazione di glucosio. Il test dell'emoglobina glicata permette di evidenziare l'andamento medio della concentrazione del glucosio nel sangue nei due, tre mesi precedenti il prelievo (vita media di un eritrocita 120 giorni). Importanti studi clinici hanno messo in evidenza come, mantenendo i valori di emoglobina glicata inferiori al 7% si riduce il rischio di complicanze dovute all'iperglicemia. Nei soggetti sani invece, il valore di emoglobina glicata è pari a circa il 5%

Le principali manifestazioni cliniche della microangiopatia diabetica sono la retinopatia, la neuropatia, la nefropatia e la dermatopatia diabetica.

3.2.7.2 La Neuropatia Diabetica

La neuropatia diabetica comprende un gruppo di sindromi cliniche e subcliniche, ognuna delle quali è caratterizzata da un danno diffuso o focale alle fibre nervose autonome o somatiche periferiche derivante dal diabete mellito (Dyck *et al.*, 1993). Viene inoltre definita come la presenza di sintomi e/o segni di disfunzione nervosa periferica nei pazienti diabetici dopo esclusioni di altre cause (Boulton *et al.*, 1998).

I nervi sono unità pluritissutali formate da fibre nervose riunite in fasci separati tra loro da tessuto connettivale. Sono provvisti di vasi (arteriosi, venosi, linfatici) e di fibre nervose per i vasi stessi ed il tessuto connettivo, rispettivamente detti vasa, e vasa nervorum. Le fibre nervose si distinguono in fibre afferenti o sensitive, che portano al cervello gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno e dal resto dell'organismo e in fibre efferenti o motorie, deputate alla trasmissione degli stimoli agli organi periferici. Infine le fibre nervose autonome controllano le funzioni indipendenti dalla volontà, come ad esempio il battito cardiaco e la peristalsi intestinale. I sintomi della neuropatia sono correlati al tipo di fibra nervosa colpita e alla gravità della patologia: debolezza agli arti (nervi motori); intorpidimento, formicolio, dolore (nervi sensitivi); assenza del senso di posizione, instabilità, vertigini, diarrea (nervi autonomici).

I principali fattori di rischio di neuropatia diabetica sono l'iperglicemia scarsamente controllata, la durata della malattia diabetica, l'appartenenza al sesso maschile, l'ipertensione arteriosa, il

fumo di sigaretta e l'abuso delle sostanze alcoliche, la dislipidemia e la macroangiopatia.

Dal punto di vista istopatologico, esistono diversi meccanismi alla base del danno e della degenerazione delle fibre nervose. Più specificatamente il danno può riguardare l'assone o il rivestimento mielinico delle fibre. Nel primo caso si parla di degenerazione assonale, la quale si manifesta con la perdita di fibre in seguito ad interruzione dell'assone o del nervo (Degenerazione Walleriana -Augustus Volney Waller, 1816-1870), in seguito ad alterazione del metabolismo neuronale, che determina una riduzione dell'apporto ematico a livello della fibra nervosa. Il processo di demielinizzazione, invece, riguarda principalmente le cellule di Schwann ed è secondaria ad una alterazione metabolica o ad un processo infiammatorio. Il danno a carico della cellula di Schwann risulta, in particolare, causato dall'assorbimento di gocce lipidiche all'interno della cellula con conseguente ispessimento della membrana basale.

La forma neuropatica più frequente diagnosticata nei pazienti diabetici è la “polineuropatia sensitivo-motoria simmetrica distale”, simmetrica perchè interessa sia la parte destra che la parte sinistra del corpo, distale perchè colpisce con più frequenza le estremità inferiori del corpo. Si presenta con la progressiva diminuzione della sensibilità alle stimolazioni tattili, termiche e dolorifiche; parestesie e dolori muscolari profondi soprattutto durante la notte; insensibilità ai traumi nelle fasi avanzate. Questa forma di neuropatia può inoltre portare alla deformità del piede, come il piede a martello o il piede di Charcot. La neuropatia autonoma è, invece, meno frequente, e colpisce i nervi che controllano le ghiandole sudoripare, il tubo digerente, la pressione sanguigna e la frequenza cardiaca. I sintomi variano in base al nervo colpito: tachicardia, ipertensione ortostatica, stipsi e/o diarrea, profusa sudorazione durante la notte o i pasti. Frequenti sono anche i disordini che interessano l'apparato urogenitale, tra cui la disfunzione erettile nell'uomo, ed una ridotta lubrificazione vaginale nella donna, dovute all'inibizione selettiva dell'innervazione genitale parasimpatica.

3.2.7.3 Macroangiopatia

Il termine macroangiopatia diabetica fa riferimento alle alterazioni funzionali e strutturali a carico dei vasi sanguigni di medio e grosso calibro. Si tratta di un processo di aterosclerosi che interessa in particolare i vasi arteriosi coronarici e periferici (arteria poplitea, pedidia e tibiale posteriore), non diverso da quello che colpisce i pazienti non diabetici, ma che presenta un decorso più rapido. L'aterosclerosi è definita dall'organizzazione mondiale della sanità come una combinazione variabile di alterazioni dell'intima delle arterie (tenute distinte dalle arteriole)

consistenti nell'accumulo focale di lipidi, in modo particolare colesterolo e carboidrati complessi, sangue e suoi derivati, tessuto fibrinoso e depositi di calcio ed associate modificazioni della tunica media. Man mano che il rivestimento interno dell'arteria diventa sempre più spesso, per la presenza della placca arteriosclerotica, il vaso sanguigno si restringe, ed il flusso di sangue si riduce. Inoltre, la placca fibrosa, una volta formatasi, può andare incontro ad emorragie e ulcerazioni o a fenomeni di ostruzione ed occlusione del normale flusso sanguigno, che possono determinare l'insorgenza di emboli o trombi. Una delle caratteristiche dell'arteriosclerosi è proprio quella di rimanere silente fino alla comparsa di trombosi ed embolie che possono causare ischemia, dovuta all'occlusione totale del vaso arterioso.

Alla base del processo aterosclerotico ci sono condizioni quale iperglicemia, iperinsulinemia, insulino-resistenza, e alterazione del profilo lipidico, che contribuiscono alla comparsa di una disfunzione endoteliale. Tale disfunzione è caratterizzata da una serie di modificazioni strutturali e funzionali a carico dell'endotelio che perde la sua funzione fisiologica di modulazione del tono e di rimodellamento della struttura vasale. In particolare un'alterata vasodilatazione ossido nitrico-mediata favorisce l'aggregazione piastrinica (favorendo eventuali trombosi), l'adesione dei monociti e la migrazione delle cellule muscolari lisce. La disfunzione è caratterizzata quindi da vasocostrizione, da attività pro-coagulante e dal reclutamento di cellule infiammatorie che stimolano la crescita della placca mediante rilascio di fattori di proliferazione e migrazione che agiscono sulle cellule muscolari lisce. Altri fattori possono favorire il processo aterosclerotico tra cui l'ipertensione, l'obesità in associazione a iperlipidemia e/o ipertensione, il fumo di sigaretta e fattori familiari.

3.2.8 Il piede diabetico

Il piede viene normalmente definito come l'ammortizzatore della macchina umana: è infatti la struttura portante del corpo, il cui compito è quello di distribuire sul terreno i carichi che derivano dal suo movimento. I piedi e gli arti inferiori assolvono alcune funzioni dinamiche molto importanti, quali il mantenimento della stazione eretta, dell'equilibrio e la deambulazione. Inoltre la contrazione dei muscoli dei piedi e della gamba, nonché la compressione plantare durante l'appoggio, facilitano il ritorno venoso del sangue e la circolazione linfatica.

La struttura ossea del piede comprende ventisei ossa, ventotto se si contano le ossa sesamoidi. Essa inizia a livello dell'osso della caviglia, l'astragalo e viene suddivisa, sia dal punto di vista

anatomico che da quello strutturale in tre porzioni distinte: tarso, cioè la parte posteriore del piede formata da: calcagno, astragalo, scafoide, cuboide e ossa cuneiformi; metatarso, la parte intermedia del piede è formata da cinque ossa: falangi, anche dette ossa delle dita. I tendini sono tessuti elastici, costituiti da fibre di collagene, che collegano i muscoli alle ossa e alle articolazioni. A livello del piede il tendine di Achille è sicuramente il più importante e congiunge il muscolo del polpaccio al calcagno. Esso consente di camminare, correre, saltare e salire in punta dei piedi. Sono presenti inoltre numerosi legamenti, robuste strutture fibrose, che collegano tra loro le ossa ed impediscono che particolari movimenti o traumi alterino le posizioni delle ossa a cui sono collegati. I nervi presenti a livello del piede sono costituiti dalla diramazione delle branche del nervo statico e in particolare lo sciatico-popliteo interno che innerva la regione dorsale e lo sciatico popliteo interno che innerva il tendine d'achille e la regione plantare. La vascolarizzazione è particolarmente ricca a livello del tallone, del metatarso e dei polpastrelli delle dita, e costituisce, insieme all'adipe, una sorta di cuscinetto ammortizzatore che assorbe i colpi con il terreno (fat-pad). L'arteria pedidia, che costituisce la continuazione dell'arteria tibiale anteriore, irrorla la regione dorsale, mentre l'arteria tibiale posteriore irrorla la zona plantare del piede. La circolazione venosa, invece, è costituita da una rete profonda, che drena circa il 90% del sangue, e da una rete superficiale, che drena il restante 10%. Le vene superficiali decorrono nello spessore del connettivo sottocutaneo e convogliano nella rete profonda, attraverso una fitta rete di vasi anastomizzati, il sangue raccolto dai tessuti sovralfasciali. Anche i vasi linfatici vengono suddivisi in profondi, i quali seguono la rete sanguigna profonda, e superficiali.

Nella stazione eretta si distinguono tre punti di appoggio plantare, su cui poggia l'intero peso del corpo.

Sono localizzati rispettivamente:

a livello della testa del primo osso metatarsale e dalle ossa sesamoidi sottostanti

alla testa del quinto osso metatarsale

alla base del calcagno.

Tra questi tre punti d'appoggio si formano tre archi: l'arco longitudinale interno che si estende dal calcagno alla testa del primo metatarso, la sua funzione è quella di assorbire ed attenuare le sollecitazioni ed i colpi; l'arco longitudinale esterno, che si estende dalla parte anteriore del calcagno alla testa del quinto metatarso; l'arco trasversale, localizzato alla base delle cinque ossa

metatarsali.

3.2.8.1 La definizione di piede diabetico

Nel 1998 l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha definito il piede diabetico come una condizione di infezione, ulcerazione, e/o distruzione di tessuti profondi associata ad anomalie neurologiche ed a vari gradi di vasculopatia periferica degli arti inferiori. Questa definizione è poi stata rivista nel 2001, nel documento internazionale sul Piede Diabetico in cui si parla di: “piede con alterazioni anatomo-funzionali determinate dall'artereopatia occlusiva periferica e/o dalla neuropatia diabetica”. La definizione è stata quindi estesa anche al piede privo di lesioni ma ad alto rischio di ulcerazione e/o infezione.

I piedi, soprattutto quelli diabetici possono andare incontro a diversi tipi di lesione, in particolare ulcere, che sono secondarie ad una alterata circolazione sanguigna e/o ad una modificazione della sensibilità nervosa a livello degli arti inferiori. L'ulcera è una soluzione di continuo della cute che può coinvolgere l'epidermide, il derma, l'ipoderma, i tendini, il tessuto muscolare e le sottostanti strutture legamentose, cartilaginee e ossee (ulcera profonda). Una classificazione delle ulcere è stata proposta da Wagner nel 1983:

grado 0: Assenza di ulcera ma piede a rischio

grado 1: superficiale

grado 2: ulcera ai legamenti, tendini, senza interessamento osseo

grado 3: ulcera profonda con infezione e osteomielite

grado 4: gangrena localizzata

grado 5: gangrena diffusa

L'ulcera diabetica è considerata una lesione cronica, cioè una lesione che non tende verso la guarigione.

La presenza concomitante di fattori quali agenti infettivi, anemia, malnutrizione, carente apporto di sangue e neuropatia, inibiscono il normale processo di guarigione. Questi fattori inoltre, rappresentano un elemento predittivo per l'esito dell'ulcera, che se non opportunamente curata può infettarsi od evolvere in una gangrena, che a sua volta può richiedere l'amputazione. Si stima infatti che l'85% di amputazioni degli arti inferiori nei pazienti diabetici sia dovuta a questi

fattori. La causa principale di ulcerazione è la perdita di sensibilità a livello dei piedi, conseguenza della neuropatia sensitiva, che porta il soggetto diabetico a non rendersi conto di microtraumi o lesioni a carico della cute. I ripetuti traumi sono spesso imputabili a calzature non idonee, troppo strette, al mancato utilizzo o alla presenza di un oggetto all'interno delle calzature stesse. Allo sviluppo di ulcere possono essere anche associate situazioni di deformità del piede ed ipercheratosi. La condizione socioeconomica del diabetico, inoltre, e la particolare scarsa possibilità di accesso alle cure, la trascuratezza e la mancanza di un'educazione sanitaria, rappresentano ulteriori fattori di rischio per lo sviluppo di ulcere. Un importante elemento che concorre alla patogenesi del piede diabetico è la ridotta resistenza alle infezioni, le ulcerazioni infatti possono complicarsi con l'insorgere di fenomeni infettivi. L'aumentata predisposizione alle infezioni dei soggetti diabetici è probabilmente causata dalla ridotta funzione dei linfociti T di tipo helper e da anomalie del funzionamento dei polimorfonucleati in conseguenza dello squilibrio metabolico alla base della malattia diabetica. Inoltre l'ispessimento della parete dei vasi e la disfunzione endoteliale, imputabili al fenomeno arterosclerotico, rallentano la migrazione leucocitaria e possono certamente compromettere la risposta antinfiammatoria in generale. Le infezioni superficiali, meno gravi, sono causate da singoli microrganismi gram positivi, quali *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus piogenes*. Le infezioni gravi, che coinvolgono le strutture dei tessuti profondi e necessitano di essere trattate chirurgicamente, sono usualmente polimicrobiche e causate da batteri anaerobi e bacilli gram negativi.

La pelle secca e fragile del paziente diabetico e i ripetuti microtraumi, costituiscono una soluzione di continuità che favorisce inoltre l'ingresso di microrganismi opportunisti, che vivono normalmente sulla pelle, e che non sono generalmente virulenti. Si tratta di batteri, lieviti e funghi che, in condizione di particolare immunodeficienza, sono in grado di superare la membrana meccanica della pelle dell'organismo ospite, causando un'infezione. Una volta instauratasi l'infezione possono distinguersi due casi clinici:

-Piede diabetico infetto acuto: viene definito con termini anglosassoni quali: limb-threatening infection e life-threatening infection e richiede un intervento chirurgico urgente per la rapida comparsa di complicanze quali fascite necrotizzante, ascessi, flemmoni, gangrena secca e gassosa.

-Piede diabetico infetto cronico: caratterizzato da fenomeni infettivi a carico dei tessuti molli e delle ossa.

Nel piede diabetico sono soprattutto le ulcere localizzate a livello plantare e nello spazio

interdigitale a infettarsi e questo è in parte dovuto alla presenza di numerose ghiandole sudoripare. Nonostante sia raramente la causa diretta di un'ulcera, l'infezione nel piede diabetico è una condizione che aumenta notevolmente il rischio di amputazione. Si stima comunque che le infezioni siano la causa immediata di amputazione effettuata a livello della coscia, in una percentuale che va dal 30 al 50 % dei pazienti diabetici.

3.2.8.2 Il piede neuropatico

Nel paziente diabetico molto spesso la neuropatia interessa, in grado diverso, tutte e tre le componenti nervose: i nervi sensitivi, che trasmettono al sistema nervoso centrale gli stimoli che riguardano la temperatura, il dolore, il tatto e la pressione esercitata sul terreno; i nervi motori, responsabili dei movimenti volontari, tra cui la deambulazione; i nervi autonomici o vegetativi, che lavorando autonomamente sono responsabili della sudorazione, del trofismo della pelle, dell'idratazione cutanea e della temperatura. Si parla quindi rispettivamente di neuropatia sensitiva, motoria, autonoma. Nel piede neuropatico la neuropatia diabetica ha modificato l'equilibrio muscolare, l'autoregolazione vegetativa e la percezione degli stimoli esterni a livello del piede. La neuropatia diabetica viene molto spesso definita come "polineuropatia bilaterale simmetrica", in quanto interessa più nervi periferici ed interessa entrambi gli arti inferiori. La neuropatia sensitiva si manifesta con una riduzione della sensibilità degli stimoli dolorifici e di natura termica. L'aumentata soglia del dolore è il più importante fattore di rischio per l'ulcerazione del piede. L'assenza della sensazione dolorifica consente infatti ad un trauma di perdurare nel tempo e determinare un danno o una lesione tissutale senza che il paziente se ne accorga. La principale causa di ulcerazione è l'utilizzo di calzature non idonee, ad esempio tanto strette da determinare uno sfregamento della cute. Anche l'abitudine di camminare scalzi può risultare allo stesso modo dannosa. La comparsa di vesciche, bolle e piccoli graffi può portare facilmente all'ulcerazione. L'ulcerazione è altresì favorita dalla vicinanza a fonti di calore non correttamente rilevato a causa della neuropatia, (piedi davanti al caminetto, scaldini per letti, etc). Anche gli oggetti utilizzati per la pedicure, quali forbicine, limette, etc, possono essere veicolo di infezione.

La principale manifestazione della neuropatia autonoma a livello dei piedi è, invece, l'anidrosi della cute, dovuta al danno a carico delle fibre post-gangliari che innervano le ghiandole sudoripare. L'anidrosi comporta una modifica del pH della cute e favorisce il formarsi di fessurazioni che costituiscono la via d'ingresso principale di microorganismi patogeni. Un altro

importante aspetto della neuropatia autonómica è la presenza di edema a livello del piede e della gamba, conseguenza dell'alterata regolazione del microcircolo. Il sistema autonomico simpatico, infatti, determina una vasocostrizione a livello delle arteriole e controlla il flusso sanguigno cutaneo attraverso le anastomosi artero-venose. La perdita del tono simpatico comporta l'aumento del flusso sanguigno nella gamba affetta da neuropatia, l'aumento della pressione idrostatica e della permeabilità capillare, meccanismi alla base dell'edema. Il mancato controllo simpatico nella neuropatia autonómica è anche il fattore determinante nella comparsa della sclerosi di Monckeberg. La sclerosi di Monckeberg è una patologia correlata all'invecchiamento ma che compare precocemente nei diabetici. Consiste nella progressiva calcificazione della tunica media dei vasi arteriosi, soprattutto di quelli localizzati a livello degli arti inferiori. Costituisce, insieme all'arteriosclerosi, la più comune e frequente malattia che colpisce le arterie. Al contrario della arteriosclerosi, non causa ischemia, in quanto non c'è ostruzione del vaso, ma è responsabile dell'irrigidimento delle arterie.

La neuropatia riguarda, invece, le fibre nervose che innervano i muscoli del piede. Il danno nervoso determina atrofia muscolare, in particolare dei muscoli flessori plantari delle dita del piede. Si viene a creare in questo modo uno squilibrio tra i muscoli estensori e quelli flessori, a cui consegue una deformazione della struttura del piede. In particolare si osservano modificazioni quali: dita a martello, in cui l'articolazione metatarso-falangea è ipertesa mentre l'interfalangea prossimale corrispondente è iperflessa, che interessa comunemente il secondo dito; dita ad artiglio, in cui l'articolazione metatarso-falangea è ipertesa mentre l'interfalangea distale e l'interfalangea prossimale sono iperflesse; alluce valgo; piede piatto, che consiste nell'appiattimento della volta plantare; piede cavo; dita sovrapposte.

Mentre nel piede sano il peso corporeo è distribuito in maniera uguale tra i tre punti di appoggio plantare, le deformità conseguenti all'atrofia dei muscoli flessori comportano, invece, un'alterazione della superficie di appoggio del piede. Tale alterazione è responsabile di un ipercarico nei punti prominenti del piede, spesso sprovvisti di cuscinetto di grasso, durante la deambulazione. In corrispondenza di questi punti si determina una situazione di callosità, definita ipercheratosi. Si tratta di un fenomeno di ispessimento dell'epidermide, causato dall'eccessivo stress meccanico. Inoltre, in corrispondenza dei punti sottoposti a maggior pressione, al perdurare della situazione di ipercarico, compaiono emorragie sottocutanee da schiacciamento e fenomeni infiammatori che possono determinare necrosi tissutale e fessurazione della cute, con conseguente formazione di un'ulcera che può, a sua volta, infettarsi.

3.2.8.3 Il piede di Charcot

Il piede di Charcot o osteoartropatia neuropatica è una delle complicanze più gravi del piede diabetico. Si tratta di una forma di neuroartropatia che viene riscontrata nel 9-12% dei diabetici affetti da una neuropatia periferica. E' quasi sempre causato da un trauma, quale una caduta o una distorsione della caviglia, estrinseco al piede neuropatico. Nello stadio acuto il piede si presenta infiammato, caldo, eritematoso e tumefatto. Successivamente si evidenzia una progressiva frammentazione dell'osso e delle articolazioni. Tipico della malattia è il collasso dell'arco longitudinale interno del piede, che porta ad una grave deformità del piede stesso. Inoltre, il collasso dell'arco, è responsabile della formazione di punti di iper carico a livello plantare, aumentando il rischio di ulcerazione dovuto a stress meccanico. Se non vengono intraprese le necessarie misure preventive e terapeutiche, la progressiva distruzione della struttura morfofunzionale del piede porta, quasi inevitabilmente, alla necessità di amputazione dell'arto.

3.2.8.4 Il piede Ischemico

La vasculopatia periferica arteriosa è la manifestazione clinica dell'aterosclerosi degli arti inferiori. Nei pazienti diabetici il fenomeno aterosclerotico, meccanismo eziopatogenico alla base della vasculopatia, è simmetrico, distale, interessa entrambi i sessi e si localizza prevalentemente a livello dei vasi arteriosi al di sotto del ginocchio. La vasculopatia periferica arteriosa colpisce con maggior frequenza l'arteria tibiale, quella femorale, e quella poplitea. Inoltre la presenza di fattori di rischio concomitanti, frequenti nel diabetico, fa sì che la patologia abbia un decorso decisamente più rapido e precoce rispetto ai soggetti non diabetici. Spesso infatti la vasculopatia è già presente al momento della diagnosi di diabete di tipo 2 e, dopo 10-15 anni di malattia diabetica oltre il 30% dei pazienti presenta *claudicatio intermittens* e calcificazioni diffuse della tonaca media.

La classificazione di Lèrichè – Fontaine, permette di suddividere la patologia in quattro stadi:

- I stadio: identificato come uno stadio pre-clinico di malattia oclusiva arteriosa senza sintomi clinici. Si caratterizza per la comparsa di una sensazione di freddo ai piedi, diminuzione della sudorazione e assenza dei polsi arteriosi periferici;
- II stadio: insufficienza arteriosa relativa, caratterizzata da dolore e da sforzo (*claudicatio*

intermittens), assenza dei polsi arteriosi periferici , distrofia degli annessi cutanei e pallore:

- III stadio: insufficienza arteriosa assoluta, con presenza di dolore ischemico a riposo;
- IV stadio: in cui compaiono lesioni ischemiche e dolore violento.

I sintomi iniziali, tra i quali torpore e parestesie, risultano spesso trascurabili e non avvertibili dal diabetico. Si ritiene infatti che l'assenza di sintomi possa essere causata dalla perdita di sensibilità agli arti inferiori, secondaria alla neuropatia.

La tipica manifestazione clinica della *claudicatio intermittens* è rappresentata da un dolore crampiforme localizzato principalmente a livello del polpaccio per interessamento dell'arteria poplitea. Il dolore si localizza invece a livello del fianco o della natica quando il fenomeno interessa l'arteria iliaca. Il dolore dell'arto insorge durante il cammino, verificandosi costantemente dopo una certa distanza percorsa, ed è conseguente ad insufficiente flusso sanguigno a livello muscolare. La soglia dolorosa varia in base a diversi fattori, quali la velocità di marcia e la pendenza del terreno. Si ha remissione della sintomatologia dolorosa in seguito a sospensione dell'attività fisica. Nei casi più gravi, però, il dolore si manifesta anche dopo aver percorso distanze molto brevi e persiste anche in uno stato di riposo (III stadio di Lèrichè – Fontaine), dovuto alla carente ossigenazione dei tessuti (ischemia critica).

A livello del piede le lesioni ischemiche (IV stadio di Lèrichè – Fontaine) sono localizzate soprattutto a livello delle dita, dei punti di sfregamento con la calzatura e del calcagno. I principali segni di ischemia sono il colorito pallido/cianotico dei piedi e la cute fredda al tatto, secca e desquamata. Sono presenti ulcerazioni periungueali e interdigitali dovute alla ridotta perfusione cutanea distale, zone necrotiche e gangrena secca. La cute fragile, disidratata e macerata a livello interdigitale favorisce l'ingresso di microorganismi infettanti con formazione di gangrena umida e talvolta gassosa, con elevato rischio di sepsi.

4 Materiali e Metodi

4.1 Istologia in vivo

4.1.1 Analisi in Risonanza Magnetica

Sono stati usati ratti maschi di 2 mesi di età. Per l'analisi NMR, dopo aver anestetizzato gli animali, in un box di pre anestesia, con una miscela di aria, ossigeno e il 5% di isofluorano, i ratti sono stati messi in posizione prona, su un lettino *custom* da noi progettato, e tenuti anestetizzati con una miscela di aria e ossigeno contenente il 2, 2,5% di isofluorano (Forane, Abbott spa, Italy)

Tutti gli esperimenti sono stati fatti con:

Magnete al boro 4,7T 33cm orizzontale (Oxford Ltd, UK)

Magnete di gradiente 20 G/m

Workstation HP RHE3 linux

72mm birdcage volume coil and a helmet shaped surface coi

Risuonatore birdcage usato per trasmissione

Ricezione con bobina di superficie ottimizzata per il cervello di ratto, ben ancorata alla testa dell'animale

T1-weighted 3D FLASH (FOV 4x4x4cm³, TR = 25ms, TE = 3.5ms, MTX = 256x128x128)

Le immagini sono state raccolte per avere un immagine volumetrica del cervello di ratto con una grandezza di voxel di : 0.0137x0.0273x0.0273 cm.

4.1.2 Preparazione prodotti chimici

Una soluzione tampone da 100mM è stata preparata sciogliendo 1,63 g di BICINE (minimum 99% titration, batch #066K5407, Sigma – Aldrich, Inc) in 100 ml di acqua distillata, il pH è stato portato a 7,4 per neutralizzare l'acidità della soluzione e successivamente è stato aggiunto MnCl₂ nella concentrazione di 270 mM (5.34g/100ml) ed iniettato in una dose di 0.2mmol/kg (73µl/100g)

La dose di cloruro di manganese è stata separata in due somministrazioni per ridurre gli effetti collaterali riscontrati sugli animali subito dopo l'iniezione. Sono stati osservati danni alla pelle, con epistassi e sanguinamento attorno al sito di iniezione, ed un comportamento anomalo. Dilazionando le iniezioni in due volte questi sintomi si sono notevolmente ridotti.

4.1.3 Analisi Virtuale: Segmentazione

Dopo essere stati acquisiti i dati sono stati processati con il software ITK SNAP (<http://www.itksnap.org/>) ; SNAP è una applicazione software usata per segmentare strutture anatomiche o funzionali in immagini mediche 3D. Fornisce metodi di segmentazione semiautomatica usando il metodo dei contorni, e dello snake expansion, inoltre fornisce gli strumenti per la rifinizione manuale della segmentazione.

L'immagine è stata prima preprocessata per aumentare il contrasto, quindi, ghiandola per ghiandola, segmentata usando una etichetta diversa per ogni ghiandola. E' stato usato l'algoritmo di region growing, rifinendo poi in un secondo passaggio, manuale, la segmentazione slice per slice. Il programma al tempo di questo studio (2007) non era ancora maturo e stabile, quindi questo ha portato via molto tempo cercando di evitare i crash di sistema e la perdita dei dati. Una volta che tutte le strutture sono state marcate, l'intero data set è stato analizzato da uno staff medico, che ha riconosciuto le varie ghiandole comparandole a quelle esistenti in bibliografia. Ogni etichetta della segmentazione è stata poi convertita in un modello mesh in SNAP, ed esportata utilizzando il formato proprietario .VTK (Visualization Toolkit). SNAP è stato anche usato per esportare degli screenshot dell'intero "organo salivare" per permettere di ben identificare il collocamento spaziale delle varie strutture che lo compongono.

4.1.4 Conversione dei dati:

Lo studio della struttura del file ha rivelato che il file .VTK è di tipo Polygon Data File. E' stato scritto uno script in Tcl per chiamare specifiche librerie del Visualizaton Tool Kit (VTK). Il VTK è un set di librerie Open source, liberamente disponibili, per la computer graphics 3D, per l'immagine procession, e la visualizzazione usato da migliaia di ricercatori e sviluppatori nel mondo. I poligoni sono stati smussati in 10 iterazioni usando un fattore di rilassamento 0,01 ed un feature angle di 45°, dopodichè è stata creata la mesh di triangoli, ed infine i dati salvati in un file .STL

lo standard de facto per la stereo litografia.

4.1.5 Mesh smoothing:

Il file .STL generato usando il file .VTK è stato successivamente importato in MeshLab (meshlab.sourceforge.net). MeshLab è un sistema portatile, estendibile, open source per il processing e l'editing delle mesh triangolari 3D non strutturate, provvedendo a strumenti per editare, pulire, riparare, ispezionare, renderizzare e convertire questo tipo di mesh.

I buchi sono stati riempiti se necessario, e gli artefatti smussati, il tutto sempre sotto il controllo dello staff medico, le superfici nascoste ed i dati superflui rimossi. Alla fine del processo il modello è stato riesportato in .STL pronto per la stampa tridimensionale.

4.1.6 Stampa stereolitografica:

I modelli 3D delle singole ghiandole sono state infine stampate usando una Objet (www.2objet.com) Eden 330 usando la resina Fullcure 720. Questo tipo di stampante usa la tecnologia polyjet, le cartucce sono riempite con una resina che polimerizza per esposizione a luce ultravioletta, ad ogni passaggio l'asse di stampa Z si abbassa, per creare oggetti solidi dai modelli tridimensionali, permettendo alla stampante di creare oggetti che possono essere “toccati con mano” dallo staff medico.

4.2 Analisi del fat-pad

4.2.1 Analisi in TAC multislice a spirale

Grazie alla collaborazione con l'ospedale Borgo Roma di Verona e con l'ospedale di Rovigo sono state acquisite delle TAC ad alta risoluzione dei piedi di pazienti sani e di pazienti diabetici. L'ospedale di Verona ha fornito le TAC di pazienti non affetti da diabete mentre l'ospedale di Rovigo quelle di pazienti affetti da diabete. Come maschera di acquisizione è stata utilizzata quella per osso e per tessuti molli. E' da precisare che la modalità di acquisizione è stata concordata con il tecnico radiologo. Infatti, bisogna considerare che la macchina per le TAC è utilizzata in ambito clinico, dove lo scopo principale è la finalità diagnostica. Al fine di ottenere una corretta ricostruzione dei tessuti è importante che la risoluzione sugli assi x ed y, sia quanto più possibile congruente con quella lungo l'asse z. Anche se il software di ricostruzione ricalibra il modello sull'effettiva grandezza del voxel, avere i voxel quadrati, e di dimensione più piccola possibile, rende migliore la risoluzione e l'isotropia dell'informazione, permettendo analisi più accurate. Un altro aspetto da considerare è il centraggio corretto del dettaglio da analizzare nel

campo di visione (field of view, fov). La risoluzione finale del modello, dipende dalla risoluzione dell'immagine tomografica, ma anche da quanto il dettaglio di interesse "occupa" all'interno dell'immagine. Se per uso diagnostico un soggetto scentrato e piccolo rispetto al campo di ripresa può essere sufficiente, non è lo stesso per avere un buon modello in uscita. Le immagini sono state quindi acquisite massimizzando la centratura e lo zoom del dettaglio all'interno del campo di visione, e massimizzando la risoluzione anche sull'asse z.

4.2.2 Analisi Virtuale: Segmentazione

Grazie alle nuove apparecchiature TAC, quali la multislice 64 strati si riescono ad ottenere immagini di qualità e risoluzione superiori, ovviando al contempo anche agli artefatti temporali. Il rovescio della medaglia è che i dati disponibili per l'elaborazione sono di dimensioni notevoli e si è dovuto perciò lavorare al fine di arrivare ad una configurazione hardware/software in grado di elaborarli. L'ambiente di lavoro utilizzato per le ghiandole salivari di ratto si è rivelato non *compliant* per il lavoro sul fat pad. Le dimensioni eccessive dei file mandavano in *crash* il sistema impedendo una qualsiasi elaborazione, non si riusciva nemmeno a caricare le immagini. Al fine di poter elaborare le immagini è stato necessario abbandonare Windows, che non riusciva ad allocare correttamente la memoria (risoluzione elevata della tac multislice/64) causando *crash*, e passare al sistema operativo Linux. E' stata preparata una *workstation* con 8 gigabyte di RAM, per permettere il corretto caricamento dei dati molto voluminosi, e dotata di sistema operativo Ubuntu. E' stato utilizzato il software ITK Snap 2.1 per la segmentazione e la creazione dei modelli 3D del fat pad. Per le misurazioni invece è stato utilizzato il software OSIRIX, che permette un rendering volumetrico, con la possibilità di affettare e misurare sezioni e particolari; l'applicazione OSIRIX ha richiesto l'uso di un sistema Mac.

4.2.3 Misurazioni

Grazie ad Osirix sono stati visualizzati e misurati gli spessori del fat pad nel piede di soggetti sani. A questa immagine è poi stata affiancata quella dei pazienti affetti da diabete mellito e sono state confrontate le immagini. È inoltre possibile, qualora si desideri, l'analisi con un CAD effettuando le misurazioni sul modello 3D .STL generato dal software di segmentazione (ITK Snap).

4.2.5 L'analisi TAC del piede diabetico

Grazie ai software ITK Snap e OSIRIX sono stati analizzati i dati provenienti dalle TAC ad alta risoluzione. Si è evidenziata una differenza, tra paziente sano e paziente malato, della struttura dei setti fibrosi e del grasso in essi contenuti. Nel soggetto sano i setti sono chiari, ad indicare il tessuto fibroso, ed il contenuto è scuro, ad evidenziare il tessuto grasso. Nel malato sono stati analizzati gli stessi dettagli a parità di impostazioni di scansione, di risoluzione, di contrasto e luminosità (vedi figura). Il malato presenta i setti di un bianco meno intenso, sfibrati, e le cellette contenenti il tessuto adiposo presentano invece una colorazione biancastra, probabilmente dovuta alla cronicità del fenomeno infiammatorio che porta alla formazione di tessuto fibroso.

5 Risultati

5.1 Risonanza magnetica con traccianti: l'idea dell'istologia in vivo

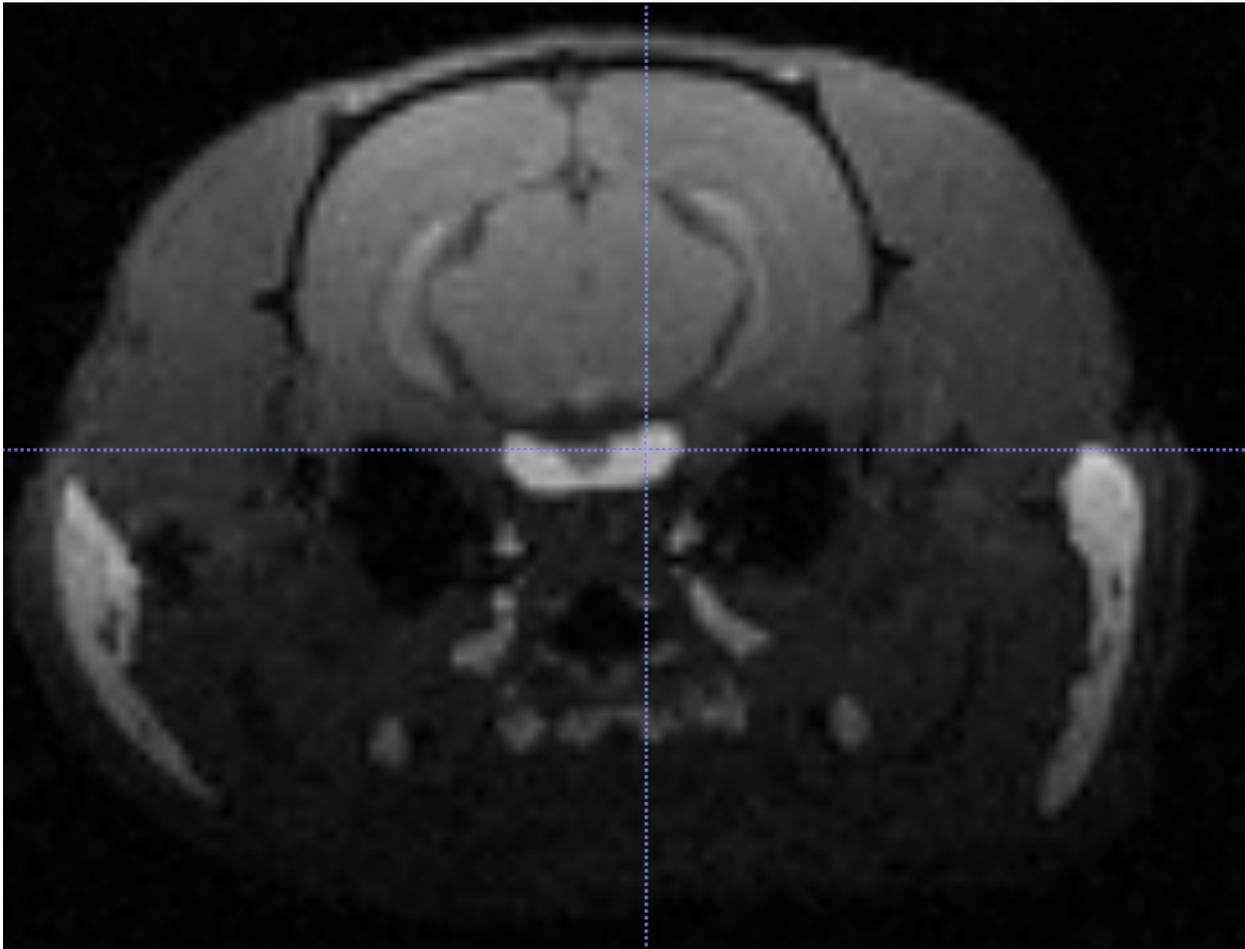


Immagine RMN dell'Ipofisi di ratto marcata con agente di contrasto a base di manganese

E' stato studiato nel ratto, mediante ricostruzione 3D da risonanza magnetica, il complesso sub

linguale e sub mandibolare (SSC). Nel dettaglio per l'estrazione di SSC è stato usato un mezzo di contrasto a base di manganese, le zone chiare in figura rappresentano i tessuti colorati dall'agente di contrasto (spiegazione dettagliata nel paragrafo seguente). I complessi submandibolari e sublinguali sono stati prima segmentati in 3D, ricostruiti il loro modelli tridimensionale ed infine stampati con stampante stereolitografica 3D, per un analisi più accurata dei dettagli anatomici.

5.1.1 Anatomia

All'esame, nel cadavere di ratto, la ghiandola submandibolare risulta a forma di noce, con bordi regolari e larga 1,5 cm. La ghiandola sublinguale è a forma di lente, compatta, con margini regolari e larga 0,5 cm. La submandibolare è appena più ventrale della parotide, ed è adiacente ad essa, ma più spostata sull'anteriore sublinguale. Un piccolo strato di tessuto connettivo separa la submandibolare dalla sublinguale, i dotti secretori emergono tangenzialmente da entrambe le ghiandole (Sbarbati et al., 1994).

5.1.2 Descrizione anatomica microscopica

I rami delle ghiandole salivari terminano in acini che producono la saliva. Questi acini possono essere sia serosi che mucosi a seconda della consistenza delle loro secrezioni. Sono detti mucosi se secernono la mucina che, contenendo glicoproteine dotate di catene di carboidrati carichi negativamente, contribuisce alla viscosità della saliva. Le cellule degli acini serosi secernono un grande numero di proteine tra cui l'amilasi, ma mancano della mucina. Inoltre certi acini sono chiamati seromucosi, e producono sia proteine mucose che serose. Le ghiandole submandibolari e sublinguali sono entrambe seromucose, mentre la parotide è serosa (Tucker AS et al., 2007).

5.1.3 RMN

Grazie alla risonanza, usando l'agente di contrasto $MnCl_2$, il SSC emette un segnale di alta intensità che ne permette l'identificazione in vivo con una risoluzione spaziale eccellente, separandola dalle altre strutture presenti nella regione ventrale del collo. La ghiandola sublinguale è laterale, emette un segnale più intenso rispetto alla ghiandola submandibolare ed il diverso contrasto permette di separare correttamente le due ghiandole. La faccia ventrale del SSC è convesso, mentre il lato dorsale è praticamente piatto, e poggia sul resto della laringe. Nella maggior parte della sezione caudale, solo la submandibolare è visibile, presentandosi con una forma ovoidale. Per controllare l'efficacia del metodo sono stati fatti dei controlli istologici,

qualche animale oggetto dello studio è stato sacrificato, sono state estratte le ghiandole e sono state trattate e colorate con procedure standard. Questo approccio permette una descrizione anatomica accurata degli organi e della loro corretta disposizione spaziale all'interno del corpo dell'animale, così come appaiono in vivo. Infatti in vivo le ghiandole sono racchiuse fra fasci muscolari, e l'analisi delle stesse sull'animale squartato non rende la reale forma anatomico funzionale delle stesse. La RMN, congiuntamente al software Snap, possono diventare un valido strumento per lo studio anatomico degli organi in vivo.

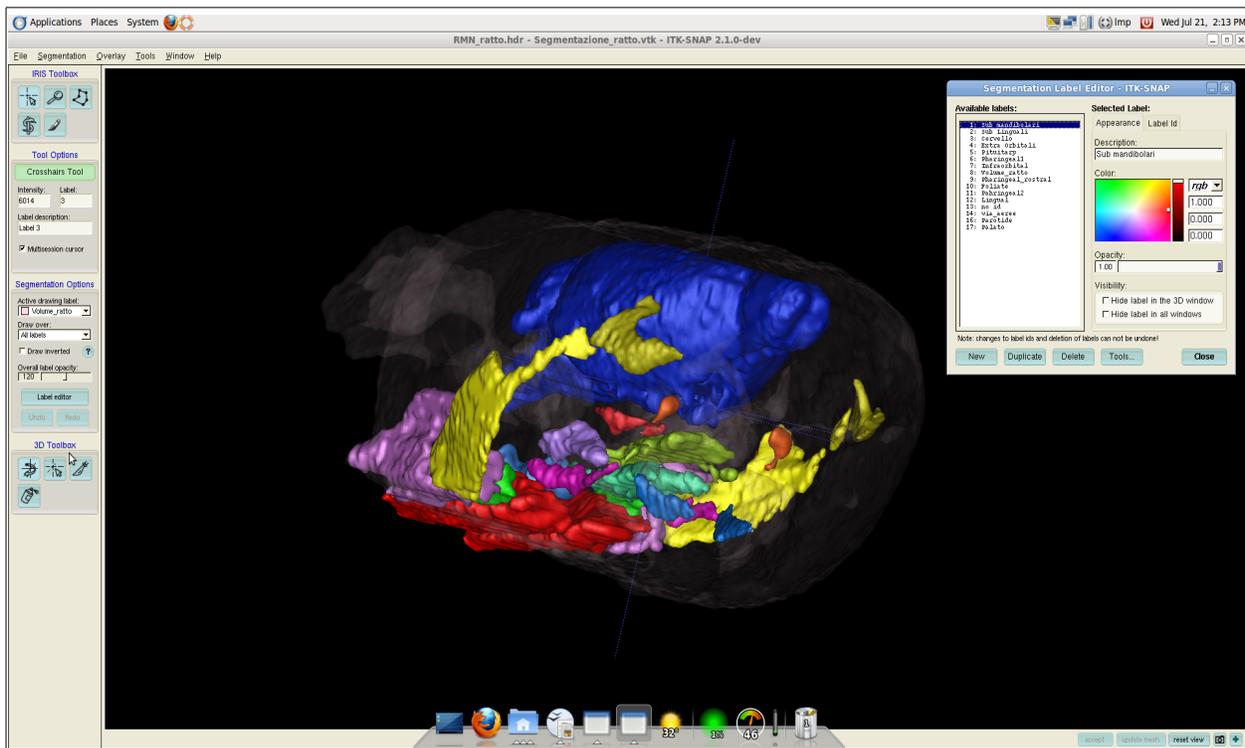


fig. 5.3.1(1) ITK Snap, vista d'insieme dei vari organi e organelli nella testa del ratto.

In questa figura (5.3.1(1)) è visibile la schermata di visualizzazione in ITK Snap, una volta terminato il lavoro di segmentazione è possibile infatti visualizzare le strutture segmentate in 3D. In questa visuale è possibile marcare, colorare, nascondere, sezionare, ruotare; ogni singolo dettaglio isolato. Di seguito alcune immagini del SSC e dell'ipofisi, come esempio del visualizzatore. Assieme alla Tesi, in formato elettronico, vengono forniti i modelli 3D.

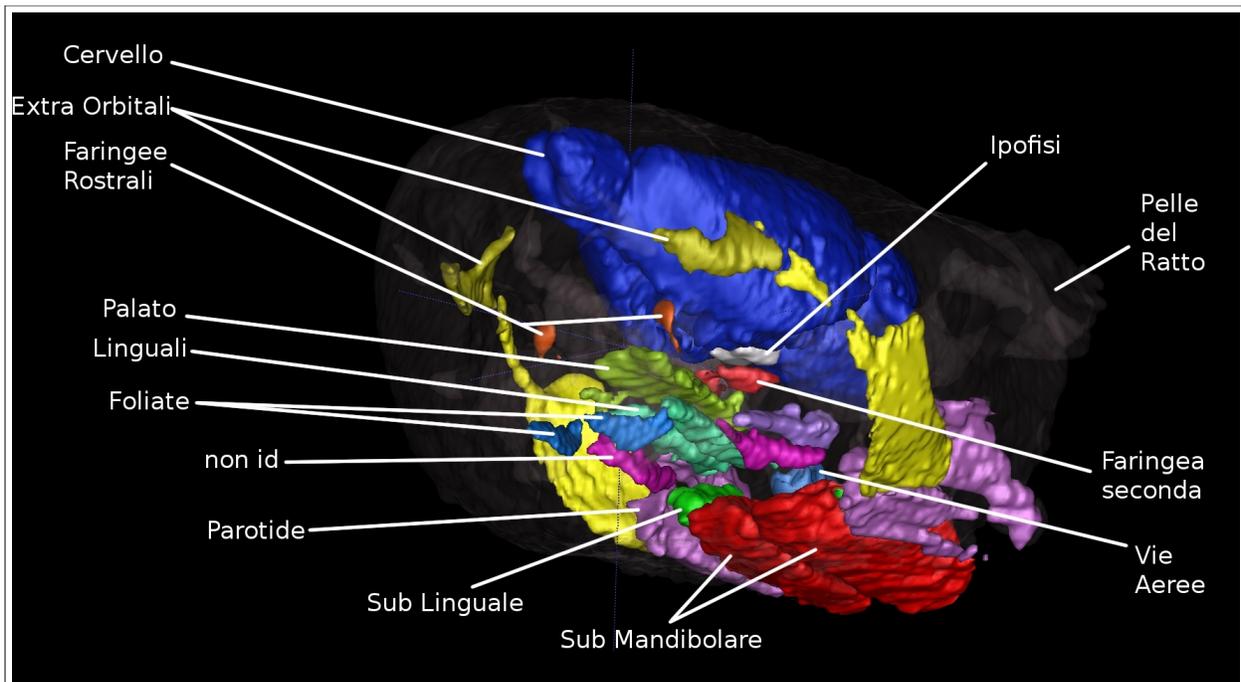


fig. 5.3.1(2) Vista d'insieme delle varie ghiandole identificate.

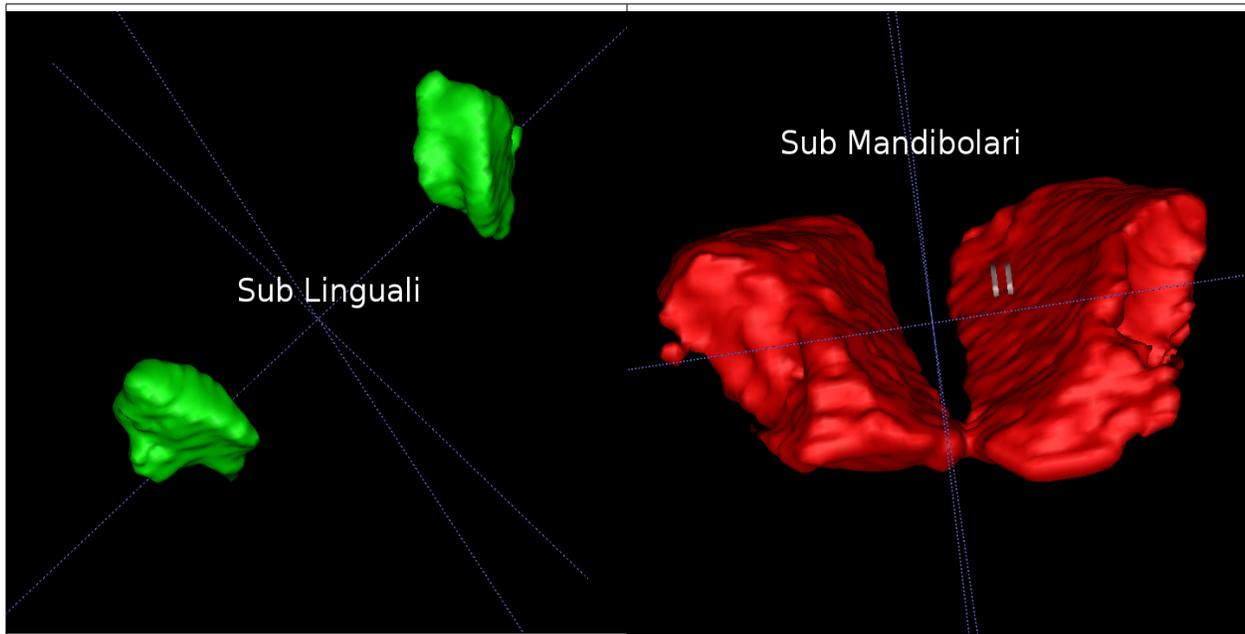


Fig. 5.3.1(3) ITK Snap, le ghiandole Sub Linguali

Fig. 5.3.1(4) ITK Snap, le ghiandole Sub Mandibolari

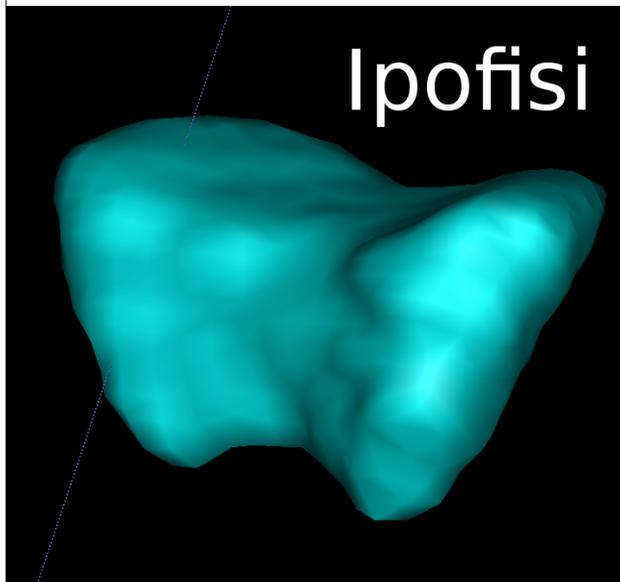


Fig. 5.3.1(5) ITK Snap, l'Ipofisi

Nella prossima pagina fig 5.3.1.(6)(7) sono visibili i modelli 3D oggetto dello studio e le foto delle ghiandole recise da un animale sacrificato e gli esami istologici.

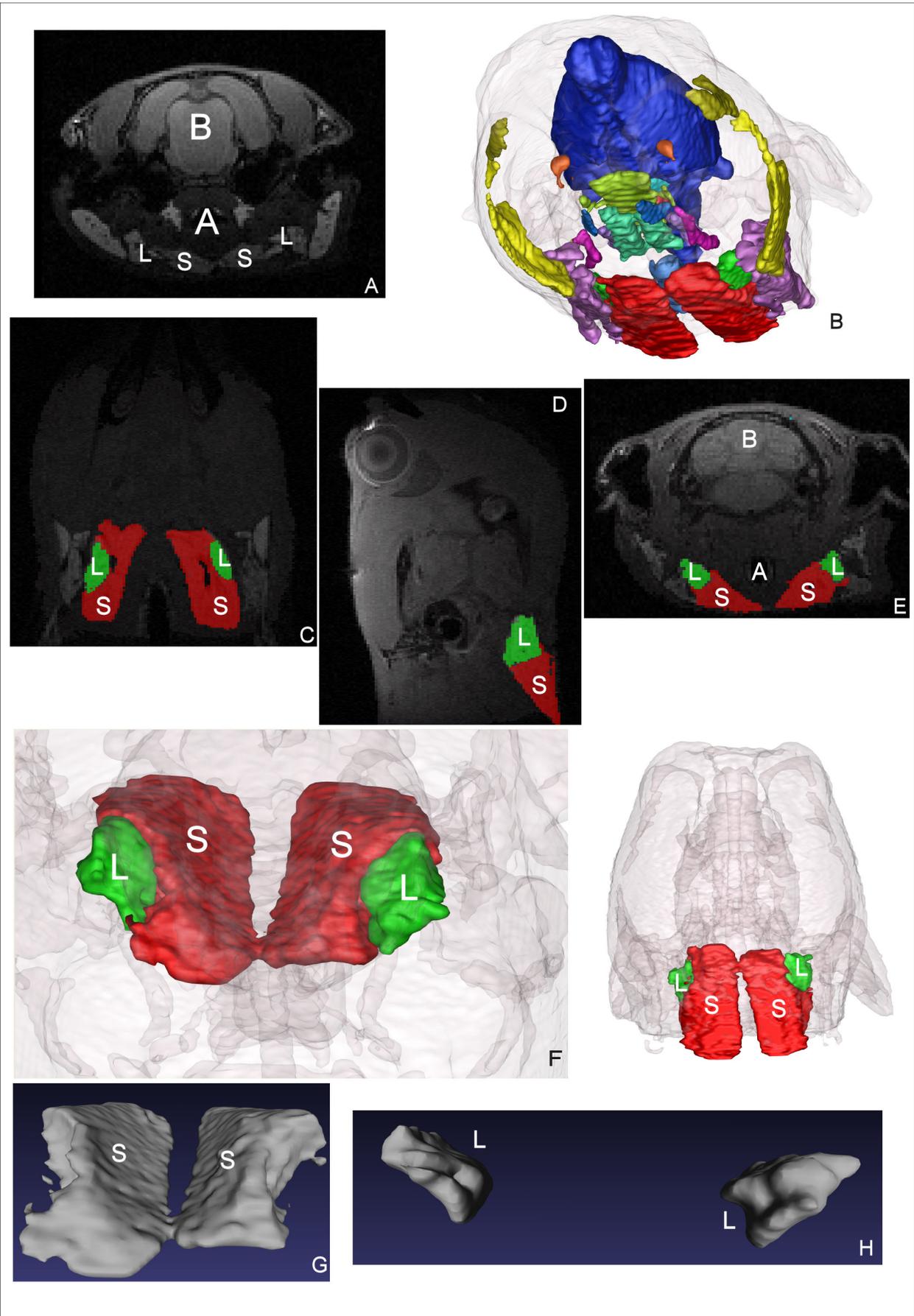
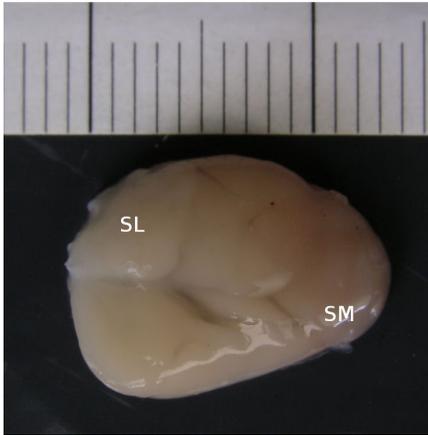
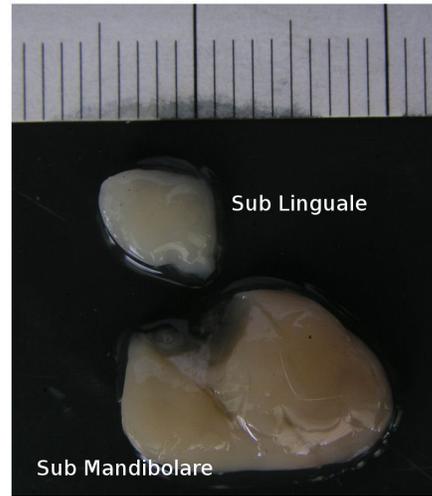


Fig 5.3.1(6) Immagini RMN, modelli tridimensionali e stereolitografici

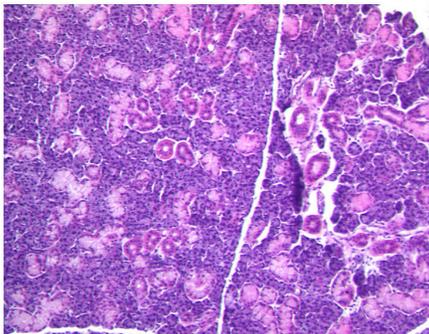
- A) Fetta assiale del ratto, si notino le vie aeree (A), il cervello (B), ghiandole submandibolari(B), sub linguali (L)
- B) In questa immagine è visibile un rendering globale, con le ghiandole e gli organi segmentati in colori differenti
- C) Fetta coronale del ratto, si può vedere evidenziato l'intero SSC in verde le ghiandole sub mandibolari, ed in rosso le sublinguali.
- D,E) Come in C, ma vista sagittale e assiale
- F,I) Due visuali del render 3D del Complesso sub mandibolare, sub linguale (SSC)
- G) Il modello 3D delle ghiandole submandibolari, pronto per essere stampato
- H) Il modello 3D delle ghiandole sublinguali, pronto per essere stampato



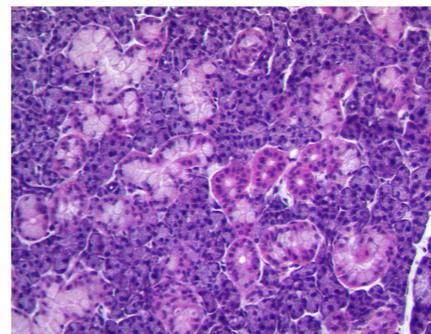
Anat.macroscopica: ghiandole unite



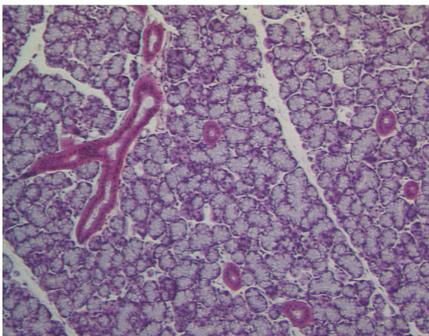
Anat. macroscopica: ghiandole separate



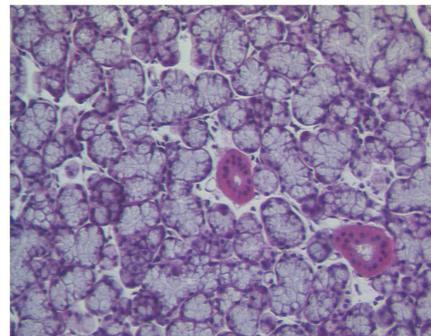
Istologia: ghiandola submandibolare
Ingrandimento lente 10X



Istologia: ghiandola submandibolare
Ingrandimento lente 20X



Istologia: ghiandola sublinguale
Ingrandimento lente 10X



Istologia: ghiandola sublinguale
Ingrandimento lente 20X

Fig 5.3.1(7) Ghiandole estratte da animale sacrificato ed istologia.



Fig 5.3.1(8) Foto del modello sub mandibolare/sub linguale stampato in 3D, ghiandole evidenziate e unite

In queste due fotografie fig 5.3.1(8), 5.3.1(9); sono visibili i modelli in resina, ottenuti con la stampante tridimensionale, del SSC, rispettivamente ghiandole sublinguali e submandibolari.

Nell'immagine 5.3.1(8) è stato dato un leggero tono di colorazione alla resina, per permettere un più facile accostamento, stesso colore, dei modelli presenti all'interno del software di segmentazione tridimensionale.

L'immagine 5.3.1(9) presenta invece i modelli in resina nella colorazione giallo opalino, tipico della resina fotopolimerizzante utilizzata.

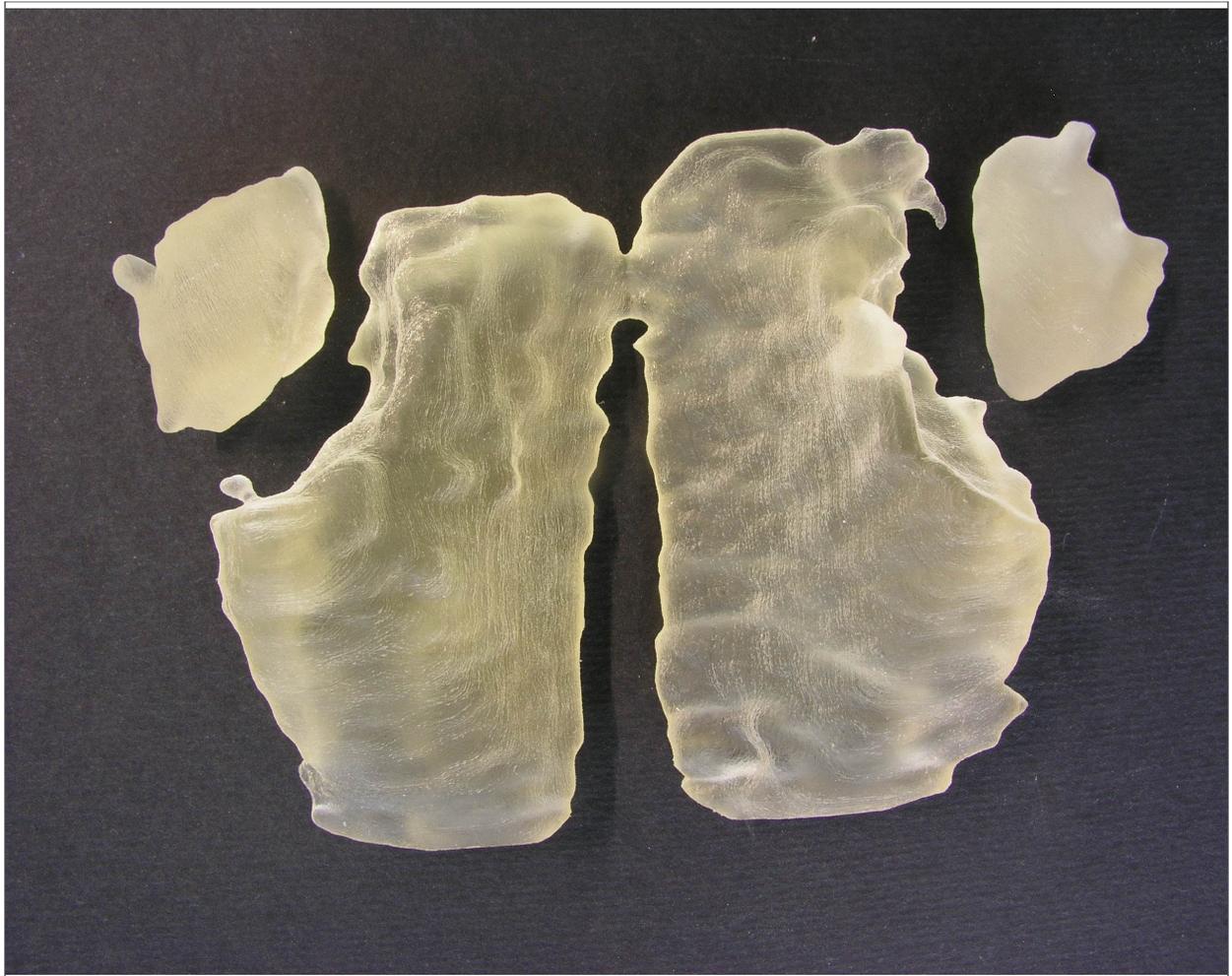


Fig 5.3.1(9) Foto del modello sub mandibolare/sub linguale stampato in 3D, colori naturali della resina, ghiandole separate

5.2 Analisi del fat pad

5.2.1 Immagini della segmentazione del *fat pad*

Nell'immagine fig 5.2.1.(1) è possibile vedere il fat pad separato dagli altri tessuti del piede. Nelle seguenti immagini fig. 5.2.1(2)(3)(4)(5) sono visibili diversi punti di vista per rendere su carta, le potenzialità del software di segmentazione. Nelle seguenti slide del piede si possono notare in giallo le ossa, in rosso i muscoli ed in azzurro il tessuto adiposo che costituisce il *fat pad*.

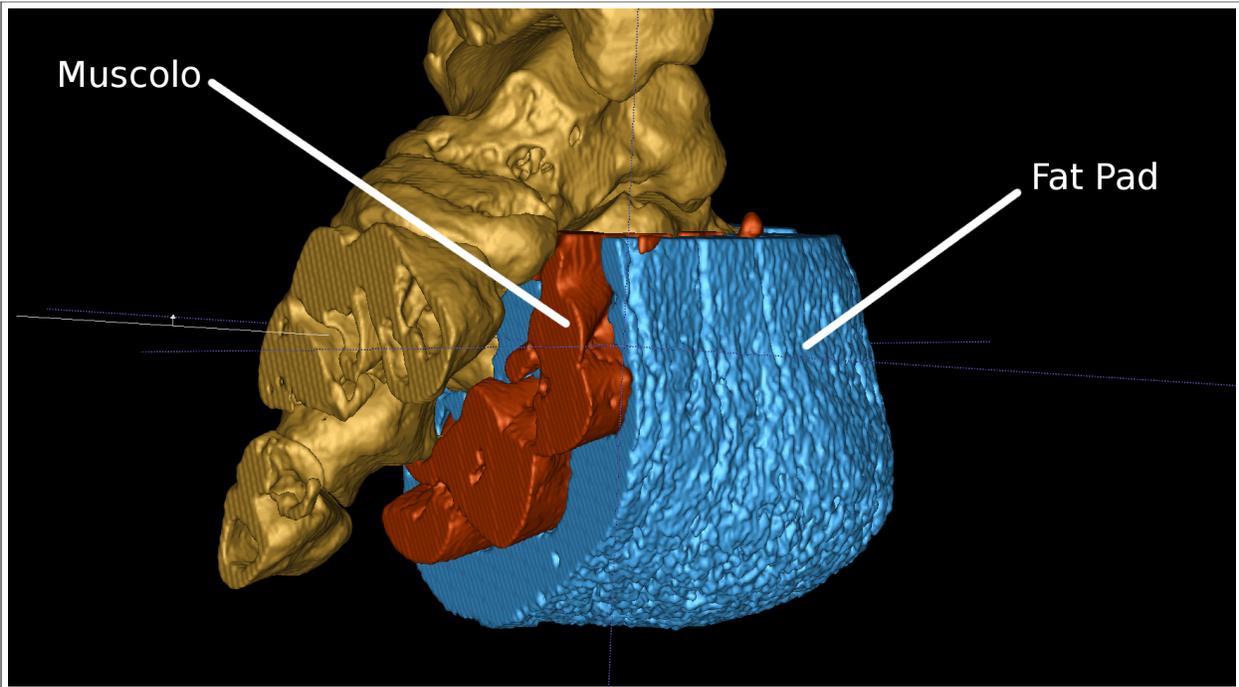


Fig 5.2.1(1)
Diverse visuali del modello.

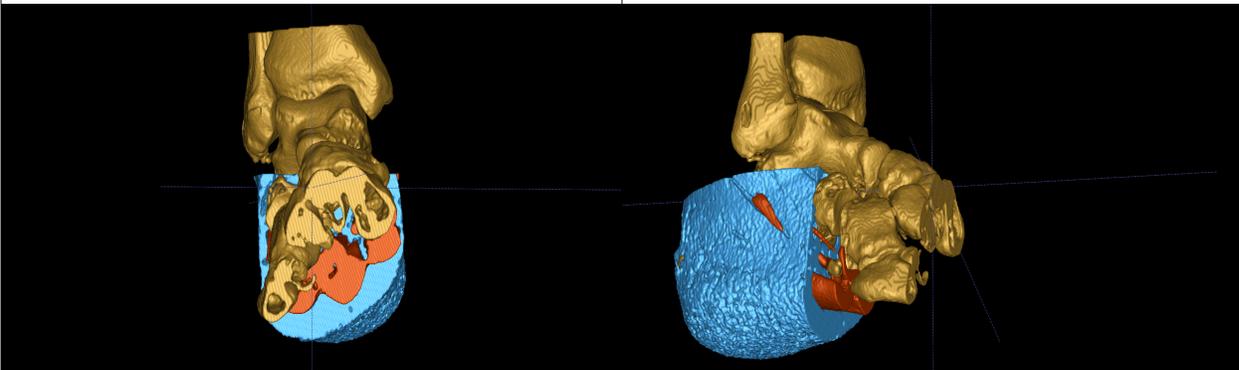


Fig 5.2.1(2)

Fig 5.2.1(3)

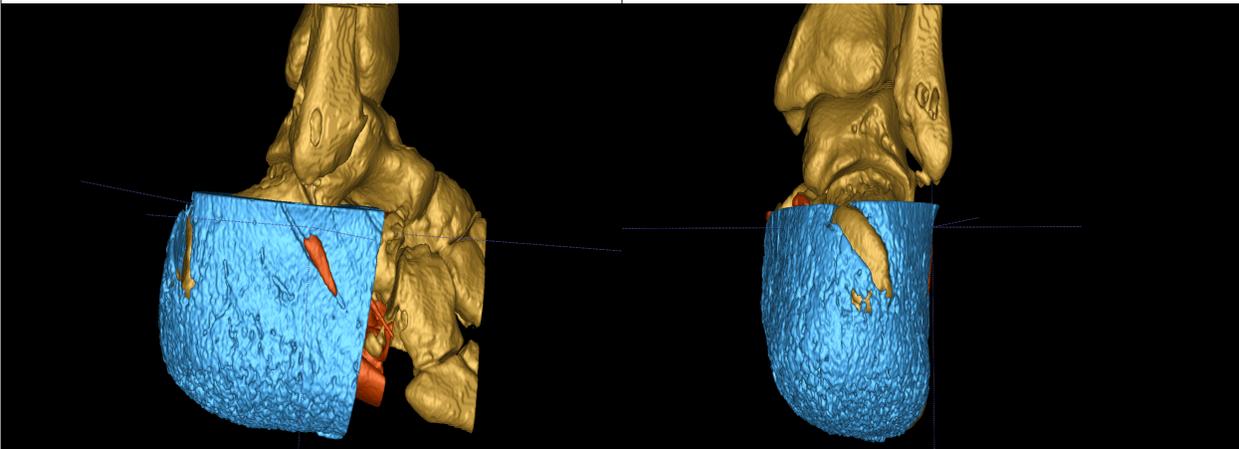


Fig 5.2.1(4)

Fig 5.2.1(5)

Immagini della segmentazione del piede per evidenziare gli spessori: in giallo l'osso, in rosso il muscolo ed in verde il tessuto adiposo.

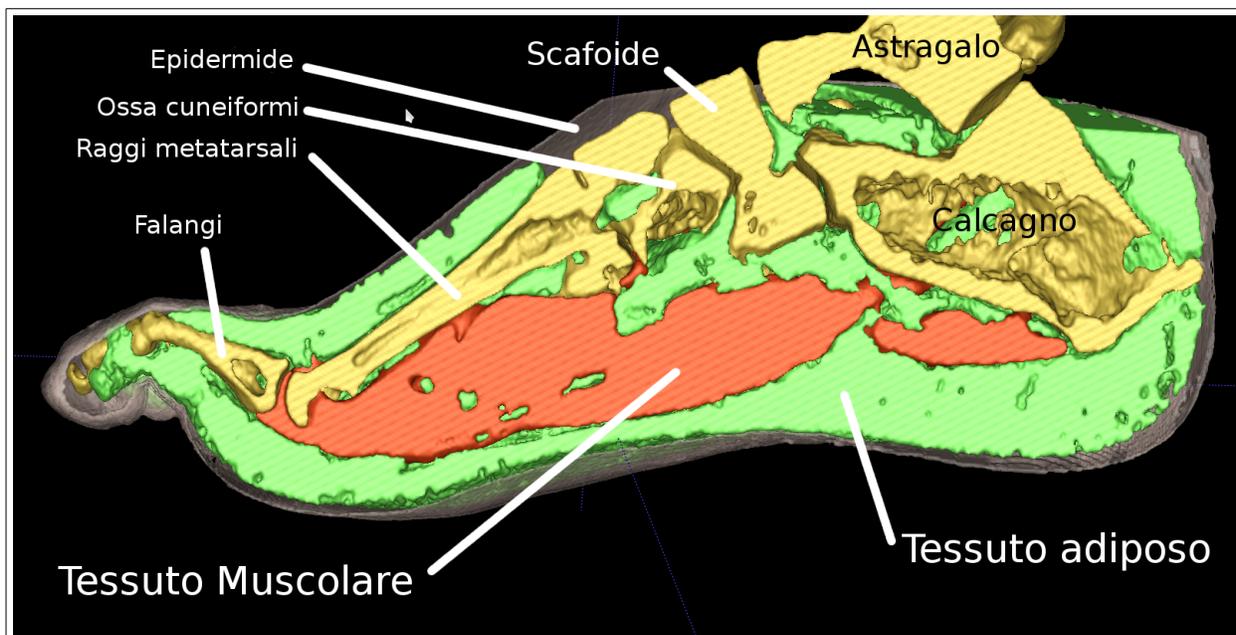


Fig 5.2.1(6) Immagine della segmentazione del fat pad, per misurarne lo spessore, evidenziata una sezione del rendering 3D

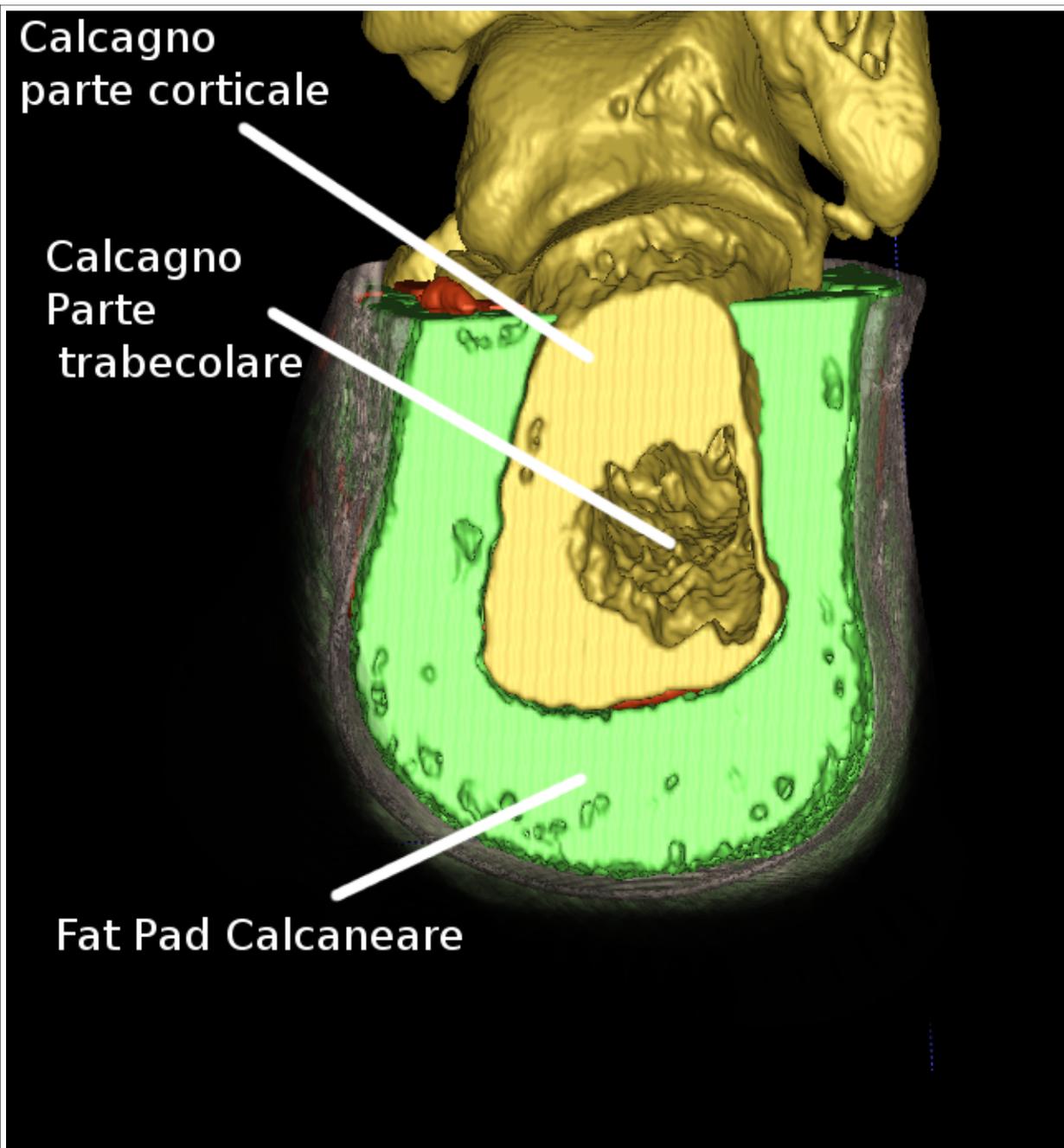
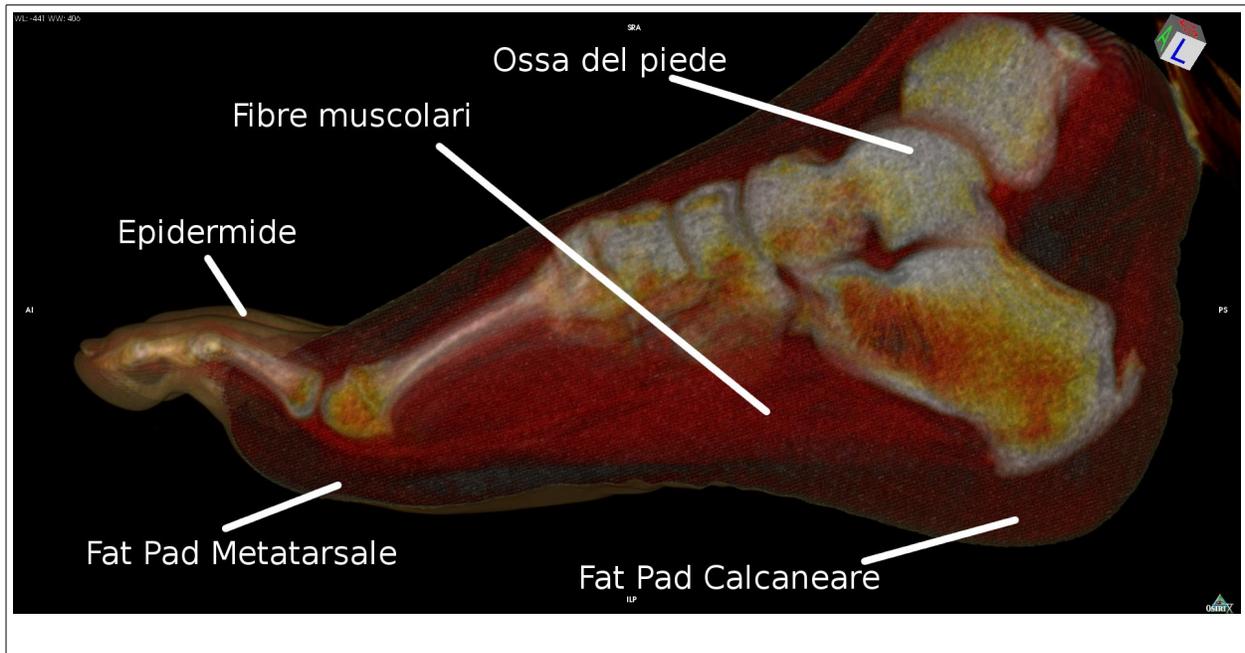


Fig 5.2.1(7) Sezione del rendering 3D del *fat pad* calcaneare

5.2.2 Rendering volumetrico fat pad

Rendering volumetrico in tempo reale in OsiriX; immagine per riferimento per indicare la qualità del dettaglio. La carta stampata non si presta alla visualizzazione, le immagini vanno osservate nella *workstation*, dove è possibile zoomare, ruotare, tagliare e misurare.



5.2.3 Confronto tra fat pad soggetto sano Vs diabetico

In figura 5.2.3(1) un rendering volumetrico del piede del soggetto diabetico, si può notare, nella parte del calcagno, la compromessa distinzione tra setti fibrosi e tessuto adiposo.

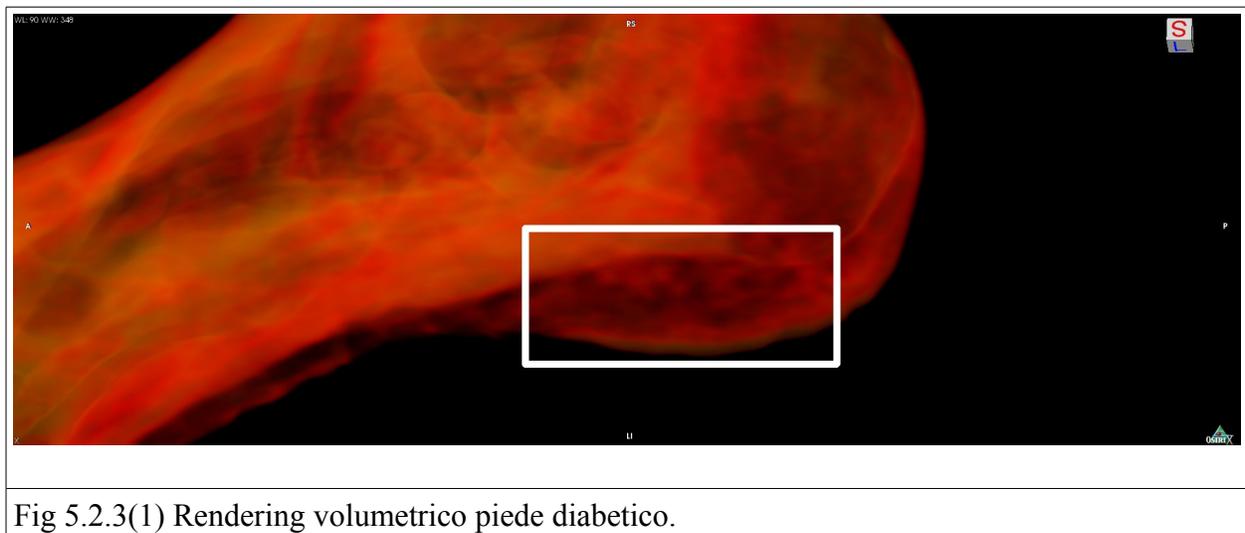
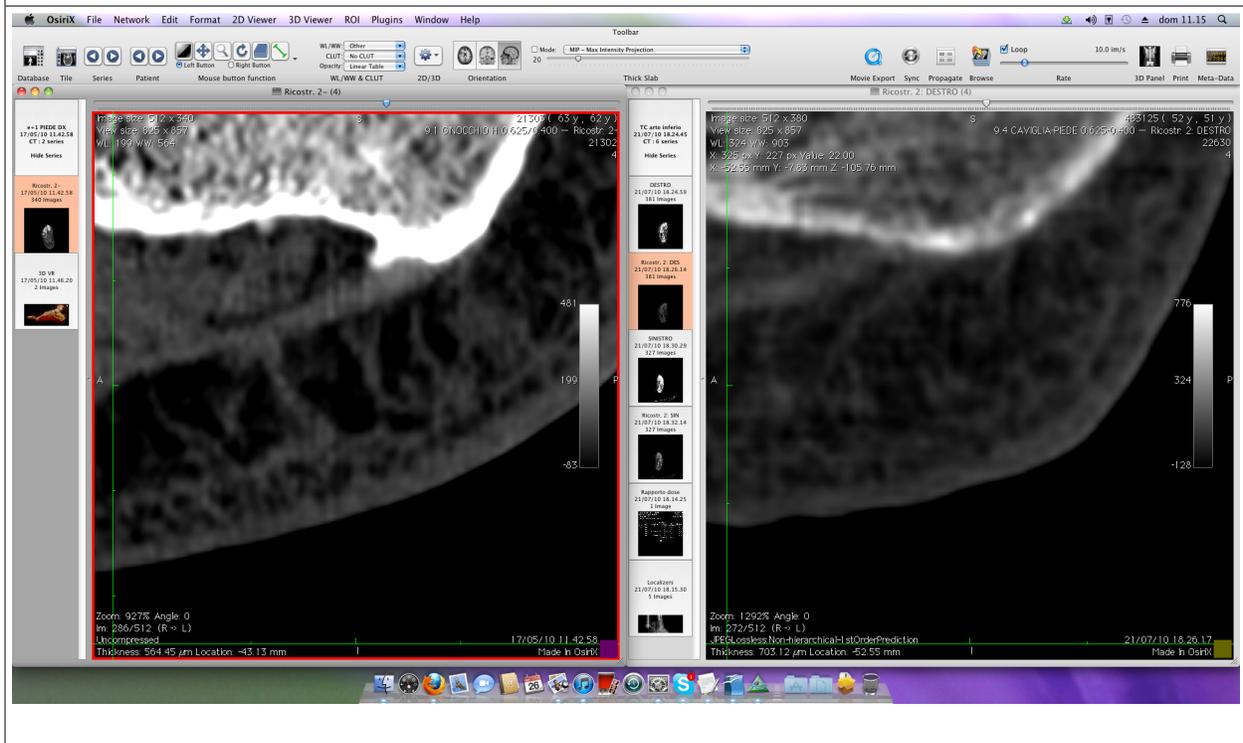
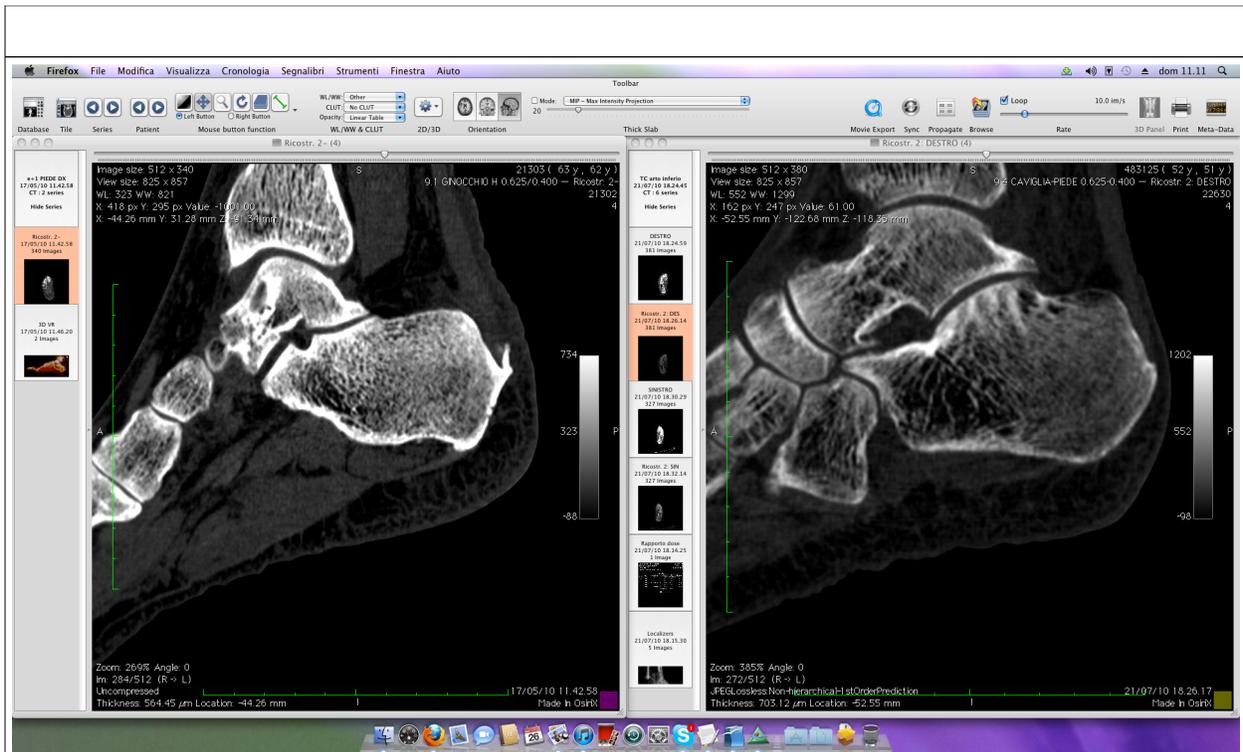


Fig 5.2.3(1) Rendering volumetrico piede diabetico.



TAC a confronto : soggetto sano a SX e diabetico a DX

L'analisi delle Tac del piede diabetico ha evidenziato una distrofia dei setti, le pareti dei setti sono logorate ed il grasso in essi contenuto è anch'esso "sporcato" da tessuto a densità più elevata. Il parere dello staff medico è che questo porti ad una perdita di rigidità degli stessi il che comporterebbe una perdita da parte della struttura di sopportare il peso del corpo e di attutire e

distribuire i carichi.

5.3 Discussione

In questa Tesi di dottorato sono stati studiati in dettaglio il complesso SSC nel ratto mediante RMN e il *fat pad* calcaneare nell'uomo, sia sano che diabetico, mediante TAC.

La prima parte del lavoro ha riguardato l'ottenimento di un'accurata descrizione anatomica degli organi SSC del ratto così come sono posizionati correttamente nella testa dell'animale. Ciò è stato possibile tramite il *post processing* dei dati ottenuti sottoponendo a RMN un ratto anestetizzato. E' stato usato uno strumento con magnete al boro in grado di generare un campo magnetico principale di 4.7 Tesla. Per aumentare il contrasto tra i vari tipi di tessuto è stato necessario somministrare al ratto, tramite iniezione endovena, una soluzione di cloruro di manganese. Lo ione manganoso, pur risultando non tossico per l'animale, è fortemente paramagnetico grazie agli elettroni spaiati presenti nel livello 3d. Lo ione si distribuisce nei vari distretti in ragione delle rispettive affinità ed incrementa il campo magnetico locale permettendo di definire meglio i vari organi. I dati grezzi, ottenuti dalla RMN, sono stati analizzati per quanto riguarda la loro struttura matematica e quindi elaborati con software ITK SNAP opportunamente predisposto su un elaboratore dotato di notevole potenza di calcolo. Intervenendo numerose volte su alcune fasi del processo e con l'aiuto dell'esperienza di uno staff medico, è stato condotto il *post processing* ottenendo infine una struttura 3D degli organi di interesse presenti nella testa dell'animale. Il risultato finale è un'ottima visualizzazione 3D delle ghiandole salivari sia sublinguali che submandibolari così come si presentano realmente *in vivo* nella testa del ratto, comprese e sostenute dagli altri tessuti che le circondano. Nella vista d'insieme della testa del ratto risultano comunque definite, oltre alle ghiandole salivari, numerose altre strutture (cervello, ipofisi, parotidi, etc.) che tuttavia non sono state ulteriormente indagate in questo lavoro.

La procedura seguita si rivela uno strumento molto utile perchè rende evidenti, mediante colorazione artificiale, gli organi in questione in tutti i loro dettagli e, soprattutto, *in vivo*. Risulta così facilmente accessibile a tutti l'osservazione delle strutture anatomiche e non solamente a radiologi esperti in grado di interpretare direttamente le immagini tomografiche e discernere tutti i dettagli. Inoltre, dopo la ricostruzione 3D virtuale degli organi SSC del ratto, i dati sono stati usati per guidare la stampa stereolitografica di modelli delle ghiandole in studio realizzati in

resina Fullcure 720. Questi modelli fisici tridimensionali permettono l'osservazione diretta dell'oggetto senza l'ausilio del computer e possono essere, ad esempio, di grande utilità didattica. L'indagine RMN può essere usata anche in associazione con l'indagine istologica tradizionale (Sbarbati et al, 1994) che rimane ancora la sola, attualmente, in grado di osservare le singole cellule di un tessuto. Infatti la risoluzione dell'indagine RMN dipende linearmente dall'intensità del campo magnetico in cui è posto l'oggetto in studio e nonostante l'utilizzo di campi magnetici sempre più intensi ottenuti con materiali superconduttori ci sono limiti sperimentali soprattutto di dimensioni e problemi di costo e di sicurezza. Merita ricordare che l'indagine RMN utilizza onde radio caratterizzate da bassa energia intrinseca ed è quindi praticamente innocua se paragonata alla TAC che, impiegando raggi X di elevata energia, necessita di maggiori precauzioni. La RMN può quindi essere ripetuta più volte entro brevi intervalli di tempo. Alcune limitazioni della RMN riguardano una certa lentezza nell'acquisizione dei dati (rispetto alla TAC), da cui la necessità di anestetizzare il ratto per evitare che possa muoversi durante l'esecuzione delle misure, e la non applicabilità a pazienti portatori di protesi metalliche o di pacemaker a causa dei gravi effetti negativi di cui risentirebbero in presenza del campo magnetico presente in questi strumenti.

La seconda parte del lavoro ha riguardato la ricostruzione virtuale del *fat pad* del piede umano, sia in soggetti sani che in soggetti diabetici, utilizzando dati ottenuti da TAC spirale e lo stesso tipo di approccio sviluppato in precedenza per i dati da RMN. Anche in questo caso è stato possibile isolare, a livello di immagine e di ricostruzione 3D, la porzione *fat pad* del piede che risulta composta da setti (presumibilmente costituiti da robuste fibre di collagene) e cellette contenenti tessuto adiposo. L'insieme delle due strutture è deputato alla funzione di ammortizzare le forze meccaniche prodotte dalla deambulazione e distribuire l'energia termica prodotta dall'impatto del calcagno con il suolo. I modelli matematici 3D ottenuti saranno utilizzabili, in futuro, per lo studio di calzature e dispositivi ortopedici in grado di mimare il funzionamento del cuscinetto adiposo naturale del piede. Dall'analisi comparata delle strutture del *fat pad* nel piede sano e in quello diabetico sembra risaltare una diversa struttura del sistema setti/cellette, in particolare, nei pazienti diabetici il sistema risulta parzialmente compromesso e ciò comporta delle modificazioni cinetico-meccaniche che impediscono al *fat pad* di svolgere bene la funzione di ammortizzatore e di dissipatore dell'energia meccanica. L'intenzione iniziale di ricostruire, analogamente a quanto è stato fatto con le ghiandole del SSC, le singole cellette adipose ed i setti che le contengono non è stata realizzata per un'insufficienza del rapporto segnale/rumore delle misure TAC. E' infatti presumibile che l'assorbimento delle radiazioni di

tipo X sia poco elevato da parte di un tessuto “molle” come il *fat pad* ed in mancanza di un mezzo di contrasto adeguato. Per questa ragione è stato possibile, mediante il cosiddetto *rendering* volumetrico, discriminare e ricostruire solo il volume globale occupato dal *fat pad*, ma non è stato possibile calcolare il modello tridimensionale delle singole celle costitutive. E' d'altra parte possibile che ogni piede “normale” abbia una sua peculiare architettura delle strutture setti/cellette. Prove meccaniche e ulteriori indagini mediante tecniche più sensibili ai tessuti molli quali, ad esempio, la RMN o l'ecografia, potranno confermare l'ipotesi che il deterioramento delle strutture setti/cellette sia una conseguenza della patologia diabetica.

Bibliografia

Aerts P, De Clercq D, Ilsley DW. 1996. The effects of isolation on the mechanics of the human heel pad. *Journal of Anatomy*, 188, 417- 423.

Aerts P, Ker RF, De Clercq D, Ilsley DW, Alexander RM. 1995. The mechanical properties of the human heel pad: a paradox resolved. *Journal of Biomechanics* 28, 1299-1308.

Ahmed AM. ,2002. History of diabetes mellitus.. *Saudi Med J.* **23:** 373-378

Arndt C, Graessner J, Cramer MC et al. ,2006. Functional imaging of submandibular glands: diffusion-weighted echo-planar MRI before and after stimulation. *Rofo* **178**, 893-897.

Bennett MB, Ker RF, 1990. The mechanical properties of the human subcalcaneal fat pad in compression. *Journal of Anatomy* 171, 131-138.

Bernoville F, Beck-Peccoz P,1999, Diabetes Mellitus, Jain Publishers. 7

Boulton AJM et all ,1998.*Diabetic Med* **15:**508-524.

Brocco SL, Tamarin A ,1979. The topography of rat submandibular gland parenchyma as observed with scanning electron microscope. *Anat Res* **194**, 445-460.

Buschmann WR, Jahss MH, Kummer F, Desai P, Gee RO, Ricci JL., 1995. Histology and Histomorphometric Analysis of the Normal and Atrophic Heel Fat Pad. *Foot & Ankle Int.*, 254-258.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG,. Diano S, Horvath ST, Cone RD, LOW MJ ,2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411:** 480-484.

D'Andrea SE, Lord DR, Davis BL, 1997. A rheological model of the human heel pad. *American Society of Biomechanics.*

Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ 3rd, Service FJ., 1993. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43:817-824.

Gales DJ, Challis JH, 2007. Validity of hand-held heel pad indenter for determining heel pad properties.

- Gefen A, Megido-Ravid M, Itzhak Y., 2001.** In vivo biomechanical behaviour of the human heel pad during the stance phase of gait. *Journal of Biomechanics* **34**, 1661-1665.
- Gooding GAW, Stress RM, Graf PM, 1985.** Heel Pad thickness: determination by high-resolution ultrasonography. *Journal of Ultrasound Medicine* **4**, 173-174.
- Hauner H, Petruschke T, Gries FA ,1994.** Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells. *Metabolism*, **43**: 227-232.
- Hebel R, Stromberg MW ,1986.** Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wörtsee BioMed Verlag.
- Hsu CC, Tsai WC, Wang CL, 2007.** Microchambers and Macrochambers in heel pads: are they functionally different?. *Journal of Applied Physiology* **102**, 2227-2231.
- Huang L, Li C. ,2000.** Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research* **10**, 81-92.
- Jacoby F, Leeson CR ,1959.** The post-natal development of the rat sub maxillary gland. *J Anat* **93**, 201-216.
- Jahss MD, Kummer F, Michelson JD, 1992.** Investigation into the fat pads of the sole of the foot: heel pressure studies. *Foot & ankle*, 227-232.
- Ji L, Heather BA, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA,2002.** Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291**: 701-706.
- Ker RF, 1996.** The time-dependent mechanical properties of the human heel pad in the context of locomotion. *Journal of Experimental Biology* **199**, 1501-1508.
- Koerner A, Kratzsch J, Kiess W ,2005.** Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **19**:525–546.
- Lee SJ, McPherron AC,1999.** Myostatin and the control of skeletal muscle mass: Commentary. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**: 604-607.
- Levy AS, Berkowitz R, Franklin P, 1992.** Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Calcaneal Fat Pads in Patients with Os Calcis Fractures. *Foot & Ankle*, 57-62.
- Llena-Puy C ,2006.** The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* (2006) **11**, 449-455.
- Lorber M ,1991.** Branching and course of the larger ducts and accompanying structures within the rat submandibular salivary gland. *Am J Anat* **190**, 133-156.

Ludvigsen S, Thim L, Blom A M, Wulff BS ,2001. Solution structure of the satiety factor, CART, reveals new functionality of a well-known fold. *Biochemistry*, **40**: 9082-9088.

McPherron AC, Lee SJ ,2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, **109**: 595-601.

McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. ,2002. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *The Lancet*, **359** : 46-47.

Miller-Young JE, Duncan NA, Baroud G., 2002. Material properties of the human calcaneal fat pad in compression: experiment and theory. *Journal of Biomechanics* **35**, 1523-1531.

Ozdemir, H Soyuncu, Y Ozgorgen, M Dabak, K, 2004. Effects of changes in Heel Fat Pad Thickness and Elasticity on Heel Pain. *Journal of the American Podiatr Medical Association* **94(1)**, 47-51.

Pain, MTG. Challis, JH, 2001. The role of the heel pad and shank soft tissue during impacts: a further resolution of a paradox. *Journal of Biomechanics* **34**, 327-333.

Rome, K, 1998. Mechanical Properties of the heel pad: current theory and review of the literature. *The Foot*, 179-185.

Sbarbati A, Baldassarri A, Leclercq F, Merigo F, Antonakis K, Boicelli A ,1994. Magnetic resonance imaging of the submandibular-sublingual complex. *Acta Anatomica* **149**, 63-69.

Sbarbati A, Baldassarri AM, Zancanaro C, Boicelli A, Osculati F ,1995. In vivo morphofunctional study of rat gastric mucus secretion. *Anat Res* **241**, 377-382.

Sbarbati A, Leclercq F, Zancanaro C, Guerrini U, Antonakis K, Osculati F ,1996. Evaluation of frog gastric mucus secretion by 7T magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* **6**, 336-340.

Spears IR, Miller-Young JE, 2006. The effect of heel-pad thickness and loading protocol on measured heel-pad stiffness and a standardized protocol for inter-subject comparability. *Clinical Biomechanics* **21**, 204-212.

Spears IR, Miller-Young JE, Sharma J, Ker RF., 2007. The potential influence of the heel counter on internal stress during static standing: a combined finite element and positional MRI investigation. *Journal of Biomechanics* **40**, 2774-2780.

Sul HS, Smas CM, Moustaid N,1993. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **Volume 4, Issue 10, October 1993** : 554-562

Thoeny HC, De Kreyzer F, Claus FG, Sunaert S, Hermans R ,2005. Gustatory stimulation

changes the apparent diffusion coefficient of salivary glands: initial experience. *Radiology* **235**, 629-634.

Tong J, Lim CS, Goh OL., 2003. Technique to study the biomechanical properties of the human calcaneal heel pad. *The Foot* **13**, 83-91.

Tucker AS ,2007. Salivary gland development. *Seminars in cell and developmental biology* **18**, 237-244.

Wabitsch M, Heinze E, Hauner H, Shymko RM, Teller WM, De Meyts P, Ilondo MM,1996. Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism*, **45**: 34-42.

Wang CL, Shau YW, Hsu TC., 1999. Mechanical properties of heel pads reconstructed with flaps. *The Journal of bone and joint surgery* **81**, 207-211.

Watanabe T, Natt O, Boretius S, Frahm J, Michaelis T ,2002. In vivo 3D MRI staining of mouse brain after subcutaneous application of MnCl₂. *Magn Reson Med* **48**, 852-859.

Xiong Y, Tanaka H, Richardson JA, Williams SC, Slaughter CA, Nakamura M, Chen J-L, Yanagisa M, 2001. Endothelin-1 Stimulates Leptin Production in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* , **276**:28471-28477.

Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. ,2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, **296** : 1486-1488.