



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOINGEGNERIA**

**“VALUTAZIONE DEL COMPORTAMENTO BIOMECCANICO
CORNEALE: ANALISI SPERIMENTALE E COMPUTAZIONALE DI
TEST DI INSUFFLAZIONE ”**

Relatore: Dott.ssa Ilaria Toniolo

Correlatore: Dott.ssa Maria Vittoria Mascolini

Laureando: Andrea Russo

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

3 aprile 2023

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 - Anatomia e fisiologia dell'occhio umano	3
1.1 Tonaca fibrosa.....	4
1.2 Tonaca vascolare.....	6
1.3 Tonaca nervosa	8
1.4 Strutture di protezione, motorie e mezzi diottrici	9
CAPITOLO 2 - La cornea	13
2.1 Anatomia e Fisiologia	13
2.1.1 Epitelio	14
2.1.2 Strato di Bowman	16
2.1.3 Stroma.....	16
2.1.4 Membrana di Descemet	18
2.1.5 Endotelio.....	19
2.2 Principali patologie	20
2.2.1 Corneal crosslinking	20
2.3 Modellazione FEM della cornea in letteratura	21
2.3.1 Densità della mesh.....	21
2.3.2 Condizioni al contorno	22
2.3.3 Distribuzione dello spessore.....	23
2.3.4 Topografia della cornea	24
CAPITOLO 3 - Biomeccanica della cornea	25
3.1 Introduzione alla meccanica dei tessuti biologici	26
3.2 Comportamento meccanico della cornea	29
3.3 Tecniche di analisi biomeccanica	31
3.3.1 Prove di trazione	32
3.3.2 Prove di insufflazione	35
3.3.2.1 Prove di insufflazione: confronto uomo/suino	39
3.3.3 Confronto prove di insufflazione-trazione	41
CAPITOLO 4 - Prove sperimentali	43
4.1 Materiali e metodi	43
4.1.1 Preparazione del campione.....	43
4.1.2 Set up sperimentale.....	44
4.2 Protocollo di insufflazione	48
4.3 Processing dei dati	49
CAPITOLO 5 - Modelli computazionali	55

5.1	Modello striscia corneale per prove di trazione	55
5.1.1	Modello striscia corneale per prove di trazione viscoelastico	58
5.2	Modello strutturale della cornea per insufflazione.....	59
5.2.1	Definizione della geometria	60
5.2.2	Definizione del materiale iperelastico per il modello cornea	62
5.2.3	Definizione e generazione della mesh	63
5.2.4	Interazione fluid cavity	65
5.2.5	Creazione dello step di analisi	65
5.2.6	Condizioni al contorno.....	66
CAPITOLO 6 - Risultati	69
6.1	Prove sperimentali di insufflazione	67
6.2	Analisi computazionali di trazione.....	71
6.2.1	Modello con materiale iperelastico	71
6.2.2	Modello con materiale viscoiperelastico.....	73
6.3	Analisi computazionali di insufflazione.....	76
CAPITOLO 7 - Discussioni e conclusioni	85
RIFERIMENTI	91

Introduzione

La cornea trasparente costituisce la porzione anteriore della tonaca fibrosa attraverso cui è possibile vedere l'iride e la pupilla. È un tessuto connettivo privo di vasi che agisce da protezione per il contenuto interno dell'occhio. Compone la superficie refrattiva anteriore dell'occhio rappresentando la maggior parte del potere refrattivo totale dell'occhio. La trasparenza e la stabilità dimensionale della cornea, essenziali per la potenza ottica, sono risultato di diversi fattori quali l'anatomia strutturale, la fisiologia dei suoi componenti cellulari e al suo comportamento meccanico dipendente dalla geometria, in termini di spessore, curvatura e topografia.

Attualmente, lo studio del comportamento biomeccanico della cornea fornisce uno strumento di fondamentale importanza ai fini della ricerca nel campo dell'Oftalmologia per la diagnosi di varie malattie corneali e in diverse applicazioni cliniche, ad esempio, la pianificazione di procedure di chirurgia refrattiva, l'analisi della progressione del cheratocono e la misurazione della IOP.

Le prime conoscenze riguardanti le proprietà biomeccaniche corneali derivano principalmente da prove sperimentali *ex vivo* su cornee animali, in maggioranza, ed umane. Queste prove *ex vivo*, tuttora utilizzate, sono principalmente di due tipi, trazione uniassiale e di insufflazione, è stato dimostrato che queste ultime consentono di ottenere risultati migliori. Più recentemente queste prove sperimentali sono state associate ad un'analisi computazionale con tecniche di modellazione numerica basate sul metodo agli elementi finiti.

Lo scopo di questa tesi è la valutazione del comportamento biomeccanico della cornea sana in risposta alla variazione della pressione intraoculare tramite prove di insufflazione sperimentali su campioni di cornea e simulazioni computazionali di queste prove su modello corneale 3D.

Per le prove sperimentali di laboratorio sono state analizzate un totale di 18 cornee suine, di cui 9 fresche e 9 congelate, provenienti da un macello locale. Queste cornee sono state sottoposte a prove di insufflazione nel laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università di Padova. Sono state scelte cornee porcine data la loro affinità biologica, in termini di forma e caratteristiche meccaniche, con quelle umane e la possibilità di ottenere una quantità numerosa di campioni di questa specie.

Il setup sperimentale del laboratorio è stato aggiornato migliorando quello che era stato adoperato in passato nelle prove di insufflazione del 2021. Ciò ha previsto l'utilizzo di una nuova camera di insufflazione per il fissaggio del campione corneale stampata in 3D al fine di ridurre al minimo le perdite di liquido insufflato e di un nuovo sensore di pressione con lo scopo di ottenere dei dati di qualità superiore. Per l'applicazione della quantità controllata di fluido

all'interno del campione è stata utilizzata invece la medesima pompa peristaltica.

Per eseguire le analisi computazionali sono stati creati due modelli tridimensionali utilizzando il software Abaqus/CAE, il primo rappresenta una striscia corneale mentre il secondo l'intera geometria della cornea. Si è prima considerato il modello 3D di striscia corneale a cui sono stati assegnati i parametri costitutivi per il materiale corneale ottenuti da risultati sperimentali di test di trazione su strisce corneali porcine sane, svolte in uno studio antecedente a questo, per verificarne la validità ed ottenere quindi dei parametri costitutivi di partenza per il modello computazionale di insufflazione. Questi sono stati associati al modello computazionale di cornea per insufflazione e sono stati modificati fino a quando si è ottenuta una curva pressione-volume quanto più simile a quella ricavata in media dall'attività sperimentale e una risposta pressione-spostamento apicale concorde al comportamento corneale riportato in letteratura.

Capitolo 1

Anatomia e fisiologia dell'occhio umano

Gli occhi sono organi di senso complessi, ricevono stimoli luminosi che vengono elaborati e rendono l'uomo in grado di vedere. Gli occhi sono l'organo più sensibile agli stimoli esterni, infatti, attraverso di essi raccogliamo la maggior parte delle informazioni provenienti dall'ambiente che ci circonda (Barrett et al., 2016).

L'occhio solitamente è descritto approssimativamente come un globo sferico, il cui diametro maggiore è di 24 mm nella direzione anteroposteriore (Irsch e Guyton, 2009). Esso è composto da uno strato di recettori, un sistema di lenti che focalizza la luce su tali recettori e un sistema di nervi che conduce gli impulsi dai recettori al cervello.

L'occhio è contenuto nella cavità ossea del cranio (cavità orbitaria) che lo protegge e a cui è collegato attraverso i tessuti molli del corpo adiposo dell'orbita (Biga et al., 2018).

Il corpo adiposo dell'orbita adempie un'importante funzione di sostegno per il bulbo oculare il quale, tramite la fascia del bulbo (o capsula di Tenone), riposa sulla sua parte anteriore.

Come illustrato in Figura 1.1, il bulbo oculare è composto macroscopicamente da tre strati concentrici di tessuto, che prendono il nome della funzione da loro svolta: una tonaca fibrosa, costituita posteriormente dalla sclera e anteriormente dalla cornea, una tonaca pigmentata vascolare, comprendente la coroide, il corpo ciliare e l'iride, e una tonaca nervosa, rappresentata dalla retina.

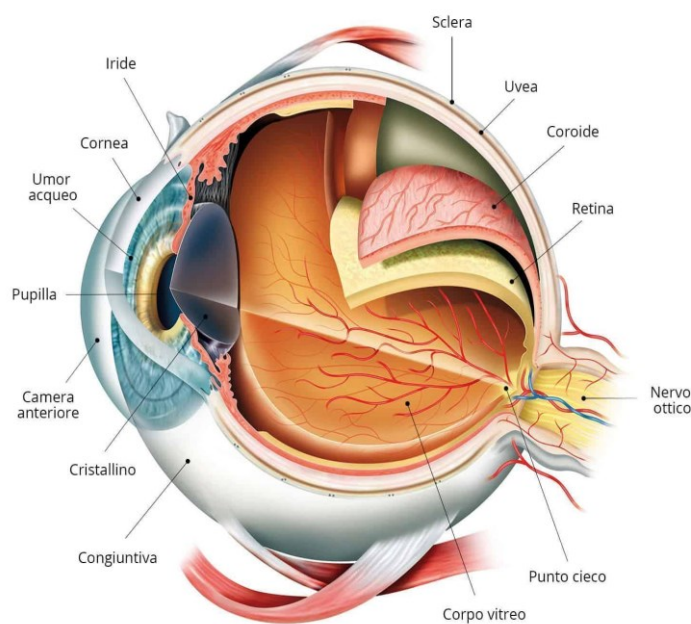


Figura 1.1: Schema dell'occhio e delle sue componenti (Nizzola, 2019).

1.1 Tonaca fibrosa

Lo strato più esterno è la tonaca fibrosa composta dalla sclera bianca che si modifica anteriormente e forma la cornea trasparente. La sclera compone 5/6 della superficie dell'occhio anche se la maggior parte non è visibile. Si estende posteriormente dal perimetro corneale al forame ottico. È approssimabile con una forma sferica con un diametro verticale medio di 24 mm. Lo spessore della sclera non è uniforme: è più spessa nel polo posteriore (1-1.35mm), si riduce gradualmente raggiungendo 0.4-0.6 mm verso l'equatore raggiungendo lo spessore minimo di 0.3mm nei pressi del muscolo retto. Dall'inserzione del muscolo verso la zona del limbus, lo spessore della sclera aumenta gradualmente raggiungendo gli 0.8 mm dove si unisce alla cornea. La sclera delle donne è solitamente più sottile di quella degli uomini. Con l'avanzare dell'età, la sclera aumenta di spessore e opacità. Fornisce un substrato solido per il contenuto intraoculare e lo protegge dagli infortuni. È un tessuto opaco e per questo assicura che la rifrazione di luce interna non abbia effetti sull'immagine retinale. Deve essere abbastanza rigida da garantire condizioni relativamente costanti in modo tale che, anche quando il bulbo oculare si muove, la pressione intraoculare non vari e danneggi la visione. La stabilità ottica è ottenuta attraverso il bilanciamento della pressione intraoculare e la curvatura del rivestimento corneoscleare. Questa stabilità, fondamentale per una visione chiara, è possibile grazie all'organizzazione e alle proprietà viscoelastiche del tessuto connettivo della sclera.

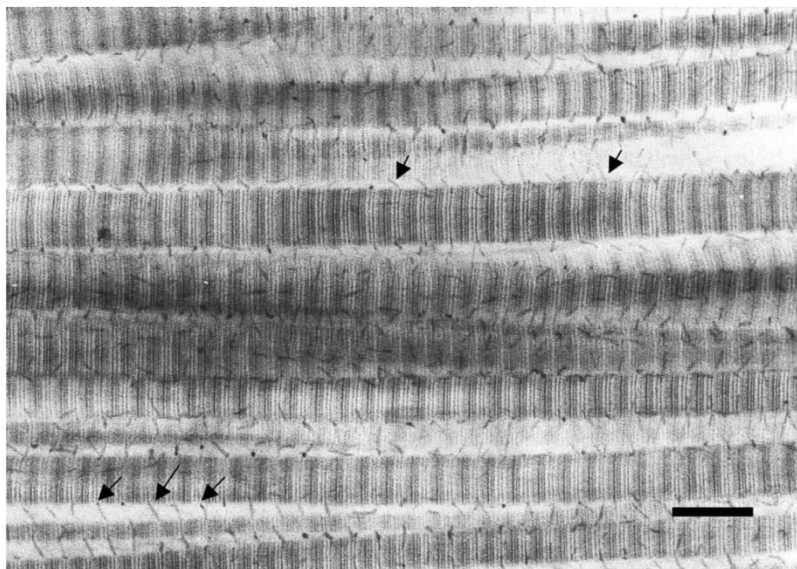


Figura 1.2: Sclera umana normale in sezione longitudinale, sono visibili i proteoglicani come filamenti sottili (indicati dalle frecce) associati a fibrille di collagene. La barra rappresenta 250 nm (Watson e Young, 2003).

La matrice che compone la sclera è composta da uno scaffold di fibrille di proteine, collagene, elastina, proteoglicani e glicoproteine interfibrillari che avvolgono la popolazione cellulare. Le fibrille della sclera sono composte maggiormente da collagene di tipo I e III ma una piccola quantità di tipo V e VI è anche presente. Fibrille più sottili sono presenti nello strato interno della sclera e nella lamina cribrosa dove il nervo ottico entra nell'occhio (Watson e Young, 2003).

La sclera è organizzata in strati concentrici che dall'esterno verso l'interno sono: la Capsula di Tenon, l'episclera, lo stroma sclerale e la lamina fusca. La Capsula di Tenon è uno strato ipocellulare con le cellule disposte radialmente e fasci compatti di collagene orientati parallelamente alla superficie sclerale. Su di essa fanno inserzione i muscoli extraoculari. È avvolta da due strati vascolari che forniscono il nutrimento: il plesso congiuntivale e il plesso episclerale. Muovendosi verso l'interno si trova l'episclera. È uno strato di tessuto connettivo sottile e denso molto vascolarizzato, le sue fibre si uniscono con lo stroma sclerale sottostante. A differenza della Capsula di Tenon, i fasci di collagene sono organizzati in modo circonferenziale con una fitta connessione alle pareti dei vasi sanguigni. Questa connessione ne impedisce i movimenti nella sclera. Lo stroma sclerale è uno strato caratterizzato da forza e resilienza essendo organizzato in fasci paralleli di fibrille di collagene. I fasci in superficie si raggruppano formando delle lamelle disposte parallelamente alla superficie dell'occhio. A differenza della cornea, queste lamelle si diramano e intrecciano e presentano dimensioni molto variabili fino a 50 mm di larghezza e 6 mm di spessore. La lamina fusca rappresenta lo strato più interno della sclera in contatto con l'uvea. In questa regione i fasci di collagene sono più piccoli e si diramano ampiamente per unirsi nel sottostante strato di stroma coroidale (uvea). L'organizzazione di questo tessuto fornisce alla sclera importanti proprietà viscoelastiche proteggendolo nei casi in cui aumenti la pressione intraoculare. Per resistere agli stress e deformazioni imposte dai muscoli extraoculari, questo tessuto è caratterizzato da spiccate proprietà tensionali. Le cellule presenti in questo strato sono fibroblasti e melanociti piatti fusiformi (Watson e Young, 2003). Nella tonaca fibrosa è locata una zona che prende il nome di limbus, formata dall'unione tra la cornea e la congiuntiva epiteliale, che definisce il confine tra la sclera opaca e la cornea trasparente dove il raggio di curvatura cambia improvvisamente. Conferisce il nutrimento alle zone periferiche della cornea e contiene le vie di deflusso dell'umore acqueo (Van Buskirk, 1989). Attraverso questa zona si riscontra un graduale cambiamento delle composizioni della matrice, della sua struttura e delle sue proprietà biomeccaniche che rispecchia il passaggio da sclera a cornea. In questa zona sono presenti le palizzate di Vogt contenenti le cellule staminali da cui hanno origine le nuove cellule del tessuto epiteliale (Van Buskirk, 1989).

L'anatomia della cornea verrà descritta in modo dettagliato successivamente nel Capitolo 2 in quanto parte dell'occhio presa in considerazione in questo studio.

1.2 Tonaca vascolare

Lo strato intermedio dell'occhio è la tonaca vascolare che svolge funzioni quali vascolarizzazione, termoregolazione e produzione di fattori di crescita. È composta dalla coroide, che ne costituisce la maggior parte, il corpo ciliare e l'iride (Biga et al, 2018).

La coroide è uno strato di tessuto connettivo molto vascolarizzato che fornisce il sangue al bulbo oculare e forma la parte posteriore dell'uvea. È collocata posteriormente al corpo ciliare e copre interiormente la tonaca fibrosa. L'istologia della coroide mostra cinque strati che, procedendo dalla sclera alla retina, sono: pigmentato esterno (sovracoroideale), due strati vascolari, uno esterno chiamato di Haller e uno interno chiamato di Sattler (interno), strato coriocalpillare e membrana di Bruch. Lo strato pigmentato esterno (sovracoroide) è una zona di transizione tra la sclera e la coroide composto da tessuto connettivo elastico, fibre di collagene organizzate in lamelle, fibroblasti e melanociti. Questo strato è coperto esternamente dalla lamina Fusca. Lo strato di Haller è composto da vasi larghi, per la maggior parte vene vorticose mentre lo strato di Settler è composto da vasi di calibro medio e piccolo, specialmente arterie. Lo strato coriocalpillare è una ramificazione di vasi coroideali che formano una estesa rete capillare. La membrana di Bruch è uno strato trasparente omogeneo formato da una membrana basale endoteliale dei capillari dallo strato coriocalpillare (Oprea et al., 2016).

Il corpo ciliare rappresenta il secondo strato della tonaca vascolare, è la parte anteriore dell'uvea ed è locato tra l'iride e la coroide. Il corpo ciliare è responsabile della produzione dell'umore acqueo e ne controlla le dinamiche. È una struttura muscolare connessa alla lente. È composto da muscoli, vasi ed epitelio. In sezione trasversale ha la forma di triangolo rettangolo con l'apice connesso alla coroide e con la base vicino all'iride. La superficie esterna è l'inserzione anteriore del tratto uveale mentre la superficie interna è in contatto con la superficie vitrea ed in continuità con la retina. La porzione anteriore del corpo ciliare contigua con la superficie posteriore dell'iride è chiamata *pars plica*, è definita dai processi ciliari: circa 70 creste radiali (processi ciliari maggiori) intervallate da creste minori (processi minori o intermedi). Nei processi ciliari avviene la produzione dell'umor acqueo, questi processi hanno un'area superficiale dai 6 ai 2 cm² per l'ultrafiltrazione e il trasporto attivo dei fluidi. La porzione posteriore del corpo ciliare è chiamata *pars plana*, superficie interna piatta e pigmentata contigua con la coroide nell'ora serrata. La superficie interna dei processi ciliari e della *pars plana* è organizzata in due strati di epitelio: quello più esterno è pigmentato e composto di cellule cuboidali adiacente allo stroma

mentre quello interno è composto da epitelio non pigmentato adiacente all'umore acqueo nella camera posteriore e contiguo con la retina (Giampani e Giampani Junior., 2013). L'ora serrata è la linea circolare seghettata che nell'occhio costituisce la delimitazione fra il corpo ciliare e la coroide. Per estensione si definisce ora serrata anche la corrispondente porzione della retina. È costituita da giunzioni serrate tra la retina e il corpo ciliare dell'occhio. Tale struttura demarca il passaggio tra lo strato non fotosensibile da quello fotosensibile a più strati (la retina) (Wikipedia ora serrata, 2020). Nel corpo ciliare sono presenti i muscoli ciliari, questi sono formati da tre fibre di muscoli separate: longitudinale, circolare e obliquo. Le fibre longitudinali, le più esterne, connettono il corpo ciliare anteriormente alla sclera e al limbus e posteriormente allo strato pigmentato esterno. La contrazione del muscolo longitudinale apre la rete trabecolare ed il canale di Schlemm. Le fibre circolari formano la porzione più anteriore ed interna e si sviluppano parallelamente al limbus, hanno inserzione nella parte posteriore dell'iride. Quando queste fibre si contraggono, le fibre zonulari si rilassano aumentando il diametro assiale della lente e la sua convessità. Le fibre oblique connettono quelle longitudinali e quelle circolari (Giampani e Giampani Junior, 2013).

L'ultima componente dello strato vascolare è l'iride, una membrana del bulbo oculare che costituisce la parte colorata dell'occhio. È un muscolo liscio, con forma e funzione di diaframma che regola la quantità di luce che entra nell'occhio aprendo o chiudendo la pupilla. È situata posteriormente alla cornea e davanti al cristallino (Biga et al, 2018). La superficie dell'iride è divisa in una zona pupillare interna e una zona ciliare esterna, il confine tra queste due aree è delimitato da una struttura sinuosa detta collaretto. L'iride è formata da quattro strati, dal più anteriore al posteriore il primo è lo strato di confine anteriore che è composto principalmente da fibroblasti e melanociti pigmentati distanziati da grandi fosse chiamate cripte di Fuchs. Lo strato successivo è lo stroma, contiene fibre di collagene disposte in modo non ordinato che circondano i vasi sanguigni e le fibre dei nervi. La componente cellulare è formata da fibroblasti, melanociti e da cellule a grappolo e mastociti particolarmente caratteristiche di questo strato. Il pigmento nei melanociti determina il colore dell'iride, occhi blu indicano la mancanza di pigmenti di melatonina. In profondità allo stroma è locato il muscolo sfintere pupillare che circonda con le sue fibre muscolari i margini pupillari, contraendosi causa il restringimento della pupilla. Il muscolo dilatatore è formato dai processi delle cellule mioepiteliali dell'epitelio anteriore, il terzo strato dell'iride. Le fibre del muscolo dilatatore sono disposte secondo un pattern radiale e terminano alla radice dell'iride. L'ultimo strato è l'epitelio pigmentato posteriore, composto da cellule colonnari e più pigmentate rispetto a quelle dell'epitelio anteriore, è il principale assorbitore di luce nell'iride (Irsch e Guyton, 2009).

1.3 Tonaca nervosa

Lo strato più interno dell'occhio è la tonaca nervosa o retina, che contiene il tessuto nervoso responsabile della fotorecezione. La retina è composta da diversi strati e contiene cellule specializzate nel processare stimoli visuali. I fotorecettori (coni e bastoncelli) cambiano il loro potenziale di membrana quando sono stimolati da energia luminosa. Questo modifica la quantità di neurotrasmettitore che le cellule fotorecettori liberano nelle cellule bipolari presenti nello strato esterno sinaptico. Le cellule bipolari connettono un fotorecettore ad una cellula gangliare retinica (RGC) nello strato sinaptico interiore, qui le cellule amacrine contribuiscono all'elaborazione retinale prima che un potenziale di azione sia prodotto dalle RGC. Gli assoni delle RGC locati nello strato più interno della retina si raccolgono al disco ottico ed escono dall'occhio formando il nervo ottico attraverso il quale le informazioni sono condotte al cervello. A causa di questi assoni che passano attraverso la retina, non ci sono fotorecettori nel retro dell'occhio dove inizia il nervo ottico. Questo crea un punto cieco (disco ottico) nella retina e quindi nel campo visivo (Biga et Al, 2018). Nel centro della retina è presente una piccola depressione nota come fovea, in questa area la retina è priva di cellule e vasi sanguigni e contiene solo fotorecettori, in questo modo la luce non viene assorbita da altre strutture della retina ma viene concentra nei fotorecettori. Per questo motivo la fovea è l'area dove l'acuità visiva, cioè la nitidezza della visione, è massima. Allontanandosi da questo punto l'acuità visiva diminuisce progressivamente (Biga et Al, 2018).

Dal punto di vista istologico anche la retina è composta da diversi strati. Il primo strato, la membrana limitante interna, è formata sia da elementi del corpo vitreo che della retina e si trova vicino al corpo vitreo, gli altri sono invece progressivamente più vicini alla coroide.

Segue lo strato di fibre nervose che contiene gli assoni delle cellule gangliari. Queste fibre nervose formano fasci e convergono nel disco ottico. I corpi cellulari delle cellule gangliari sono situati in uno strato che prende da loro il nome. Molti dendriti si estendono nello strato plessiforme interno dove formano sinapsi con le cellule di interconnessione, i corpi di queste cellule si trovano nello strato nucleare interno. Lo strato plessiforme esterno contiene connessioni sinaptiche a cellule fotorecettori. Proseguendo si trova lo strato nucleare esterno, dove si trovano i corpi cellulari dei fotorecettori. La membrana limitante esterna è chiamata impropriamente membrana in quanto è composta da fitti intrecci tra fotorecettori a cellule di supporto (Irsch e Guyton, 2009). I fotorecettori sono contenuti nello strato dei recettori, si dividono in due tipi: coni e bastoncelli. Ogni retina umana contiene 110-125 milioni di bastoncelli e 6.3-6.8 milioni di coni. I bastoncelli sono molto sensibili alla luce e sono responsabili della visione notturna (*scotopic vision*), i coni hanno un'acuità visiva più elevata

e sono il sistema assegnato alla visione diurna (*photopic vision*) e dei colori (Barret et Al). Nell'epitelio pigmentato retinale sono presenti cellule che forniscono i nutrienti a fotorecettori, contiene inoltre granuli di pigmenti di melanina che potenziano l'acuità visiva assorbendo la luce che i fotorecettori non assorbono. La funzione più importante svolta dall'epitelio pigmentato retinale è quella di immagazzinare e sintetizzare la vitamina A essenziale per la produzione del pigmento visuale. Questo epitelio è appoggiato sulla membrana di Bruch, una membrana basale che si trova sulla superficie interna della coroide (Irsch e Guyton, 2009).

1.4 Strutture di protezione, motorie e mezzi diottrici

Intorno all'occhio sono presenti delle strutture esterne: le palpebre che agiscono da protezione e le strutture motorie che ne consentono il movimento.

Le palpebre, a cui sono connesse le ciglia, aiutano a proteggere l'occhio da abrasioni bloccando particelle esterne che potrebbero venire a contatto con la loro superficie. La superficie interna di ogni palpebra è una membrana sottile nota come congiuntiva palpebrale (Figura 1.3) che si estende sopra le aree bianche dell'occhio (sclera) congiungendo le palpebre con il bulbo oculare.



Figura 1.3: Visione esterna dell'occhio. Le palpebre sono le strutture di protezione (Netter, 2018).

Le lacrime prodotte dalla ghiandola lacrimale scorrono attraverso il dotto lacrimale fino all'angolo mediale dell'occhio dove scorrono sulla congiuntiva per lavare via particelle esterne (Biga et al., 2018).

Il movimento degli occhi all'interno delle orbite è possibile attraverso la contrazione di sei muscoli extra oculari, visibili in Figura 1.4, che originano dalle ossa dell'orbita e si inseriscono sulla superficie del bulbo oculare.

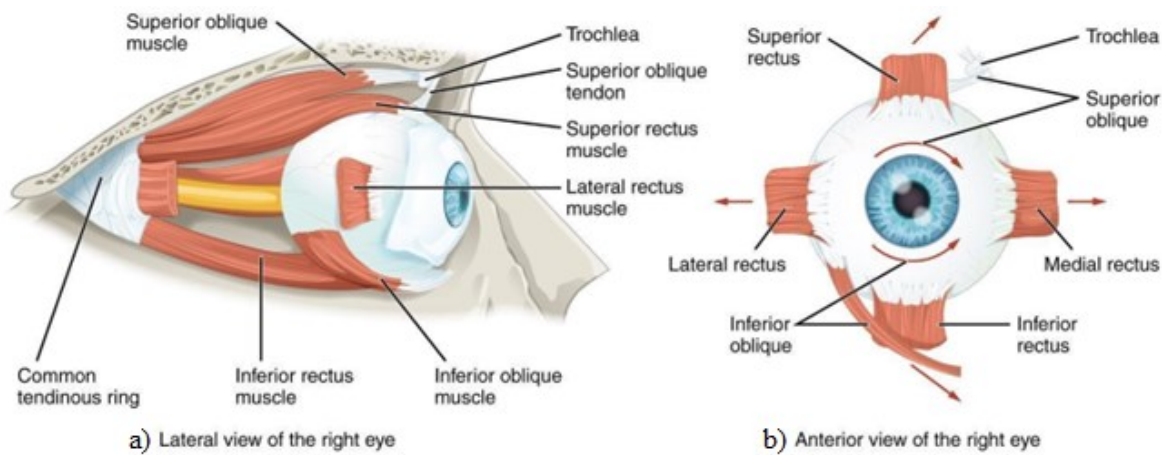


Figura 1.4. Rappresentazione dei muscoli estrinseci in una visione laterale (a) e in una visione anteriore (b) dell'occhio destro all'interno della cavità orbitaria. Le frecce in rosso mostrano i movimenti oculari dati dalla contrazione dei singoli muscoli (Biga et al., 2018).

Quattro di questi muscoli sono posti in corrispondenza dei punti cardinali attorno all'occhio e prendono il nome da essi: i muscoli superiore retto, mediale retto, inferiore retto e laterale retto. Quando uno di questi muscoli si contrae, l'occhio si muove nella direzione di contrazione del muscolo. Il muscolo superiore obliquo origina nell'orbita posteriore vicino all'origine dei quattro muscoli retti. Il tendine del muscolo obliquo inserendosi obliquamente nella superficie dell'occhio esercita la sua azione attraverso una parte cartilaginea che fa da puleggia, detta troclea. Tra il tendine e la troclea si forma così un angolo, per questo motivo la contrazione del muscolo superiore obliquo comporta la rotazione dell'occhio medialmente. Il muscolo obliquo inferiore origina dalla parete inferiore dell'orbita e ha inserzione nella superficie anterolaterale dell'occhio, quando si contrae ruota lateralmente l'occhio in opposizione al superiore obliquo. La rotazione del bulbo oculare tramite i muscoli obliqui è necessaria perché l'occhio non è perfettamente allineato con il piano sagittale. Infatti, quando l'occhio guarda in alto o in basso deve anche ruotare leggermente per compensare il fatto che il muscolo superiore tira ad un angolo di circa venti gradi e non dritto verso l'alto. Lo stesso vale per il muscolo retto inferiore che è compensato dalla contrazione del muscolo obliquo inferiore. Un settimo muscolo è presente nell'orbita, il muscolo elevatore della palpebra, come indica il nome ha il compito di sollevare e ritrarre la palpebra superiore. I muscoli extra oculari sono innervati da tre nervi cranici, il nucleo motorio di questi nervi è connesso al tronco encefalico il quale coordina i movimenti degli occhi (Biga et al., 2018).

L'occhio è diviso in due cavità una anteriore ed una posteriore.

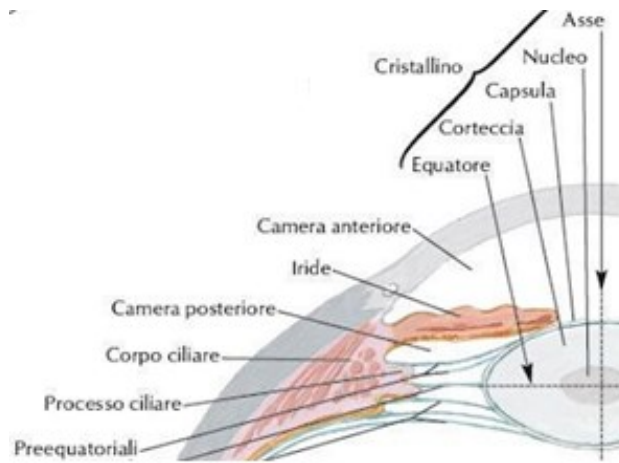


Figura 1.5: Mezzi diottrici. Sono visibili la camera anteriore, la camera posteriore e il cristallino (Netter, 2018).

La cavità anteriore corrisponde allo spazio tra la cornea e la lente e comprende l'iride ed il corpo ciliare. È riempita da un fluido acquoso chiamato umore acqueo, fornisce il nutrimento alla cornea e al cristallino ed è prodotto dal corpo ciliare tramite diffusione e trasporto attivo dal plasma. Viene riassorbito tramite una rete di trabecole nei canali di Schlem, un canale venoso che si trova nel passaggio tra l'iride e la cornea nel cosiddetto angolo della camera anteriore.

La cavità posteriore è lo spazio dietro la lente che si estende fino alla parte posteriore del bulbo oculare anteriore, dove si trova la retina. La cavità posteriore è riempita da un fluido più viscoso chiamato umore vitreo che mantiene la pressione intraoculare e aiuta l'occhio a mantenere la sua forma (Biga et al., 2018).

La lente del cristallino è una struttura trasparente sorretta dal legamento sospensore circolare (o zonula ciliare di Zinn) che è connesso al muscolo ciliare. L'azione del muscolo ciliare causa il rilassamento o la tensione delle zonule rendendo possibile l'accomodazione del cristallino: l'abilità di cambiare la sua curvatura permette di mettere a fuoco sulla superficie della retina oggetti a distanze diverse. Questa abilità diminuisce con l'età, l'occhio diventa presbionico (Irsch e Guyton, 2009).

Cornea, umore acqueo, corpo vitreo e cristallino compongono l'apparato diottrico dell'occhio, raggiungendo un potere rifrattivo complessivo di circa 60 diottrie. La componente di rifrazione maggiore dell'occhio è la cornea a causa della grande differenza di indice di rifrazione attraverso l'interfaccia aria-cornea (Irsch e Guyton, 2009).

Capitolo 2

La cornea

2.1 Anatomia e Fisiologia

La cornea trasparente forma la porzione anteriore della tonaca fibrosa, non ha una composizione complessa e non si muove. È un tessuto connettivo privo di vasi che agisce da protezione per il contenuto interno dell'occhio (DelMonte e Kim, 2011). Nonostante sia avascolare necessita del sangue e delle sue componenti per rimanere in salute, questi sono forniti da piccoli vasi presenti nel bordo più esterno della cornea e da rami delle arterie facciali e oftalmiche attraverso l'umore acqueo e il film lacrimale. Assieme al film lacrimale forma la superficie refrattiva anteriore dell'occhio, infatti la cornea rappresenta 2/3 del potere refrattivo dell'occhio contribuendo con 40-44 diottrie ed è caratterizzata da un indice di rifrazione di 1.376 (Sridhar, 2018). La sua trasparenza è risultato di diversi fattori quali l'anatomia strutturale e la fisiologia dei suoi componenti cellulari. La cornea è uno dei tessuti più innervati del corpo umano, per questo è molto sensibile. I nervi corneali e le sensazioni derivano dal ramo naso ciliare della prima divisione (oftalmica) del nervo trigemino. La forma e la curvatura corneale sono regolate dalla struttura biomeccanica intrinseca e dall'ambiente estrinseco. La forma è considerabile ovale convessa, più piatta nelle zone periferiche e più ripida centralmente, questa consente di ottenere un sistema ottico asferico. La curvatura corneale anteriore è di 7.8 mm mentre la curvatura posteriore è di circa 6.5mm (Sridhar, 2018). Nell'adulto medio il diametro orizzontale della cornea è tra gli 11.5 e i 12 mm, quello verticale tra i 10.5 e 11 mm (DelMonte e Kim, 2011). Lo spessore della cornea è compreso tra 551 e 565 μm nel centro e aumenta gradualmente verso le zone periferiche dai 612 ai 640 μm , questa variazione è dovuta all'aumento di collagene nello stroma periferico. Lo spessore della cornea diminuisce con l'avanzare dell'età.

La cornea umana consiste in cinque strati (Figura 2.1), tre cellulari: Epitelio, stroma, endotelio e due interfacce: Membrana di Bowman e Membrana di Descemet.

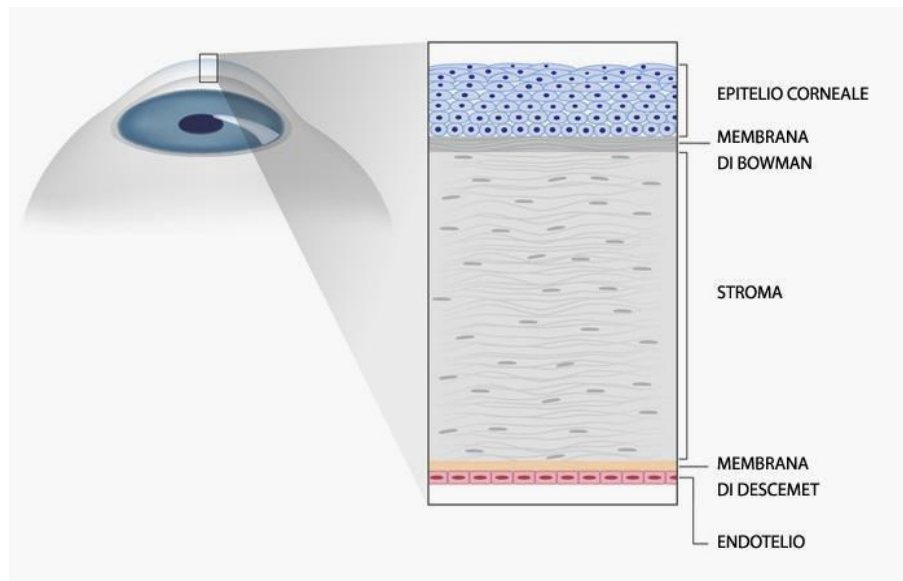


Figura 2.1: struttura della cornea nei vari strati (A. Di Maria, 2015).

2.1.1 Epitelio

È lo strato più esterno della cornea. Forma la prima barriera verso l'ambiente esterno ed è parte integrante dell'interfaccia tra film lacrimale e la cornea fondamentale per il potere rifrattivo dell'occhio. La composizione cellulare dell'epitelio è visualizzata in figura 2.2.

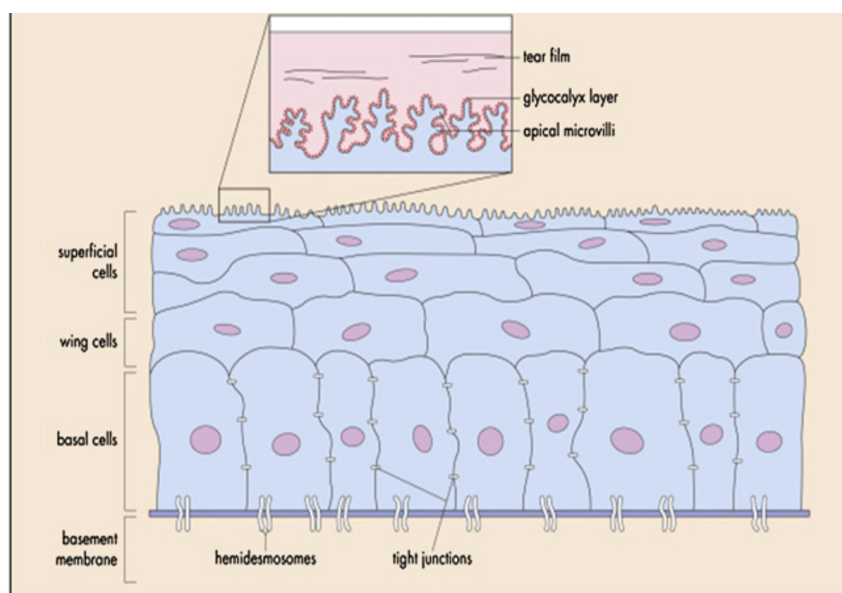


Figura 2.2: Vista in sezione trasversale dello strato di cellule epiteliali corneali (DelMonte e Kim, 2011).

È un epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato contraddistinto da un'organizzazione piuttosto uniforme composta dai 4 ai 6 strati cellulari per uno spessore che varia dai 40 ai 50 mm (DelMonte e Kim, 2011). L'epitelio e il sovrastante film lacrimale esistono in simbiosi. Il film lacrimale ricopre l'epitelio rendendolo più regolare anteriormente conferendo migliori proprietà ottiche. Lo strato mucinico di questo film è in contatto diretto con l'epitelio della cornea, è prodotto dalle cellule globulari congiuntivali ed interagisce strettamente con le cellule glicocalici dell'epitelio della cornea per consentire la diffusione idrofilica del film lacrimale ad ogni sbattimento di ciglia (Sridhar, 2018). Il film lacrimale protegge anche la cornea da invasioni da parte di microbi, agenti chimici tossici e corpi esterni, inoltre fornisce fattori di crescita ed immunologici fondamentali per la salute dell'epitelio, la sua proliferazione e riparazione. Le cellule dell'epitelio hanno una durata di vita che va dai 7 ai 10 giorni rinnovandosi così ciclicamente, ogni settimana le cellule presenti in profondità prendono il posto di quelle superficiali degradate.

Lo strato più in superficie è composto da cellule che formano circa 2 o 3 strati di celle poligonali piatte, queste hanno microvilli apicali estesi e microplacae che a loro volta sono coperte strettamente da uno strato fino di glicocalici. La membrana apicale di questo strato aumenta la superficie di contatto e aderenza tra il film lacrimale mucinico e la membrana cellulare formando un sistema ottico liscio e chiaro. Lo strato cellulare più profondo dell'epitelio è lo strato basale, composto da un singolo strato di cellule colonnari epiteliali alte circa 20 mm che sono in grado di compiere la mitosi. Queste cellule basali sono connesse in modo forte alla sottostante membrana cellulare da un sistema emidesmosoidale, in questo modo l'epitelio non si può separare dallo strato di cornea sottostante. La membrana basale epiteliale è spessa circa 0.05 mm ed è composta da collagene di tipo 4 e laminina secrete dalle cellule basali (DelMonte e Kim, 2011). Ci sono differenze tra l'epitelio che si trova al centro o nelle periferie della cornea. In quella centrale l'epitelio ha 5-7 strati, le cellule basali sono colonnari e formano uno strato liscio con cheratin solfato. Nelle zone periferiche invece l'epitelio ha 7-10 strati, le cellule basali sono cuboidali, sono presenti melanociti e cellule di Langerhans. Queste cellule formano uno strato basale ondulato (Sridhar, 2018).

L'epitelio forma il 10% dello spessore della cornea e generalmente non vi è attribuito nessun ruolo biomeccanico (Ma et al., 2018). In test di insufflazione su bottoni corneali Elsheitk et al hanno stimato che l'epitelio compone il 10-14% della rigidità di uno stesso spessore di stroma.

2.1.2 Strato di Bowman

Lo strato di Bowman giace anteriormente allo stroma e non è una vera membrana ma più esattamente un condensato cellulare, formato da collagene e proteoglicani, della porzione più superficiale dello stroma. Questo strato liscio è spesso circa 15 µm ed è costituito da collagene di tipo I e V e da proteoglicani (DelMonte e Kim, 2011). Le fibrille di collagene, di diametro 22 nm, sono densamente impacchettate e disposte in modo casuale in continuità con quelle dello stroma per questo si ritiene stabilizzino la curvatura corneale (Ma et al., 2018). Lo strato di Bowman Aiuta la cornea a mantenere la sua forma ma non ha capacità rigenerativa per cui in caso di rottura non si rigenera e forma una cicatrice (DelMonte e Kim, 2011). Seiler e collaboratori tramite analisi stress deformazione uniassiale hanno dimostrato che lo strato di Bowman non contribuisce significativamente alla stabilità della cornea mentre tramite studi fem Shih e collaboratori hanno dimostrato che lo strato di Bowman contribuisce al 20% della rigidità al piegamento della cornea (Ma et al., 2018).

2.1.3 Stroma

Lo stroma della cornea costituisce la parte principale del framework strutturale della cornea, infatti, ne rappresenta tra l'80 e l'85 % dello spessore totale. È composta dal 78% da acqua, 15% collagene e 7% da altre proteine, proteoglicani e sali (Maurice, 1984). A differenza delle altre strutture collagenose è trasparente, questo è il risultato di una precisa organizzazione delle fibre stromali e della matrice extracellulare (DelMonte e Kim, 2011). All'interno delle fibre è predominante il collagene di tipo I ma sono presenti anche collagene di tipo VI e XII. Le fibre di collagene sono disposte in fasci paralleli (fibrille) e queste fibrille sono raggruppate in strati paralleli detti lamelle (Sridhar, 2018).

A livello microscopico il collagene nello stroma è disposto in lamelle caratterizzate da uno spessore variabile, questo negli umani varia dai 0.2 µm ai 2 µm. Lo stroma dell'occhio umano contiene 200-250 lamelle, ogni strato è ortogonale alle fibre della lamella adiacente. Le lamelle anteriori sono fortemente interconnesse e si inseriscono in maggioranza nello strato di Bowman mentre le lamelle al centro della cornea sono meno intrecciate, contraddistinte da un'idratazione maggiore e si dispongono l'una sopra l'altra. L'ultrastruttura all'interno dell'organizzazione delle lamelle varia scendendo in profondità nello stroma, gli strati più profondi sono più organizzati di quelli superficiali e caratterizzati da una densità maggiore.

La regione posteriore dello stroma prima dell'ultimo strato di cheratociti è diversa e può essere considerato uno strato a sé stante chiamato Dua Layer o pre-Descemet Layer. È stato dimostrato

che questa regione è strettamente legata al meshwork trabecolare e come questa struttura è ricca di collagene di tipo IV.

Lo stroma periferico è più spesso di quello centrale, avvicinando al limbus le fibrille di collagene cambiano direzione e iniziano a disporsi circonferenzialmente (fig. 2.3).

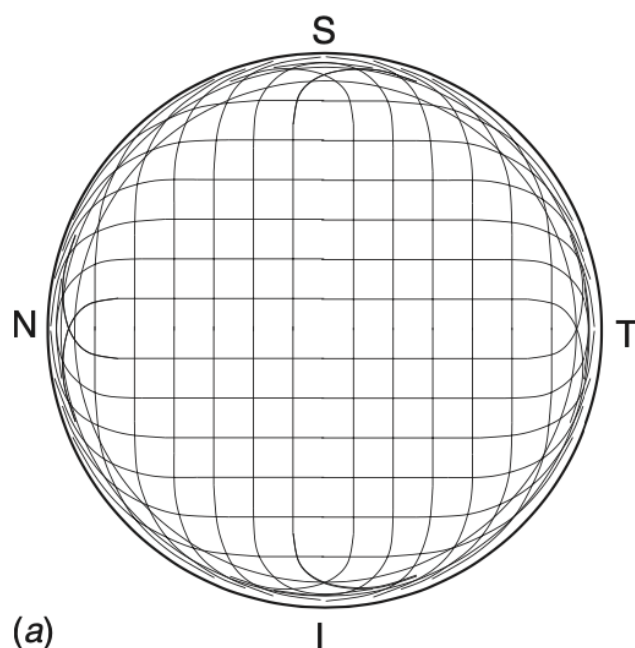


Figura 2.3: Schema dell'orientamento delle fibrille di collagene nella cornea umana (Meek e Knupp, 2015).

Questa rete molto organizzata riduce la dispersione della luce che arriva e contribuisce alla trasparenza e alla forza meccanica della cornea. Nella cornea prepupillare, parte della cornea di spessore ridotto, le fibrille di collagene sono molto dense, questo è necessario per resistere agli stress mantenendo intatte le proprietà meccaniche e la curvatura.

Le fibrille di collagene che compongono le lamelle della cornea in quanto costituenti portanti devono resistere a tensioni dovute alla pressione intraoculare, proteggere la superficie interna da traumi ma al contempo devono essere strette per garantire la trasparenza del tessuto. Per svolgere queste diverse funzioni contemporaneamente le fibrille sono organizzate in modo complesso strutturalmente. Ci sono tra le 300-400 molecole a tripla elica all'interno della sezione trasversale di una fibrilla, sono composte da collagene di tipo 1 in un complesso eterodimerico con collagene tipo 4 per ottenere il loro diametro ridotto caratteristico. Questi complessi sono circondati da proteoglicani specializzati che aiutano a regolare l'idratazione e le proprietà strutturali. I cheratociti costituiscono la componente cellulare principale dello stroma e partecipano al mantenimento dell'ambiente dell'ECM, sono in grado di sintetizzare molecole di collagene, glicosaminoglicani e metalloproteasi che svolgono una funzione cruciale

nel mantenimento dell'omeostasi dello stroma. La maggior parte di questi cheratociti si trovano nello stroma anteriore e contengono cristallina, una proteina solubile presente nelle cellule che riduce la retrodiffusione della luce aiutando a mantenere la tipica trasparenza della cornea (Meek e Knupp, 2015).

2.1.4 Membrana di Descemet

La membrana di Descemet (fig 2.4) è una struttura elastica con spessore medio di 7 μm che serve come membrana basale endoteliale. Le cellule endoteliali secernono questa membrana, i 3 μm anteriori secreti prima della nascita sono contraddistinti da bande mentre gli strati post nascita hanno un'ultrastruttura amorfa. La membrana di Descemet con l'età può raggiungere lo spessore di 10 μm (Sridhar, 2018). È formata da componenti collagenosi e non, le 4 componenti principali sono: laminina, collagene tipo IV, nidogens e perlecan. Svolge un ruolo essenziale nel mantenimento della struttura della cornea, nell'omeostasi ed anche nel garantire la trasparenza corneale. Ancora l'endotelio alla cornea contribuendo così all'integrità della cornea fondamentale per la sua idratazione e trasparenza, simultaneamente consente l'entrata dei nutrienti e macromolecole nello stroma (de Oliveira e Wilson, 2020).

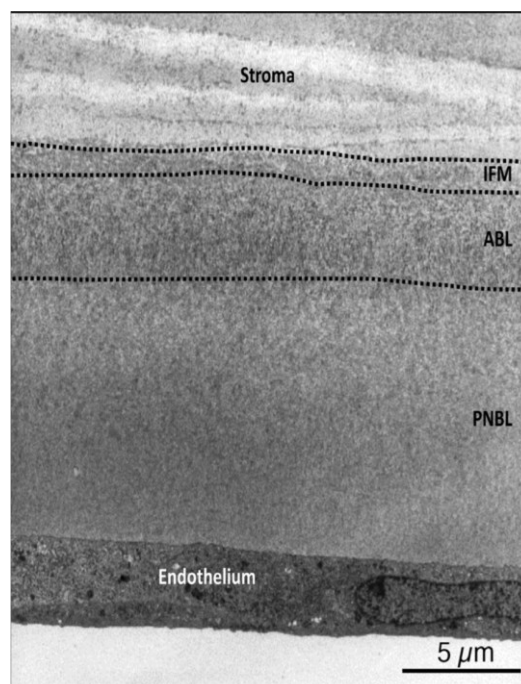


Figura 2.4: Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) della normale membrana di Descemet umana adulta. La matrice interfacciale anteriore (IFM) ha la funzione di fissare la membrana di Descemet allo stroma sovrastante. Lo strato anteriore a bande (ABL) e lo strato posteriore non a bande (PNBL) si trovano più indietro e costituiscono la maggior parte della membrana basale (de Oliveira e Wilson, 2020).

2.1.5 Endotelio

Lo strato endoteliale della cornea garantisce la trasparenza della cornea assicurandosi che essa rimanga idrata. L'endotelio umano (Figura 2.5) è uno strato spesso 5 μm , composto da cellule esagonali metabolicamente attive.

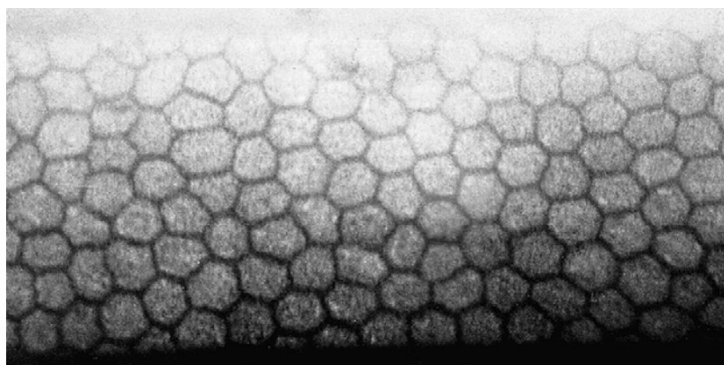


Figura 2.5: Fotomicrografia speculare di endotelio normale. Evidenti i confini scuri e ben definiti delle cellule, la disposizione regolare degli esagoni e le dimensioni uniformi delle cellule (Del Monte e Kim, 2011).

Alla nascita lo strato endoteliale è spesso circa 10 μm e consiste in un singolo strato cellulare di spessore uniforme che si espande in tutta la superficie posteriore della cornea e si fonde con le cellule della rete trabecolare. Le cellule di questo monostrato continuano ad appiattirsi nel tempo fino a stabilizzarsi intorno ai 4 μm di spessore nell'adulto. Le cellule adiacenti condividono ampie interdigitazioni laterali e possiedono gap e tight junctions lungo i loro bordi esterni (Del Monte e Kim, 2011). Le membrane laterali contengono un'alta densità di pompe $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ per la regolazione del contenuto d'acqua. La superficie basale dell'endotelio contiene molti emidesmosomi che favoriscono l'adesione della membrana di Descemet. La concentrazione e la topografia delle cellule endoteliali cambiano continuamente durante la vita. Lo stroma corneale, contenente il 78% d'acqua, è mantenuto idratato dall'attività delle cellule endoteliali. La deidratazione avviene attraverso le pompe, il fluido esce dallo stroma corneale e fluisce per gradiente di osmosi dallo stroma che è relativamente isotonica verso l'umore acqueo ipertonico. Questo movimento del fluido non richiede energia invece per il trasporto degli ioni dallo stroma verso l'umore acqueo necessario a generare il gradiente osmotico è richiesta energia (Sridhar, 2018).

Le cellule endoteliali non hanno attività mitotica in vivo per questo gli umani nascono con una consistente riserva. La perdita o il danneggiamento delle cellule dell'endotelio causa un aumento della quantità d'acqua assorbita dallo stroma (DelMonte e Kim, 2011).

2.2 Principali Patologie

Il disturbo più comune della cornea associato a modifiche delle proprietà biomeccaniche è il cheratocono. Questo è caratterizzato da un assottigliamento della cornea e rotture nello strato di Bowman con conseguente riduzione dell'elasticità delle fibre di collagene. La densità delle cellule dell'epitelio basale è minore nelle cornee affette da cheratocono. Lo spessore medio dell'epitelio e dello strato di Bowman è ridotto rispetto all'occhio sano, le variazioni nello spessore dell'epitelio è accentuata in particolare nei 3 mm centrali della cornea. Meek e collaboratori hanno dimostrato che lo sviluppo del cheratocono comporta un alto grado di spostamento tra le lamelle e scivolamento di esse, questo comporta l'assottigliamento della cornea centrale e conseguenti modifiche alla curvatura della cornea. Questo scivolamento può essere favorito dalla perdita di forze di coesione nelle zone dove le lamelle si biforcano. Nell'occhio affetto da cheratocono non ci sono fasci di microfibrille anteriori alla membrana di Descemet ma si trovano sotto l'epitelio, ciò comporta una riduzione delle proprietà meccaniche perché nell'occhio sano queste microfibrille forniscono forza aggiuntiva allo stroma anteriore prevenendo la rottura del tessuto. I componenti dell'ECM quali proteoglicani e collagene nella cornea malata vedono la propria espressione genetica alterata e possono trovarsi in posizioni anomale.

Un altro disturbo della cornea caratterizzato da un progressivo assottigliamento dello stroma periferico inferiore, interruzioni dello strato di Bowman e cicatrici stromali è la degenerazione marginale pellucida.

Nella distrofia corneale maculare sono presenti alcuni fasci di fibrille di collagene di grande diametro non fisiologico che causano progressivamente l'opacizzazione della cornea (Ma et al., 2018).

2.2.1 Corneal crosslinking

È una procedura usata per aumentare la resistenza biomeccanica della cornea inducendo la formazione di nuovi legami molecolari tra le fibrille di collagene e le lamelle tramite riboflavin e luce UV-A. Studi sperimentali hanno dimostrato che questa tecnica aumenta significativamente la rigidità della cornea. Questo trattamento si dimostra utile contro casi di cheratocono. Studio ex vivo sulla cornea umana registrano un aumento del 328.9% della rigidità della cornea perché questo trattamento separa le fibre e conseguentemente induce un aumento nella spaziatura intermolecolare e l'aumento di diametro del collagene (Ma et al., 2018).

2.3 Modellazione FEM della cornea in letteratura

Il metodo agli elementi finiti (FEM) è una tecnica numerica utilizzata per ottenere soluzioni approssimate di equazioni differenziali alle derivate parziali riguardanti fenomeni di vario tipo quali fisici, termici e chimici.

La modellazione numerica basata sul FEM è usata per analizzare accuratamente il comportamento meccanico della cornea in risposta a diverse azioni meccaniche permettendo di analizzare parametri del modello non approfonditi durante le prove sperimentali (Anderson, 2004).

Generalmente queste equazioni differenziali sono impossibili da risolvere analiticamente a causa delle geometrie complesse e delle proprietà del materiale. L'approccio per risolvere queste equazioni è semplificare la loro forma usando delle funzioni di interpolazioni ed integrare l'intera soluzione per ottenere il risultato finale. Per svolgere un'analisi agli elementi finiti (FEA), un dato corpo è diviso in piccole unità chiamate elementi, questi sono interconnessi in punti chiamati nodi. I nodi e gli elementi creano una rete chiamata mesh. Ad ogni elemento è assegnato uno specifico materiale e proprietà strutturali.

Tecniche FEA sono utilizzate come metodo di previsioni non invasive in un'ampia varietà di strutture biologiche e organi, permettono anche di studiare le relative patologie.

Nel caso della cornea, modelli FEM 3D possono essere usati in applicazioni cliniche per investigare le problematiche esistenti e identificare delle possibili soluzioni. Tramite FEA, si può prevedere la risposta pre e post-operatoria della cornea ad interventi chirurgici e può essere usata come strumento di simulazione per la pianificazione chirurgica paziente specifica (Nejad et al., 2014).

La scelta dei parametri del modello ha delle conseguenze significative sulla qualità dei risultati e sui tempi di elaborazione.

2.3.1 Densità della mesh

Aumentando la densità della mesh normalmente si ottengono due effetti, il primo è una migliore precisione nell'analisi mentre il secondo invece un costo computazionale più elevato dovuto al numero maggiore di nodi e di conseguenti equazioni all'equilibrio da risolvere. Questo trend del miglioramento dell'accuratezza con mesh più dense continua fino ad un certo limite oltre il quale i benefici di una mesh più densa diminuiscono. Aumentare la densità della mesh da 294 a 486 elementi risulta in un massimo miglioramento delle predizioni del 0.9%, un miglioramento così cospicuo (Figura 2.6) non giustifica il carico computazionale maggiore che sarebbe richiesto in costi di analisi (Elsheikh e Wang, 2006).

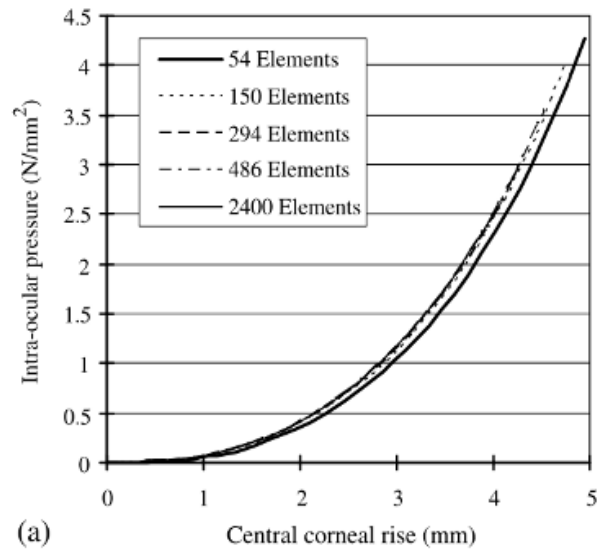


Figura 2.6: Predizioni del comportamento spostamento apicale/IOP utilizzando un modello numerico con diverse dimensioni della mesh (Elsheikh e Wang, 2006).

2.3.2 Condizioni al contorno

Un modello intero dell'occhio che comprende sia la cornea che la sclera fornisce sicuramente una rappresentazione migliore dello stato della cornea rispetto al modello composto unicamente dalla cornea. Ovviamente il modello completo è più costoso da sviluppare e analizzare, per questo si cerca un compromesso realizzando un modello solo cornea in cui le condizioni al contorno lungo i bordi sono rese rappresentative degli effetti della connessione con la sclera. Questo per tenere conto del fatto che la sclera, pur essendo più rigida della cornea, non dovrebbe fornire alla cornea un supporto che le impedisca sia la traslazione che la rotazione. Per questo un'approssimazione ragionevole considera i nodi del bordo del modello corneale attaccati a supporti a rullo in una direzione inclinata (Elsheikh e Wang, 2006). Cambiando l'angolo del supporto si ottengono diverse inclinazioni, Anderson et al. hanno dimostrato che un angolo di 40° fornisce i risultati più simili al modello con occhio intero (Anderson et al, 2004).

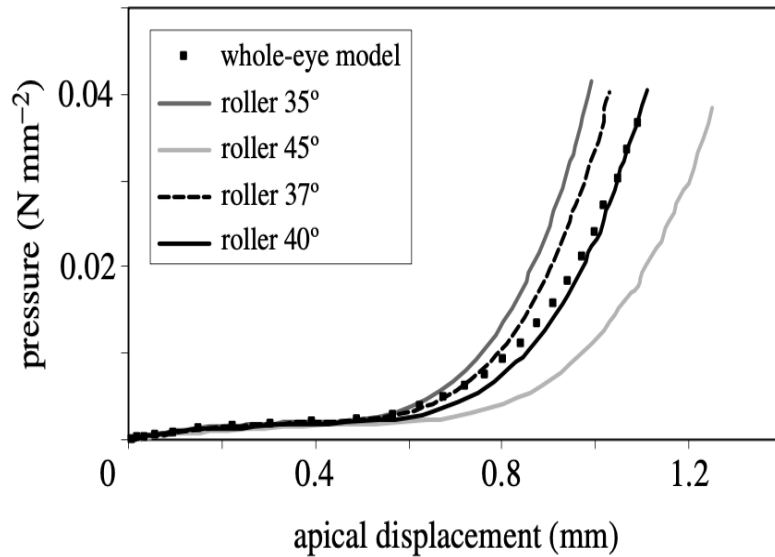


Figura 2.7: Confronto tra il modello di cornea con diversi orientamenti del supporto ed il modello occhio completo (Anderson et al, 2004).

2.3.3 Distribuzione dello spessore

Fisiologicamente lo spessore della cornea varia da un minimo al centro fino a valori massimi lungo il limbus. In termini di modello, è più facile assumere uno spessore costante che considerare uno spessore variabile. Per questo sono state svolte simulazioni di entrambi i casi e i risultati sono stati confrontati. Le differenze nei risultati tra il modello a spessore variabile e quelli a spessore costante sono sufficientemente alte per giustificare la necessità di considerare l'attuale variazione di spessore nella costruzione del modello (Elsheikh e Wang, 2006).

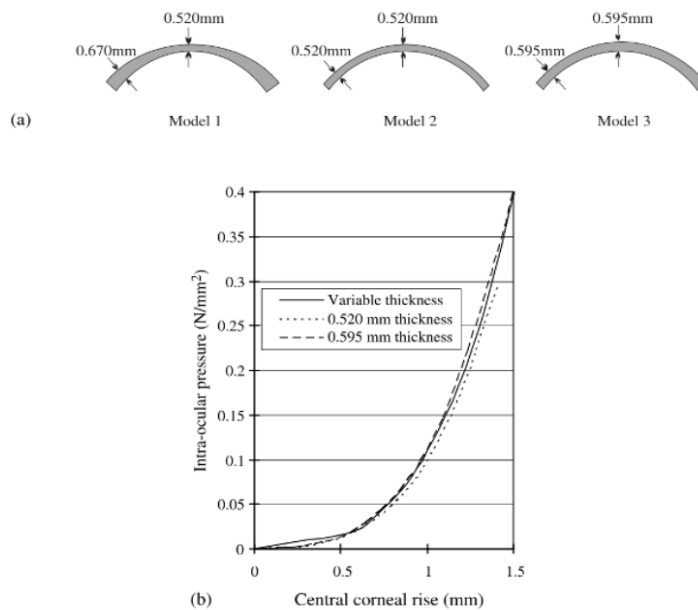


Figura 2.8: Predizioni del comportamento corneale comparando modelli con spessore variabile e fisso (Elsheikh e Wang, 2006).

2.3.4 Topografia della cornea

L'intersezione corneo sclerale è ellittica con un diametro temporale-nasale del 10% maggiore rispetto a quello inferiore-superiore. Questo dà origine ad una topografia corneale non puramente sferica, gli effetti del considerare una forma completamente sferica sono comparati costruendo i due rispettivi modelli. I risultati presentano una differenza nei risultati minore dell'1% confermando così la possibilità di considerare la cornea come un oggetto sferico senza significative perdite in accuratezza (Elsheikh e Wang, 2006).

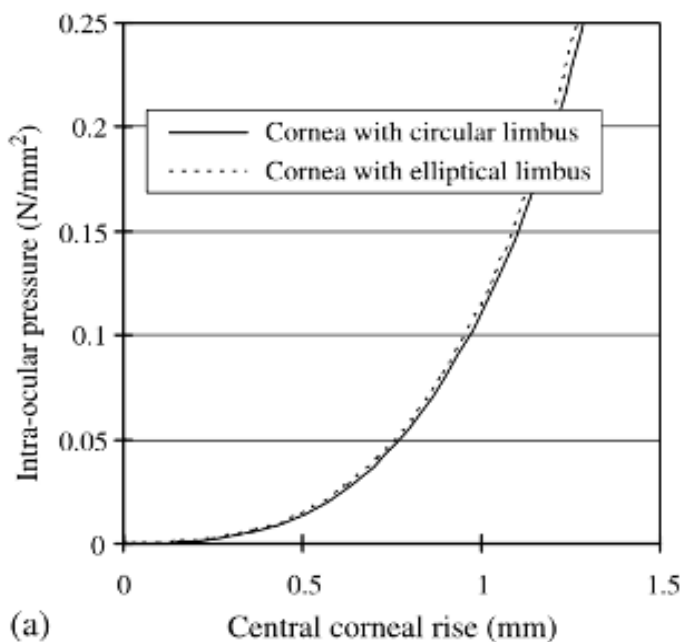


Figura 2.9: Confronto della risposta tra modello di cornea ellittico e circolare (Elsheikh e Wang, 2006).

Capitolo 3

Biomeccanica della cornea

La geometria, i costituenti e la loro organizzazione microstrutturale determinano la caratteristica struttura del tessuto corneale e veicolano le proprietà meccaniche corneali.

La cornea umana ha una complessa struttura, il cui costituente principale è il collagene, che varia sostanzialmente lungo i suoi archi e lungo il suo spessore. Lo stroma che costituisce più del 90% dello spessore corneale è considerato la parte che più ne definisce il comportamento biomeccanico. Lo stroma anteriore è la parte più rigida composta da una rete di lamelle di collagene intrecciate che si inseriscono nello strato di Bowman. Questa struttura a rete conferisce un'alta resistenza alla trazione rendendo lo stroma anteriore il 50% più rigido dello stroma sia mediale che posteriore. Tale caratteristica rende lo stroma anteriore resistente al rigonfiamento, consentendo il preservamento della curvatura della cornea. Nello stroma centrale e posteriore il collagene è disposto da limbus a limbus in due direzioni tra di loro ortogonali, quella nasale temporale e quella superiore inferiore. Questa disposizione permette di avere una resistenza a trazione anche a grandi deformazioni che possono insorgere dall'azione di forze che nascono dal muscolo oculare retto, che controlla i movimenti dell'occhio e dalle palpebre con il battito degli occhi.

Le fibre di collagene, sotto condizioni di tensione fisiologiche, si trovano naturalmente in uno stato ondeggiato. Il processo di allungamento di queste fibre contribuisce significativamente all'assorbimento dei cambiamenti di IOP (Intraocular Pressure) fornendo un meccanismo di deformazione efficiente, a bassa energia e resistente all'usura. Sono state identificate delle differenze nell'organizzazione del collagene: il limbus è la regione della cornea dove si osservano maggiori ondulazioni, tortuosità e ampiezza mentre la cornea periferica mostra valori significativamente maggiori per le suddette caratteristiche rispetto alla cornea centrale.

Nella cornea sono presenti anche fibre di elastina concentrate principalmente nella cornea periferica e posteriormente al limbus. Questa rete elastica agisce assieme alle fibre di collagene ondulate per facilitare l'assorbimento di piccoli cambiamenti di pressione (Wilson e Marshall, 2020).

3.1 Introduzione alla meccanica dei tessuti biologici

Prima di analizzare il comportamento specifico della cornea è utile introdurre alcune definizioni tipiche nella descrizione del comportamento meccanico dei tessuti biologici.

Quando un tessuto biologico è soggetto ad una forza o carico si deforma (trazione, compressione, taglio ecc.) in base alla sollecitazione applicata.

Nella prova di trazione uniassiale, la forza divisa per l'area della sezione trasversale viene definita come tensione; l'allungamento percentuale del tessuto rispetto alla dimensione iniziale nella direzione in cui è applicata la forza è chiamato deformazione.

Nel caso di comportamento elastico lineare il rapporto tra stress e deformazione, che in un grafico stress-deformazione è rappresentato dalla pendenza della curva, è definito come modulo elastico o modulo di Young e descrive la rigidità del tessuto (Figura 3.1) (Dawson et al., 2011).

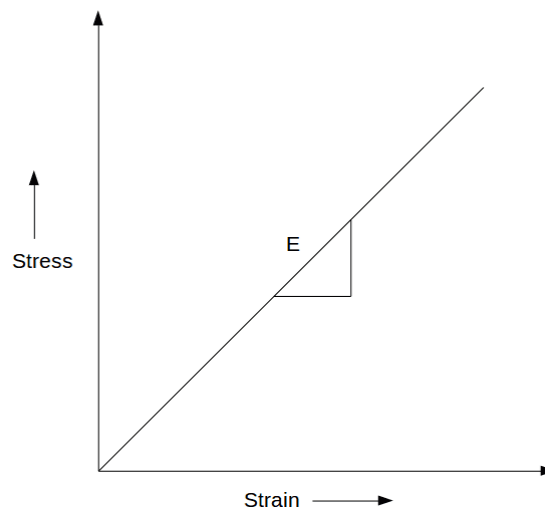


Figura 3.1: Rappresentazione grafica del modulo di Young per un materiale elastico lineare. (Simscale, 2022).

Un materiale in regime elastico torna alla sua geometria iniziale quando la tensione imposta viene rimossa, ripercorrendo la stessa curva stress deformazione. Per tale motivo viene definito processo reversibile. Il modulo elastico è solitamente misurato su campioni di tessuto con estensimetri che misurano la forza generata durante la trazione statica assiale del campione. La pendenza dello stress sulla deformazione viene calcolata per una porzione rappresentativa della curva, un modulo elevato indica un materiale molto rigido. Il modulo di Young varia in base alla categoria di materiali considerata, ad esempio, nei materiali metallici il modulo di Young è compreso in un ordine di grandezza tra 10^{10} - 10^{12} Pa mentre nei polimeri tra 10^8 - 10^{10} Pa, nei tessuti biologici molli tra 10^2 - 10^5 Pa (Daalkhajav, 2018).

La maggior parte dei tessuti biologici in caso di stress di intensità ridotta mostra un comportamento elastico lineare, ma a stress maggiori il comportamento caratteristico diventa altamente non lineare (Dawson et al., 2011). Risposte plastiche (Figura 3.2) come snervamento e cedimento hanno origine quando si verifica una deformazione permanente e il materiale non recupera la sua configurazione originale al momento dello scarico.

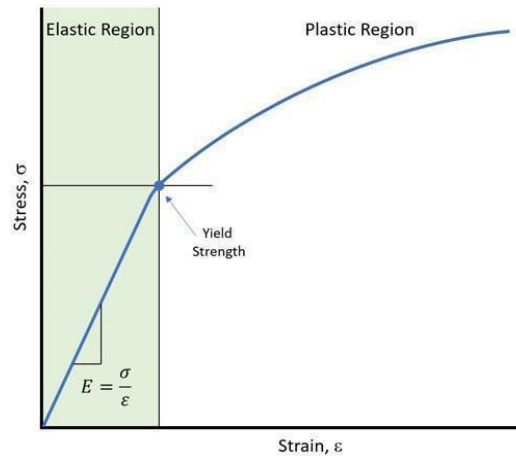


Figura 3.2: Curva stress strain divisa in regione elastica e regione plastica. (Altair, 2017).

Il modulo di Poisson è un fattore di conversione che mette in relazione la deformazione in una direzione e quello in una direzione trasversale ad essa, nelle prove di trazione o compressione un campione in tensione si allunga in una dimensione ma si assottiglia nell'altra.

Le caratteristiche viscoelastiche derivano dal comportamento tempo dipendente (Figura 3.3) delle proprietà biomeccaniche dei tessuti biologici. Queste proprietà sono rappresentate dal fenomeno di isteresi, stress relaxation e creep (Dawson et al., 2011).

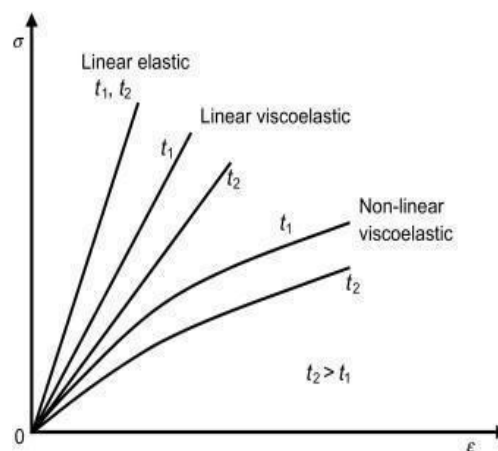


Figura 3.3: Grafico tempo dipendenza in diversi tipi di materiali. (Papanicola S.P., 2019).

A differenza dei materiali elastici, i materiali viscoelastici tornano al loro stato pre-stress attraverso una curva diversa da quella iniziale che dipende dal grado di carico, questa è l'isteresi, la differenza di area tra le due curve (Figura 3.4) rappresenta l'energia dissipata durante un singolo ciclo meccanico.

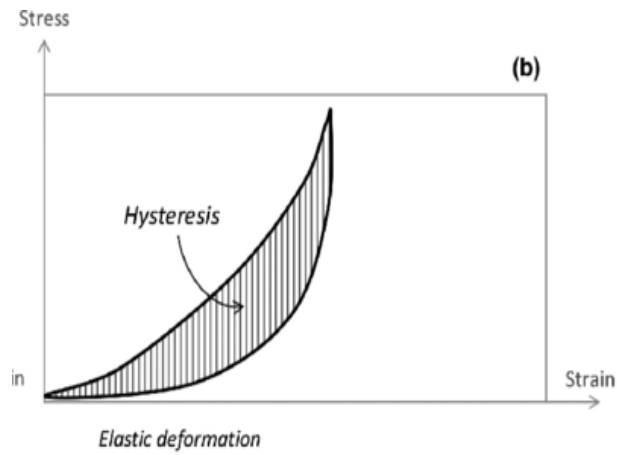


Figura 3.4: Rappresentazione grafica dell'isteresi. (Kling e Hazefi, 2017).

Il creep viscoelastico (Figura 3.5) è un allungamento tempo dipendente che avviene sotto uno stress costante mantenuto per del tempo (es. IOP). In una prova di stress relaxation (Figura 3.5), invece, la deformazione del campione è mantenuta costante, si registra un lento ma quantificabile rilassamento del carico (Dawson et al., 2011).

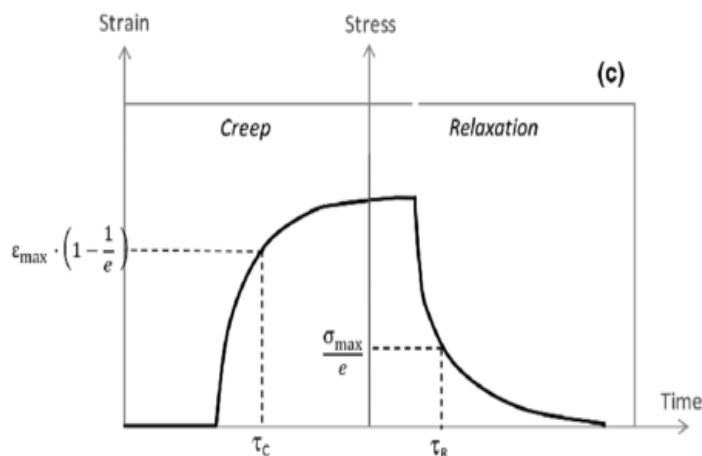


Figura 3.5: Curva di creep e stress relaxation di un materiale viscoelastico. (Kling e Hazefi, 2017).

3.2 Comportamento meccanico della cornea

La cornea è un composto biologico complesso caratterizzato da pareti spesse, una struttura parzialmente intrecciata, laminato e fibrorinforzato unidirezionalmente. Dal punto di vista della scienza dei materiali la cornea è anisotropa quasi incomprimibile con proprietà non lineari elastiche e viscoelastiche. È un composto perché le sue proprietà sono determinate dall'interazione di diversi materiali quali collagene e proteoglicani ed è anisotropo perché le proprietà meccaniche non sono indipendenti dalla direzione. L'anisotropia nell'architettura stromale risulta in anisotropia meccanica della cornea che ha infatti più alta rigidità nella direzione fronte-retro. Questa elaborata organizzazione realizza un eccellente compromesso tra rigidità, resistenza, estensibilità e tenacità che rendono la cornea in grado di sopportare forze interne ed esterne che causano degli stati di tensione e deformazione che potrebbero comprometterne l'integrità strutturale. Il comportamento macro, micro e nano-meccanico della cornea è dovuto principalmente alla struttura gerarchica di tre regioni composite: lo strato di Bowman, lo stroma e la membrana di Descemet.

Quale materiale composito la cornea è biomeccanicamente resistente, leggera ed ha una grande capacità di assorbire energia data la sua matrice fluida gelatinosa (Dawson et al., 2011).

La cornea caratterizzata dalla sua forma a cupola è sottoposta a tre tipi di carichi o stress: pressione transmurale (differenza di pressione tra l'interno e l'esterno di un organo cavo), penetrazione e schiacciamento. Fisiologicamente la cornea è in pressione, l'IOP corrisponde alla pressione che costantemente impone uno stress verso l'esterno su di essa dovuta all'umor acqueo contenuto al suo interno. Valori standard per l'IOP sono 16 ± 3 mmHg, ma stress esterni di varia natura possono modificare questo valore. Nel caso questo aumenti il comportamento meccanico della cornea è dominato dalla tensione transmurale longitudinale che è solitamente ben tollerata in quanto la direzione del vettore degli stress è parallela alla direzione della maggior parte delle fibrille di collagene nella struttura. Contrariamente, nel caso di una pressione esterna, la tensione agisce in direzione obliqua rispetto alla direzione preferenziale delle fibrille di collagene e per questo è più probabile che uno stress esterno origini o propaghi difetti interni dovuti a danno a fatica nello stroma corneale. Esempi di stress esterni sono lo strofinamento degli occhi, pressione esterna notturna, impatti che possono causare stress di compressione radiali, tensioni circonferenziale e deformazioni.

La cornea è un importante trasduttore meccanico biologico dello stress grazie alle sue proprietà viscoelastiche che dissipando l'energia prevengono danni biomeccanici. Queste proprietà viscoelastiche conferiscono alla cornea, come la maggior parte dei tessuti biologici, un comportamento meccanico tempo-dipendente che rende più complessa la sua descrizione

dovendo introdurre delle variabili viscosi. La viscosità è legata alla dissipazione di energia tempo dipendente causata dallo scivolamento reciproco delle fibrille di collagene, filamenti e lamelle in una matrice idratata con proteoglicani. È la proprietà caratteristica dei fluidi che permetta alla cornea di deviare parte dell'energia ricevuta dalle componenti elastiche ed in questo modo mantenere la possibilità di cambiare la propria forma elastica nel tempo reversibilmente o permanentemente.

I valori riportati per il modulo elastico della cornea umana sono abbastanza diversi a seconda dello studio, questo è dovuto ad una variabilità biologica, alla idratazione del campione, dalle condizioni di carico e dalla tecnologia di misurazione. La cornea esibisce inoltre un comportamento elastico non lineare (figura 3.6) dovuto alle fibre di collagene, che dapprima sono disposte aggrovigliate e in seguito a sollecitazione si sgrovigliano evidenziando generalmente 3 zone non lineari con diverse pendenze. La non linearità impedisce di stabilire un valore unico per il modulo elastico e rende necessario definire il modulo elastico come funzione del carico.

Il modulo di poisson associato alla cornea è di solito 0.49 come per tessuti pieni di liquidi quasi incompressibili, nella realtà il modulo di poisson è una vera proprietà fisica del tessuto e non una costante per questo in alcuni casi può essere utile ricavarlo.

Lo stroma ha una caratteristica resistenza al taglio dovuta allo scivolamento reciproco dei layer che lo compongono.

Esperimenti ex vivo dimostrano che la curva stress deformazione della cornea ha una forma a J non lineare. Nelle curve stress-deformazione della cornea si osserva una risposta elastica immediata dominata inizialmente dal comportamento a bassa deformazione della sua matrice non collagenosa, l'uncrimping delle fibrille ed anche al riorientamento delle fibrille di collagene nella direzione dello stress nella parte inferiore della J, successivamente il comportamento ad alta deformazione è caratterizzato da fibrille di collagene tese. Una più lenta risposta viscosa avviene a causa dello scivolamento interlamellare e interfibrillare che risulta in una curva di deformazione o stress tempo dipendente (Dawson et al., 2011).

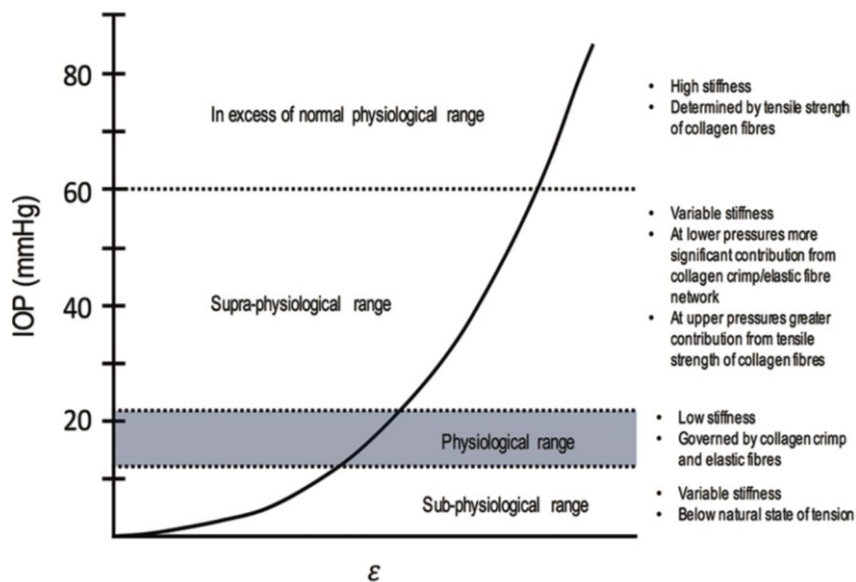


Figura 3.6: Diagramma rappresentativo della deformazione corneale in un intervallo di IOP compreso tra 0 e 100 mmHg. Diverse componenti strutturali dominano la risposta a diversi intervalli di IOP. (Wilson e Marshall, 2020).

3.3 Tecniche di analisi biomeccanica

Lo studio del comportamento biomeccanico della cornea è importante per diverse applicazioni cliniche, ad esempio, la pianificazione di procedure di chirurgia refrattiva, l'analisi della progressione del cheratocono e la misurazione della IOP (tonometria). Le prime pubblicazioni relative alla biomeccanica della cornea risalgono al 1972 (Woo et al., 1972) con test ex-vivo, questi col tempo sono cresciuti in complessità per essere in grado di approssimare meglio le condizioni fisiologiche in modo tale da ottenere dei risultati più significativi. Negli ultimi 40 anni ampi progressi sono stati fatti nel modo in cui i tessuti sono mantenuti, supportati e caricati e in come la deformazione del tessuto è monitorata, registrata ed usata per stimare le proprietà biomeccaniche. In questo modo è stato possibile individuare l'irrigidimento a cui la cornea va incontro a causa di diversi fattori come il progredire dell'età, diabete e la perdita di rigidità dovuta al cheratocono. Fino ad oggi i test di trazione su campione sono quelli più comunemente usati data la loro semplicità e basso costo seguiti dai test di insufflazione che permettono di ottenere risultati migliori. Ogni metodo comporta degli svantaggi per questo ne sono stati sperimentati diversi quali test di compressione, indentazione, separazione delle lamelle, taglio ed altri (Wang et al., 2021).

3.3.1 Prove di trazione

Sono la tecnica più usata per misurare l'elasticità della cornea. Il setup del test è semplice, consiste nel sottoporre un campione di forma rettangolare o ad osso di cane di tessuto corneale ad una tensione solitamente uniassiale che aumenta fino a rottura. Durante il test vengono registrati la tensione assiale applicata e la rispettiva deformazione del campione a diverse fasi di carico per ottenere la relazione stress-deformazione. Un vantaggio di questo tipo di prove è la possibilità di impostare la deformazione, in questo modo è possibile svolgere prove di stress relaxation dove si osserva la riduzione dello stress nel tempo nel campione sottoposto ad una deformazione costante (Wang et al., 2021).

Curve sforzo-deformazione risultati da test di trazione uniassiale presentato un comportamento non lineare caratterizzato da due regioni distinte. Nella prima regione, compresa tra deformazione da 0.02-0.10, la risposta della cornea è governata dall'elasticità della matrice extracellulare, si registra una bassa rigidità, $E = 3.193 (\pm 1.589)$ MPa. Nella seconda regione dove la risposta è dominata dall'elasticità della rete di collagene la rigidità aumenta, $E = 41.806 (\pm 10.920)$ MPa (Boschetti et al).

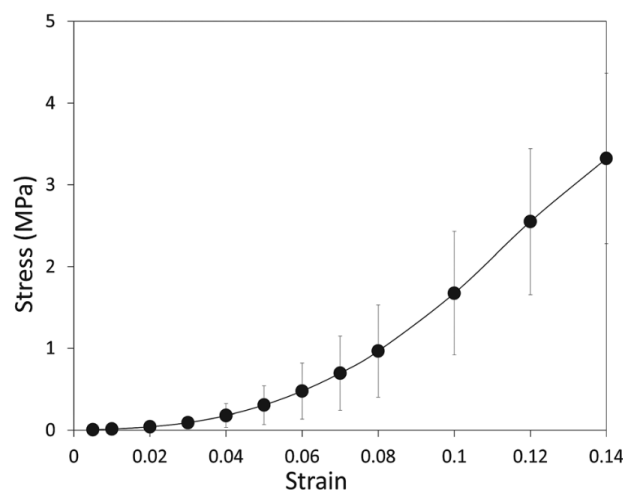


Figura 3.7: Curva media di stress-strain uniassiale per 47 campioni di strisce corneali di suino. (Boschetti et al, 2012).

I valori di modulo elastico riportati in letteratura variano in un ampio range [0.4-57 MPa] (Boschetti et al). Molte ragioni possono giustificare questa varietà in quanto diverse variabili influenzano le proprietà meccaniche quali la specie di origine del campione, età, metodo di preservazione, idratazione, livello di precarico, protocollo di test, presenza dell'endotelio ed epitelio ed altri ancora (Boschetti et al).

I vantaggi delle prove di trazione sono la semplicità, il costo basso e l'ottenere una misura quantitativa della rigidità ma questo tipo di prove ereditano alcune carenze intrinseche. Due

di queste derivano dal fatto che la striscia di campione è ricavata dalla superficie tridimensionale della cornea che è curvata. Come risultato, la lunghezza del campione lungo la sua linea centrale longitudinale è maggiore della sua lunghezza lungo i bordi. Questa variazione di lunghezza del campione comporta una distribuzione degli sforzi non uniforme lungo la sua larghezza.

Il secondo difetto è causato dall'appiattimento del campione inizialmente curvato che produce tensione sul lato posteriore e compressione sul lato anteriore. Questo stato comporta delle deformazioni che possono essere importanti anche se lo spessore della cornea è considerevolmente minore rispetto alle altre dimensioni.

Complicazioni ulteriori derivano dall'uso di morsetti ai vertici del campione per tenerlo fisso, data la bassa coesione di taglio tra le lamelle stromali della cornea l'uso dei morsetti comporta uno scivolamento delle lamelle che compongono la cornea e quindi un ulteriore effetto sulla distribuzione non uniforme degli stress. Nonostante lo spessore della cornea sia notoriamente non uniforme lungo la sua lunghezza, i risultati in letteratura dimostrano che questo metodo di analisi solitamente considera lo spessore della cornea centrale o una media degli spessori, ciò comporta una semplificazione dell'analisi. A livello microstrutturale la preparazione del campione comporta inevitabilmente il danneggiamento delle fibrille di collagene nei suoi vertici, ciò comporta un'alterazione della microstruttura del tessuto che ne controllo il comportamento meccanico e quindi influisce sull'attendibilità delle misure effettuate. Per questi diversi motivi test di trazione su strisce sono più adeguati a studi comparativi in cui ci si concentra sull'effetto di alcuni parametri sul comportamento del materiale, si preferisce utilizzare test di insufflazione per determinare le proprietà meccaniche della cornea in maniera più attendibile (Wang et al., 2021).

A causa della difficoltà nell'ottenere campioni di cornea umani è utile comparare le proprietà biomeccaniche in risposta a prove di trazione della cornea umana a quelle dei suini come fatto da Zeng e collaboratori nel 2001. Nella prima fase del loro studio hanno misurato le cornee porcine intatte e quelle umane ottenendo come risultati dimensioni molto simili. Per la preparazione dei provini da testare dagli anelli di cornee sono stati ottenuti due semicerchi senza sclera. Lo spessore dei campioni è stato calcolato come il valore medio tra lo spigolo interno e quello esterno, lo spessore medio sia della cornea umana che quella porcina risultante è di 1 mm. I campioni utilizzati nelle prove sono strisce rettangolari larghe 2.5mm e lunghe 12-16mm. Questi campioni sono caricati e scaricati ad una velocità costante di 10 mm/min per tre cicli. I tessuti biologici sono noti per possedere una forte dipendenza dalla velocità di deformazione. È stato osservato che i cicli di isteresi diminuiscono nei cicli successivi fino a scomparire, per questo dopo tre cicli i campioni sono considerati preconditionati e pronti per essere testati. La

resistenza a trazione della cornea umana media ottenuta dalle prove è di 3.81 ± 0.40 Mpa. Nelle curve stress-deformazione non ci sono differenze statisticamente significative tra cornee umane e porcine (Figura 3.8).

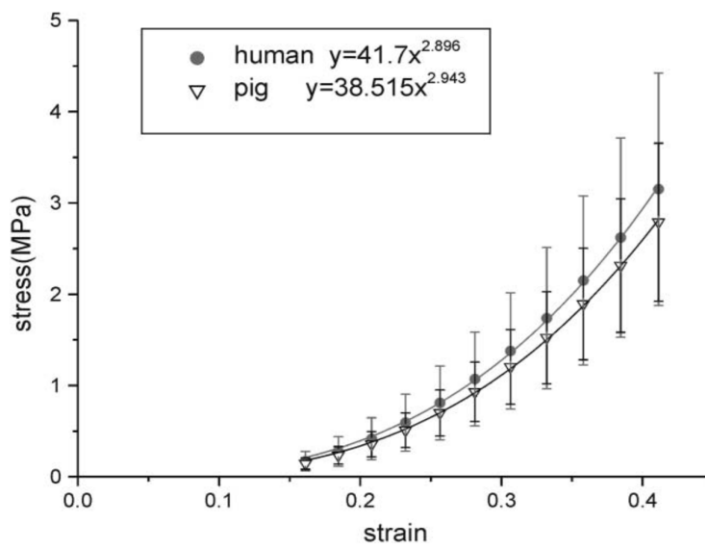


Figura 3.8: Curve sforzo-deformazione per i valori medi di 10 campioni di cornea umana e porcina. (Zeng et al.,2001).

Quando la cornea è caricata quasi istantaneamente e mantenuta ad una deformazione costante, lo stress diminuisce nel tempo esibendo il fenomeno del rilassamento della tensione, in queste prove un rapporto di deformazione di 1.5 è mantenuto per 1000s. Nelle curve di rilassamento ottenute si osservano invece differenze statisticamente significative tra cornee umane e porcine, le cornee porcine rilassano molto più velocemente di quelle umane (Figura 3.9).

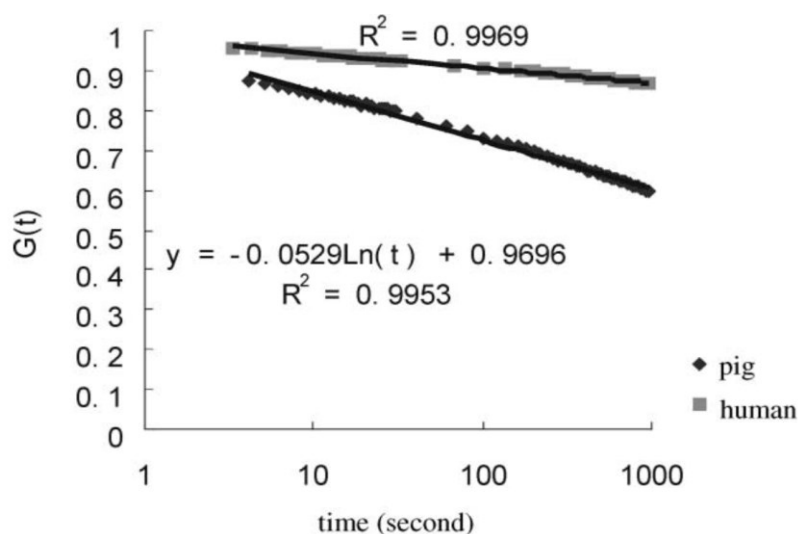


Figura 3.9: Tipiche curve normalizzate di stress-relaxation della cornea umana e suina. (Zeng et al.,2001).

Questi risultati mostrano che la cornea porcina è una buona approssimazione di quella umana nelle prove di trazione, per prove di stress relaxation è necessario tenere in considerazione le differenze presenti (Zeng et al.,2001).

3.3.2 Prove di insufflazione

La modellazione delle modifiche della topografia corneale causate dal carico e scarico della IOP dell'intero globo oculare, come eseguita tramite test di gonfiaggio, rappresenta una delle procedure più appropriate per studiare ex vivo le proprietà biomeccaniche del tessuto corneale. Test di insufflazione simulano più verosimilmente le forze fisiologiche imposte dalle variazioni di IOP. Per misurare gli spostamenti dell'apice della cornea in risposta a cambiamenti di pressione viene solitamente usato il tracciamento laser. Questo metodo ha dimostrato efficientemente la risposta non lineare della cornea al carico, cambiamenti nella rigidità legati all'età e gli effetti della viscoelasticità ma non fornisce informazioni sul modo in cui la cornea si deforma e la natura specifica della biomeccanica del tessuto che ne governa la risposta (Wilson e Marshall, 2020). In letteratura sono presenti numerosi articoli che riportano prove di insufflazione in laboratorio, alcuni di essi si concentrano su dischi di cornea altri invece considerano l'intero bulbo oculare, inoltre, alcuni articoli comparano i test di insufflazione a quelli di trazione e analizzano le differenze nelle risposte meccaniche tra cornee umane e porcine. Tutti i risultati presenti in letteratura concordano nel riportare un comportamento della cornea non lineare, viscoelastico e anisotropo.

Boschetti e collaboratori hanno eseguito uno studio, con lo scopo di svolgere una caratterizzazione completa delle proprietà meccaniche della cornea porcina tramite prove di insufflazione. Proprietà biomeccaniche importanti per comprendere il comportamento della cornea sono la risposta a breve termine non lineare del materiale, il cambiamento di rigidità del tessuto all'aumentare della pressione intraoculare, le caratteristiche anisotrope e le risposte viscoelastiche a medio e lungo termine.

Le procedure sperimentali sono svolte su 52 occhi porcini freschi di età compresa tra i 9 e 10 mesi ottenuti da un macello locale tra le 2 e 4 ore post mortem. I test di insufflazione sono stati svolti a temperatura ambiente su campioni corneali circolari che includono una striscia di 4 mm circostante di tessuto sclerale. Per garantire una buona sigillatura lungo i bordi del campione sono stati usate dei morsetti. Prima del test di insufflazione ogni campione è soggetto a 3 cicli di carico scarico mantenendo una pressione di 28 mmHg per 10 minuti. Successivamente i campioni sono sottoposti a una pressione posteriore che aumenta gradualmente, da 0 fino a 40 mmHg a step di 3.6 mmHg, applicata tramite una colonna di Eusol-C per simulare l'effetto

della IOP. Gli stress non raggiungono valori elevati a causa della forma ottimizzata della cornea per sostenere l'IOP. Un micrometro laser è utilizzato per misurare lo spostamento apicale della cornea durante il carico e lo scarico.

Prove di insufflazione sono state condotte riproducendo l'azione della pressione intraoculare da valori fisiologici (15-18 mmHg) fino a valori patologici (40 mmHg) (Figura 3.10).

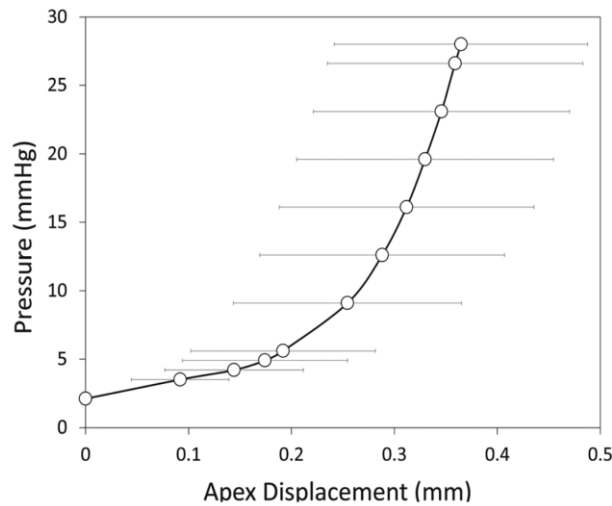


Figura 3.10: Curve medie pressione-spostamento apicale ottenute da 51 test su cornee di suini. Le barre orizzontali mostrano la deviazione standard sperimentale dell'aumento apicale misurato. (Boschetti et al., 2012).

Le risultanti curve pressione-spostamento apicale (Figura 3.11) sono chiaramente non lineari in tutto l'intervallo di pressioni ma è evidente un cambiamento marcato di pendenza delle curve intorno a pressioni di 10 mmHg.

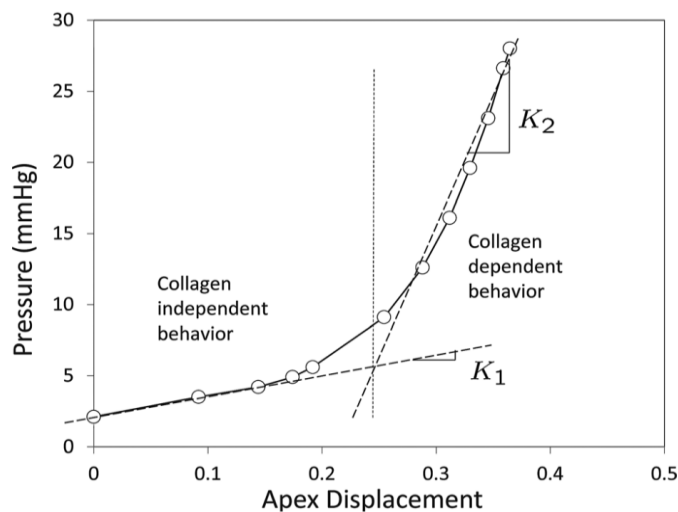


Figura 3.11: Pendenze medie K_1 e K_2 delle due distinte regioni di comportamento per il materiale della cornea suina nei test di inflazione. (Boschetti et al., 2012).

Per questo motivo tutte le curve sperimentali sono state divise anche in questo caso in due regioni lineari (Figura 3.11). La prima regione è caratterizzata da una rigidità media bassa (20.660 ± 13.075 mmHg/mm) mentre la seconda fase è caratterizzata da una rigidità media relativamente alta (275.827 ± 100.664 mmHg/mm). In quest'ultima fase le fibrille di collagene dominano la risposta meccanica. Coerentemente ai risultati in letteratura le cornee porcine testate mostrano una tipica risposta viscoelastica sottolineata dalla presenza di un'area di isteresi del 25% tra le curve di carico e scarico della pressione rispetto allo spostamento apicale. Un ulteriore risultato interessante ottenuto dall'elaborazione delle immagini di insufflazione è la quantificazione geometrica dei cambiamenti che la cornea subisce al crescere della IOP nelle range di 2.1-28 mmHg. L'aumento medio del raggio in piano è di circa il 3% mentre quello della curvatura principale esterna del 7% (Boschetti et al.,2012).

Mappare la deformazione corneale in modo non invasivo in risposta a variazioni di IOP permette di analizzare le proprietà viscoelastiche del tessuto intatto, per questo motivo Lombardo e collaboratori hanno eseguito dei test sul bulbo oculare intero. Prove di insufflazione dell'intero bulbo oculare sono preferibili per test biomeccanici più realistici in quanto la procedura è minimamente invasiva e non altera la microstruttura corneale, le condizioni al contorno della cornea sono preservate e lo stress applicato è generato dall'IOP. In questo modo i risultati possono essere prontamente trasposti nella pratica clinica.

La procedura di laboratorio è stata sviluppata per indagare i cambiamenti di forma della cornea in risposta a stress ciclici e a creep variando la pressione intraoculare nell'intervallo di valori fisiologici (18-42 mmHg). Le curve stress-deformazione ottenute nelle prove di carico scarico cicliche forniscono informazioni riguardanti l'elasticità e l'isteresi del tessuto mentre le prove di creep forniscono informazioni sulla deformazione tempo dipendente della cornea.

Per le prove sono usati sei occhi umani esportati tra le 3 e le 16 ore post morte testati entro 48 ore tramite un apparato personalizzato in un ambiente monitorato. Le temperature e l'umidità della camera umida, dove il bulbo oculare è posizionato durante l'esperimento sono state continuamente sotto controllo. L' IOP del bulbo oculare è stata misurata utilizzando una colonna d'acqua ed un sensore di pressione e modificata insufflando soluzione salina nel segmento posteriore dell'occhio attraverso un ago tramite una pompa automatizzata.

Per mantenere un'umidità costante nella camera dove i bulbi sono stati posizionati si è utilizzato un umidificatore ad ultrasuoni mentre per mantenere la temperatura costante a quell'ambiente è stata usata una pompa di calore commerciale.

Per ogni occhio sono state applicate prove di carico ciclico seguite da prove di creep. Entrambe le prove sono iniziate dopo il pretensionamento, l'ioip è stata mantenuta costante a 18 mmHg per 15 minuti per ottenere uno stato di riferimento di partenza unico tra tutti i campioni. Il

regime ciclico consiste in una misura iniziale presa a 18 mmHg e consecutivi aumenti di 6 mmHg fino a raggiungere i 42 mmHg, questa fase è seguita da un decremento graduale di 6 mmHg fino a tornare ai 18 mmHg iniziali. Per ogni occhio è stato misurato lo spostamento apicale della cornea due volte dieci minuti dopo ogni cambiamento di IOP. Il regime di creep consiste in un aumento di pressione quasi istantaneo da 18 a 42 mmHg, questa pressione finale viene mantenuta costante per 10 minuti e si misura lo spostamento ogni 2.5 minuti. In seguito, la pressione è stata diminuita istantaneamente a 18 mmHg e mantenuta per 10 minuti.

Il modulo elastico del tessuto corneale è stato stimato usando un modello per la relazione stress-deformazione basato sulle variazioni di IOP ed i conseguenti cambiamenti nel raggio e spessore della cornea. Il modulo elastico E della cornea posteriore e anteriore è stato calcolato plottando i valori di stress e deformazione ottenuti durante la fase di carico del regime ciclico. Il modulo di Young è stato stimato come la pendenza della curva di carico nella regione lineare. La tempo dipendenza della deformazione della cornea posteriore e anteriore all'applicazione di un carico statico è stata descritta tramite il modello di Zener, è dimostrato che questo modello approssima bene la risposta viscoelastica dei tessuti biologici.

La cornea anteriore ha mostrato deformazioni minori in risposta a stress ciclici rispetto alla cornea posteriore in tutti i campioni. Nei campioni il modulo di Young medio della cornea anteriore è di 2.28 ± 0.87 MPa mentre di quella posteriore 0.21 ± 0.09 MPa, il modulo di Young della cornea anteriore è sempre maggiore di quello della cornea posteriore, questo rispecchia probabilmente le diverse proprietà biomeccaniche della parte di stroma posteriore e anteriore. È stato dimostrato che un range di pressioni 27-60 mmHg produce piccole deformazioni viscoelastiche e una risposta pressione-deformazione quasi lineare, ciò suggerisce che per un intervallo di pressioni fisiologico la cornea può essere approssimata come un materiale viscoelastico lineare. Il modello usato per stimare la risposta deformativa a regime di creep è basato sul modello Zener e descrive la deformazione permanente che può restare nel tessuto corneale soggetto a stress meccanico costante.

Curve stress-deformazione di tutti i campioni mostrano un ciclo di isteresi nei cicli di carico e scarico dimostrando così la risposta viscoelastica della cornea al test meccanico ciclico. Dopo entrambi i regimi di ciclico e di creep è stata trovata della deformazione plastica rimanente che è stata correlata all'irrigidimento della cornea e all'assottigliamento dei tessuti.

La deformazione tempo dipendente della cornea posteriore può essere influenzata da diversi fattori quali il valore e la durata di tempo per cui è applicato lo stress, la temperatura e la relativa umidità, lo stato di idratazione dello stroma ed il tipo e quantità di proteoglicani stromali a causa delle variazioni che questi fattori possono comportare nella struttura microstromale in cui si riorganizzano collagene e matrice (Lombardo et al., 2014).

3.3.2.1 Prove di insufflazione: confronto uomo/suino

Analogamente a quanto fatto per prove di trazione, è stato svolto uno studio atto a confrontare le risposte a prove di insufflazione di cornee umane e porcine. Elsheikh e collaboratori nel 2008 hanno testato 44 occhi porcini freschi da maiali di 4-6 mesi ottenuti da un macello locale e preparati per gli esperimenti tra le 2 e le 6 ore post mortem. Dall'occhio intero un disco centrale formato da un bottone di cornea e un anello di 2mm di sclera sono stati rimossi con delle forbici e successivamente anche l'iride, la lente e il corpo ciliare. Prima della separazione del campione lo spessore della cornea centrale è stato misurato usando un pachimetro. I valori medi registrati sono 922 ± 81 μm . Oltre alle cornee di maiale sono state testate 49 cornee da donatori umani, anche queste sono state separate lasciando solo 2 mm di sclera.

Un banco prova per l'insufflazione è stato costruito per testare queste cornee umane e porcine simulando la pressione intraoculare mantenendo un ambiente controllato regolando la temperatura e l'idratazione. Il test ha previsto l'aumento di pressione ad una velocità selezionata e il monitoraggio dallo spostamento apicale usando fotocamere digitali ed un raggio laser. Le cornee sono state montate sulla camera di pressione del banco prova utilizzando morsetti meccanici e colla. La camera di pressione era piena di soluzione salina e connessa ad un piccolo serbatoio che si svuotava progressivamente causando cambiamenti di pressione regolari di 37.5 mmHg/min. La pressione nella camera è stata misurata usando un sensore di pressione differenziale e le misurazioni sono state registrate automaticamente. La pressione massima applicata era di 170 mmHg, molto superiore ai livelli fisiologici. Tre cicli di carico e scarico fino a 170 mmHg sono stati applicati per il preconditionamento del tessuto stabilizzando il suo comportamento per poi considerare effettivamente i risultati nel quarto ciclo come risultati rappresentativi del test. Nel mentre lo spostamento apicale è stato registrato.

Il banco prova di insufflazione ha permesso di individuare il comportamento non lineare a breve termine delle cornee porcine e umane e di effettuare prove di creep. Le prove di creep consistono nel sottoporre il campione di tessuto ad un livello di pressione costante pari a 15 mmHg per 20 minuti registrandone il comportamento, il livello di pressione è poi aumentato con incrementi costanti di 5 mmHg fino a raggiungere il livello massimo di 40 mmHg.

Tutte le cornee hanno dimostrato una bassa rigidità fino a 15-20 mmHg. Oltre questo livello di pressione, simile all'intervallo fisiologico, le cornee hanno subito un incremento graduale della rigidità fino alla fine del test. Le cornee porcine hanno dimostrato un cambiamento di rigidità più improvviso e generalmente una rigidità iniziale e finale più bassa delle cornee umane (Figura 3.12).

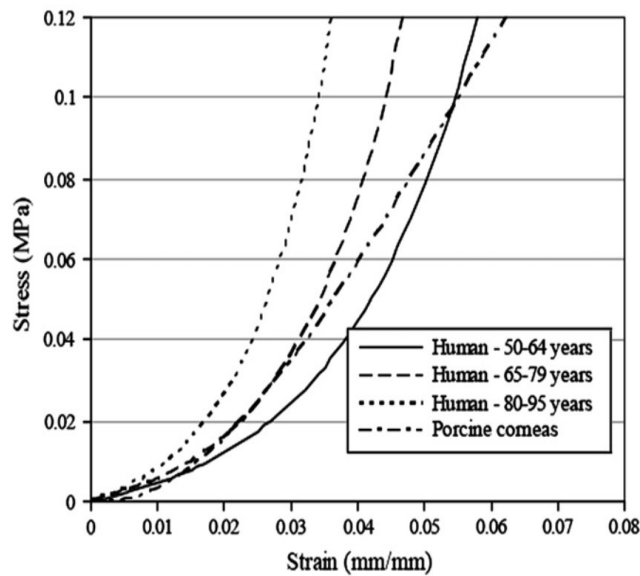


Figura 3.12: Confronto tra il comportamento tensione-deformazione di cornee umane di età diverse e porcine. (Elsheikh et al., 2008).

I valori di stress e deformazione risultati dai test di pressione-deformazione sono stati usati per determinare la variazione del modulo di Young in relazione alla pressione posteriore. Nonostante la non linearità della curva pressione-deformazione e stress-deformazione la relazione tra il modulo di Young e la pressione si dimostra quasi lineare. Le cornee porcine subiscono una maggiore deformazione da creep, approssimativamente il doppio, rispetto a quelle umane.

Sotto prove di insufflazione a breve durata sia le cornee umane che quelle porcine dimostrano un comportamento iperelastico caratterizzato da una rigidità iniziale bassa ed una finale alta. A differenza di quelle umane le cornee porcine dimostrano un comportamento bilineare con un evidente cambiamento di rigidità a valori di pressione intorno ai 10 mmHg. Il comportamento delle cornee umane ha un buon fit con una curva esponenziale mentre quelle porcine sono state descritte meglio da curve polinomiali. Le cornee porcine hanno rigidità minore in tutte le fasi del test (Figura 3.13).

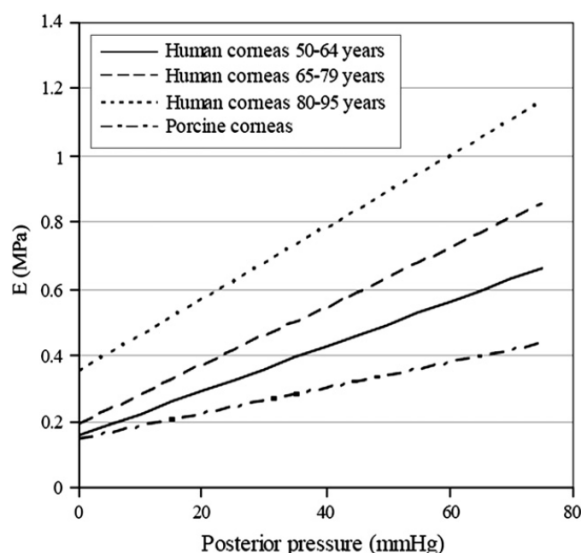


Figura 3.13: Confronto tra le relazioni E-p per cornee umane e suine. (Elsheikh et al., 2008).

Entrambi i set di cornee dimostrano un comportamento anisotropo, la direzione verticale è leggermente più rigida rispetto a quella orizzontale e molto più rigida di quella diagonale (Elsheikh et al., 2008).

3.3.3 Confronto prove di insufflazione-trazione

Elsheikh e collaboratori nel 2005 hanno elaborato un programma sperimentale considerando dieci paia di occhi porcini per indagare le differenze nei risultati legate al tipo di prove sperimentali effettuate, trazione o insufflazione e per verificarne quale tra questi due fosse il più attendibile. I campioni sono stati ottenuti da un macello e testati entro quattro ore dopo la morte. I 10 campioni per l'insufflazione sono formati dalla cornea e da un anello di sclera sottile circostante separati meccanicamente dal resto del globo oculare, si è posta attenzione a non danneggiare l'epitelio e l'endotelio nonostante il loro poco contributo alla biomeccanica della cornea (Greene 1978). Questi campioni sono montati su un banco prova in modo tale da non permettere la fuoriuscita di liquido durante la prova fissando i campioni lungo la parte di sclera. I campioni sono sottoposti ad una pressione posteriore che aumenta gradualmente causata da una colonna di soluzione salina per simulare gli effetti dell'elevata pressione intraoculare. Questa pressione aumenta fino a raggiungere 14 KPa (105 mmHg) che è ben superiore al limite fisiologico in cui la cornea ha un comportamento stabile. Nel mentre un sensore di spostamento laser è usato per misurare continuamente lo spostamento apicale della cornea.

Gli altri dieci campioni sono stati preparati per le prove di trazione. Sono stati presi dalla porzione centrale della cornea e tagliati per avere uno spessore costante di 5mm. I campioni

sono stati montati in modo tale che la lunghezza della parte monitorata del campione (lungo il suo lato) fosse di 12 mm. La sezione trasversale di ogni campione è stata misurata prima di effettuare il test usando un microscopio. Le prove hanno sottoposto il campione ad una velocità di allungamento pari a 1 mm min^{-1} fino a raggiungere la rottura. Durante il test i dati di tensione assiale ed allungamento sono registrati.

La curva pressione-spostamento apicale risultante dai test di insufflazione è caratterizzata da una lunga fase con comportamento lineare seguita da un irrigidimento graduale a circa 2-4 KPa (15-30 mmHg). Analisi matematiche basate sulla shell theory sono state usate per ottenere le relazioni costitutive del materiale dai risultati pressione-spostamento apicale. Si ottiene un'equazione finale che mette in relazione la pressione interna e lo spostamento, questa viene usata per ogni set di dati delle prove ottenendo il corrispondente modulo di Young E.

Le prove di trazione, analogamente a quelle di insufflazione, dimostrano un comportamento elevatamente non lineare. Vi è un'evidente fase iniziale con bassa rigidità seguita da una con rigidità molto più elevata. La seconda fase di comportamento continua fino a rottura che avviene in corrispondenza di un carico assiale tra i 23 e 26 N. I risultati delle prove sui 10 campioni sono stati analizzati e comparati con i risultati di insufflazione (Figura 3.13).

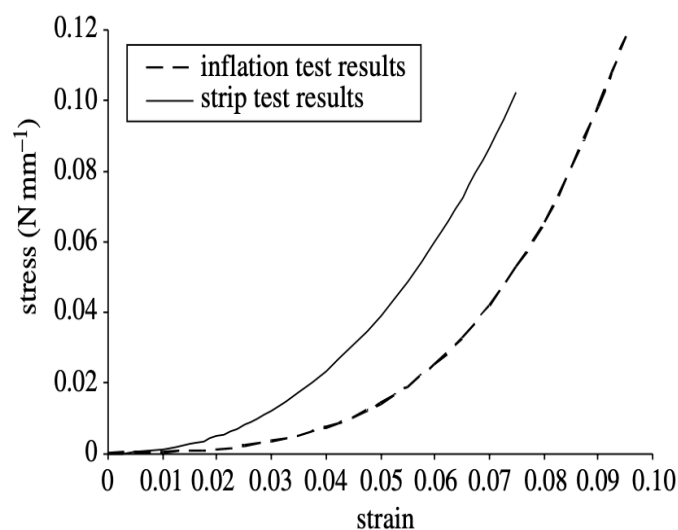


Figura 3.14: Confronto tra curve sforzo-deformazione ottenute da test di insufflazione sull'intera cornea e da test di trazione su strisce corneali nel caso di campioni suini (Elsheikh & Anderson, 2005).

In media i test di trazione su strisce sovrastimano la rigidità del materiale del 32% rispetto ai test di insufflazione, è possibile ridurre questa percentuale effettuando delle correzioni matematiche nelle prove di trazione (Elsheikh et al., 2005).

Capitolo 4

Prove Sperimentali

4.1 Materiali e metodi

Tutte le prove descritte in questa tesi sono state eseguite su cornee porcine data la loro affinità biologica, in termini di forma e caratteristiche meccaniche, con quelle umane. Come visto in precedenza nel Capitolo 3, le cornee porcine sono meno rigide delle cornee umane. Ciononostante, modelli porcini sono stati usati frequentemente in letteratura per approssimare la cornea umana in termini di proprietà meccaniche con buoni risultati, come confermano diverse pubblicazioni (Elsheikh et al., 2008; Kling et al., 2010). Le maggiori problematiche sull'utilizzo di cornee umane sono la difficile reperibilità e le complicate procedure etiche-regolamentari necessarie per l'utilizzo, al contrario delle cornee porcine che possono essere fornite da macelli nel rispetto del principio del benessere animale nell'ambito della sperimentazione animale.

4.1.1 Preparazione del campione

In questo studio, sono state utilizzate 18 cornee suine provenienti da un macello locale da animali ritenuti sani durante l'esame pre-mortem. Tutti gli occhi sono stati raccolti da animali di età, grandezza e salute simili ed eventuali differenze individuali non sono state considerate rilevanti per tale studio. L'unico parametro significativo considerato è stato l'assenza di qualsiasi difetto oculare derivante da una condizione patologica o dal processo di enucleazione. Gli occhi sono stati raccolti entro un'ora dalla morte degli animali per evitare cambiamenti autolitici e sono stati trasportati al laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università di Padova all'interno di un contenitore con betadine, una soluzione antisettica con concentrazione al 10% per ridurre la contaminazione. Una volta in laboratorio, i bulbi oculari sono stati risciacquati con soluzione PBS (tampone fosfato salino) prima di qualsiasi procedura.

I campioni circolari di cornea per i test di insufflazione sono stati separati dal bulbo oculare con bisturi e forbici. Successivamente, sono stati rimossi il cristallino e l'iride, mentre una parte di sclera è stata mantenuta per fissare il campione al dispositivo per l'insufflazione (Figura 4.1).

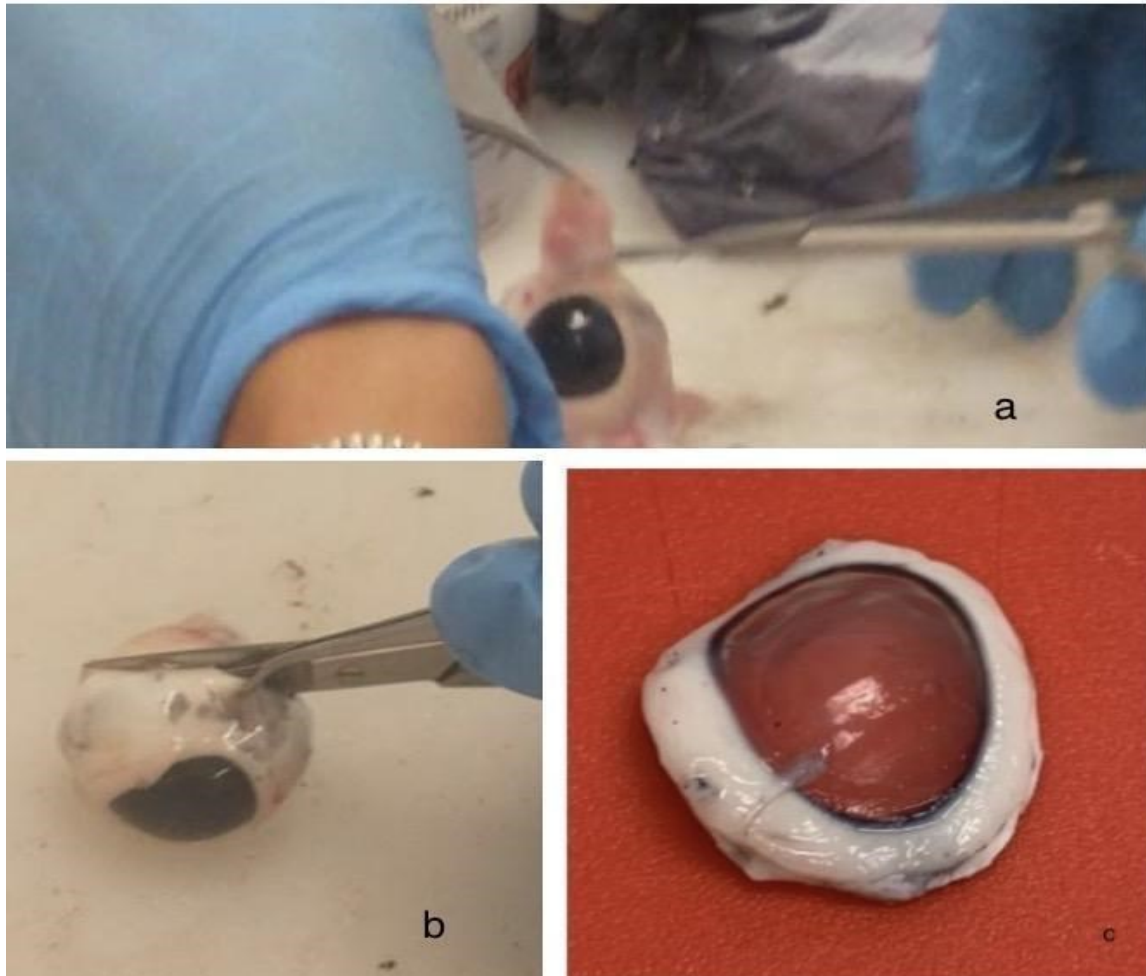


Figura 4.1: (a, b) Procedura di separazione dei campioni; (c) esempio di campione cornea suina.

Le cornee considerate per l'analisi dei dati sono divise in due gruppi: 9 cornee fresche e 9 congelate. Le cornee fresche sono state testate entro la giornata in cui sono arrivate in laboratorio conservandole in frigo, quelle congelate invece sono state conservate nel congelatore del laboratorio ed estratte qualche ora prima dei test.

4.1.2 Set up sperimentale

Il setup (Figura 4.2) che è stato utilizzato per l'esecuzione delle prove di insufflazione si compone principalmente di una camera anteriore artificiale disegnata appositamente e ricavata tramite stampa 3D, in cui è stato installato il campione di cornea da analizzare, un sistema di pompaggio, un serbatoio contenente acqua, un sensore di pressione, un sistema DAQ e un personal computer per l'acquisizione dei dati.

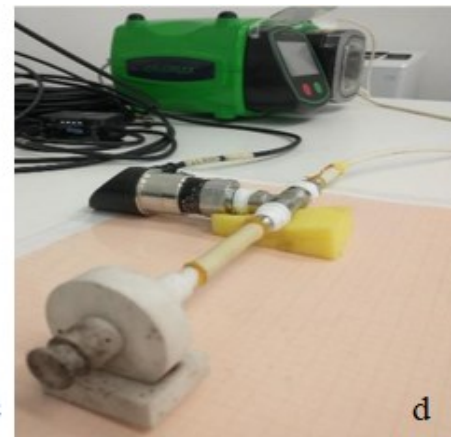
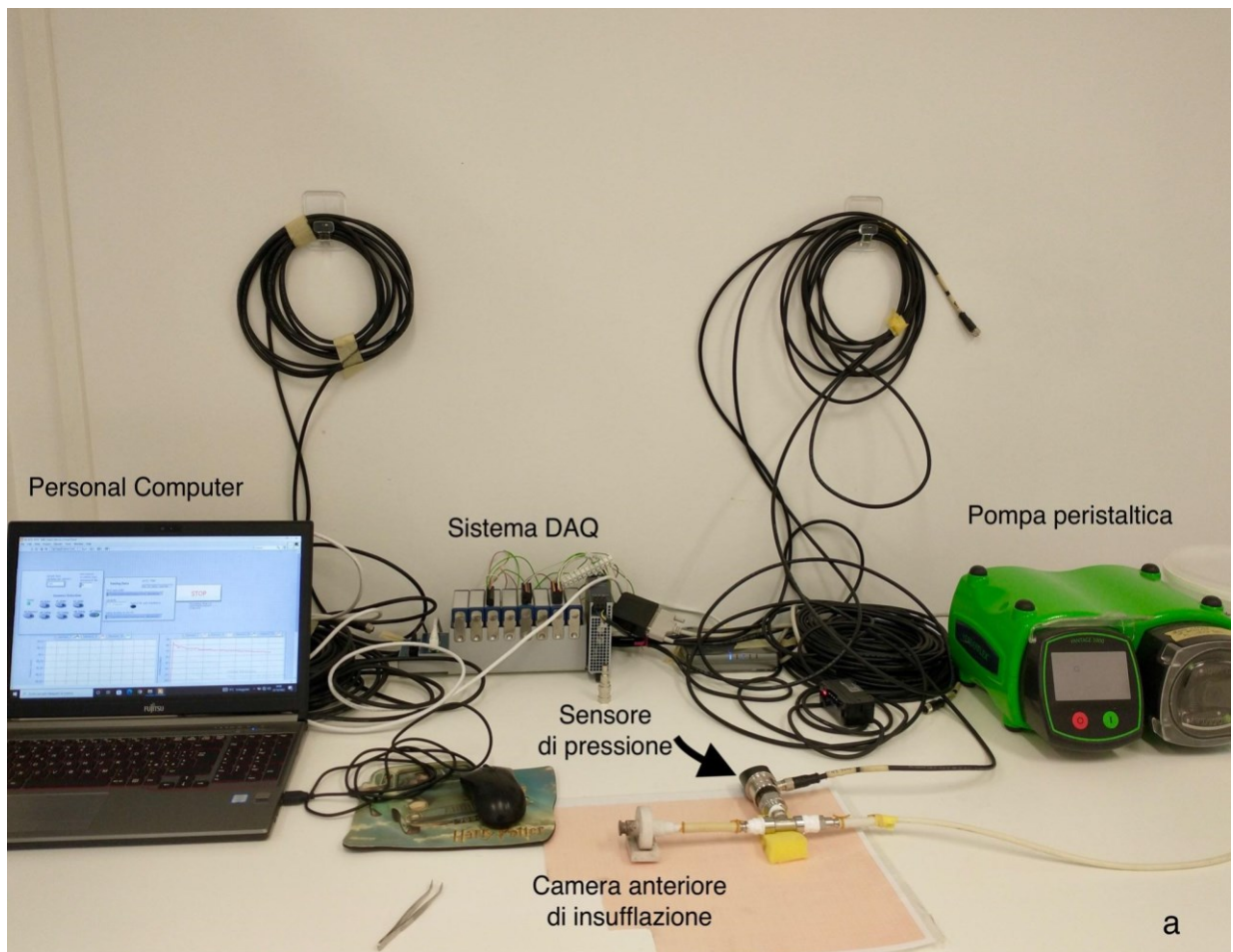


Figura 4.2: (a) Set up sperimentale; (b) Camera anteriore di insufflazione ; (c) Sensore di pressione; (d) Collegamenti idraulici tramite connettore a T rinforzati con elastici e teflon.

Nel laboratorio di meccanica dei tessuti biologici erano già state eseguite delle prove di insufflazione con attrezzatura in parte diversa. Per posizionare le cornee si era utilizzata una camera artificiale commerciale disponibile sul mercato Barron Artificial Anterior Chamber utilizzata solitamente nei trapianti di cornea. Nel precedente studio è stato notato che questa camera non permette una sigillatura adeguata della cornea e ciò ha comportato perdite. Per questo è stata disegnata una camera per insufflazione (Figura 4.2 b) ad hoc ottenuta tramite

stampa 3D utilizzando come materiale PA-GF (polvere di poliammide) e microsferi di vetro. Per la stampa in 3D del modello è stato utilizzato il servizio offerto dal sito Materialise a cui è possibile inviare il disegno 3D che viene poi da loro stampato e spedito.

Questa camera per l'insufflazione è stata connessa tramite un connettore a T al sensore di pressione e al tubo per il liquido. Dopo i primi tentativi in cui sono state osservate piccole perdite, ogni parte del collegamento è stata rinforzata con del nastro in teflon ed elastici per evitare perdite di liquido (Figura 4.2 d).

Per il pompaggio dell'acqua è stata utilizzata una pompa peristaltica Verderflex® Vantage 5000 (Verder Ltd, UK) (Figura 4.3)



Figura 4.3: Pompa peristaltica Verderflex® Vantage 5000 (Verder Ltd, UK).

Essa è dotata di un tubo continuo Verderprene Verderflex® di diametro 3.8 mm. Il tubo viene inserito facendo ruotare il rotore della pompa in senso antiorario utilizzando i rulli di guida verticali e viene tenuto in posizione da due morsetti di cui è dotato il sistema, uno superiore dal lato di aspirazione e uno inferiore dal lato di scarico. La peristalsi alla base di tale modalità di pompaggio si basa sulla compressione e sul rilassamento del tubo, in virtù dell'elasticità naturale del materiale con cui esso è realizzato.

Dunque, un rullo compie un'azione compressiva lungo il tubo facendo sì che il contenuto posto davanti al rullo si sposti in avanti lungo la lunghezza del tubo. Ne consegue il recupero elastico del tubo e quindi il ritorno al suo profilo originale che crea una pressione di aspirazione tale da riempire il tubo. Questo principio fa sì che, durante la prova di insufflazione, a partire da un serbatoio, appositamente posto nelle vicinanze della pompa, venga aspirato un determinato volume di liquido e poi pompato all'interno della camera anteriore artificiale mediante la sua porta di irrigazione. Il liquido pompato non viene a contatto con nessuna parte in movimento ed è totalmente contenuta all'interno del tubo. Il sistema Verderflex® Vantage 5000 è dotato

anche di un touchscreen attraverso cui è stata definita la modalità di pompaggio, in termini di senso di rotazione della pompa, portata di rilascio e valore della dose.

Al circuito idraulico è connesso un sensore di pressione Trafag AG DPC 8380 (Figura 4.2 c) la cui scheda tecnica è illustrata nella figura seguente (Figura 4.4).

Dati tecnici			
Principio di misura	Film spesso su ceramica	Precisione @ 25 °C tip.	± 0.5 % F.S. tip. ± 0.3 % F.S. tip.
Campo di misura	0 ... 0.2 a 0 ... 100 bar 0 ... 2.5 a 0 ... 1500 psi regolabile	Temperatura del fluido	-25°C ... +85°C
Segnale di uscita	4 ... 20 mA, 0 ... 5 VDC, 1 ... 6 VDC, 0 ... 10 VDC, commutabile mA o V	Temperatura ambiente	-25°C ... +85°C
NLH @ 25 °C (BSL) tip.	± 0.2 % F.S. tip.	Unità della pressione per display	bar, psi, MPa, kPa, mCA, mmCA, inchCA, %, scala utente
Uscita di commutazione	2 PNP	Data logger	Memoria circolare: 3518 dati Tempo di campionamento: 0.1 ... 999.9 s, spento (0)

Figura 4.4: Scheda tecnica sensore.

Questo sensore è collegato tramite un apposito cavo schermato in PVC ad un sistema DAQ. Il sistema DAQ è composto da diverse parti connesse tra di loro tramite una apposita struttura chiamata Chassis. In laboratorio è stato utilizzato il cDAQ-9189 Chassis NI CompactDAQ che controlla la temporizzazione, la sincronizzazione e il trasferimento dati tra moduli I/O C Series che compongono il sistema e un host esterno. È utilizzato per creare una combinazione di moduli I/O C Series che permettono di ottenere diversi tipi di misure. Il DAQ chassis dispone di 8 slot per la connessione dei moduli, quelli non utilizzati sono occupati da NI-9977 un modulo riempimento slot C che funge da modulo C Series vuoto e non funzionante.

Uno dei moduli che compone il sistema DAQ presente in laboratorio è NI-9253, un un modulo di ingresso analogico a 8 canali per il sistema ComapctDAQ. Ogni canale fornisce un intervallo di ingresso $\pm 20\text{mA}$ e 24 bit di risoluzione con una frequenza di campionamento di 50 kS/s. Questo modulo ha diverse funzioni diagnostiche per garantire che il sistema funzioni sempre e dispone anche di una serie di filtri hardware programmabili grazie ai quali è possibile ridurre sensibilmente il rumore nel sistema. Un altro modulo presente nel sistema è NI-9252, un modulo di ingresso analogico a 8 canali, ogni canale fornisce un intervallo di misurazione di $\pm 10\text{ V}$ e 24 bit di risoluzione con campionamento di 50 kS/s. Anche questo modulo presenta una serie di filtri hardware programmabili. Nel sistema DAQ è presente NI-9263, un modulo di output di tensione C Series a 4 canali, 100 kS/s/canale simultaneo, $\pm 10\text{ V}$. È un modulo di uscita

analogica con aggiornamento simultaneo. Include una protezione da sovratensioni, da corto circuito ed una barriera a doppio isolamento a terra (da canale a terra) per la sicurezza e per l'isolamento dal rumore. Tutto il sistema DAQ è alimentato da alimentazione industriale PS-15 24 V CC a 28 V CC, 5 A, 120 W. Il PS-15 ha una potenza di uscita di 120 W con una temperatura di funzionamento compresa tra -25°C e $+60^{\circ}\text{C}$ e presenta un ingresso da 100 V CA a 240 V CA. Il sistema DAQ viene controllato dal pc attraverso un programma LabView scritto appositamente. Tramite questo programma è possibile impostare la frequenza di campionamento, visualizzare la curva pressione-tempo, avviare e fermare la registrazione dei dati ed il loro salvataggio.

4.2 Protocollo di insufflazione

Per svolgere le prove si è impostata la pompa nella modalità *batch* che consente di definire la quantità di liquido da insufflare, il numero di insufflazioni e l'intervallo temporale tra di esse. Data l'esperienza derivata dal precedente lavoro di insufflazione, per quanto possibile, si è cercato di mantenere un protocollo costante per ogni cornea. Il primo tipo di prove consiste in 3 o 4 insufflazioni, scelte in base alla grandezza della cornea per non danneggiare i sensori di pressione, con una dose di 0.1 ml di liquido ad intervalli regolari di 5 minuti per consentire il rilassamento della pressione. Il secondo protocollo prevede invece l'insufflazione di una singola dose di 0.6 ml, questo valore è stato poi diminuito a 0.5 ml dopo alcuni casi in cui si è registrata la saturazione del sensore causata da una pressione superiore ai 200 mbar. Per le prime 7 cornee si è adoperato un flow rate di 0.5 ml/s ed una frequenza di campionamento dei dati di 100 campioni al secondo. Successivamente, il flow rate è stato abbassato a 0.2 ml/s e la frequenza di campionamento dei dati a 10. L'impostazione delle dosi e velocità è stata inserita tramite il touch screen della pompa, inoltre sono state inserite le caratteristiche del tubo usato per l'insufflazione: il diametro del tubo pari a 3.8 mm e il suo materiale Verderprene. La rotazione della pompa è stata impostata in verso orario.

I test delle cornee sono stati effettuati in quattro giornate diverse, in ognuna di esse prima di iniziare ad eseguire le prove è stato necessario calibrare la pompa tramite l'utilizzo di un serbatoio di liquido dal lato di aspirazione e un cilindro graduato dal lato di scarico. Impostata una certa dose di liquido alla pompa, si è verificato che il volume di liquido contenuto nel cilindro graduato raggiungesse precisamente il livello corrispondente alla quantità desiderata. Le cornee sono state posizionate tramite pinzette sull'apposita parte delle camere di insufflazione e fissate attraverso una guarnizione idraulica circolare ed un elastico per evitare fuoriuscite di liquido.

In ogni insufflazione è visibile l'aumento di pressione interna della cornea dovuto alla dose di liquido insufflata e il conseguente spostamento apicale (Figura 4.5). Quest'ultimo in questo studio non è registrato, diversamente da quanto viene invece fatto spesso nelle prove riportate in letteratura.

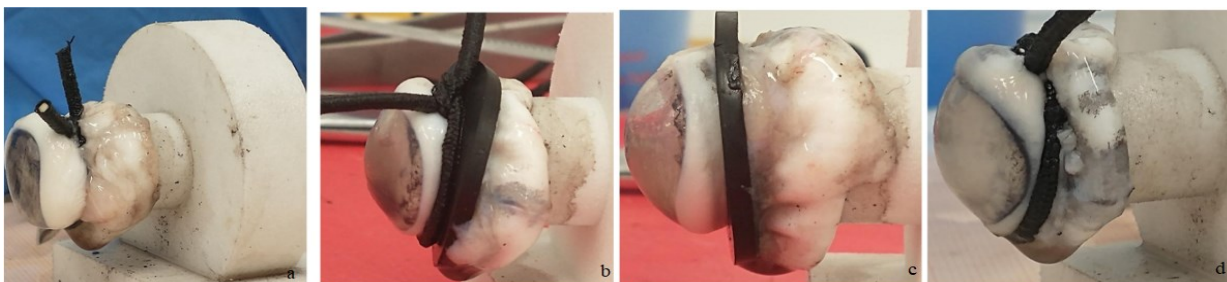


Figura 4.5: (a) Cornea vuota; (b,c,d) Spostamento apicale cornea in seguito ad insufflazioni consecutive da 0.1 ml.

4.3 Processing dei dati

I dati ottenuti dalla prova sono stati elaborati tramite il programma MATLAB (R2022a, The MathWorks Inc., Natick, MA, US). I risultati di ogni prova di insufflazione ottenuti dal sensore sono tempo e pressione in mbar. Questi ultimi dati sono stati convertiti in mmHg in quanto molti studi medici e clinici in letteratura usano più frequentemente tale unità di misura. Il grafico volume-tempo caratteristico delle prove eseguite secondo il primo protocollo (insufflazione multipla) è visibile in Figura 4.6 a.

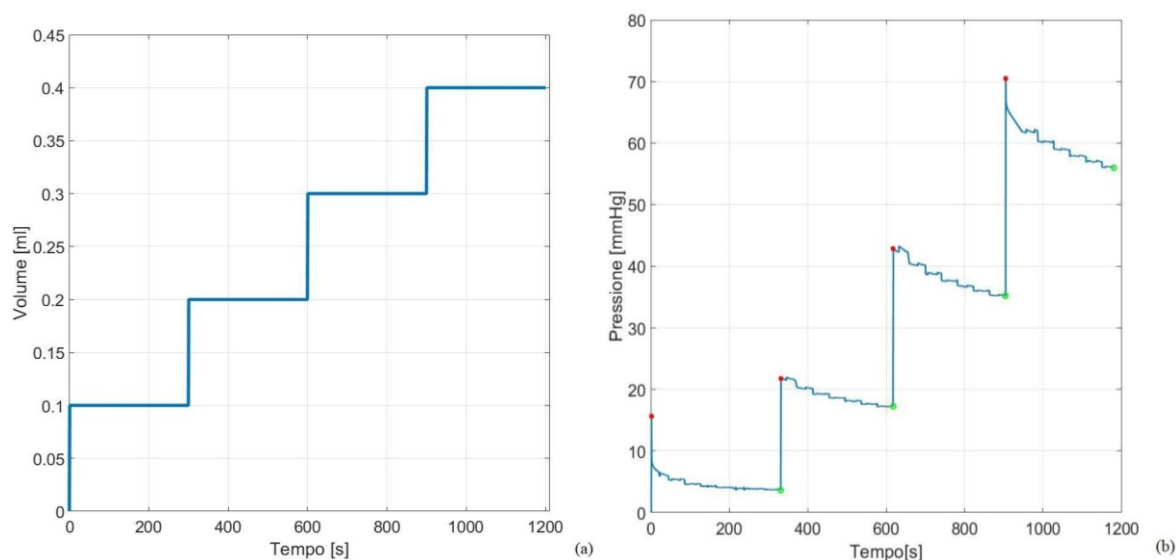


Figura 4.6: (a) Curva volume-tempo, descrive le 4 dosi da 0.1 ml insufflate ogni 300 secondi. (b) Grafico pressione-tempo, descrive 4 curve di rilassamento.

In alcuni casi è stato necessario interrompere il protocollo dopo la terza insufflazione a causa di perdite o altri errori operativi come lo spostamento involontario del campione.

Il grafico pressione-tempo tipico ottenuto dai dati registrati dal sensore è illustrato in Figura 4.6 b, sono stati evidenziati in rosso i punti di picco e in verde i punti di equilibrio in cui i processi di rilassamento sono stati ritenuti esauriti.

I dati ottenuti dalle prove sperimentali non contengono direttamente la relazione esistente tra pressione e volume, è necessario ottenerla per ogni cornea, considerando la pressione e il corrispondente volume insufflato nei diversi punti di equilibrio (Figura 4.7 a).

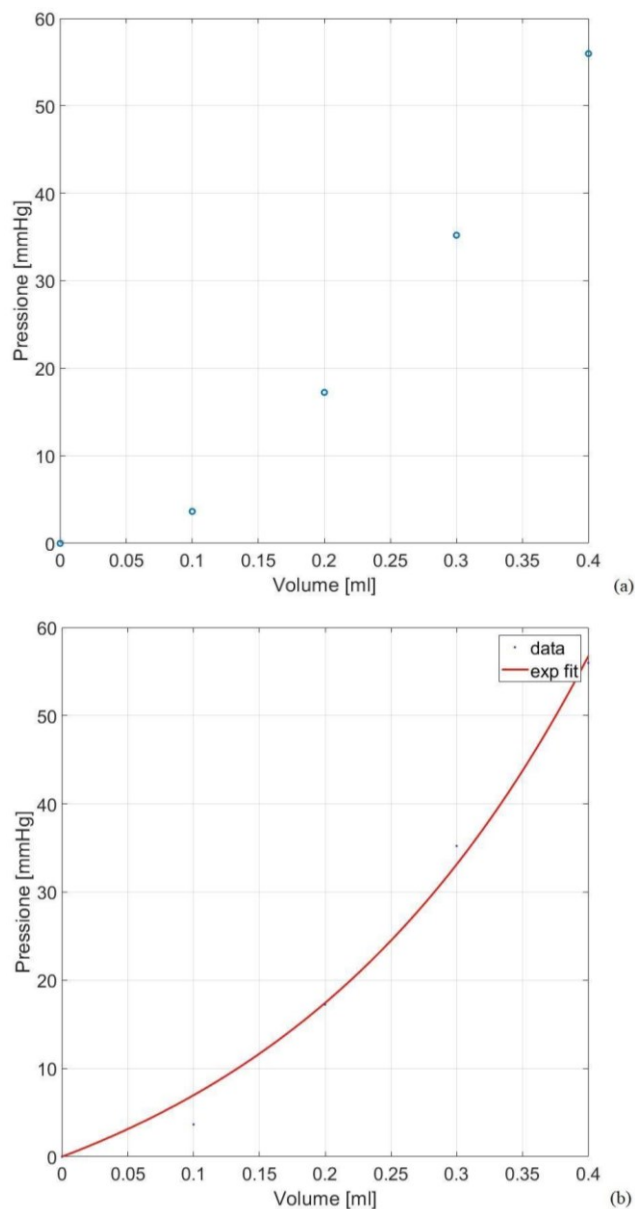


Figura 4.7: (a) Grafico Punti di equilibrio; (b) Curva pressione-volume all'equilibrio ottenuta mediante fitting dei punti di equilibrio.

Da questa relazione si è successivamente ricavata la curva pressione-volume all'equilibrio. Per fare ciò è necessario utilizzare lo strumento *Curve fitting* presente in Matlab per ricavare una curva che abbia la migliore corrispondenza ai dati sperimentali. Per il fitting della curva pressione-volume è stata utilizzata la funzione

$$y=a*(exp(b*x)-1) \quad (\text{Equazione 4.1})$$

In questo modo si ottengono la curva ed i 2 parametri caratteristici corrispondenti, ed anche gli indici della qualità del fitting (Figura 4.7 b).

Gli indici di qualità del fitting, Root Mean Square Error (RMSE), per le curve pressione-volume all'equilibrio sono riportati nella Tabella 4.1 a seguire.

	FRESCHЕ RMSE [mmHg]	CONGELATE RMSE [mmHg]
C1	0.9947	0.9931
C2	0.9915	0.9906
C3	0.9956	0.9916
C4	0.9659	0.9822
C5	9.9965	0.9859
C6	0.9993	0.9942
C7	0.9846	0.9645
C8	0.9946	0.9509
C9	0.9932	0.9830

Tabella 4.1: Valori di RMSE per le curve di equilibrio.

Successivamente si è considerato il rilassamento della pressione nel tempo. Per ogni curva pressione-tempo sono state isolate le 4 curve di rilassamento, considerandole in termini di pressione dal valore di picco a quello di equilibrio e sono state normalizzate sul rispettivo valore di picco. Per ogni curva di rilassamento normalizzata è stato eseguito un fitting dei dati sperimentali con un modello di Prony a due rami viscoelastici con la seguente formulazione (Figura 4.8):

$$y=1-\gamma_1*(1-exp(-x/\tau_1))-\gamma_2*(1-exp(-x/\tau_2)) \quad (\text{Equazione 4.2})$$

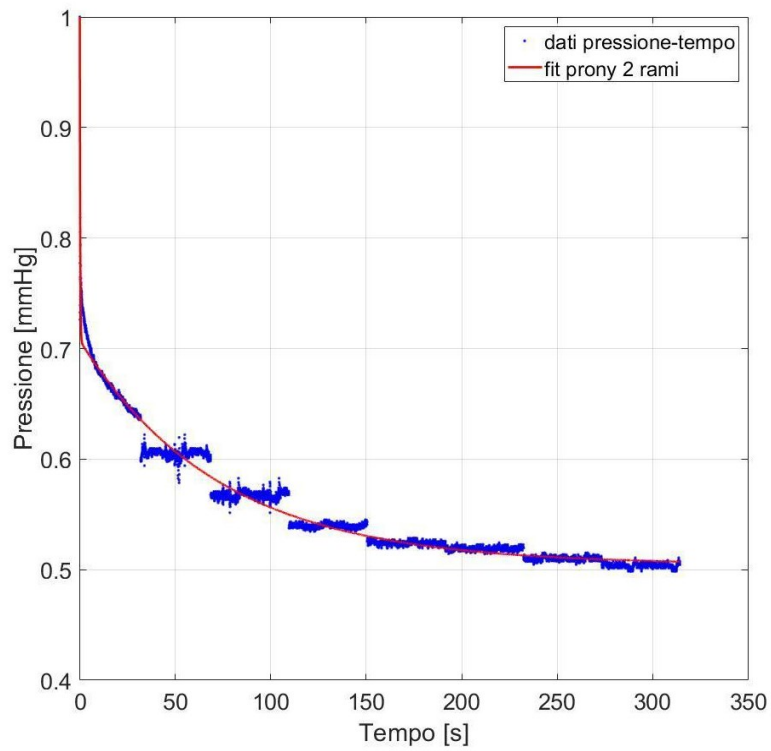


Figura 4.8 Fitting curva rilassamento con serie di Prony.

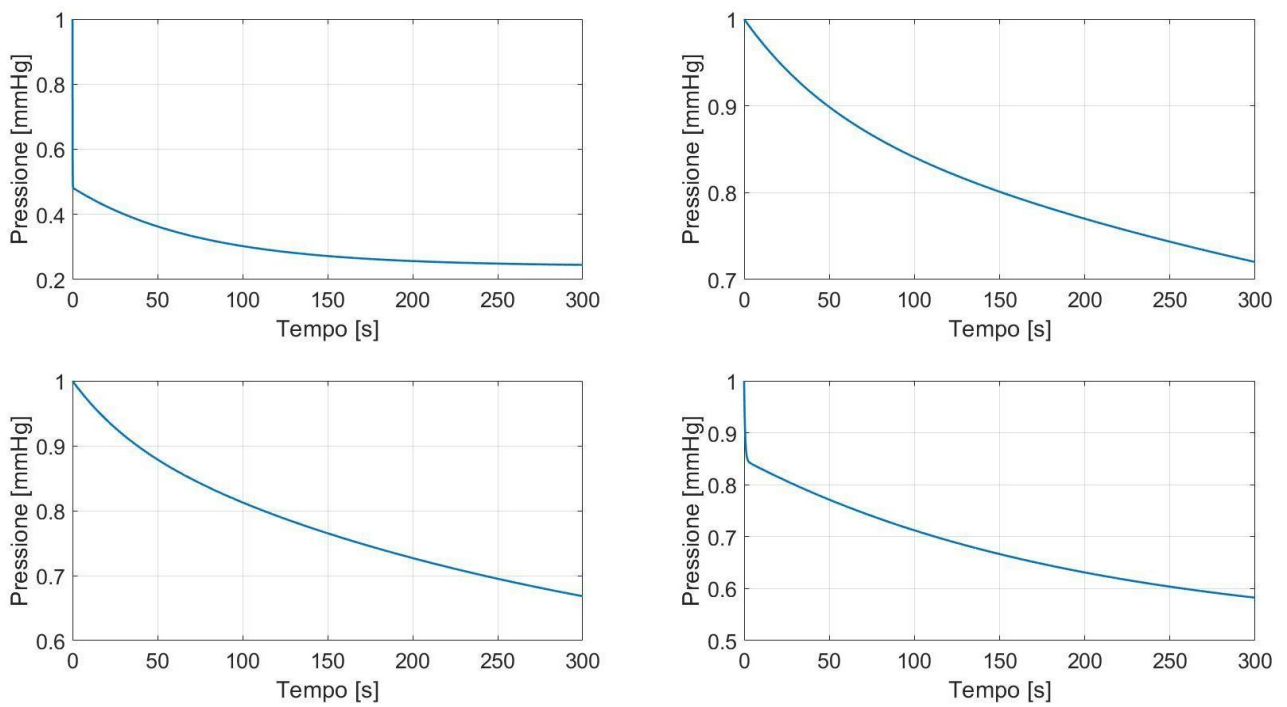


Figura 4.9: Esempio delle quattro curve di rilassamento isolate, normalizzate e fittate del campione C2 fresco.

Gli indici di qualità del fitting per i rilassamenti ottenuti mediando i 4 RMSE risultati per ogni cornea sono visibili nella Tabella 4.2.

	FRESCHE RMSE [mmHg]	CONGELATE RMSE [mmHg]
C1	0.9726	0.9817
C2	0.9729	0.9779
C3	0.9977	0.9855
C4	0.9832	0.9211
C5	0.9986	0.9801
C6	0.9966	0.9732
C7	0.9428	0.9375
C8	0.9750	0.9623
C9	0.9756	0.9690

Tabella 4.2: Valori medi di RMSE per le curve di rilassamento.

Capitolo 5

Modelli computazionali

In questa tesi per svolgere l'analisi FEM si è usato il software Abaqus/CAE 2020 (Dassault Systèmes Simulia Corp., Providence, RI) per la costruzione del modello, la definizione delle condizioni al contorno, l'impostazione della modalità di analisi, per la sua implementazione e infine per la visualizzazione dei risultati.

Sono stati creati ed analizzati due modelli computazionali, il primo rappresenta un campione rettangolare di cornea sottoposto a prove di trazione, il secondo invece la cornea completa sottoposta a test di insufflazione.

5.1 Modello striscia corneale per prove di trazione

Il primo modello computazionale analizzato è quello per la prova di trazione ed è necessario per l'identificazione dei primi parametri costitutivi da associare al materiale corneale. Si possiedono infatti i dati sperimentali risultanti da test di trazione eseguiti su 8 campioni rettangolari di cornea porcina sana tagliati lungo la direzione latero-mediale. Queste prove sperimentali sono state effettuate utilizzando lo strumento Bose ElectroForce® Planar Biaxial TestBench® System (TA Instruments, New Castle, USA) nel laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università di Padova (Fontanella et al., 2021) (Figura 5.1).

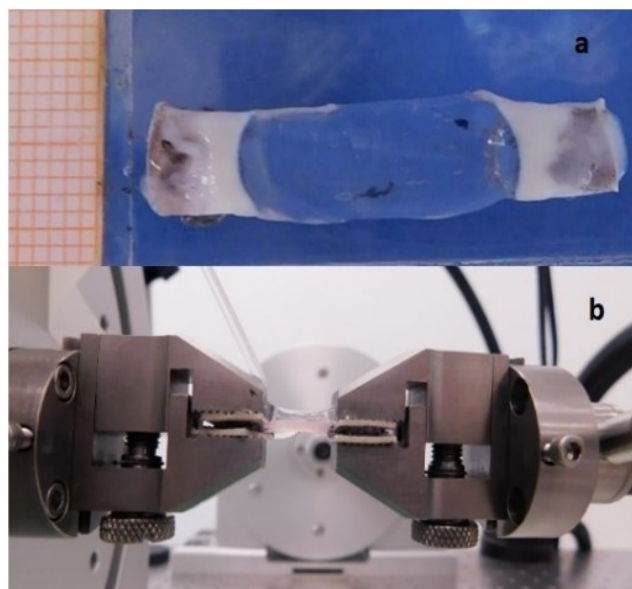


Figura 5.1: (a) Esempio provino cornea per la prova di trazione; (b) Vista laterale del provino bloccato dalle morse del ElectroForce® Planar Biaxial TestBench® System (Fontanella et al., 2021).

Di queste prove sperimentali è stata calcolata la media dei risultati relativi agli 8 campioni testati e questa è stata presa come riferimento. I dati tenso-deformativi medi sono stati importati all'interno del software Abaqus/CAE ed è stato valutato il modello costitutivo che riuscisse a descrivere meglio il comportamento meccanico e garantisse la stabilità del materiale. Tra i modelli iperelastici disponibili sul software, è stato considerato il modello iperelastico isotropo basato sulla densità di energia di deformazione di Ogden:

$$U \stackrel{\text{def}}{=} \sum_{i=1}^N \frac{2\mu_i}{\alpha_i} (\bar{\lambda}_1^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_3^{\alpha_i} - 3) + \sum_{i=1}^N \frac{1}{D_i} (J_{el} - 1)^{2i},$$

Dove

$$\bar{\lambda}_i = J^{-\frac{1}{3}} \lambda_i \rightarrow \bar{\lambda}_1 \bar{\lambda}_2 \bar{\lambda}_3 = 1$$

(Formulazione di Ogden, Documentazione Abaqus)

Nella formula λ_1 , λ_2 e λ_3 rappresentano gli allungamenti principali, μ_p e α_p sono parametri del materiale ed N indica l'ordine del modello. L'ordine è stato scelto pari a 1 dato che si possiedono i risultati solamente da una prova indipendente (quella di trazione) mantenendo un livello di complessità ragionevole in termini di costo computazionale, i relativi parametri sono stati determinati direttamente dal programma tramite la funzionalità 'evaluate'. I risultati ottenuti sono 0.2778 MPa e 13.3850, rispettivamente per μ_1 e α_1 . Per verificare la validità di questi parametri di modello nel descrivere prove di trazione corneali si eseguono delle simulazioni su Abaqus per poi confrontare i risultati con quelli ottenuti sperimentalmente. Per prima cosa si è definita la geometria del campione da testare corrispondente alle dimensioni del campione reale usato nelle prove di laboratorio. Nel modulo *Part* di Abaqus/CAE è stato disegnato dapprima in 2D la sezione rettangolare di dimensioni (14 x 5) mm e poi andando ad estrarre lo sketch per uno spessore di 1 mm si è generato un corpo solido deformabile in 3D. I campioni di cornea testati nelle prove sperimentali erano stati anche dotati di un contorno sclerale al fine di consentire il fissaggio del provino all'interno della strumentazione. Per questo nella prova computazionale sono state create due sezioni per simulare l'aggrappaggio del provino. Queste due sezioni sono state realizzate partizionando l'istanza tramite due piani di taglio ortogonali all'asse del provino in modo da ottenere una parte centrale di 10 millimetri e due zone agli estremi lunghe 2 millimetri in cui poter applicare in seguito le condizioni al contorno. Per la meshatura del modello (Figura 5.2), data la semplicità della geometria, è stata utilizzata una mesh strutturata con elementi esaedrici lineari a 8 nodi, di tipo 3D stress, con formulazione ibrida (elementi C3D8HR). Si è scelto di utilizzare un *Mesh Seed* pari a 0.25 mm, sulla base

della dimensione dello spessore del provino pari a 1 mm in modo da ottenere 4 elementi lungo lo spessore del provino.

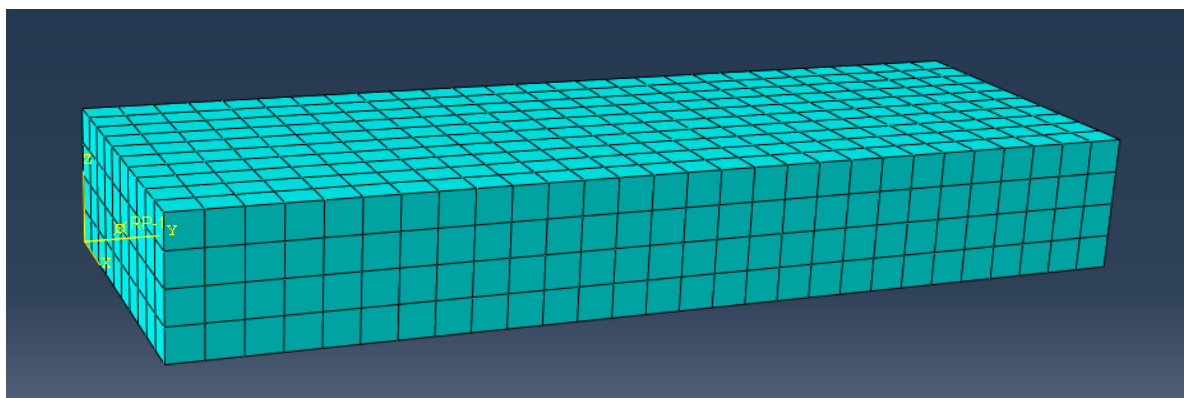


Figura 5.2: Mesh del campione rettangolare.

Nella definizione delle condizioni al contorno (Figura 5.3) al fine di simulare quanto è stato fatto nella prova di trazione in laboratorio, è stato imposto uno spostamento di 2.5 mm per parte lungo la direzione dell'asse del provino in modo tale da raggiungere una deformazione totale del 50%. Tale condizione è stata applicata sulla superficie superiore e su quella inferiore di ciascuna delle due zone di aggrappaggio riproducendo quanto avviene fisicamente durante la prova dove le morse alle estremità del provino agiscono soltanto sulla faccia superiore e sulla sua opposta e non lungo lo spessore. Gli spostamenti lungo le altre 2 direzioni sono stati imposti nulli perché le morse impediscono lo spostamento nel piano ortogonale alla direzione di maggiore sviluppo del provino.

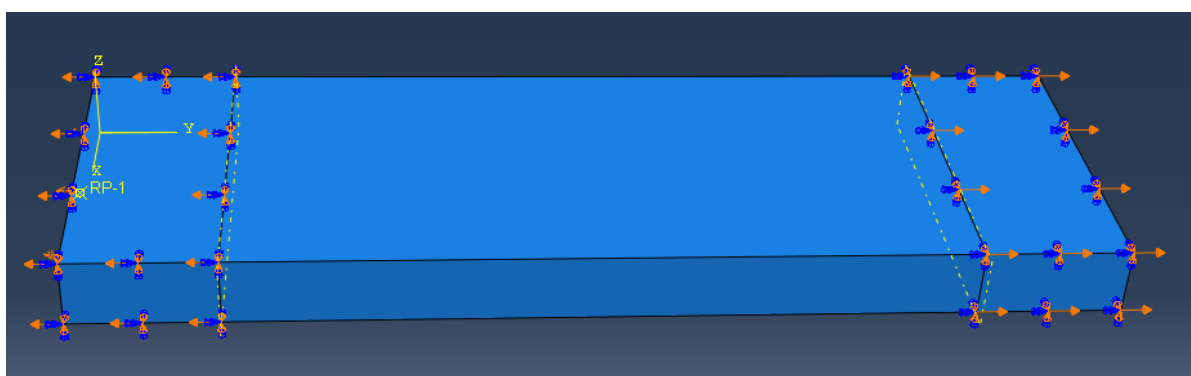


Figura 5.3: Geometria 3D di campione di cornea con rappresentate le condizioni al contorno applicate durante la prova di trazione.

Una volta definiti tutti gli aspetti necessari è stata lanciata l'analisi della prova di trazione sul modello di striscia corneale considerando il modello di Ogden di ordine 1 con i valori di μ_1 e α_1 determinati, i risultati saranno esposti nell'omonimo Capitolo 6.

5.1.1 Modello striscia corneale per prove di trazione viscoelastico

Per riprodurre con più precisione il comportamento corneale, è opportuno considerare un modello con materiale viscoelastico, più realistico rispetto al modello semplicemente iperelastico considerato in precedenza. Sono stati considerati i dati di rilassamento normalizzato di 8 cornee risultanti sempre dalle prove svolte nel laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università di Padova (Fontanella et al., 2021) utilizzando lo strumento Bose ElectroForce® Planar Biaxial TestBench® System. Da queste prove si sono ricavati i parametri costitutivi viscosi:

γ_1 [-]	0.48
τ_1 [s]	1.44
γ_2 [-]	0.27
τ_2 [s]	98.52

Tabella 5.1: parametri costitutivi viscosi.

Aggiungendo questi parametri viscoelastici nella definizione del materiale creato in precedenza in Abaqus (modello iperelastico Ogden grado 1), si ottiene un modello che riproduce il comportamento viscoelastico i cui risultati sono confrontabili con le prove sperimentali. Per quanto riguarda geometria e mesh del provino, non sono state apportate modifiche rispetto a quanto utilizzato in precedenza. Il protocollo sperimentale, seguito in queste prove, prevedeva l'imposizione di una deformazione dell'8% con una velocità pari a 80 mm/s seguita da un tempo di rilassamento di 400 secondi, questo ripetuto per quattro volte fino a raggiungere una deformazione totale del 32%. Per riprodurre questo protocollo computazionalmente, in Abaqus è stato modificato lo step creandone uno di tipo viscoso dalla durata di 1600.04 secondi corrispondente al tempo necessario al completamento della prova. Nelle condizioni al contorno per semplicità lo spostamento di 0.8 mm, corrispondente all'8% dei 10 mm iniziali, viene applicato, quasi istantaneamente (in 0.01 secondi), ad un'unica estremità mentre l'altra viene ancorata impedendo i movimenti. Per ricreare la prova ciclica, viene creata una amplitudine da applicare alla BC (*boundary conditions*) di spostamento così definita:

	Time/Frequency	Amplitude
1	0	0
2	0.01	1
3	400.01	1
4	400.02	2
5	800.02	2
6	800.03	3
7	1200.03	3
8	1200.04	4
9	1600.04	4

Tabella 5.2: Definizione dell'amplitude per ottenere quattro deformazioni consecutive.

In questo modo si applica in 0.01 secondi lo spostamento di 0.8 mm, ogni spostamento è seguito dai rispettivi 400 secondi di rilassamento. Anche in questo caso una volta definiti tutti gli aspetti necessari è stata lanciata l'analisi della prova di trazione sul modello di striscia corneale considerando il modello viscoelastico. I risultati saranno esposti nel Capitolo 6.

5.2 Modello strutturale della cornea per insufflazione

Un modello strutturale della cornea è necessario per simulare computazionalmente le prove di insufflazione svolte in laboratorio. Questo può essere generato creando un modello continuo o di tipo shell. I Modelli shell utilizzano la teoria dei gusci sottili per descrivere in modo più semplice la geometria complessa della cornea. In questo tipo di modello la geometria creata è una superficie avente lo spessore come unico parametro caratterizzante. Nonostante questo approccio riduca la complessità geometrica ed aumenti l'efficienza dalla formulazione, è difficile da estendere a modelli costitutivi complessi e può semplificare in maniera eccessiva alcuni comportamenti. Modelli di tipo continuo rispecchiano la geometria reale della cornea nelle tre dimensioni incrementando però il tempo computazionale necessario per le analisi. In questo lavoro di Tesi, per lo sviluppo del modello si è scelto di avvalersi di un modello di tipo continuo cercando di riprodurre la struttura e la forma reali della cornea compiendo alcune semplificazioni nei parametri del modello computazionale che sono stati descritti nel capitolo

2 paragrafo 3 in modo tale da ottenere un livello di complessità ragionevole in termini di costo computazionale.

5.2.1 Definizione della geometria

Il modello di cornea è stato costruito come un corpo solido deformabile definito in uno spazio tridimensionale. La geometria è stata disegnata utilizzando il motore CAD integrato in Abaqus/CAE che consente la generazione di geometrie semplici. La cornea, come già riportato nei paragrafi precedenti (2.3.4), è caratterizzata da una curvatura variabile con uno spessore minore nella regione centrale rispetto a quello nella regione periferiche del limbus. Per tentare di ricreare questa geometria tipica del tessuto corneale, la forma della cornea concettualmente è ottenuta tramite un'operazione di sottrazione tra due calotte sferiche costruite con dimensioni appositamente selezionate. Questa operazione è stata eseguita direttamente nella fase primaria di sviluppo del modello, ovvero nel modulo 'part' dove è possibile generare lo sketch in 2D. Inoltre, in fase di costruzione della geometria, è stato considerato l'approccio di Anderson et al. che prevede l'applicazione di supporti inclinati di 40° ai nodi marginali del modello corneale in quanto fornisce i risultati più simili al modello con occhio intero, per i motivi discussi nel paragrafo 2.3.3. In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare come misure del modello di cornea completa quelle tipiche della cornea suina che presenta delle differenze rispetto a quelle umane. La cornea porcina è significativamente più spessa di quella umana a causa dello spessore maggiore degli strati di epitelio e di stroma, inoltre è caratterizzata da un diametro maggiore (Heichel et al., 2016). Per ricavare le dimensioni da assegnare al modello, sono stati consultati alcuni lavori presenti in letteratura riguardanti misurazione delle varie dimensioni significative (L R Bartholomew, et al., 1997; Faber et al., 2008; Heichel et al., 2016;) ed alcuni lavori in letteratura riguardanti la modellazione di cornea in configurazione fisiologica per simulazioni FEM (Nejad et al., 2014; Elsheikh e Wang, 2011; Pandolfi e Maganiello, 2006). Di conseguenza si è deciso di adottare le seguenti misure: lo spessore centrale di 0.833 mm, lo spessore laterale di 1.033 mm, i diametri della base anteriore e posteriore rispettivamente di 13.81 mm e 12.228 mm, l'altezza totale di 2.4 mm e il bordo corneale inclinato di 40°. Per la generazione del modello 3D, si parte da un disegno 2D: per prima cosa sono state realizzate due circonferenze di costruzione, queste rappresentano rispettivamente il confine anteriore e il confine posteriore della cornea. Una volta realizzate le due circonferenze, tramite il comando 'misure' sono state impostate le dimensioni corrette in modo da ottenere le dimensioni prestabilite. Successivamente tramite comando Trim sono stati eliminati tutti gli elementi 2D utili solamente alla costruzione della geometria, in questo modo si è ottenuto lo sketch

definitivo 2D (Figura 5.7). Questo viene fatto ruotare di 360° intorno all'asse verticale per ottenere la struttura definitiva in 3D della cornea. Tutte le quote presenti nella figura sottostante sono in mm. Il software Abaqus/CAE non presenta al suo interno un sistema di unità di misura predefinito, per cui tutte le grandezze introdotte per la costruzione del modello sono espresse in maniera coerente tra di loro.

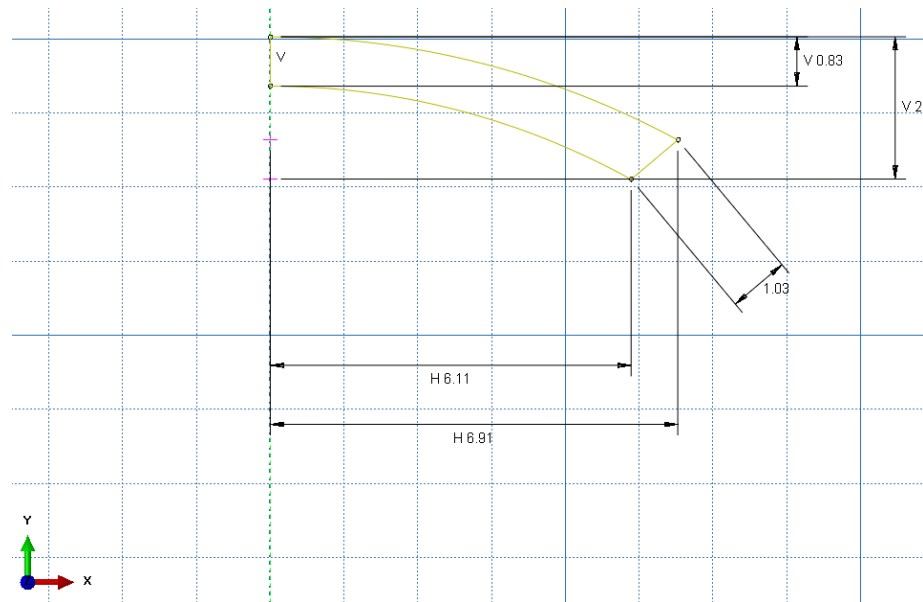


Figura 5.7: Sketch definitivo utilizzato per la generazione del modello 3D di cornea mediante rivoluzione di 360° intorno all'asse verticale tratteggiato in verde.

Le figure riportate di seguito mostrano il modello 3D ottenuto in vista laterale, anteriore e posteriore.

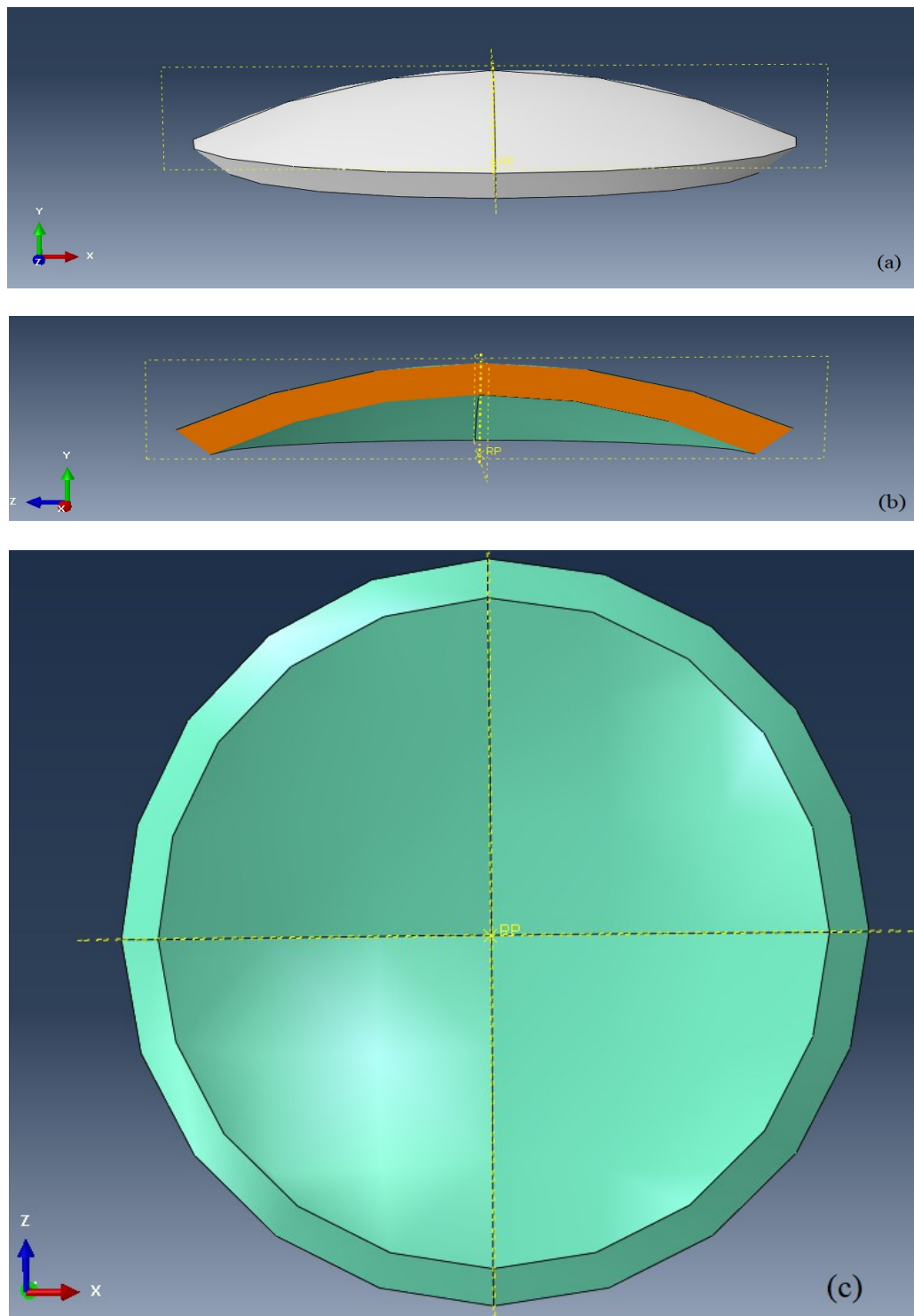


Figura 5.8: Viste del modello 3D; (a) vista laterale, (b) vista laterale in sezione, (c) vista posteriore.

5.2.2 Definizione del materiale iperelastico per il modello cornea

Come visto nel paragrafo 5.1, inizialmente sono stati utilizzati i dati sperimentali derivanti da prove da trazione mono assiali svolte su campioni rettangolari di cornea per ottenere i parametri del materiale corneale iperelastico. In letteratura (paragrafo 3.3.3), viene riportato che i risultati

provenienti da test di trazione riproducono solo parzialmente il reale comportamento biomeccanico del tessuto corneale rispetto ai test di insufflazione. La relazione tensione-deformazione risultante da una prova di trazione su campioni di striscia corneale risulta notevolmente più rigida di quella ricavata da test di insufflazione eseguiti sull'intera cornea (Elsheikh e Anderson, 2005). Per questo motivo è stato necessario modificare il set originale di parametri costitutivi del modello Ogden identificati nella prova di trazione in modo da valutare il comportamento meccanico della struttura in tutte le direzioni. È stato eseguito un approccio di *reverse engineering*, consistente in prove successive con diversi settaggi fino ad ottenere un andamento pressione-volume quanto più simile al comportamento ottenuto sperimentalmente in media dai test di insufflazione sui campioni di cornea porcina sana. I valori iniziali dei parametri sono stati moltiplicati ciascuno per un fattore differente e per ciascuna combinazione di parametri considerata è stata eseguita l'analisi computazionale di insufflazione sul modello di cornea. Sulla base di queste valutazioni, sono state svolte delle prove variando entrambi i parametri e sono stati scelti i valori dei moltiplicatori pari a 0.25 per μ_1 e 3 per α_1 . Dunque, nella modellazione computazionale per definire il materiale corneale, sono stati utilizzati i seguenti parametri costitutivi del modello di Ogden di ordine 1: μ_1 pari a 0.06945 MPa e α_1 pari a 40.1550.

5.2.3 Definizione e generazione della mesh

Per generare il reticolo computazionale, ovvero gli elementi e i nodi che compongono il modello corneale, è stata scelta una mesh con elementi esaedrici lineari a 8 nodi di tipologia 3D stress con formulazione ibrida e integrazione ridotta (elementi C3D8RH). Per potere assegnare una mesh con elementi esaedrici è stato necessario dividere l'istanza in quattro parti tramite 2 piani di taglio come visibile nell'immagine del modello 3D riportata in Figura 5. 8. Come descritto in precedenza nel paragrafo 2.3.2, il numero di elementi migliora l'accuratezza dei risultati fino ad una certa soglia. Sono state condotte diverse simulazioni con mesh di dimensioni crescenti ed è stata scelta quella che rappresenta il compromesso migliore tra peso computazionale e qualità dei risultati. È stata definita una dimensione media degli elementi finiti pari a 0.25 mm per tutti gli elementi non appartenenti allo spessore, mentre è stata assegnata una dimensione di 0.15 mm lungo lo spessore. Complessivamente, la mesh è costituita da 19040 elementi esaedrici connessi da 22408 nodi.

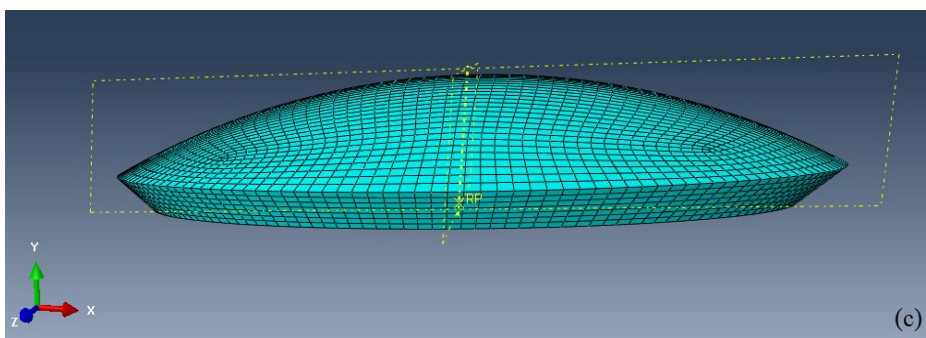
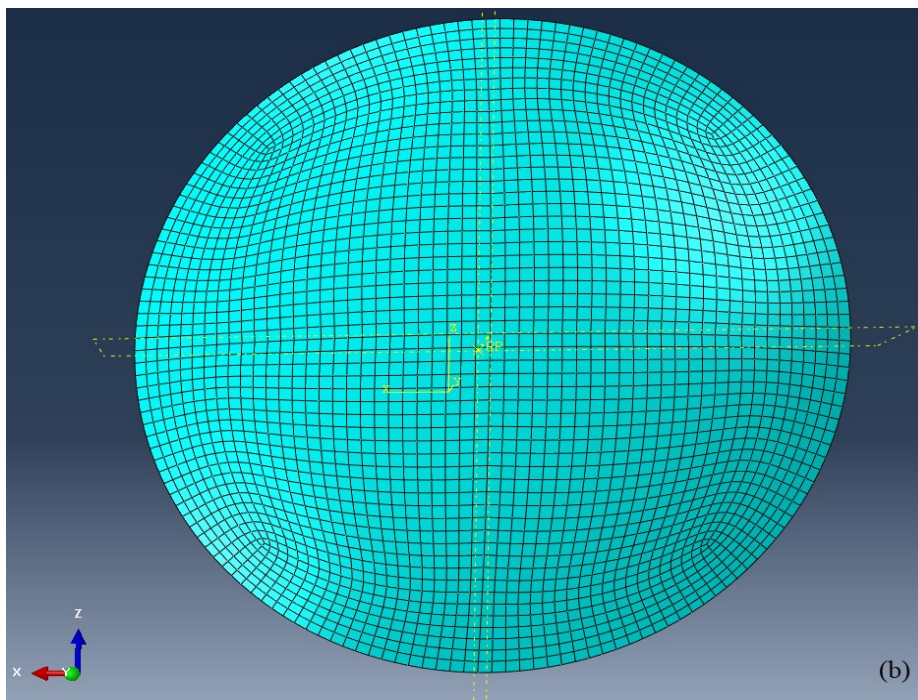
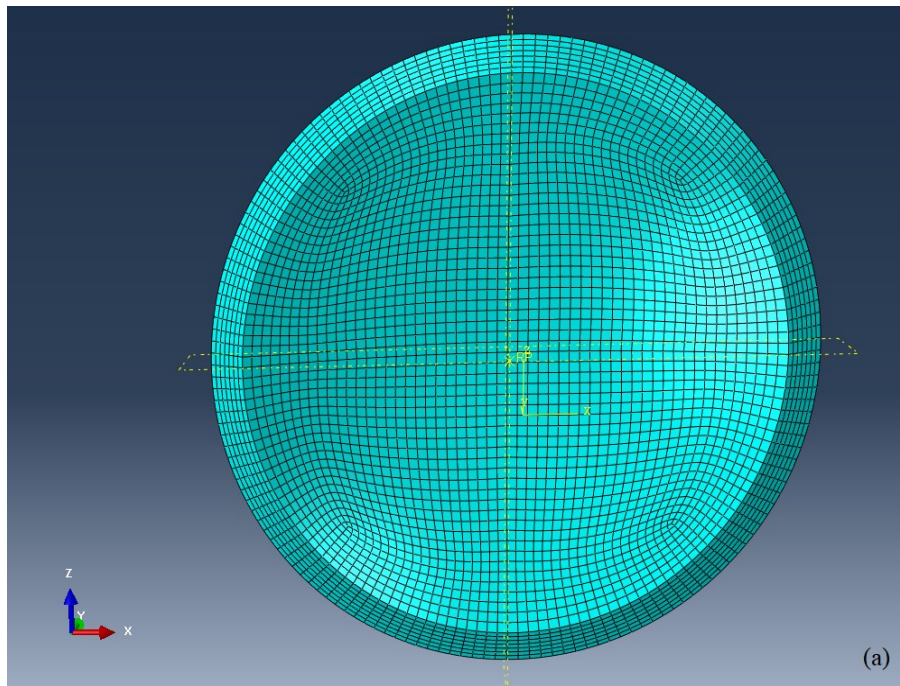


Figura 5.9: Vista cornea con mesh di elementi C3D8RH. (a) vista posteriore, (b) vista anteriore, (c) vista laterale.

5.2.4 Interazione fluid cavity

Tra i diversi tipi di interazioni disponibili in Abaqus, per eseguire la prova computazionale di insufflazione, è necessario crearne una di tipo *fluid cavity* a cui viene assegnata la rispettiva *interaction property* di tipo *fluid cavity*. Questa consente di definire le proprietà della cavità riempita di fluido presente nel modello specificando le proprietà fisiche del fluido. Nel modello analizzato, la cavità è rappresentata dalla cornea e la soluzione liquida usata per l'insufflazione è definita come un fluido incomprimibile caratterizzato da una densità di 10^{-9} t/mm³. L'incomprimibilità è stata definita mediante il modello di fluido di tipo idraulico. Per la creazione della fluid cavity è richiesta la selezione di un punto di riferimento e della superficie che definisce la cavità. Il punto non deve fare parte degli elementi del modello per questo è utile creare un Reference Point in corrispondenza del centro della base del modello mentre come superficie delimitante la cavità è stata selezionata la regione interna del modello cioè la superficie posteriore del tessuto corneale.

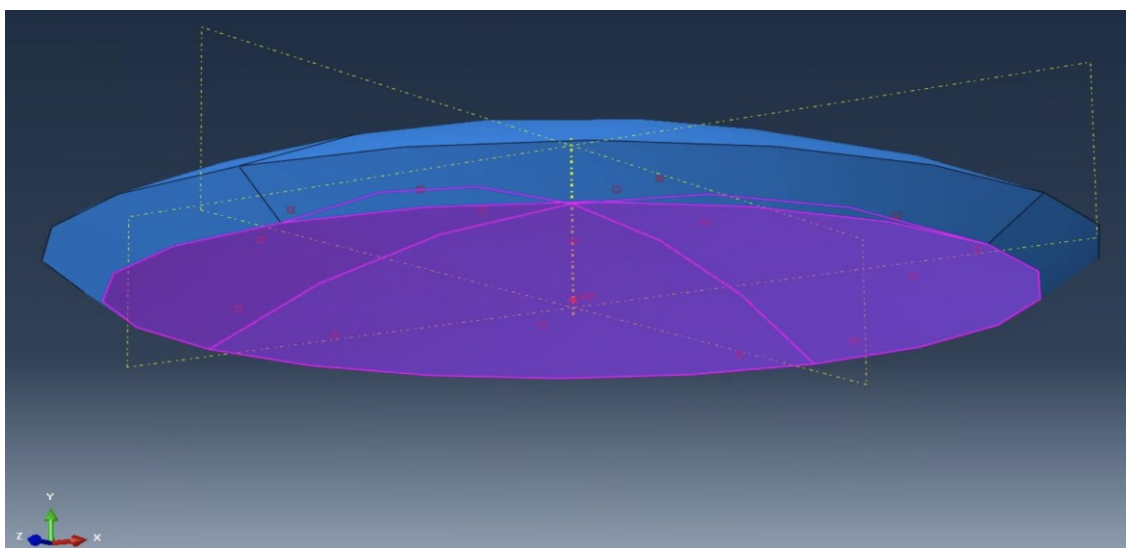


Figura 5.10: È evidenziata la fluid cavity definita tramite reference point e superficie corneale interna.

5.2.5 Creazione dello step di analisi

Per definire la modalità d'analisi è necessario creare degli Step. Abaqus di default crea lo step Initial, questo è utilizzato solamente per definire l'interazione Fluid cavity che viene applicata all'inizio dell'analisi e resta costante in tutte le fasi dell'analisi. Per il test di insufflazione, è stato creato un nuovo Step di tipo Static General in cui vengono applicate le condizioni al contorno necessarie per la prova, descritte successivamente. È stato definito un tempo di analisi unitario ed è stata considerata la non linearità per geometria (NLgeom : ON). È stata impostata una dimensione iniziale dell'incremento di 2.5×10^{-5} ed una dimensione massima pari ad 1. Il

metodo di risoluzione del sistema di equazioni scelto è quello diretto mediante la tecnica Full Newton.

5.2.6 Condizioni al contorno

Per ricreare computazionalmente l'ancoraggio della cornea al supporto per insufflazione, che in laboratorio è stato realizzato tramite guarnizione idraulica ed elastico, sono state create delle condizioni al contorno di tipo meccanico applicate lungo il contorno corneale (Figura 5.15). In questo modo vengono impediti gli spostamenti e le rotazioni del bordo corneale.

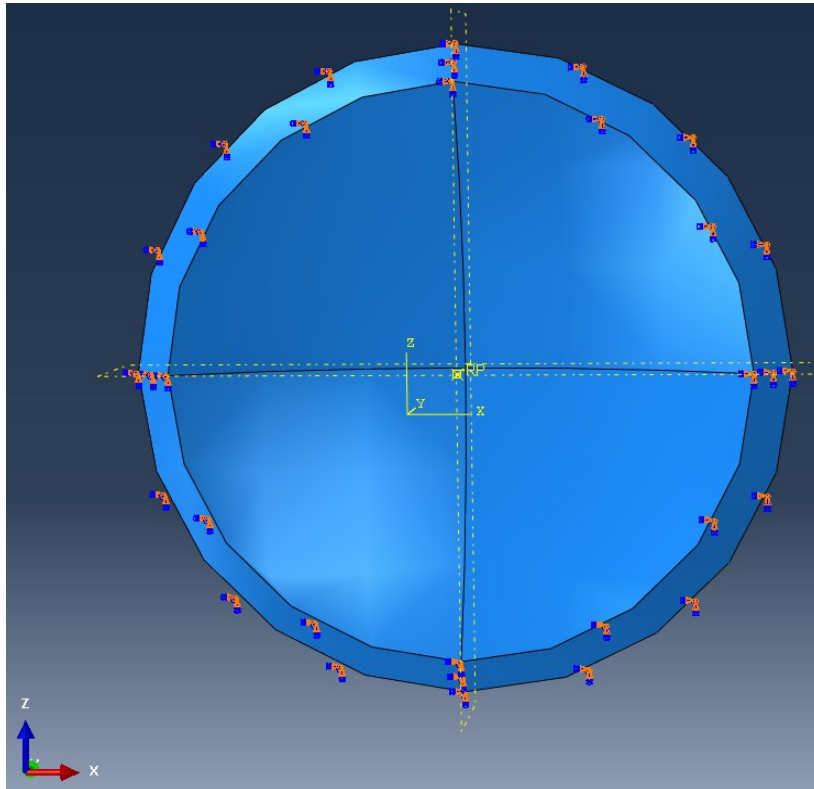


Figura 5.11: Condizioni al contorno che garantiscono il fissaggio della cornea lungo il contorno corneale.

Per simulare il test di insufflazione è necessario creare una seconda condizione al contorno di tipo *fluid cavity pressure* che viene associata all'interazione *fluid cavity* definita in precedenza. In questo modo si definisce la pressione all'interno del modello di cornea applicata durante l'analisi. Come valore di pressione finale da ottenere è stato scelto 100 mmHg (0.0133322 MPa in Abaqus), questo valore di pressione largamente superiore rispetto ai normali livelli di pressione intraoculare fisiologici permette di ricavare il comportamento meccanica della cornea in un intervallo più ampio.

Capitolo 6

Risultati

6.1 Prove sperimentali di insufflazione

I primi risultati che si riportano sono stati ottenuti dalle prove sperimentali di insufflazione su campioni di cornea suina, descritte nel Capitolo 4. A partire dai dati sperimentali, sono state ricavate le curve pressione-volume all'equilibrio per le 9 cornee di ogni gruppo tramite Matlab. Queste curve sono state fittate con il modello esponenziale, come illustrato nel paragrafo 4.3, e per valutare la distribuzione statistica è stata calcolata la banda interpercentile, che descrive l'area compresa tra il 25° percentile ed il 75° percentile per i due gruppi, rispettivamente cornee congelate (Figura 6.1 a) e cornee fresche (Figura 6.1 b). Si osserva una banda di distribuzione statistica abbastanza larga, indice di una certa variabilità tra i campioni. Questa variabilità è attesa in quanto caratteristica tipica dei tessuti biologici ed inoltre, può essere causata da diversi fattori quali la variabilità biologica tra i donatori suini, danni strutturali causati al tessuto durante la preparazione dei campioni ed il fissaggio sulla camera anteriore di insufflazione o un'idratazione del campione non effettuata in modo sempre corretto.

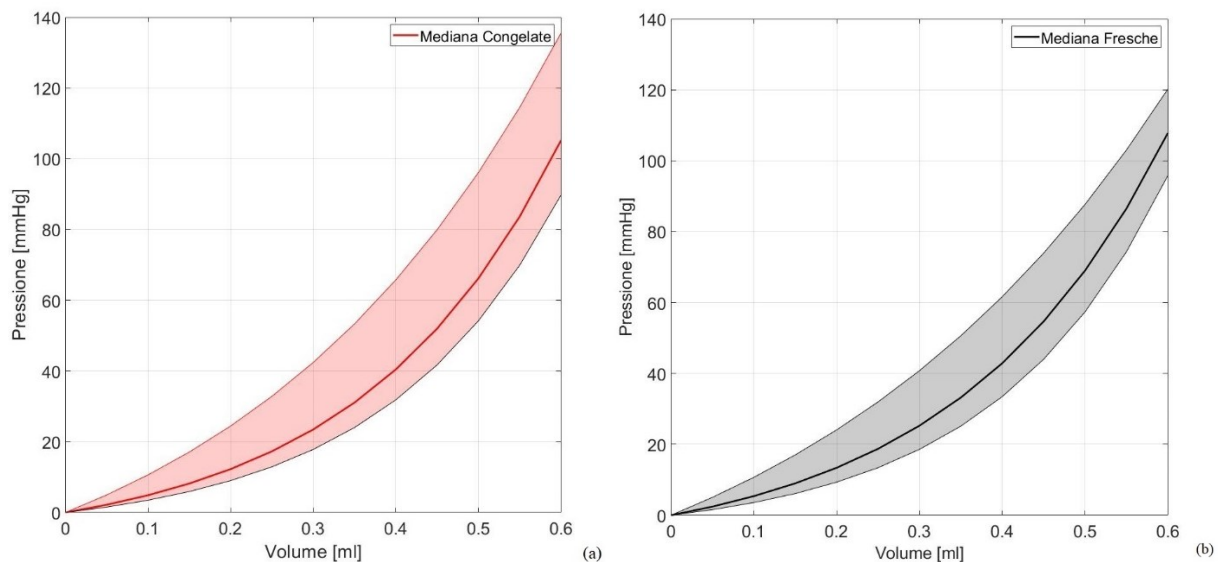


Figura 6.1: Le curve mediane sono riportate insieme alla banda interpercentile per l'andamento pressione-volume all'equilibrio ottenuto per (a) gruppo di cornee congelate; (b) gruppo di cornee fresche.

Dal confronto delle bande statistiche, come visibile in Figura 6.2, non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, sia in termini di mediana che di ampiezza della banda statistica. Effettuando un t-test tra i due gruppi si ottiene un valore di p value 0.9023 che conferma il fatto che i dati non derivino da campioni indipendenti.

Non si osservano, infatti, caratteristiche specifiche nei campioni appartenenti al gruppo di cornee fresche rispetto a quelle congelate.

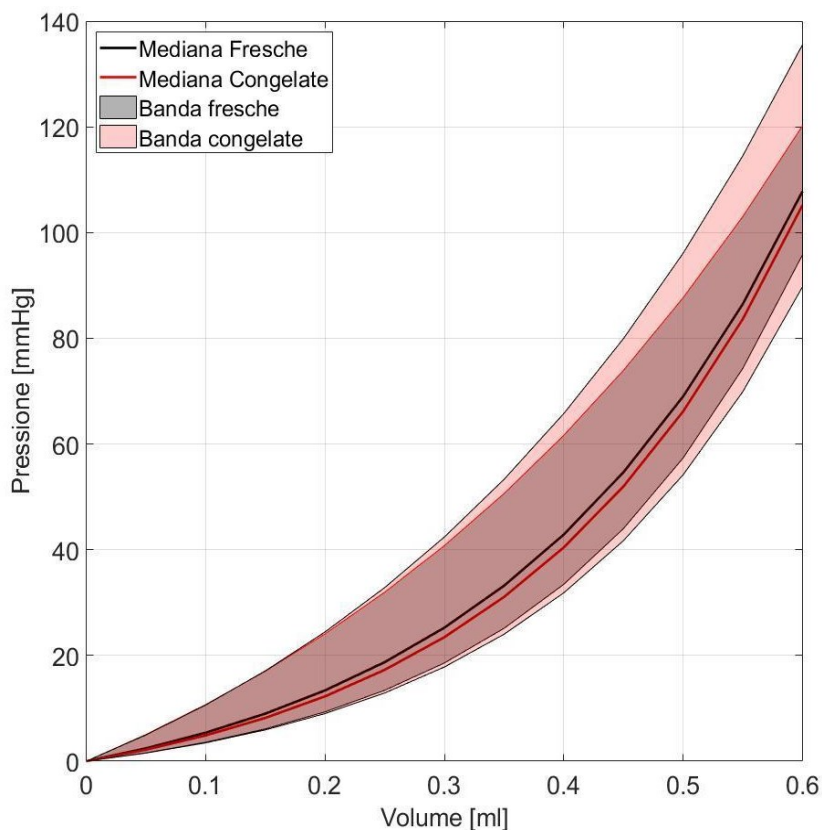


Figura 6.2: Confronto tra le bande statistiche delle curve pressione-volume all'equilibrio ottenute per i gruppi di cornee congelate e fresche.

In Tabella 6.1, si riportano i parametri risultanti dal fitting con modello esponenziale (equazione 4.1).

	Fresche	Congelate	Media
a [mmHg]	46.04	39.56	42.8
b [1/ml]	3.64	3.36	3.5

Tabella 6.1: parametri risultanti fitting modello esponenziale

Per quanto riguarda le curve di stress-relaxation, una volta ottenuto il fitting delle curve di rilassamento normalizzato con il modello di Prony a 2 rami viscoelastici, come illustrato nel paragrafo 4.3, ne è stata calcolata la media per ogni cornea. Considerando queste medie, si è ricavata la banda definita tra il 25° e il 75° percentile per i due gruppi di cornee (fresche e congelate), come mostrato in Figura 6.3.

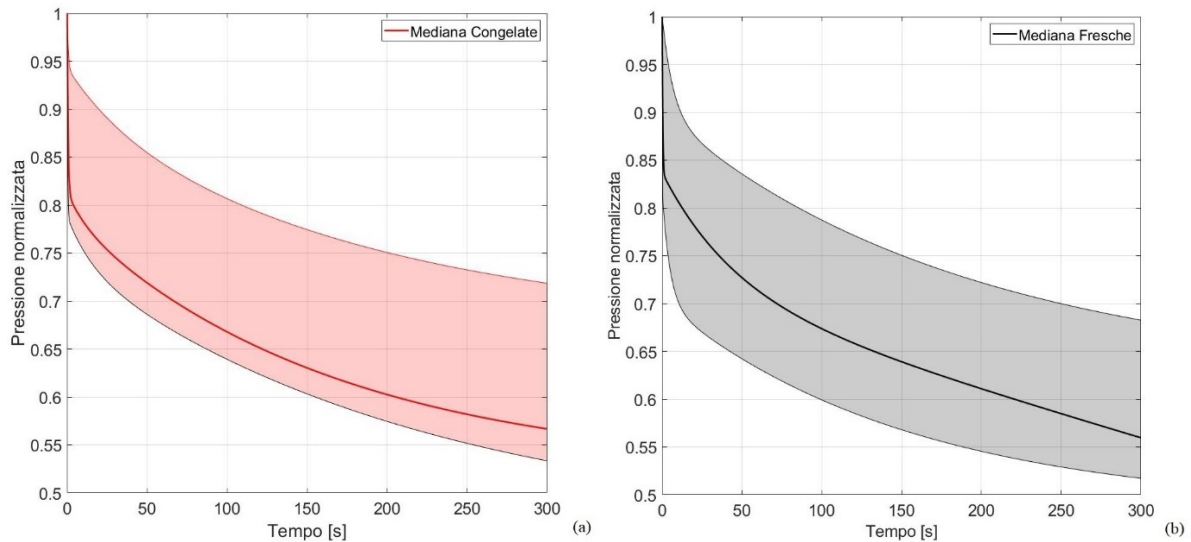


Figura 6.3: Le curve mediane sono riportate insieme alla banda interpercentile per l'andamento della pressione normalizzata nel tempo ottenuto per (a) gruppo di cornee congelate; (b) gruppo di cornee fresche.

Confrontando le bande statistiche delle curve di rilassamento dei due gruppi, si ottiene il grafico in Figura 6.4 riportato di seguito, in cui non si nota una differenza significativa tra le cornee congelate e fresche, analogamente a quanto visto anche nelle curve pressione-volume.

È stato effettuato un t-test tra i valori di pressione registrati al termine dei rilassamenti nei due gruppi di cornee fresche e congelate, questo restituisce un valore di p value pari a 0.6470.

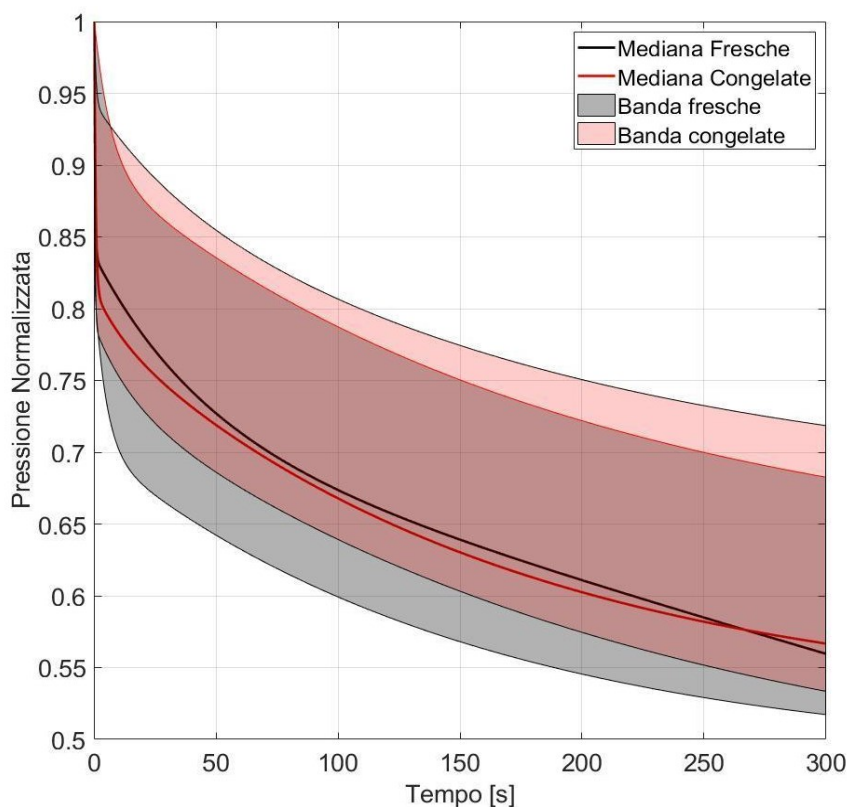


Figura 6.4: Confronto tra le bande statistiche delle curve pressione normalizzata-tempo ottenuto per i gruppi di cornee congelate e fresche.

In Tabella 6.2, si riportano i parametri risultanti dal fitting con modello di Prony a due rami viscosi (Equazione 4.2).

	Fresche	Congelate	Media
γ_1 [-]	0.1212	0.1555	0.1384
τ_1 [s]	20.1297	28.3167	24.2232
γ_2 [-]	0.4323	0.3952	0.4138
τ_2 [s]	287.2506	344.9068	316.0787

Tabella 6.2: parametri fitting modello Prony due rami viscosi.

6.2 Analisi computazionali di trazione

6.2.1 Modello con materiale iperelastico

Una volta definiti tutti gli aspetti necessari come descritto nel paragrafo 5.1, è stata eseguita l'analisi della prova di trazione sul modello di striscia corneale considerando il modello Ogden di ordine 1 con i valori di μ_1 e α_1 determinati rispettivamente 0.2778 MPa e 13.3850. Di seguito, sono riportati i risultati ottenuti in termini di spostamento (U), espresso in mm, e forza di reazione (*Reaction Force*, RF), espressa in N, lungo l'asse del provino.

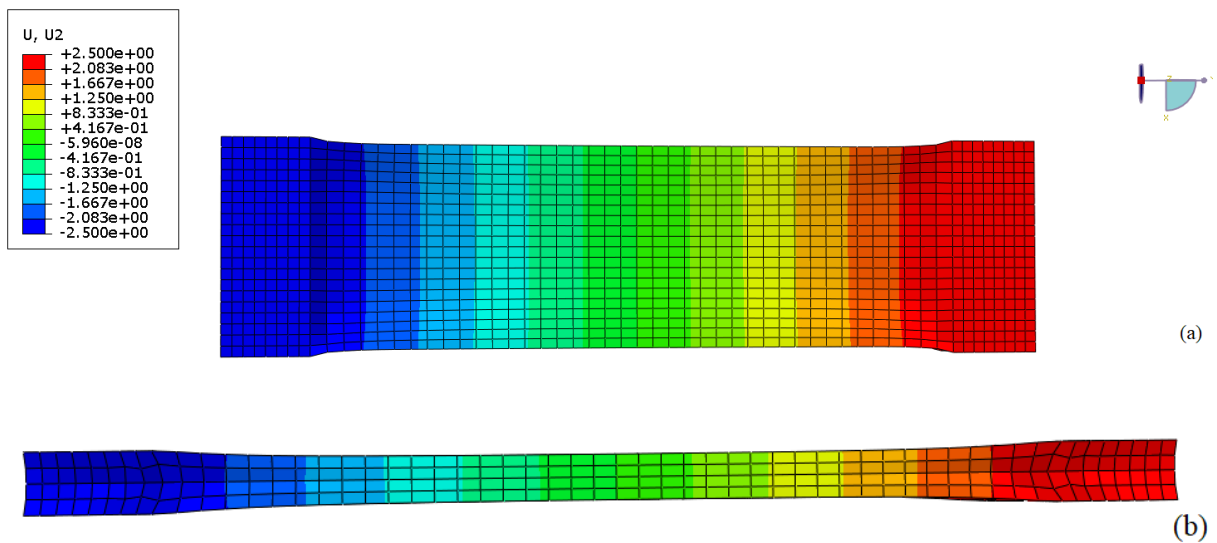


Figura 6.5. Modello di striscia corneale con materiale iperelastico al termine della prova di trazione con evidenziata la mappa degli spostamenti U_2 lungo la direzione di trazione y . (a) Visualizzazione nel piano XY ; (b) Visualizzazione nel piano YZ .

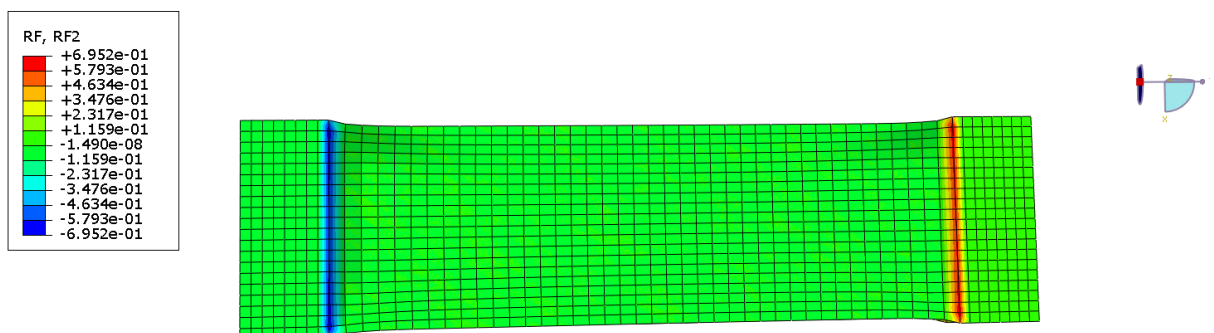


Figura 6.6. Modello di striscia corneale con materiale iperelastico al termine della prova di trazione con evidenziata la mappa delle forze di reazione RF_2 lungo la direzione di trazione nel piano XY .

Nelle prove di trazione eseguite in laboratorio, si ricavano i dati deformativi a partire dallo spostamento complessivo dei due motori interfacciati tra loro, che permettono la trazione del

provino, dividendo tale valore per la lunghezza iniziale del provino. I dati di tensione si ottengono dividendo la forza, direttamente misurata dalle celle di carico presenti nella strumentazione, per l'area della sezione trasversale del provino. Per ottenere in maniera analoga i valori di tensione nominale e deformazione nominale dall'analisi computazionale, sono considerati i valori di spostamento totale applicato al modello mentre i valori di forza lungo l'asse del provino sono ricavati sommando le forze di reazione (*Reaction Forces*) registrate in ogni nodo selezionato nella condizione al contorno per lo spostamento appartenente alla faccia superiore e inferiore della zona di ammorsaggio che subisce uno spostamento positivo. Risultati di deformazione e stress ottenuti dall'analisi computazionale sono comparati con i dati sperimentali ottenuti dalle prove sperimentali svolte nel 2021 (Fontanella et al., 2021), da cui si sono ricavati i parametri costitutivi come descritto nel Capitolo 5. Dal confronto dei risultati, visibile in Figura 6.7, si può affermare che i risultati computazionali sono coerenti con quelli ottenuti sperimentalmente e che quindi i parametri costitutivi ottenuti rappresentano con buona precisione il comportamento di un campione di striscia corneale sottoposto a prove di trazione.

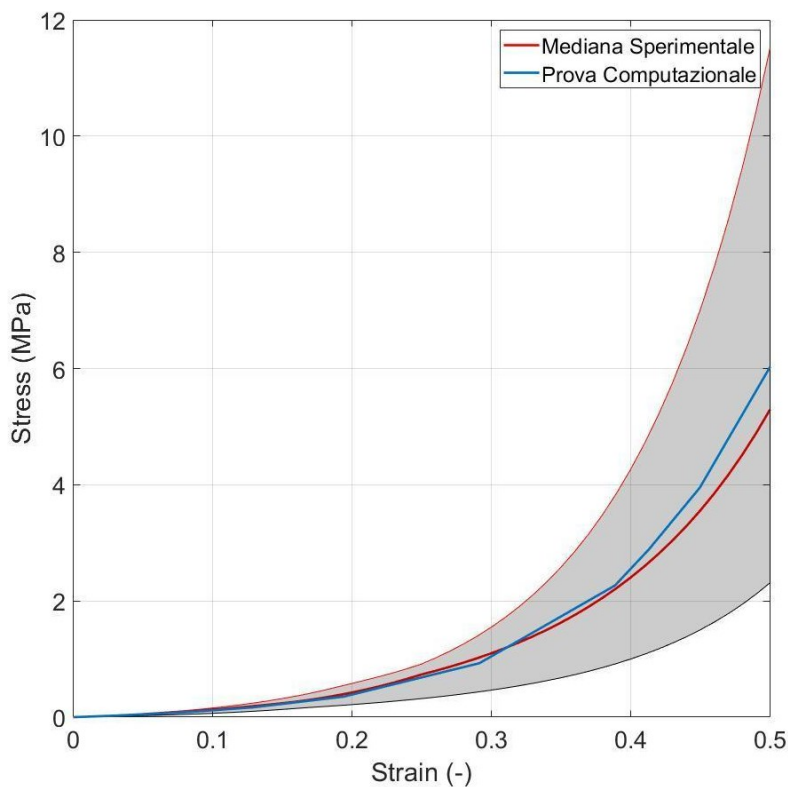


Figura 6.7: Confronto tra l'analisi computazionale di trazione e la prova sperimentale di trazione su cornee fresche rappresentata da curva mediana e banda interpercentile.

6.2.2 Modello con materiale viscoiperelastico

L'analisi computazionale di trazione sul modello di striscia corneale è stata ripetuta considerando un materiale viscoiperelastico, come descritto nel Capitolo 5. Passando da un modello iperelastico ad uno viscoelastico, come mostrato in Figura 6.8 e Figura 6.9 visivamente i risultati ottenuti sono simili. Coerentemente a quanto imposto, i valori di deformazione e forze di reazione sono minori dato che si arriva ad una deformazione del 32% nel modello viscoelastico contro quella del 50% del modello iperelastico.

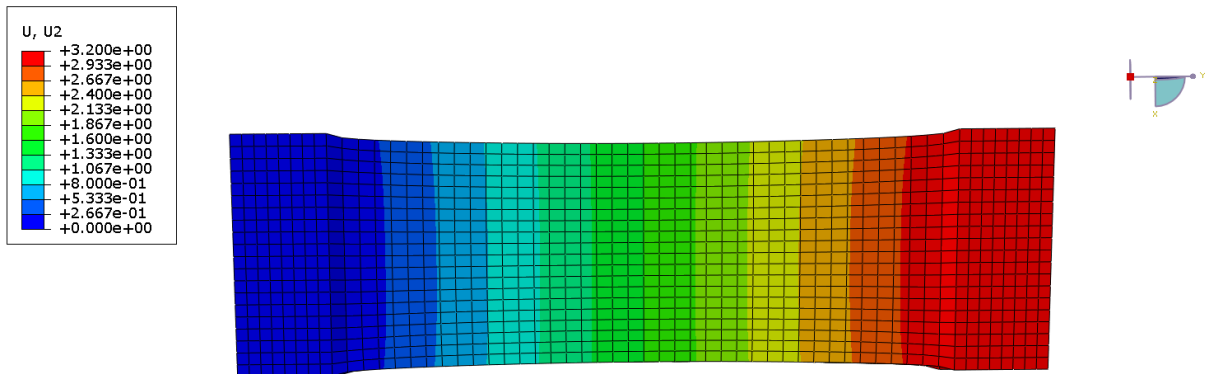


Figura 6.8. Modello di striscia corneale con materiale viscoelastico al termine della prova di trazione con evidenziata la mappa degli spostamenti U_2 lungo la direzione di trazione y , con visualizzazione nel piano XY .

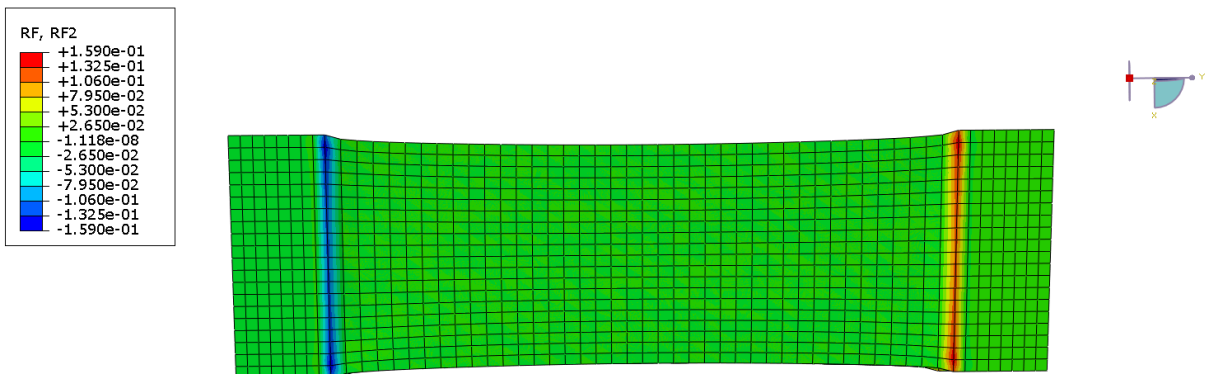


Figura 6.9. Modello di striscia corneale con materiale viscoelastico al termine della prova di trazione con evidenziata la mappa delle forze di reazione lungo la direzione di trazione, con visualizzazione nel piano XY .

Per ottenere i valori numerici dello stress risultanti dall'analisi, è stato seguito lo stesso procedimento descritto nel paragrafo precedente per il modello iperelastico. Da questi, è stato possibile ottenere il grafico tensione-tempo che descrive la prova computazionale del rilassamento delle tensioni per 4 step deformativi (Figura 6.10). Si sono isolati i 4 rilassamenti

ed è stata calcolata la curva media come fatto in precedenza per le curve di rilassamento ottenute dalle prove sperimentali di insufflazione.

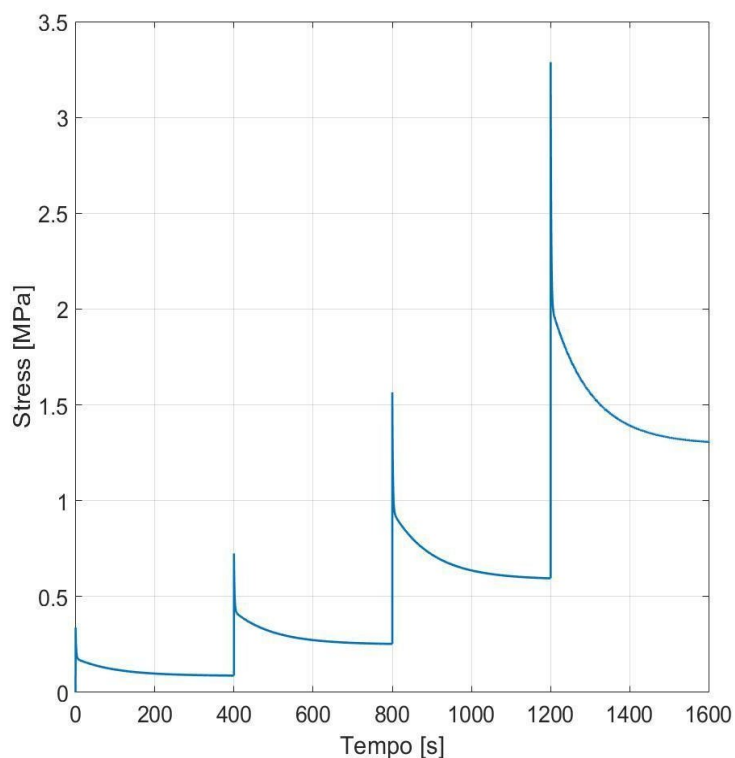


Figura 6.10: Curva stress-tempo ottenuta da analisi computazionale di trazione su modello viscoelastico.

L'andamento dei rilassamenti ottenuto computazionalmente è stato confrontato con 8 curve di rilassamento ottenute sperimentalmente testando strisce corneali suine in prove di stress-relaxation a trazione con i medesimi 4 step deformativi (Fontanella et al., 2021). Il confronto è stato eseguito sia in termini di forza che di tensione (Figura 6.11). Si può osservare che la curva di stress-relaxation ottenuta computazionalmente è compresa tra le curve sperimentali.

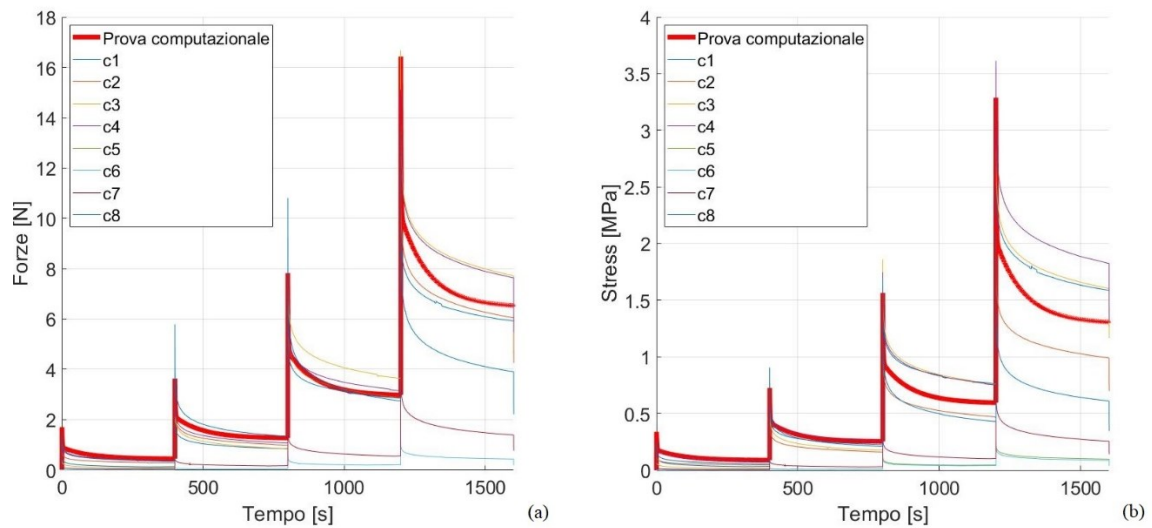


Figura 6.11: Confronto tra la curva di rilassamento ottenuta computazionalmente su modello viscoelastico e i risultati sperimentali di 8 cornee denominate c1-c8. (a) confronto in termini di forza; (b) confronto in termini di tensione.

Tutte le curve di rilassamento sono state normalizzate e per le curve sperimentali è stata calcolata la banda statistica al 50%. Quanto ottenuto è riportato in Figura 6.12, in cui si osserva come i parametri costitutivi viscoelastici ottenuti dalle prove sperimentali descrivono con buona precisione il comportamento di una striscia corneale sottoposta a prove di stress-relaxation.

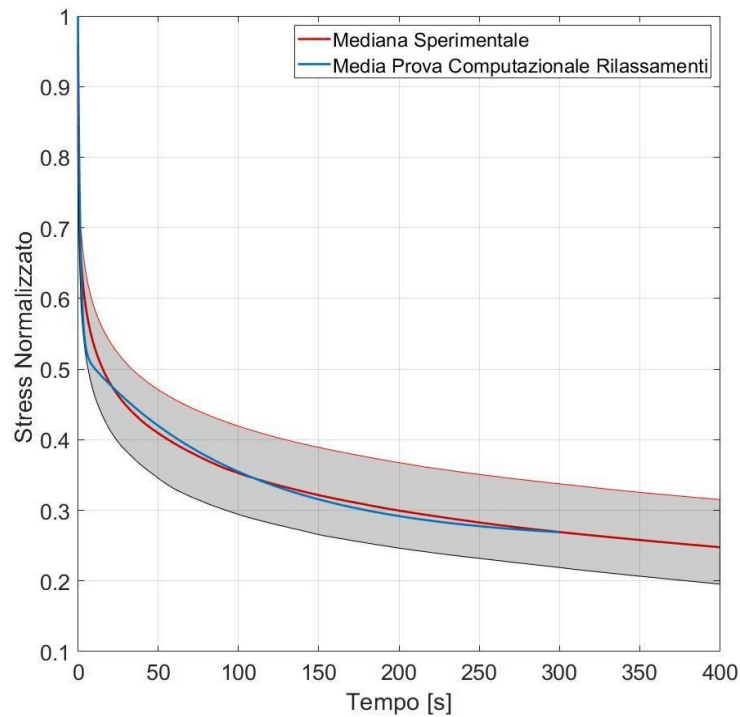


Figura 6.12 Confronto in termini di stress normalizzato tra la curva ottenuta dall'analisi computazionale e risultati sperimentali rappresentati dalla curva mediana e dalla banda interpercentile.

6.3 Analisi computazionali di insufflazione

Per l'analisi di insufflazione con il modello di cornea, sono state considerate come variabili di uscita nodali la pressione esercitata dal fluido sulla superficie posteriore della cornea, il volume della cavità corneale e lo spostamento apicale. Pressione e volume sono riportate come *History Output*, il primo è riportato come PCAV (*Hydrostatic fluid pressure*) mentre il secondo come CVOL (*Hydrostatic fluid cavity volume*). Lo spostamento, individuabile come *Field output*, è stato considerato lungo la direzione verticale in corrispondenza della zona apicale del modello. In particolare, sono stati mediati gli spostamenti lungo la direzione verticale dei nodi più prossimi al centro della superficie anteriore del modello e questa media è stata considerata come spostamento apicale del modello corneale. Per coerenza con le grandezze espresse in mm nella definizione del modello, i valori di CVOL sono considerati espressi in mm^3 , i valori di PCAV in MPa e i valori di spostamento apicale in mm. In Figura 6.13, è visualizzata la distribuzione degli spostamenti verticali U2 sul modello corneale a simulazione terminata in cui sono stati raggiunti i 100 mmHg imposti come pressione interna nella BC. Coerentemente a quanto imposto nelle condizioni al contorno del modello, gli spostamenti ottenuti in corrispondenza del bordo corneale sono nulli mentre in tutte le altre zone sono registrati valori positivi caratteristici di una prova di insufflazione. Si raggiunge uno spostamento massimo nella zona di cornea centrale che, da una visione in sezione, risulta leggermente maggiore sulla superficie posteriore rispetto a quella anteriore.

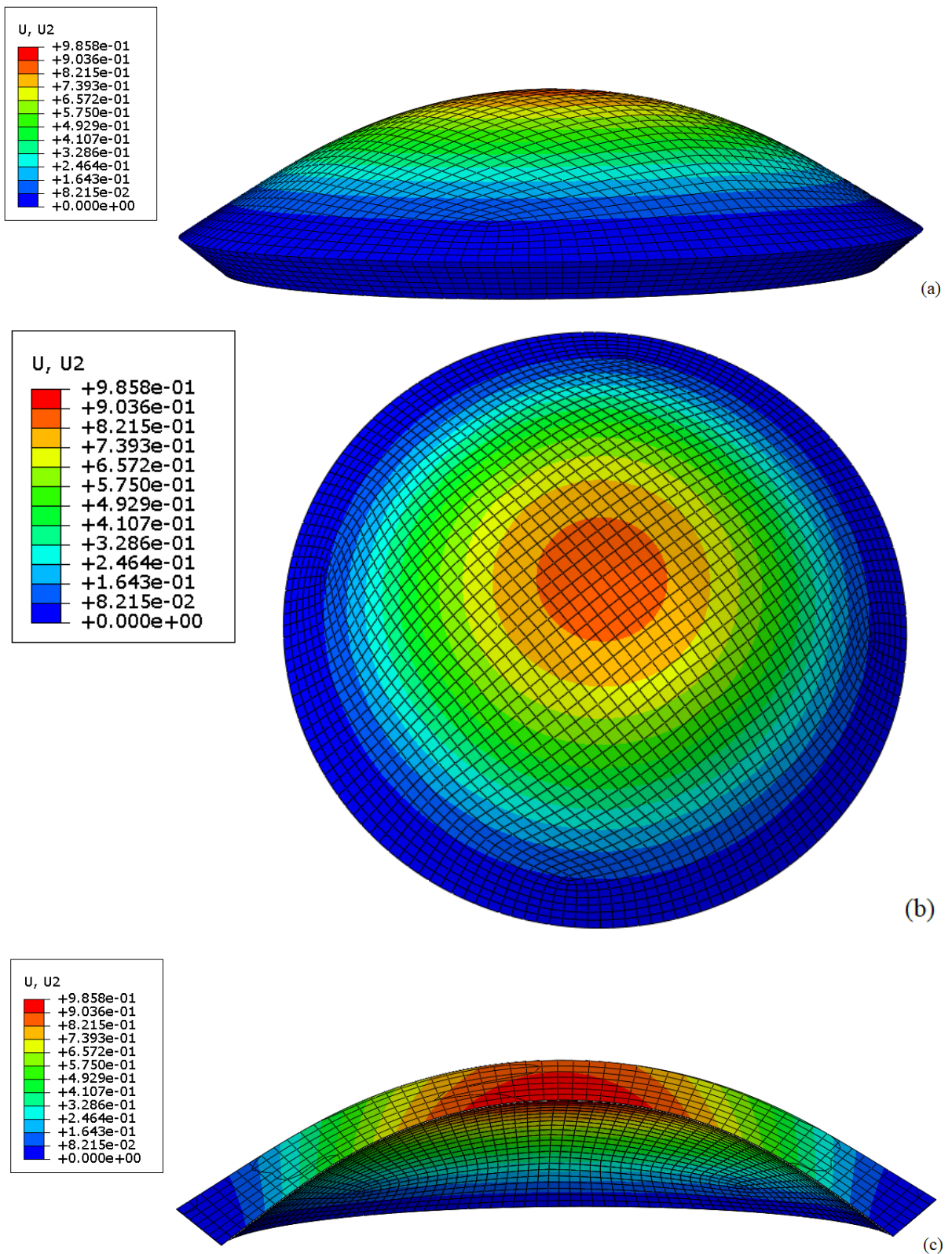


Figura 6.13: Vista del modello cornea 3D con sovrapposta la mappa degli spostamenti lungo la direzione verticale relativa all'incremento finale dell'analisi. (a) Vista laterale nel piano xy ; (b) Vista anteriore nel piano xz ; (c) Vista laterale in sezione.

Di seguito in Tabella 6.1 sono riportati i valori numerici di pressione, volume e spostamento apicale ottenuti dalla prova di insufflazione.

Pressione [N/mm²]	Volume [mm³]	Spostamento apicale medio [mm]
0.00E+00	94.2786	0.00E+00
3.33E-07	94.2813	4.79E-05
6.67E-07	94.2840	9.59E-05
1.17E-06	94.2881	1.68E-04
1.92E-06	94.2942	2.76E-04
3.04E-06	94.3033	4.37E-04
4.73E-06	94.3170	6.80E-04
7.26E-06	94.3375	0.001044
1.11E-05	94.3683	0.001591
1.68E-05	94.4145	0.002410
2.53E-05	94.4839	0.003639
3.81E-05	94.5882	0.005484
5.73E-05	94.7447	0.008253
8.62E-05	94.9801	0.01241
1.29E-04	95.3345	0.01865
1.94E-04	95.8686	0.02801
2.92E-04	96.6755	0.04208
4.38E-04	97.8967	0.06320
6.56E-04	99.7473	0.09482
9.85E-04	102.5430	0.14180
0.001477	106.6958	0.21013
0.002216	112.5800	0.30448
0.003325	120.2333	0.42277
0.004987	129.2576	0.55432
0.007481	139.1229	0.68770
0.011221	149.4292	0.81698
0.013332	153.4132	0.86380

Tabella 6.3: Risultati dell'analisi computazionale, mesh 0.25 mm, parametri costitutivi finali.

Dalla tabella si può osservare che i valori di volume non partono da un valore nullo come ci si attenderebbe eseguendo una prova di insufflazione sperimentalmente. Il primo valore di volume

94.2786 mm³ corrisponde infatti al volume contenuto all'interno della superficie posteriore del modello di cornea nel primo step di analisi. Per ottenere dei valori di volume che partano da 0 ed aumentino ad ogni step è stato sottratto ad ogni valore di volume in tabella il valore iniziale e la differenza è stata normalizzata rispetto al valore iniziale. In questo modo si ottiene la quantità di volume di fluido insufflato all'interno della cornea in ogni step della prova di insufflazione computazionale.

Come per il modello precedente, anche i dati risultanti da questo modello sono stati elaborati in Matlab. Per prima cosa è stata individuata la dimensione ottimale della mesh (paragrafo 5.2.3) ai fini dell'analisi computazionale. Per farlo, sono state confrontate le curve computazionali ottenute implementando mesh di diverse dimensioni e la banda statistica calcolata su tutte le cornee congelate e fresche, ottenuta dalle prove sperimentali, mostrate nel paragrafo 6.1. Come visibile in Figura 6.14, la dimensione della mesh ha mostrato un'influenza sull'analisi computazionale e, rispetto a quanto ottenuto sperimentalmente, i risultati più prossimi sono stati ottenuti con una mesh di 0.25 mm. Questa dimensione della mesh è stata usata infatti per le simulazioni con i parametri costitutivi finali, μ_1 pari a 0.06945 MPa e α_1 pari a 40.1550, identificati tramite *reverse engineering* (paragrafo 5.2.2).

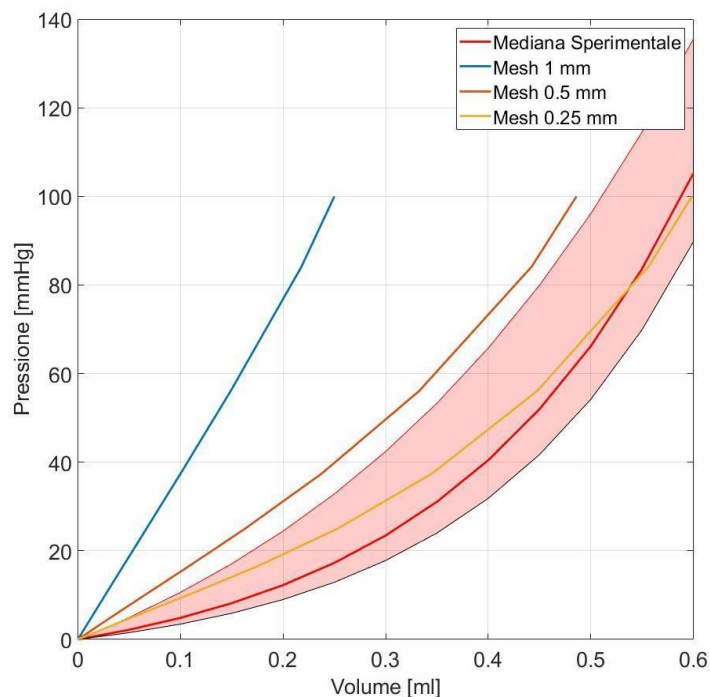


Figura 6.14: Confronto tra risultati pressione-volume di prove di insufflazione ottenuti da analisi computazionali utilizzando mesh con densità crescente e da prove sperimentali rappresentate mediante curva mediana e banda statistica calcolata su tutte le cornee testate.

Sono stati costruiti il grafico pressione-volume, analogamente a quanto fatto per la prova sperimentale, e il grafico pressione-spostamento apicale per mostrare visivamente la relazione tra l'applicazione della pressione e la deformazione risultante in corrispondenza dell'apice corneale. In Figura 6.15 è illustrata la curva pressione-volume ricavata dall'analisi computazionale di insufflazione e tale andamento viene confrontato con la banda di variabilità ottenuta mediando i risultati dei test di insufflazione svolti in laboratorio sui 18 campioni di cornea totali (9 fresche, 9 congelate).

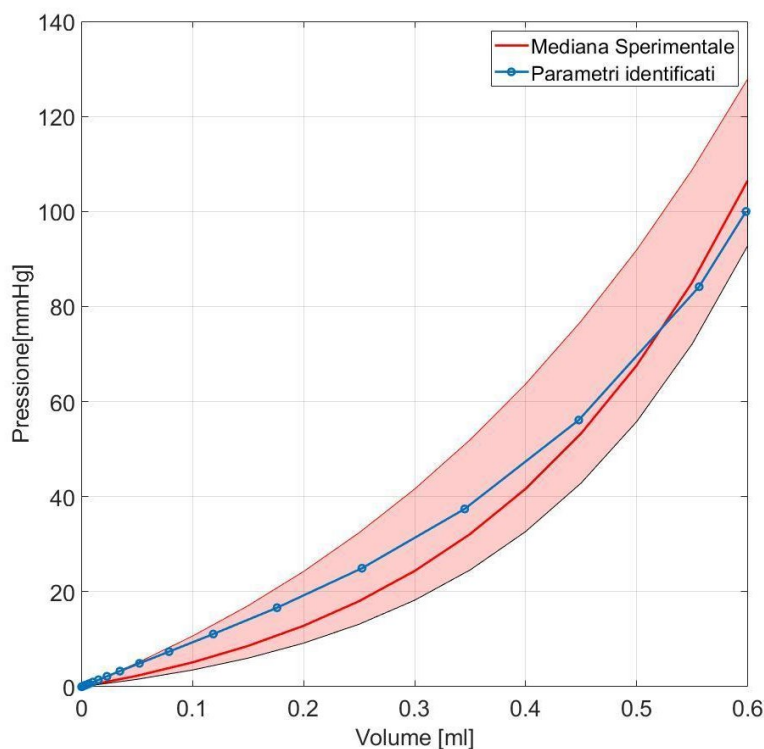


Figura 6.15: Confronto curva pressione-volume ricavata da analisi computazionale utilizzando i parametri costitutivi finali e mediana sperimentale con relativa banda statistica al 50%.

Il confronto tra banda di variabilità dei risultati sperimentali e i risultati computazionali conferma la scelta dei parametri costitutivi finali ottenuti moltiplicando per fattori adeguati (0.25 per μ_1 e 3 per α_1) i parametri costitutivi di partenza ricavati sperimentalmente da prove di trazione. Sulla base della scelta effettuata, la curva pressione-volume ottenuta dall'analisi computazionale è in questo modo contenuta all'interno della banda di variabilità e comparabile alla curva mediana sperimentale.

Utilizzando direttamente i parametri costitutivi determinati dal fit dei dati sperimentali medi di trazione su strisce corneali (Fontanella et al., 2021), si ottiene la curva visibile in Figura 6.16 che mostra un andamento lineare e sovrastima la rigidità del materiale corneale.

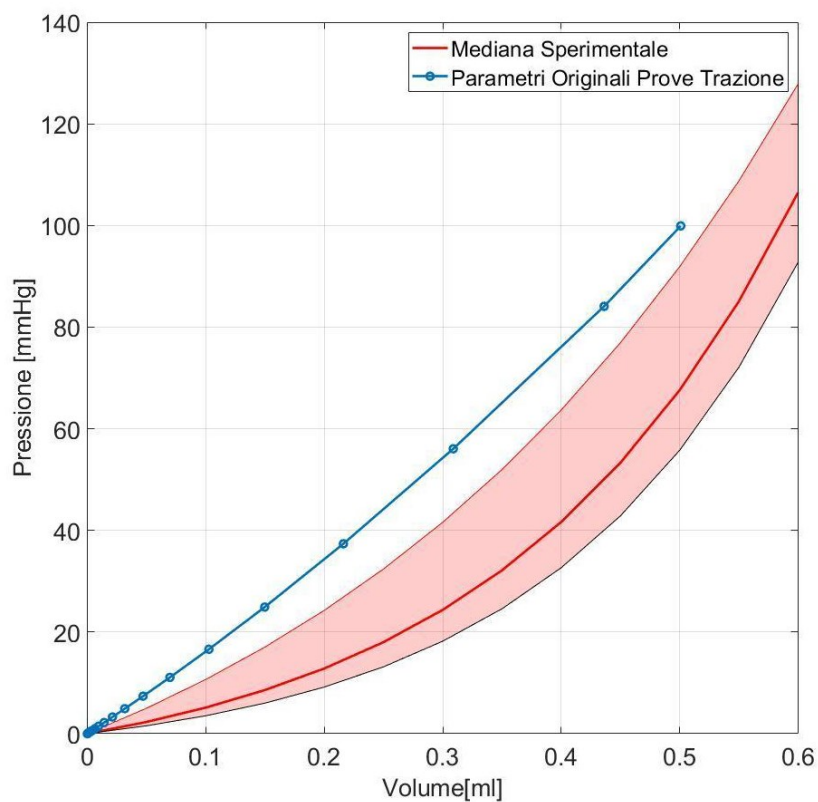


Figura 6.16: Confronto curva pressione-volume ricavata da analisi computazionale con parametri di partenza e media sperimentale con relativa banda statistica al 50%.

In Figura 6.17, si può osservare il grafico pressione-spostamento apicale ottenuto dall'analisi computazionale di insufflazione sul modello corneale considerando il set finale dei parametri costitutivi. In questo caso non avendo dei risultati sperimentali non è stato svolto un confronto tra risultati sperimentali e computazionali.

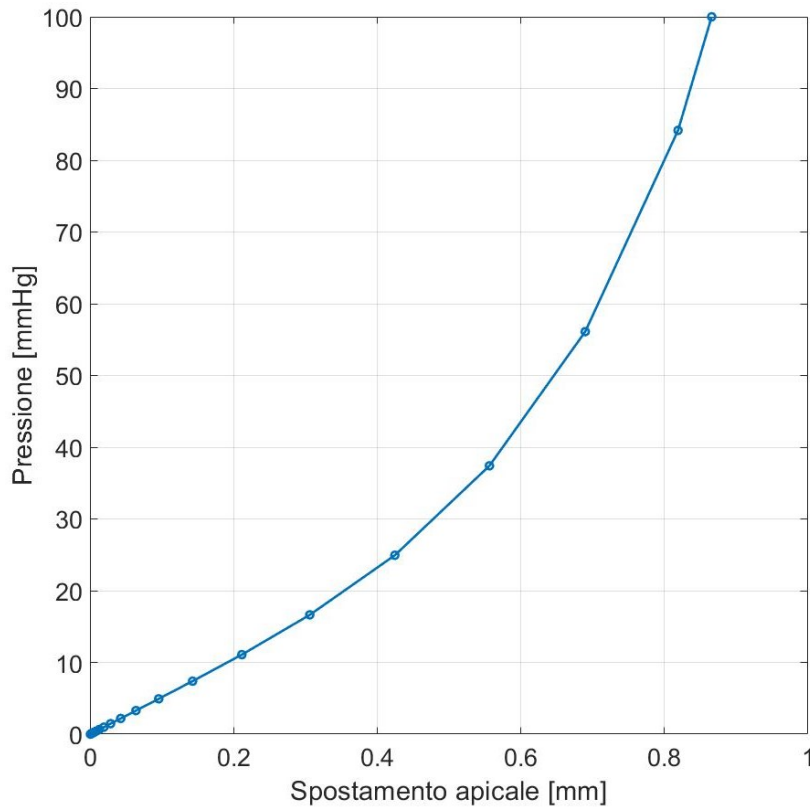


Figura 6.17: Curva pressione-spostamento apicale.

Lo spostamento apicale massimo registrato è di 0.8638 mm raggiunto con una pressione applicata di 100 mmHg sulla superficie corneale interna. La curva spostamento descrive un comportamento iperelastico a bassa rigidità fino a raggiungere l'intervallo di pressione 20-30 mmHg, che appartiene al range fisiologico di IOP, successivamente la rigidità cresce in modo graduale e concorde all'innalzamento dei valori di pressione.

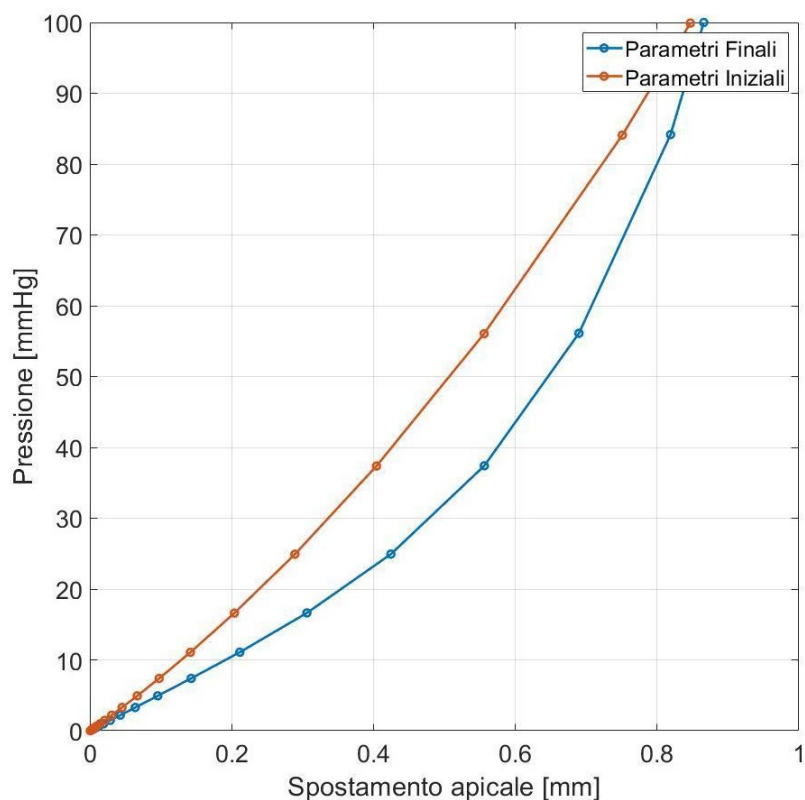


Figura 6.18: Confronto tra curve pressione-spostamento apicale ottenute con i parametri iniziali e finali utilizzati per descrivere il comportamento corneale.

La curva pressione-spostamento apicale che si ottiene utilizzando i parametri costitutivi iniziali, anche in questo caso, è quasi lineare (Figura 6.18) e non rispecchia la tipica forma J attesa, ulteriore conferma della necessità di modificare i parametri iniziali. La differenza media tra le due curve è dello 1.17%.

Capitolo 7

Discussioni e conclusioni

In questa Tesi sono proposti risultati inerenti ad attività in fase di sviluppo nell'ambito della ricerca riguardante il comportamento biomeccanico della cornea.

L'obiettivo dell'elaborato è consistito nello studio del comportamento della cornea sana in test di insufflazione, con un approccio sperimentale e computazionale accoppiato, e nella valutazione del crioconservamento dei campioni sulle proprietà meccaniche strutturali.

Le prove sperimentali sono state effettuate nel laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università di Padova dove si sono testate un totale di 18 cornee suine divise in due gruppi, uno composto da 9 cornee fresche mentre l'altro da 9 cornee congelate. Si è cercato infatti di osservare la presenza di differenze significative nel comportamento biomeccanico dovute al congelamento della cornea, queste non sono risultate presenti statisticamente. Per il fissaggio e la centratura dei campioni di cornea è stata utilizzata una camera di insufflazione creata appositamente tramite stampa 3D. Nei campioni di cornea è stato lasciato una piccola parte di sclera per permetterne il fissaggio alla camera di insufflazione tramite il supporto di guarnizioni idrauliche ed elastici.

Il setup sperimentale presente in laboratorio è formato da un sistema di pompaggio peristaltico che ha permesso l'insufflazione di una quantità definita di fluido nella cornea e da un sensore di pressione che permette di registrare la pressione interna alla cornea. È stato un protocollo di insufflazione definito: si è sottoposto ogni cornea a quattro insufflazioni di un volume di 0.1 ml ogni 5 minuti mantenendo i campioni idratati manualmente.

Una volta ottenuti i dati sperimentali questi sono stati elaborati utilizzando il software MATLAB. Analizzando direttamente i dati ottenuti dal sensore di pressione si ottiene un grafico pressione-tempo in cui si osservano quattro rilassamenti per ogni cornea. Il protocollo ha permesso l'indagine del rilassamento strutturale della cornea e i dati sono stati processati in due modi. Si è visto che l'andamento all'equilibrio (ovvero una volta passato il tempo impostato di rilassamento di 5 min) è di tipo esponenziale quindi i grafici pressione-volume sono stati ottenuti interpolando con una curva esponenziale le pressioni e i corrispondenti volumi insufflati nei diversi punti di equilibrio delle quattro curve di rilassamento.

I grafici pressione normalizzate tempo, permettono invece, di descrivere i rilassamenti delle pressioni legati al comportamento viscoelastico tipico del tessuto corneale dove lo stress registrato diminuisce nel tempo indice di come il tessuto corneale sia in grado di riorganizzare la sua struttura interna per minimizzare il carico applicato.

Per svolgere l'analisi computazionale è stato utilizzato il software Abaqus/CAE tramite il quale è stato sviluppato un modello 3D della cornea. È stata lanciata l'analisi sul modello appositamente costruito basandosi sulle grandezze riportate in letteratura della cornea suina e su accorgimenti consigliati per i parametri del modello (mesh, spessore variabile, angolo tra superficie interna ed esterna).

Per descrivere il materiale corneale si è scelto un modello iperelastico isotropo basato sulla densità di deformazione di Ogden di ordine 1. Per identificare i parametri costitutivi del modello sono stati valutati i dati tenso-deformativi ricavati da prove sperimentali di trazione uniassiale su strisce di cornea in studi precedenti (Fontanella et al., 2021). Si è creato un modello computazionale per prova di trazione tramite il quale questi parametri sono stati convalidati, confrontando le curve ottenute sperimentalmente e computazionalmente con quelle risultanti in precedenti prove di trazione presenti in letteratura (Boschetti et al., 2012; Zeng et al., 2001). Da questo confronto si osserva infatti, una forte somiglianza tra le curve ottenute, conferma del fatto che i parametri costitutivi utilizzati per la prova computazionale descrivano in maniera adeguata il comportamento di un campione di striscia corneale sottoposto a prove di trazione. Nelle curve sforzo-deformazione per i valori medi di 10 campioni di cornea umana e porcina ottenute da Zeng e collaboratori (Zeng et al., 2001) si registra in corrispondenza di un valore di deformazione pari a 0.4 un valore di stress di circa 2 MPa, dalle prove di trazione sperimentali svolte precedentemente in laboratorio di cui si dispone dei risultati si registra per lo stesso grado di deformazione una tensione di circa 2.4 Mpa molto vicino a quella risultante dalle prove computazionali che è invece pari 2.5 MPa.

Successivamente i parametri ricavati dalle prove di trazione sono stati assegnati al modello per insufflazione ed è stato osservato come tali parametri costitutivi avrebbero sovrastimato la rigidità del tessuto corneale. Per questo motivo il set iniziale di parametri costitutivi è stato moltiplicato per dei fattori opportunamente scelti fino a quando non si sono ottenuti come risultati della prova computazionale una curva pressione-volume più simile possibile alla curva ottenuta sperimentalmente e contenuta nella banda di variabilità. Si è inoltre tenuto conto anche della curva pressione spostamento apicale affinché risultasse affine a quelle riportate in letteratura

Le curve pressione volume ottenute computazionalmente sono state utilizzate unicamente per il confronto con le stesse curve ricavate dai dati sperimentali poiché queste curve pressione-volume non sono direttamente confrontabili con i dati di letteratura in quanto nella maggioranza degli studi che eseguono prove di insufflazione vengono riportare come risultati le curve pressione spostamento-apicale, ciò rappresenta un limite del protocollo sperimentale utilizzato in questo studio che non ha previsto la misurazione dello spostamento apicale. Per questo

motivo la curva più adatta allo svolgimento di confronti risultante in questo studio è quella pressione spostamento apicale ottenuta dall'analisi computazionale sul modello di cornea.

Le curve pressione spostamento apicale presenti negli studi in letteratura concordano generalmente nel riportare un comportamento meccanico della cornea caratterizzato da un'evidente non linearità in tutto l'intervallo di pressioni con un marcato cambiamento di pendenza delle curve, in un intervallo di pressione che varia dai 10 ai 30 mmHg in base allo studio, che ne conferisce la tipica forma a J. Questa forma si ritrova anche nella curva ottenuta negli studi computazionali svolti in questa tesi con delle attese differenze rispetto alle curve in letteratura.

Confrontando la curva pressione-spostamento apicale ottenuta da prove computazionali descritte in questa tesi con quella sperimentale riportata in letteratura da Boschetti e collaboratori (Boschetti et al., 2012) si rispecchia l'attesa forma a J anche se il cambiamento di pendenza avviene a valori di pressione più elevati rispetto ai 10 mmHg riportati nel loro studio. La curva ottenuta computazionalmente descrive infatti un comportamento iperelastico a bassa rigidità fino a raggiungere l'intervallo di pressione 20-30 mmHg, che appartiene al range fisiologico di IOP, successivamente la rigidità cresce in modo graduale e concorde all'innalzamento dei valori di pressione. Per quanto riguarda i valori numerici, nel loro lavoro riportano in corrispondenza ad uno spostamento apicale di 0.4 mm una pressione di circa 30 mmHg mentre la curva ottenuta computazionalmente sul modello di cornea descritto in questa tesi per lo stesso valore di spostamento apicale indica una pressione circa 24 mmHg.

Considerando un altro studio in cui sono state eseguite delle prove di insufflazione computazionali svolto da Pandolfi e collaboratori (Pandolfi et al., 2008), comparando la curva risultante dal loro lavoro e quella ottenuta computazionalmente in questa tesi si evidenzia un buon grado di affinità (Figura 7.1), infatti, essi riportano come spostamento apicale massimo in corrispondenza ad una pressione di 100 mmHg uno spostamento apicale di 0.8 mm prossimo allo 0.86 mm ottenuto in questa tesi. Inoltre, anche nel loro modello il cambio di pendenza avviene intorno ai 30 mmHg di pressione.

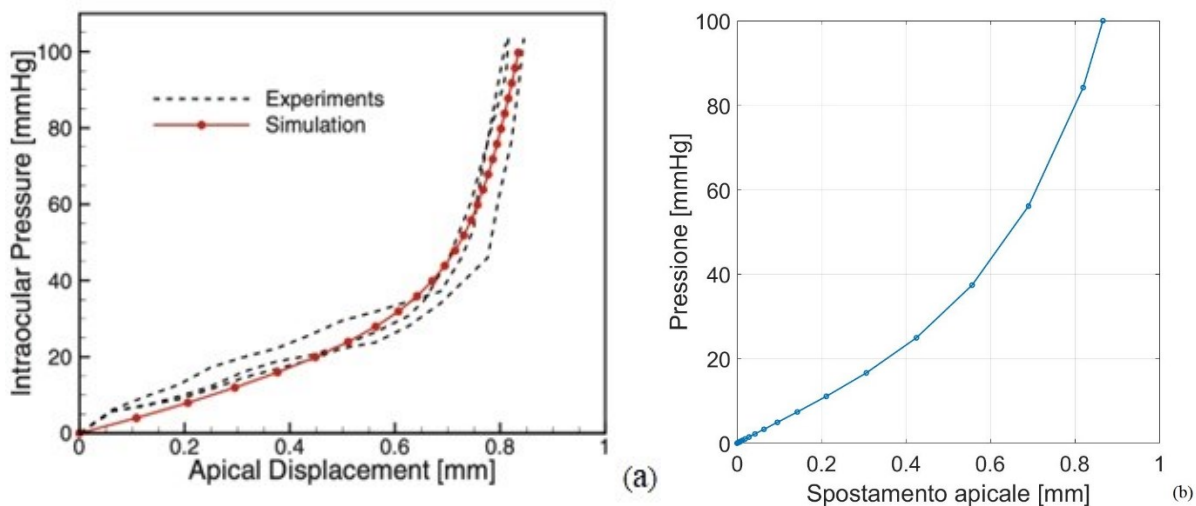


Figura 7.1: a) Curva computazionale (Pandolfi et al., 2008); b) Curva computazionale ottenuta in questo lavoro.

Per questi motivi, i risultati ottenuti computazionalmente possono definirsi sufficientemente concordi con quanto presente in letteratura e si può affermare che il modello descriva con discreta precisione il comportamento biomeccanico corneale atteso. Si ottiene un'ulteriore conferma di questo anche confrontando la curva pressione spostamento apicale risultante da questo lavoro con quella ottenuta sperimentalmente da Elsheikh e collaboratori nel 2005 (Elsheikh et al., 2005). Esse risultano relativamente simili, in quest'ultima si registra un irrigidimento graduale intorno ai 15-30 mmHg concorde all'intervallo ottenuto computazionalmente, inoltre, la curva sperimentale riporta per una pressione di circa 0.013 N/mm^2 (100 mmHg) uno spostamento apicale compreso tra 0.8 e 0.9 mm, intervallo a cui appartiene lo spostamento di 0.86 mm ottenuto computazionalmente, in questa tesi, in corrispondenza di una pressione di 100 mmHg insufflata.

Lo stesso grado di similarità tra i risultati non si riscontra invece se il confronto è effettuato con la curva spostamento apicale sperimentale riportata in uno studio del 2008 svolto anche in questo caso da Elsheikh e collaboratori. In questo, infatti, i valori di spostamento ottenuti sono nettamente minori. In corrispondenza ad una pressione di circa 100 mmHg si ha uno spostamento apicale compreso tra i 0.5 e gli 0.6 mm, mentre nella curva ottenuta computazionalmente sul modello di cornea descritto in questa tesi per lo stesso valore di pressione si registra uno spostamento apicale di 0.86 mm.

Le differenze tra le curve riportate in letteratura e quella computazionale sono attese, vista la variabilità intrinseca nell'origine biologica dei campioni e sono inoltre conseguenza di alcune variabili nella definizione del modello, come i parametri costitutivi scelti, che descrivono, semplificando, un modello iperelastico della cornea ed un set di dimensioni corneali non

variabili.

Per questo motivo sviluppi futuri del modello computazionale di cornea per insufflazione potrebbero dare risultati migliori implementando un modello trasversalmente isotropo, che rappresenti in modo più verosimile la distribuzione delle fibre di collagene e utilizzando un materiale viscoelastico per descrivere il comportamento meccanico della cornea. Come parametri di partenza per il modello viscoelastico si potrebbero utilizzare i parametri ottenuti in questa tesi (tabella 6.2) dal fitting delle curve di rilassamento con il modello di Prony a 2 rami viscosi. Questo modello computazionale più accurato potrà essere utilizzato per la pianificazione e simulazione di interventi chirurgici.

Le conoscenze ottenute sul comportamento biomeccanico della cornea sana possono essere approfondite sperimentalmente tramite un'analisi più approfondita utilizzando strumenti accurati, per questo motivo si potrebbe prevedere di registrare lo spostamento apicale della cornea in funzione della pressione applicata così da ottenere delle curve pressione-spostamento apicale sperimentali confrontabili con quelle presenti in letteratura e stress-deformazione utili per il calcolo del modulo di Young. Inoltre, la qualità dei dati risultanti ottenuti potrebbe migliorare effettuando le prove sperimentali in un ambiente controllato con un grado di umidità e temperatura fissati. In questo modo i dati ottenuti sulla biomeccanica della cornea sana possono essere utili per effettuare dei confronti con le caratteristiche di cornee malate ed osservare il diverso livello di efficacia di trattamenti atti a migliorarne il processo curativo.

RIFERIMENTI

Anderson, K., El-Sheikh, A., e Newson, T. (2004). Application of structural analysis to the mechanical behaviour of the cornea. *Journal of the Royal Society Interface*, 1, pp. 3-15. doi:10.1098/rsif.2004.0002

Ariza-Gracia, M. Á., Zurita, J. F., Piñero, D. P., Rodriguez-Matas, J. F., e Calvo, B. (2015). Coupled Biomechanical Response of the Cornea Assessed by Non-Contact Tonometry. A Simulation Study. *PLoS One*, pp. 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0121486

Altair. (2017). Material nonlinear analysis tratto da Altair:
<https://www.altair.com/newsroom/articles/new-material-non-linear-analysis-now-available-in-altair-simsolid/>

Barrett, K., Brooks, H., Boitano, S., e Barman, S. (2016). Vision. In *Ganong's review of medical physiology*, pp. 181-199. McGraw-Hill Higher Education.

Bartholomew LR, Pang DX, Sam DA, Cavender JC. (1997). Ultrasound biomicroscopy of globes from young adult pigs. *American Journal of Veterinary Research*.

Biga, L. M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., Lemaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D. e Runyeon, J. (2018). Vision. In *Anatomy & Physiology*, pp. 1477-1482. Oregon State University.

Boschetti, F., Triacca, V., Spinelli, L., e Pandolfi, A. (2012). Mechanical Characterization of Porcine Corneas. *Journal of Biomechanical Engineering*, 134. doi:10.1115/1.4006089

Daalkhajjav, Uranbileg. (2018). Rheological Techniques in Characterization and Aiding in the Modification of Soft Matter.

Dawson, D. G., Ubels, J. L., e Edelhauser, H. F. (2011). Cornea and Sclera. In L. A. Levin, S. F. Nilsson, J. Ver Hoeve, S. M. Wu, A. Alm, e P. L. Kaufman, *Adler's Physiology of the Eye*, pp. 71-130. Elsevier Health Sciences.

de Oliveira, R., e Wilson, S. E. (2020). Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Experimental Eye Research*(197). doi:10.1016/j.exer.2020.108090

DelMonte, D. W., e Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37, pp. 588-598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037

Di Maria A. (2015) Patologie della cornea. Tratto da Alessandra di Maria:
<https://alessandradimaria.it/patologie-della-cornea/>

Elsheikh, A., Alhasso, D., e Rama, P. (2008). Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Experimental Eye Research*, 86, pp. 783-790. doi:10.1016/j.exer.2008.02.006

Elsheikh, A., e Anderson, K. (2005). Comparative study of corneal strip extensometry and inflation tests. *Journal of the Royal Society Interface*, 2, pp.177-185. doi:10.1098/rsif.2005.0034

Elsheikh A, Wang D, Brown M, Rama P, Campanelli M, Pye D. (2007). Assessment of Corneal Biomechanical Properties and Their Variation with Age. *Current eye research*. 32. 11-9. 10.1080/02713680601077145.

Fontanella, C. G., Carniel, E. L., Corain, L., Peruffo, A., Iacopetti, I., Pavan, P., Todros, S., e Perazzi, A. (2021). Mechanical behavior of healthy versus alkali-lesioned corneas by a porcine organ culture model. *BMC Vet Res* 17. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03050-1>

Giampani, A. S., e Giampani Junior, J. (2013). Anatomy of Ciliary Body, Ciliary Processes, Anterior Chamber Angle and Collector Vessels. In *Glaucoma-basic and clinical aspects*, pp. 3-13 London: IntechOpen. doi:10.5772/52780

Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS, Hammer T. (2016). Topographic Findings of the Porcine Cornea. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*, pp.125-131.

Irsch, K., e Guyton, D. L. (2009). Anatomy of Eyes. In S. Z. Li, e A. Jain, *Encyclopedia of Biometrics*. Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-0-387-73003-5_253

JunJie Wang, XiaoYu Liu, FangJun Bao, Bernardo T. Lopes, LiZhen Wang, Ashkan Eliasy, Ahmed Abass, Ahmed Elsheikh. (2021). Review of ex-vivo characterisation of corneal biomechanics, *Medicine in Novel Technology and Devices, Volume 11*.

Kling S, Hafezi F. (2017). An Algorithm to Predict the Biomechanical Stiffening Effect in Corneal Cross-linking. *J Refract Surg*, pp. 128-136. doi: 10.3928/1081597X-20161206-01.

Kling, S., Remon, L., Pérez-Escudero, A., Merayo-Llodes, J., e Marcos, S. (2010). Corneal Biomechanical Changes after Collagen Cross-Linking from Porcine Eye Inflation Experiments. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, pp. 3961-3968. doi:10.1167/iovs.09-4536

Lombardo, G., Serrao, S., Rosati, M., e Lombardo, M. (2014). Analysis of the Viscoelastic Properties of the Human Cornea Using Scheimpflug Imaging in Inflation Experiment of Eye Globes. *PLoS One*, 9, pp. 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0112169

Ma, J., Wang, Y., Wei, P., e Jhanji, V. (2018). Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology*, 63, pp. 851-861. doi:10.1016/j.survophthal.2018.05.004

Meek, K. M., e Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, pp. 1-16. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.001

Nejad, T. M., Foster, C., e Gongal, D. (2014). Finite element modelling of cornea mechanics: a review. *The Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 77, pp. 60-65. doi:10.5935/0004-2749.20140016

Netter F. (2018) *Atlante di Anatomia Umana*. Elsevier-Masson.

Nizzola, F. (2019). *Anatomia dell'occhio*. Tratto da Oculista Nizzola: <https://www.oculistanizzola.it/occhio/anatomia-occhio/>

Oprea, Ș., Pantu, C. M., Filipoiu, F. M., Tulin, R., e Oprea, G. D. (2016). The anatomy of the choroid - a review. *Romanian Journal of Functional & Clinical, Macro- & Microscopical Anatomy & of Anthropology*, XV(4), pp 380-383.

Ora serrata. Wikipedia https://it.wikipedia.org/wiki/Ora_serrata

- Pandolfi A., Holzapfel G. (2008). Three-dimensional Modelling and Computational Analysis of the Human Cornea Considering Distributed Collagen Fiber Orientations. *Journal of Biomechanical Engineering*. 130. 061006.
- Pandolfi A, Manganiello F. (2006). A model for the human cornea: constitutive formulation and numerical analysis. *Biomech Model Mechanobiol*, pp.237-46. doi: 10.1007/s10237-005-0014-x.
- Simscale. (2021). Young's Modulus tratto da Simscale:
<https://www.simscale.com/docs/simulation-setup/materials/youngs-modulus/>
- Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian Journal of Ophthalmology*, 66, pp. 190-194. doi:10.4103/ijo.IJO_646_17
- Van Buskirk, E. M. (1989). The Anatomy of the Limbus. *Eye* 3, pp. 101-108. doi:10.1038/eye.1989.16
- Watson, P. G., e Young, R. D. (2003). Scleral structure, organisation and disease. A review. *Experimental Eye Research*, 78, pp. 609-623. doi:10.1016/S0014-4835(03)00212-4
- Wilson A, Marshall J. (2020). A review of corneal biomechanics: Mechanisms for measurement and the implications for refractive surgery. *Indian J Ophthalmol*, pp 2679-2690.
- Woo, S. L., Kobayashi, A. S., Schlegel, W. A., e Lawrence, C. (1972). Nonlinear Material Properties of Intact Cornea and Sclera. *Experimental Eye Research*, 14, pp. 29-39. doi:10.1016/0014-4835(72)90139-x
- Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. (2001). A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech*. doi: 10.1016/s0021-9290(00)00219-0.