



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**“Valutazione del comportamento biomeccanico corneale:
condizione sana, lesionata e trattata”**

Laureando:
Dario Zuin

Relatore:
Prof.ssa Chiara Giulia Fontanella

Correlatore:
Dott.ssa Maria Vittoria Mascolini

A.A. 2021/2022
Data di laurea 13/10/2022

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE	1
1. La cornea	3
1.1. Anatomia e fisiologia	3
1.1.1. Film lacrimale	4
1.1.2. Epitelio	5
1.1.3. Membrana di Bowman	7
1.1.4. Stroma	8
1.1.5. Membrana di Descemet	10
1.1.6. Endotelio	11
1.2. Comportamento meccanico	11
1.2.1. Prove di trazione uniassiale in letteratura	14
2. Prove sperimentali su cornea sana	21
2.1. Materiali e metodi	21
2.1.1. La cornea suina	21
2.1.2. Strumentazione	22
2.1.3. Preparazione del campione	23
2.2. Prove di trazione a fallimento	25
2.2.1. Protocollo	25
2.2.2. Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali	26
2.3. Prove di carico-scarico	29
2.3.1. Protocollo	29
2.3.2. Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali	30
3. Trattamenti e prove sperimentali su cornea sana, lesionata e trattata	35
3.1. Cross-Linking	35
3.2. Plasma	37
3.3. Comportamento meccanico: Prove di stress-relaxation	41
3.3.1. Protocollo	41
3.3.2. Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali	45

4. Discussione e conclusioni

63

BIBLIOGRAFIA

67

ABSTRACT

La seguente Tesi è parte di un più ampio lavoro svolto presso il laboratorio di Meccanica dei Tessuti Biologici dell'Università degli Studi di Padova sulla caratterizzazione meccanica e istologica del tessuto corneale in seguito all'applicazione di diverse terapie pensate per contrastare e guarire malattie degenerative della cornea. Vista la scarsità di donatori umani di cornea, l'intero studio è basato sull'utilizzo di campioni di cornea suina, i quali nonostante qualche lieve differenza anatomica e meccanica sono considerabili ottimi modelli per lo studio del tessuto corneale umano.

Una prima panoramica su anatomia, fisiologia e meccanica corneale ricavata dalla letteratura fornisce il punto di partenza per la comprensione di risultati e confronti provenienti dalle successive prove sperimentali. La trattazione continua con la presentazione dei trattamenti terapeutici presi in considerazione: l'attuazione di Cross-Linking corneale tramite l'utilizzo combinato di irradiazione ultravioletta e riboflavina; e l'esposizione del tessuto al plasma, gas ionizzato a bassa temperatura e pressione atmosferica.

I macchinari per i test di trazione sono tutti predisposti in configurazione monoassiale e alle principali prove di rilassamento dello stress, dalle quali viene ricavato l'effetto dell'esposizione al trattamento plasmatico sulla biomeccanica corneale, sono annesse ulteriori prove di caratterizzazione meccanica del tessuto corneale, quali prove di trazione a fallimento e di carico-scarico.

INTRODUZIONE

La cornea è un tessuto connettivo trasparente situato nella porzione anteriore della tonaca fibrosa oculare, la sua peculiare geometria ed organizzazione stratificata forniscono una prima barriera strutturale per l'occhio e ne costituiscono i 2/3 del potere refrattivo totale. La risposta meccanica manifestata da questa particolare membrana è principalmente dominata dallo strato tessutale intermedio denominato stroma, il quale grazie alla sua precisa organizzazione di fibrille di collagene conferisce un tipico comportamento anisotropo e viscoelastico all'intero tessuto. Il carattere anisotropo, ovvero la dipendenza dalla direzione in cui la misura di una grandezza fisica viene considerata, è il risultato dell'orientamento preferenziale assunto dalle fibrille di collagene nello strato mediano, orientamento che provoca una differente rigidità e conseguente risposta meccanica in relazione alla direzione di trazione considerata. La presenza del collagene, come in tutti i tessuti molli, conferisce anche l'abilità al materiale di comportarsi sia in modo elastico che viscoso. I materiali elastici posseggono la peculiare caratteristica di tornare al loro stato indeformato successivamente alla cessazione del carico, mentre un materiale puramente viscoso produce una reazione lineare rispetto al tempo quando ad esso viene applicato un carico. Un materiale viscoelastico possederà di conseguenza proprietà intermedie tra queste tipologie di materiali e sarà caratterizzato da un meccanismo di deformazione classificato come: reversibile, ovvero comportante una alterazione reversibile della struttura; dissipatore di energia, vale a dire che lo sviluppo del meccanismo richiede energia fornita attraverso il lavoro delle tensioni; e infine tempo-dipendente, cioè richiedente un tempo per potersi sviluppare caratteristico del meccanismo stesso e della sua componente viscosa.

Questa delicata stabilità strutturale e risposta meccanica è minacciata da numerose patologie degenerative, quali cheratiti infettive, il cheratocono e qualsiasi coinvolgimento oftalmico che risulti in assottigliamenti locali di tessuto. Per questo motivo negli ultimi decenni sono state sviluppate diverse terapie sperimentali con lo scopo di rallentare o addirittura arrestare il corso di queste malattie: i trattamenti plasmatici e di cross-linking corneale si basano entrambi sulla potenziale generazione di radicali liberi e la loro capacità di stimolare la proliferazione cellulare e la formazione di nuovi legami chimici, mirando così ad un miglioramento complessivo nella struttura e biomeccanica tissutale. Il primo trattamento si serve della generazione in loco della lesione di gas ionizzato a bassa temperatura e pressione atmosferica mentre il secondo, denominato CXL, sfrutta l'azione combinata di irradiazione ultravioletta e riboflavina. Nonostante questi due trattamenti abbiano già dimostrato numerosi benefici quali effetti antibatterici, proliferativi e sterilizzazione del tessuto, analizzando la letteratura (specialmente

considerando la terapia plasmatica) vi sono pochi riscontri di valutazioni meccaniche del tessuto corneale in seguito alla sottoposizione al trattamento, lasciando come interrogativo aperto il potenziale ripristino del normale comportamento biomeccanico di un tessuto lesionato e compromesso da una patologia.

Le prove definite di 'stress-relaxation' sono tipici test di trazione monoassiale effettuati per valutare la risposta meccanica viscoelastica e tempo-dipendente di un materiale o tessuto biologico. Questa tipologia di prove consiste nel mantenere il campione tessutale a deformazione costante, generalmente considerando stati progressivi di deformazione, e valutarne il caratteristico rilassamento degli sforzi che costituisce un elemento distintivo dei materiali classificati come viscoelastici. La struttura di questa tipologia di materiali provoca infatti un graduale decremento di tensione se sottoposta ad una condizione di deformazione mantenuta costante nel tempo, sintomo di una riorganizzazione configurazionale con lo scopo di resistere al carico applicato.

L'influenza della velocità di deformazione come parametro nelle prove a trazione monoassiale viene valutata tramite test definiti di carico-scarico, durante i quali i campioni vengono portati ad un medesimo stato deformativo attraverso velocità differenti di deformazione, per poterne così valutare l'eventuale difformità nella risposta meccanica. Ulteriori parametri come la deformazione e la tensione massima raggiungibili dai campioni di tessuto sono ricavati da prove di trazione ad alta velocità di deformazione proseguiti fino alla rottura del provino.

CAPITOLO 1

LA CORNEA

1.1 Anatomia e fisiologia

La cornea è un tessuto connettivo trasparente avascolare costituente la porzione anteriore della tonaca fibrosa del bulbo oculare; insieme alla sclera e al film lacrimale che la ricopre. Le sue funzioni principali sono quelle di fornire una prima barriera strutturale contro infezioni batteriche e virali, allo stesso tempo costituendo l'elemento con più alto potere rifrattivo dell'occhio, arrivando fino a 2/3 del totale. Anteriormente ricopre il 7% della superficie oculare ed è legata alla sclera tramite la giunzione sclerocorneale, o limbus sclerocorneale, con la quale delimita lateralmente la cosiddetta camera anteriore del bulbo oculare, bagnata dall'umor acqueo e confinata posteriormente da iride e cristallino.

Dal punto di vista geometrico nell'adulto medio la cornea risulta avere uno spessore di approssimativamente 0.5 mm nella sezione centrale, spessore che aumenta nelle sezioni periferiche fino ad arrivare a 0.7 mm, e un diametro orizzontale di 11.5-12 mm, circa 1 mm maggiore di quello verticale (DelMonte e Kim, 2011). Per questo la cornea viene definita 'prolata', ovvero con una curvatura che diminuisce dal centro verso la periferia, e 'torica', con una curvatura che varia a seconda del meridiano (il mediano orizzontale risulta più piatto, quello verticale più curvo). La struttura complessiva si presenta quindi come orizzontalmente ovale, convessa e asferica, con una curvatura anteriore di 7.8 mm e posteriore di 6.5 mm (Sridhar e Mittanamalli, 2018).

Nonostante la peculiare avascolarità della cornea sia fondamentale per permettere di svolgere la fondamentale funzione di passaggio della luce, il tessuto rimane comunque dipendente da componenti del sangue per il mantenimento delle sue funzionalità. Diversi nutrienti vengono così assimilati dalle zone più periferiche della cornea innervate da piccoli vasi o trasmesse dai rami periferici di arterie facciali tramite l'umore acqueo o il film lacrimale. Inoltre, la cornea risulta essere uno dei tessuti più innervati e sensibili del corpo umano. Un complesso e ordinato sistema di nervi originario dal ganglio di Gasser, un ganglio presente nella fossa cranica media, termina in prossimità e all'interno delle cellule epiteliali, integrandosi in una relazione di mutuo supporto. I nervi corneali si sono adattati per mantenere una corretta trasparenza corneale e contribuire alla salute del tessuto mediando la secrezione lacrimale e inviando impulsi generati da stimoli del dolore, meccanici, termici e chimici (Al-Aqaba et al., 2019).

Istologicamente nella cornea si possono identificare e suddividere componenti cellulari, le quali includono le cellule epiteliali, endoteliali e i cheratociti; e componenti acellulari, come collagene e glicosamminoglicani. Questi elementi fondamentali costituiscono i 5 principali strati in cui è divisibile la sezione corneale, nell'ordine dalla parte esterna della cornea questi si presentano come:

- Epitelio
- Membrana di Bowman
- Stroma
- Membrana di Descemet
- Endotelio

STRUTTURA DELLA CORNEA

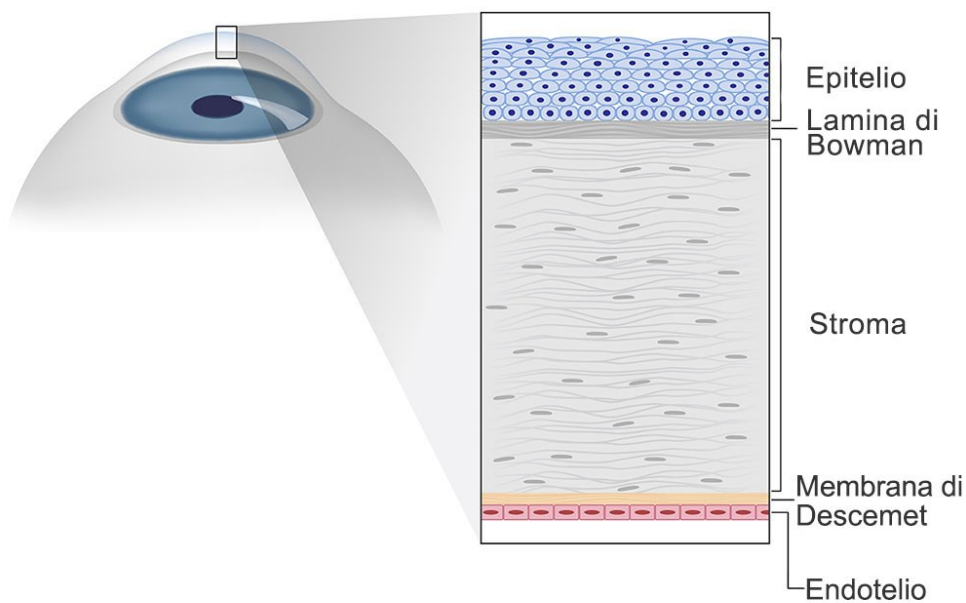


Figura 1.1 - Struttura stratificata della cornea (©Alila Medical Media)

1.1 Film Lacrimale

L'interfaccia vera e propria tra cornea e ambiente esterno è inizialmente mediata dal film lacrimale, un fluido dinamico multistrato che risponde alle sollecitazioni ambientali e viene rinnovato ad ogni battito di ciglia. Le sue principali funzioni sono quelle di fornire protezione contro infezioni microbiche, lubrificazione, idratazione e nutrimento al tessuto corneale

(Shivalingappa e Wells, 2020). Fornisce inoltre componenti fondamentali come ossigeno, immunoglobuline, lisosomi, lactoferrina e α - β - defensine (Sridhar e Mittanamalli, 2018).

Il film lacrimale è suddivisibile in un primo strato lipidico secreto dalle ghiandole di Meibomio, essendo la secrezione lipidica meno densa dell'acqua questa 'galleggia' in superficie formando una liscia superficie refrattiva che media il primo contatto con la luce esterna e impedisce l'evaporazione della componente acquosa sottostante.

Lo strato acquoso che si trova al di sotto è secreto principalmente dalle ghiandole lacrimali dell'orbita laterale superiore e da ghiandole secondarie nello stroma della congiuntiva. Questa componente principalmente acquosa è inoltre integrata con particolari mucine, fattori di crescita, soluti, anticorpi e altre proteine secrete dalle CGC (*conjunctival goblet cells*) o presenti nel siero.

L'ultimo strato definito mucinico è prodotto dalle CGC e da cellule epiteliali di cornea e congiuntiva, offre una superficie idrofila ideale per trattenere e distribuire in maniera adeguata il liquido lacrimale.

Una corretta e bilanciata composizione del film lacrimale fornisce quindi informazioni sulla salute delle diverse cellule e ghiandole predisposte alla sua secrezione. In particolare, la presenza di una corretta quantità di mucine secrete e solubili da parte delle CGC ha dimostrato essere un ottimo indicatore di stabilità, idratazione e lubrificazione del film lacrimale, portando a una corretta rimozione di batteri patogeni, detriti e contaminanti. Tutto questo garantendo alla cornea una superficie liscia, trasparente e refrattiva caratterizzata da minima dispersione (Shivalingappa e Wells, 2020).

1.1.2 Epitelio

Il film lacrimale instaura un rapporto simbiotico anatomico e fisiologico con il primo effettivo strato cellulare da cui la cornea è composta, l'epitelio, creando una superficie ideale di rifrazione che altrimenti non sarebbe possibile vista l'alta irregolarità della superficie esterna dell'epitelio stesso. Inoltre, il film lacrimale contribuisce all'allontanamento di potenziali invasioni microbiche o corpi estranei, e fornisce fattori immunologici e di crescita, assicurandosi la salute, proliferazione e riparazione del tessuto epiteliale sottostante (DelMonte e Kim, 2011).

Il tessuto epiteliale corneale inizia il suo sviluppo a partire dalla 5-6 settimana di gestazione e si presenta nel suo prodotto finale come uno strato squamoso non cheratinizzante spesso dalle 4 alle 6 cellule (50-60 micron) (DelMonte e Kim, 2011). Le componenti cellulari, la cui

presenza permette la distinzione dei diversi strati (Figura 1.2), sono principalmente divisibili in tre tipologie: cellule superficiali, cellule alari e cellule basali.

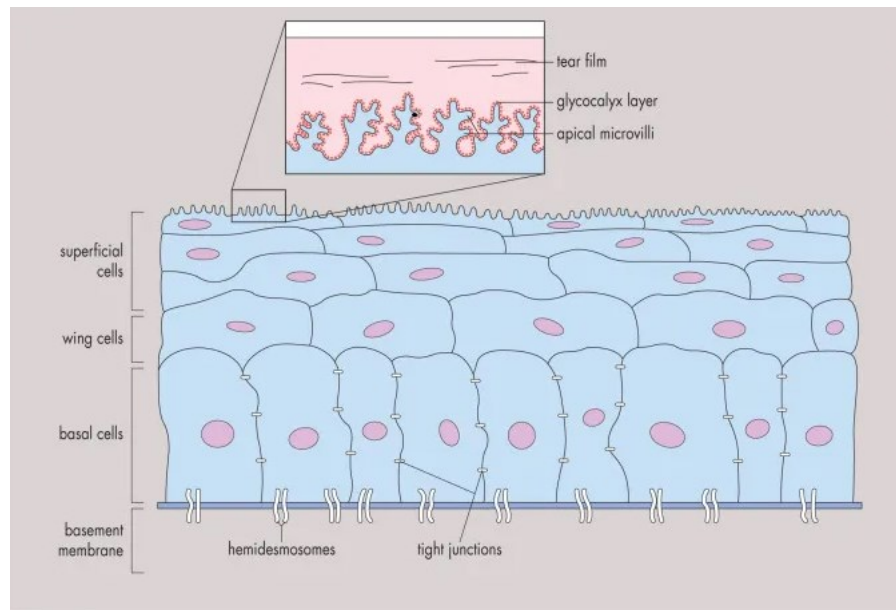


Figura 1.2 - Sezione trasversale dell'epitelio corneale (DelMonte e Kim, 2011).

Queste diverse tipologie cellulari hanno una durata vitale che varia dai 7 ai 10 giorni, durante i quali subiscono un ciclo di involuzione, desquamazione e apoptosi. Il tessuto endoteliale viene così sostituito settimanalmente a partire dalle cellule alla sua base che migrano verso la superficie.

I primi 2-3 strati cellulari vengono definiti superficiali, sono caratterizzati da cellule piatte poligonali di diametro 40-60 μm e uno spessore di 2-6 μm (Sridhar e Mittanamalli, 2018). Queste cellule mantengono una stretta giunzione con le cellule adiacenti, formando complessi che impediscono l'infiltrazione di liquido, e presentano nello strato cellulare più esterno una serie di microvilli apicali (estroflessioni della membrana della grandezza di 1 μm), rendendo maggiore la superficie di contatto e migliorando l'aderenza con il soprastante strato mucinico del film lacrimale. Questi microvilli sono inoltre ricoperti di glicocalice, una membrana extracellulare che tipicamente ricopre le cellule endoteliali.

Le cellule alari, o sopra-basali, si interpongono tra lo strato superficiale e quello basale, formando uno strato spesso 2-3 cellule con la caratteristica di essere meno piatte delle precedenti, pur mantenendo delle strette giunzioni con le cellule laterali.

L'ultimo livello dell'epitelio è costituito da un singolo strato spesso 20 μm di cellule dalla forma colonnare o cuboidale dette cellule basali, la cui peculiare capacità di mitosi risulta fondamentale per la nascita di nuove cellule superficiali e alari.

Le cellule basali sono ancorate alla membrana basale sottostante tramite un sistema di emidesmosomi, giunzioni proteiche caratteristiche delle cellule epiteliali che si occupano dell'ancoraggio tra cellula e matrice extracellulare, fornendo resistenza alla trazione e impedendo così la separazione dell'epitelio dagli strati corneali sottostanti. Queste giunzioni proteiche sono attraversate da fibrille composte da collagene di tipo VII proveniente dalle cellule basali che attraversano così la membrana basale, concludendo nella formazione di placche di ancoraggio. Le cellule basali si occupano inoltre della secrezione della membrana basale stessa, la quale si presenta come uno strato di collagene di tipo IV e laminina spesso 0.05 μm da cui dipende la stabilità strutturale dell'epitelio. In caso di suo danneggiamento il processo di guarigione che ne scaturisce può durare fino a sei settimane e risulta caratterizzato da alti livelli di fibronectina e un indebolimento di legame strutturale tra l'epitelio e il nuovo strato di membrana basale appena formatosi.

Questa struttura stratificata dell'epitelio varia a seconda del meridiano corneale di considerazione. La cornea centrale è caratterizzata da un minor numero di strati cellulari (5-7) e da cellule basali colonnari, mentre nella cornea periferica si trovano un epitelio di 7-10 strati, cellule basali cuboidali e presenza di melanociti e cellule di Langerhans (Sridhar e Mittanamalli, 2018).

Similmente al sistema di ancoraggio che lega cellule basali alla membrana sottostante, giunzioni di natura proteica definite desmosomi si occupano di formare stretti collegamenti laterali caratterizzanti tutti i tipi di cellule epiteliali elencati in precedenza. Questo sistema di giunzioni proteiche è in generale molto frequente nelle cellule epiteliali ed è composto da strutture specializzate nell'adesione cellulare. Attraverso queste strutture vengono uniti i filamenti intermedi alle membrane plasmatiche delle cellule, saldando i rispettivi citoscheletri e fornendo resistenza a trazione e pressione (Delva et al., 2009).

1.1.3 Membrana di Bowman

Anteriormente allo stroma e posteriormente al livello epiteliale si può identificare uno strato acellulare di transizione denominato Membrana di Bowman. Questa si presenta come un denso strato di fibrille di collagene intrecciate in una matrice di proteoglicani e più che una membrana vera e propria è considerata un condensato della porzione iniziale dello stroma.

Questa struttura è principalmente formata da collagene di tipo I e V, proteoglicani e possiede uno spessore stimato sui 12 μm (Sridhar e Mittanamalli, 2018).

Dal punto di vista biomeccanico questo strato liscio si suppone contribuisca a fornire rigidità e resistenza, aiutando a mantenere inalterata la forma originale della cornea. Inoltre, non possiede abilità di rigenerazione e nel caso di un eventuale lesione e interruzione dello strato (ad esempio comunemente dovute da cheratite provocata da virus herpes simplex) può determinare un leucoma, una cicatrice permanente che a seconda del grado di opacità influenza il processo visivo.

1.1.4 Stroma

Circa l'80-85% dello spessore della cornea, attorno ai 490 μm , è dovuto allo stroma, uno strato cellulare generato alla settima settimana di gestazione da una seconda ondata di cellule di origine ectodermica. Oltre a costituire lo strato più massiccio della cornea, la sua precisa e compatta organizzazione di fibrille e matrice extracellulare conferisce trasparenza e diminuisce la dispersione anteriore della luce incidente.

Le fibre di collagene, prevalentemente costituite da un complesso di collagene di tipo I e V, sono organizzate in fasci paralleli di diametro compreso tra i 22.5 e 32 nm (Formisano et al., 2021) definiti fibrille. Queste fibrille sono a loro volta unite in strutture stratificate parallele alla superficie corneale chiamate lamelle, le quali posseggono fibrille ortogonali rispetto lo strato antecedente (Figura 1.3). Questa particolare intricata organizzazione e un'alta idratazione tissutale (78%) conferiscono allo stroma le sue fondamentali proprietà meccaniche e la sua alta capacità di rifrazione, consentendo anche il mantenimento della pressione intraoculare ad un valore regolare di 10-12 mm Hg.

Lo stroma dell'occhio umano contiene un numero stimato tra le 200 e 250 lamelle, con un maggior spessore presente nello stroma periferico rispetto a quello centrale e posteriore. Questa differenza istologica è dovuta alla vicinanza dello stroma periferico rispetto l'ambiente esterno e dello stroma posteriore all'umore acqueo, creando così un naturale gradiente di rigidità strutturale che porta alla curvatura caratteristica della cornea.

La matrice extracellulare (ECM) è una matrice idratata ricca di sali, collagene (prevalentemente di tipo I, III, V, VI), proteoglicani composti da glicoproteine e glicosamminoglicani, ovvero catene laterali quali cheratansolfato, solfano di condroitina e dermatansolfato.

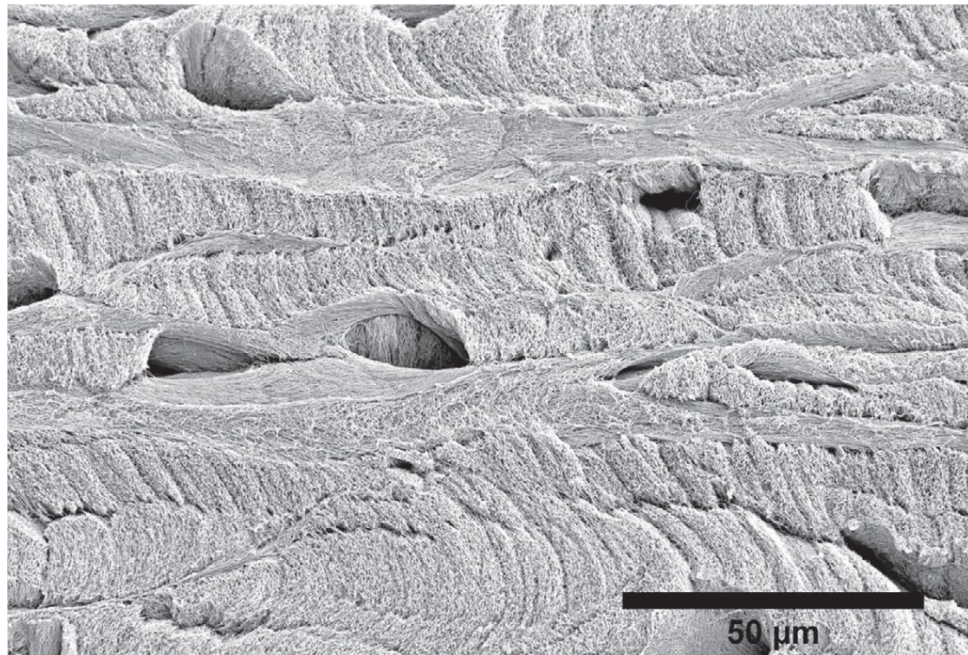


Figura 1.3 – Sezione trasversale dello stroma ottenuta tramite microscopio elettronico a scansione (SEM), visibile l'organizzazione delle lamelle di collagene (Formisano et al., 2021)

Oltre alla precisa organizzazione assunta da ECM e fibrille di collagene, lo stroma è caratterizzato da uno dei gruppi cellulari di maggior importanza nel mantenimento dell'equilibrio corneale: i cheratociti.

I cheratociti sono la principale componente cellulare dello stroma, si tratta di cellule piatte e sottili disperse principalmente nelle lamelle della parte anteriore dello strato. Queste cellule sono fondamentali nel mantenimento della ECM e dell'omeostasi stromale grazie alla loro abilità di sintesi di componenti chiave come collagene, glicosamminoglicani e metalloproteasi della matrice (MMPs). La lenta e continua produzione di collagene da parte dei cheratociti (si stima che un intero ricambio di collagene duri diversi anni) è essenziale per l'ottenimento e il mantenimento di una corretta organizzazione lamellare dello stroma. Inoltre, la struttura dendritica di queste cellule le rende adatte per il riconoscimento di corpi estranei ed eventuali ferite, attivando un processo metabolico che stimola una rapida proliferazione cellulare e produzione di collagene.

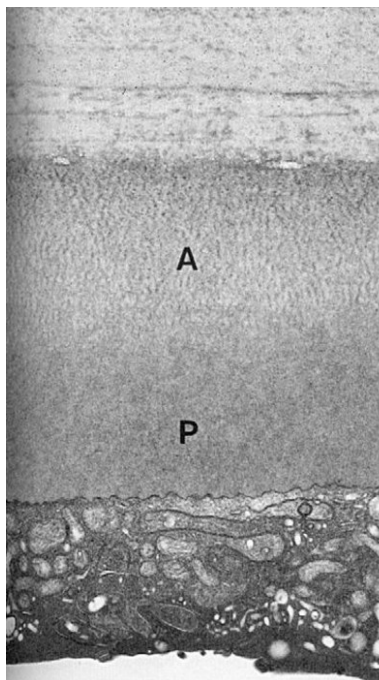
La precisa architettura e composizione dello stroma, sia a livello microscopico che macroscopico, è elemento fondamentale per la caratterizzazione delle proprietà meccaniche dello stroma stesso e dell'intero tessuto corneale. In particolare, il collagene fornisce forza e elasticità alla struttura, mentre la componente cellulare e i proteoglicani sono responsabili del suo carattere viscoelastico (Formisano et al., 2021). Le proprietà meccaniche di uno stroma sano non si limitano a fornire supporto, stabilità e una corretta risposta a stimoli esterni, ma contribuiscono all'invio di segnali d'azione necessari a un equilibrio fisiologico della

componente cellulare. È ampiamente dimostrato infatti che sollecitazioni meccaniche a carico della ECM provochino una risposta da parte dei cheratociti, influenzando proliferazione, differenziamento, adesione e mantenendo allo stesso tempo funzione e morfologia cellulare. In conclusione, la composizione e le caratteristiche meccaniche dello stroma risultano avere un ruolo fondamentale sia nella risposta biomeccanica della struttura corneale sia nel processo di guarigione e rimodellamento del tessuto danneggiato.

1.1.5 Membrana di Descemet

Collocata tra lo stroma e l'endotelio la membrana di Descemet, o lamina elastica limitante posteriore, comincia a essere secreta dalle cellule endoteliali all'ottava settimana di gestazione, iniziando la formazione di una prima interfaccia con il soprastante stroma corneale. Questa prima matrice spessa 3 μm è caratterizzata da ordinate fibre di collagene fasciato (di tipo IV e VIII) e laminina, fornendo struttura ed elasticità allo strato (Tamura et al., 1991).

Restanti 4 μm di spessore vengono secreti successivamente alla nascita e presentano una matrice più disorganizzata e amorfa che fornisce ancoraggio alle cellule endoteliali.



—S
 —DM
 —EN

Similmente alla membrana di Bowman questa membrana si presenta come una matrice priva di cellule, densa e trasparente. Costituisce uno strato di transizione tra lo stroma, di cui rappresenta una finale condensazione, e l'endotelio, utilizzato come struttura d'appoggio. Questa diversa composizione di strati ha dimostrato avere un importante ruolo nell'omeostasi corneale, partecipando al controllo della sua idratazione, alla modulazione di specifici fattori di crescita e al mantenimento biomeccanico della curvatura posteriore della cornea, influenzandone il totale potere refrattivo (de Oliveira e Wilson, 2020).

Figura 1.4 – Micrografia che mostra la collocazione della Membrana di Descemet tra lo stroma posteriore e il sottostante endotelio (DelMonte e Kim, 2011).

1.1.6 Endotelio

L'endotelio corneale si presenta come un monostrato spesso 4-5 μm costituito da cellule piatte poligonali organizzate in una struttura simil-mosaico a nido d'ape. Oltre a fornire una barriera interposta tra il tessuto corneale e la camera anteriore dell'occhio, l'endotelio possiede cellule metabolicamente attive ed è essenziale per la regolazione del contenuto d'acqua.

Lo stroma, infatti, è mantenuto in uno stato di deidratazione grazie alla pompa endoteliale che facilita il passaggio di fluido, seguendo un gradiente osmotico, da uno stroma ipo-osmotico verso un umore acqueo ipertonico. La membrana dell'endotelio deve garantire una permeabilità sufficiente al passaggio di ioni necessari alla creazione di questo gradiente osmotico, essenziale per alimentare il passaggio di liquido. Prevalentemente i sistemi che si occupano di questo trasporto ionico sono la ATPasi sodio-potassio (un vettore proteico di trasporto attivo) e la carbonato-deidratasi intracellulare.

Dal punto di vista embriogenico, le cellule endoteliali sono il risultato di un progressivo appiattimento e compattamento di un monostrato cellulare composto da cellule cuboidali provenienti dalla cresta neurale, una struttura di origine ectodermica. Alla nascita questo strato endoteliale risulta spesso 10 μm e prosegue il suo processo di appiattimento e giunzione con le cellule laterali fino al raggiungimento di uno spessore di 4 μm in età adulta.

Oltre alle strette giunzioni laterali con le cellule vicine e le numerose pompe ioniche, la superficie basale dell'endotelio è caratterizzata da un sistema di emidesmosomi per l'ancoraggio meccanico alla membrana di Descemet.

Non possedendo alcuna capacità di divisione o replicazione, la densità cellulare dell'epitelio diminuisce con l'avanzare dell'età, perdendone lo 0.6% l'anno da un valore iniziale di 3500-400 cell/mm^2 e una discreta percentuale di cellule esagonali rispetto al totale. Oltre all'età, anche infiammazioni, traumi e patologie contribuiscono alla diminuzione di questo numero di cellule, portando così quelle rimanenti ad un aumento della loro dimensione e una relativa perdita della nativa forma esagonale.

1.2 Comportamento Meccanico

Una corretta risposta meccanica da parte della cornea è fondamentale per il mantenimento della sua stabilità dimensionale e risulta dipendente dalla sua forma, estensione, spessore, microstruttura e dal comportamento meccanico del tessuto stesso. Per poter analizzare in

particolare la composizione di questo tessuto e le sue proprietà biomeccaniche risultano necessari test *ex vivo* quali prove di insufflazione o trazione uniassiale (Boschetti et al., 2012). Le prime mirano a simulare il comportamento fisiologico riproducendo una normale pressione posteriore intraoculare e stimare la rigidità tramite una curva spostamento apicale-pressione. Le seconde invece si prefiggono di caratterizzare la risposta tenso-deformativa a seguito dell'applicazione di carichi e deformazioni monoassiali, con la possibilità di poter variare tempo, velocità ed estensione della deformazione. Numerose prove di questo tipo in letteratura (Elsheikh et al. 2008, Boschetti et al., 2012, Tonsomboon et al., 2014) hanno confermato il carattere viscoelastico e anisotropo del tessuto corneale.

Con il termine viscoelasticità si fa riferimento ad un comportamento meccanico di un materiale conferito dalla sua particolare struttura macromolecolare che differisce dalla semplice elasticità. Nel caso elastico fornita una determinata sollecitazione esterna il materiale risponderà solo in funzione del valore istantaneo della stessa, per poi tornare ad una inalterata configurazione iniziale alla sua cessazione.

Un tessuto o materiale viscoelastico, invece, reagirà a uno stimolo meccanico non in maniera istantanea, ma fornirà una risposta dipendente dalla storia di carico secondo relazioni costitutive date dalla sua struttura e dai relativi legami intramolecolari. Una prima risposta è provocata dalle variazioni angolari di questi legami e un conseguente riarrangiamento macromolecolare nella direzione di applicazione dello sforzo o della deformazione, mentre in un secondo momento alla risposta si sovrapporranno le variazioni di configurazione delle macromolecole stesse. Un meccanismo di deformazione viscoelastico è pertanto principalmente definito in letteratura come: reversibile, ovvero comporta una alterazione reversibile della struttura; dissipatore di energia, lo sviluppo del meccanismo richiede energia fornita attraverso il lavoro delle tensioni; e infine tempo-dipendente, cioè richiedente di un tempo per potersi sviluppare caratteristico del meccanismo stesso e della sua componente viscosa.

Per anisotropia di un materiale si intende invece quella proprietà per cui la misura di una grandezza fisica risulta dipendente dalla direzione nella quale viene considerata ed è ormai ampiamente noto e dimostrato come le caratteristiche biomeccaniche del tessuto corneale siano influenzate dalla sua struttura anatomica.

Le prime supposizioni rispetto ad un'organizzazione non isotropica delle fibrille di collagene (Figura 1.5) nella parte profonda e centrale dello stroma vennero avanzate da Kokott nel 1938 e confermate nei decenni successivi tramite studi a diffrazione di raggi X. Questi studi confermarono come le fibrille assumano le direzioni ortogonali preferenziali superiore-inferiore e nasale-temporale, prevalentemente negli strati posteriori dello stroma (Boote et al., 2014). La

conoscenza dell'orientamento delle fibrille di collagene è fondamentale nel processo di caratterizzazione delle prestazioni meccaniche di un tessuto, essendo le fibrille forti lungo il loro asse e fornendo così rinforzo al materiale biologico. Nel caso delle cornee le prestazioni meccaniche influenzano la distribuzione del film lacrimale e di conseguenza il potere refrattivo complessivo.

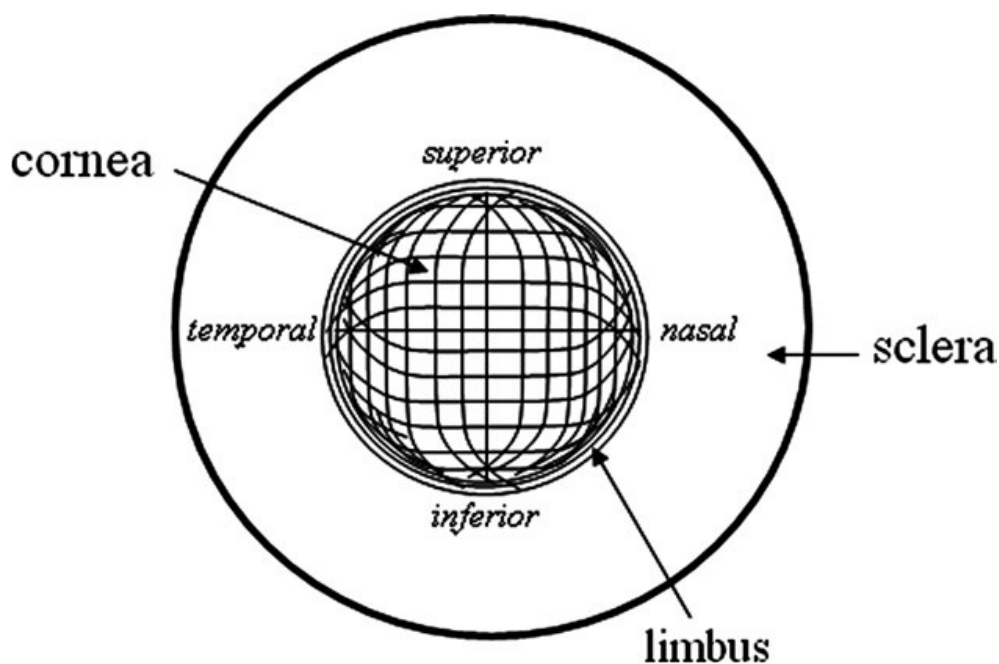


Figura 1.5 - Rappresentazione della direzione preferenziale delle fibrille di collagene nell'occhio umano. La cornea centrale è caratterizzata da un maggior numero di fibrille ortogonali orientate nelle direzioni superiore-inferiore e nasale-temporale (Boote et al., 2014)

Il lavoro di Boote, tramite una prova di diffrazione a raggi X ad ampio angolo con lo scopo di esaminare la densità fibrillare in diverse zone di sette campioni corneali umani e correlarle alla risposta meccanica, ha identificato una significativa variabilità nelle famiglie di campioni. Alcuni campioni corneali risultano sbilanciati nella direzione superiore-inferiore con una presenza di collagene maggiore del 25%, mentre altri campioni esaminati esibiscono una prevalenza di fibrille nella direzione ortogonale nasale-temporale. Nonostante questa variabilità, le fibrille non variano di diametro tra meridiani e mantengono dunque un comune modulo elastico. Inoltre, la frazione volumetrica calcolata tenendo conto degli spazi interfibrillari può considerarsi in media simile tra i meridiani, portando così la dipendenza finale del modulo di Young della cornea umana al solo fattore di orientamento della fibrilla rispetto al meridiano considerato.

Uno studio di Elsheik ha ricavato tramite test di tensione uniassiali il comportamento tenso-deformativo di campioni corneali porcini ottenuti lungo i differenti assi verticale, orizzontale e diagonale orientato a 45 gradi. I risultati evidenziano come la direzione preferenziale assunta

dalle fibrille nello stroma influenzi la risposta biomeccanica, fornendo ai campioni verticali una rigidità maggiore del 10-20% rispetto alle altre due popolazioni in considerazione. Prendendo inoltre in esame diverse velocità di deformazione è possibile notare come a bassi rapporti deformativi (1%/min) le 3 famiglie di campioni sembrano rispondere alla sollecitazione con la stessa rigidità, mentre aumentando considerevolmente la velocità di deformazione il carattere anisotropo del tessuto domina la risposta meccanica, evidenziando la maggior rigidità della direzione verticale (Elsheikh et al., 2008).

1.2.1 Prove di trazione uniassiale in letteratura

Come riportato in precedenza, numerosi studi con lo scopo di caratterizzare la risposta biomeccanica del tessuto corneale, sia nel caso suino che umano, si sono avvalsi di diverse prove a trazione uniassiali, come prove di creep, stress-relaxation, deformazione a rottura e carico-scarico.

Oltre all'analisi del campione stesso, la quale può portare all'estrazione di parametri geometrici quali diametri, curvature e spessori necessari per l'analisi biomeccanica o di semplice utile annessione, dalle curve di risposta del tessuto in seguito alle diverse prove possono essere analizzati diversi parametri e comportamenti meccanici, quali rigidità elastica, tensione a rottura, carattere anisotropo e viscoelasticità.

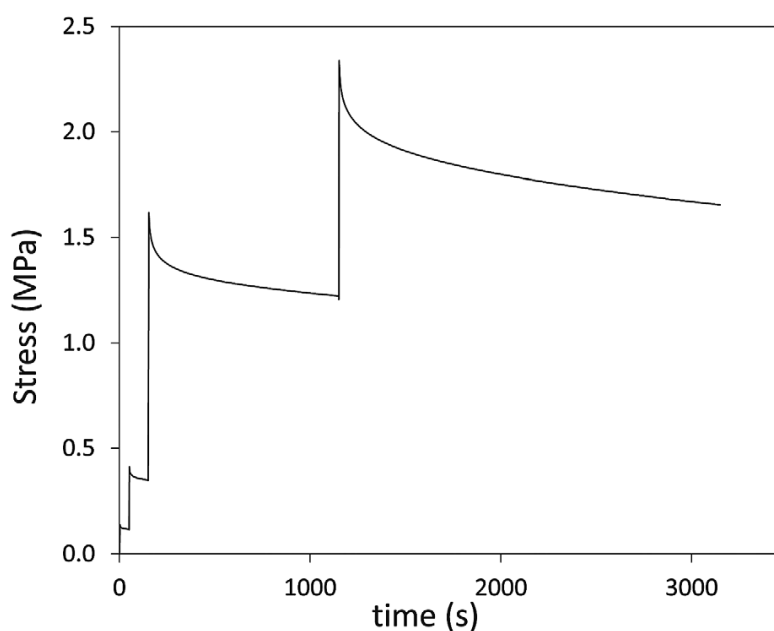


Figura 1.6 - Esempio di curva di rilassamento (Boschetti et al. 2012).

Boschetti, tramite un'analisi di caratterizzazione meccanica della cornea porcina, ha riscontrato il carattere viscoelastico e tempo-dipendente del tessuto tramite prove di rilassamento dello stress, prove di creep e prove di trazione a fallimento mediate su 47 campioni di strisce corneali (Boschetti et al., 2012).

Come è possibile notare dal comportamento delle curve di rilassamento delle tensioni rispetto al tempo (Figura 1.6), successivamente al rapido incremento tensionale relativo al momento di applicazione della deformazione, il tessuto impiega un determinato tempo di rilassamento per il raggiungimento del suo valore finale di stress ad uno stato più stabile, questo a causa della natura viscoelastica del materiale in esame.

Le prove di trazione monoassiale portate a fallimento sono in genere mirate a descrivere il comportamento di un tessuto ad alti livelli deformativi, individuando le condizioni in cui il provino subisce un irreversibile cedimento meccanico. In questo particolare studio, è stata riscontrata una tensione media di stress di fallimento di 4.746 ± 1.251 MPa e una deformazione media a rottura di 0.192 ± 0.023 . Il test ha inoltre fornito un'ulteriore conferma sul carattere anisotropo del tessuto corneale, mostrando per le prove eseguite lungo la direzione superiore-inferiore una maggiore rigidità, in particolare nella regione di deformazione dominata dal collagene.

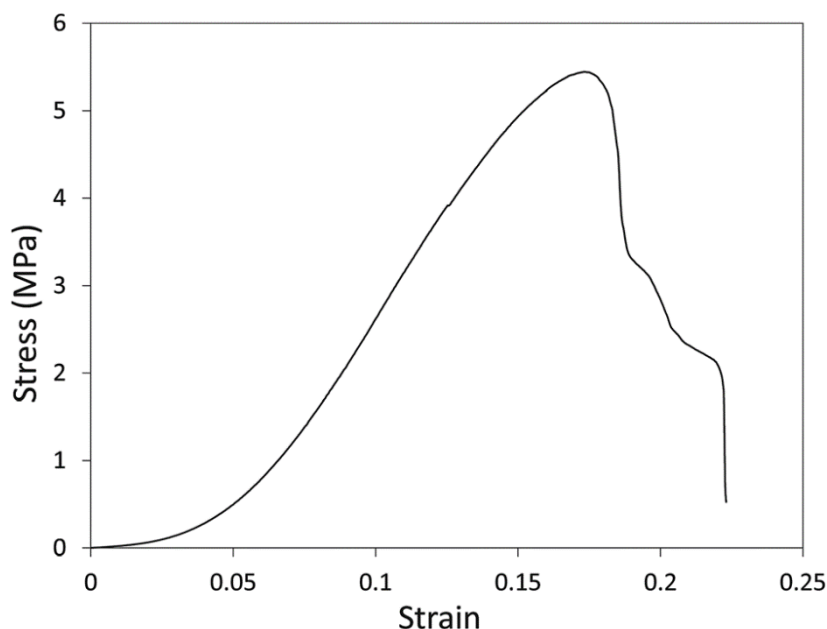


Figura 1.7 - Curva uniassiale tenso-deformativa portata al fallimento (Boschetti et al., 2012)

L'andamento della curva tensione-deformazione (Figura 1.8), ricavata dalle prove di trazione a fallimento, evidenzia la risposta non lineare del tessuto corneale. In particolare, può essere presentata come una bi-linearità distinta in una prima regione quasi elastica governata dalle proprietà della matrice extracellulare (fino a una deformazione dell'8%) e una seconda regione caratterizzata da maggior rigidità dipendente dalla intricata struttura del collagene. Il calcolo del modulo di Young nella seconda regione conferma l'elevata rigidità strutturale dovuta alla presenza del collagene ($E_2 = 41.806 \text{ MPa}$) rispetto alla prima regione ($E_1 = 3.193 \text{ MPa}$), constatando come possa variare in maniera considerevole il calcolo di questo parametro costitutivo a seconda del grado di deformazione preso in esame.

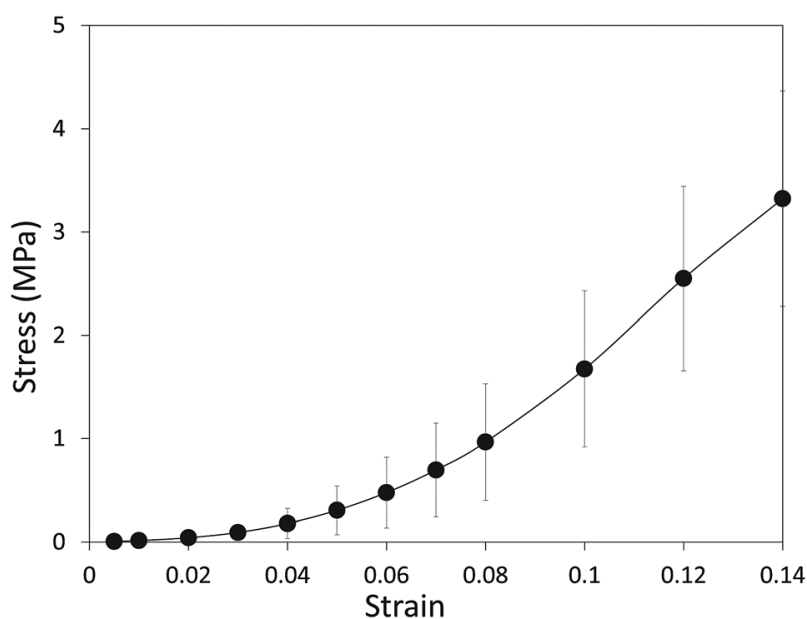


Figura 1.8 - Curva tensione-deformazione mediata sui 47 campioni corneali. (Boschetti et al., 2012)

In linea generale, parametri biomeccanici ricavabili dalle prove di trazione monoassiale come il modulo elastico, il coefficiente di Poisson, la percentuale di rilassamento delle tensioni e le condizioni di fallimento sono difficilmente applicabili all'intera cornea e comparabili tra studi diversi a causa del grande numero di variabili presenti, ma molto utili per dimostrare le principali caratteristiche biomeccaniche del tessuto ed eventualmente aprire la possibilità di confronto tra studi successivi utilizzando i medesimi campioni. Esempi di variabilità che incorre nei diversi campioni possono trovarsi nella provenienza delle cornee (specie e età), nella loro conservazione e idratazione, nel protocollo stesso della prova e nella discontinuità dello spessore della cornea.

Ulteriori analisi sulla dipendenza temporale dei meccanismi di deformazione del tessuto corneale sono portate a termine da Tonsomboon, nel cui lavoro sono esposte prove di stress-relaxation a bassa deformazione e trazione monoassiale a rottura a diverse velocità di

deformazione mediate su 24 campioni di cornea porcina (Tonsomboon et al., 2014). L'andamento delle curve di rilassamento (Figura 1.9) ha confermato come a deformazioni molto basse prevalgano componenti strutturali che portano a un maggior rilassamento dello stress e relativamente a una miglior ristabilimento della configurazione iniziale. Al contrario, con il graduale aumento della deformazione le componenti elastiche del tessuto predominano la risposta biomeccanica, portando a una minor rilassamento delle tensioni interne.

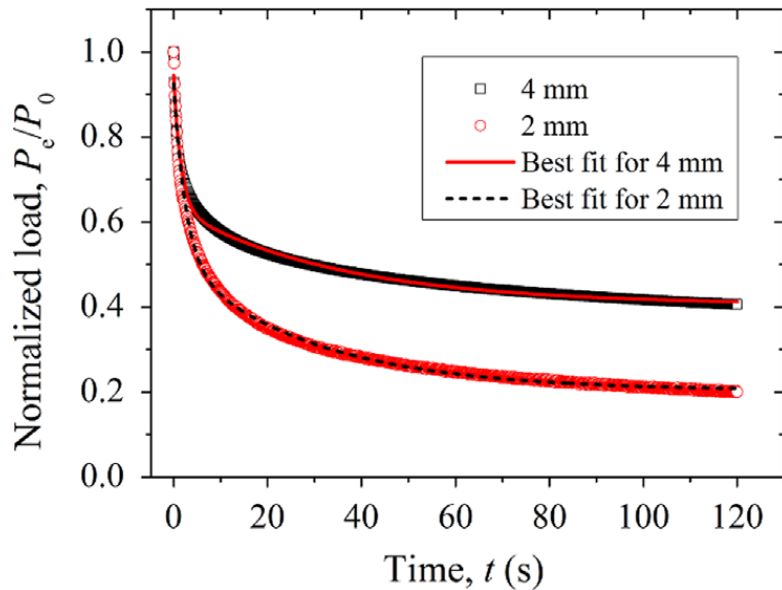


Figura 1.9 – Andamento temporale della tensione normalizzata per le due condizioni di deformazione (2 mm e 4 mm) (Tonsomboon et al., 2014)

Controintuitivo invece il comportamento del tessuto considerando una prova di fallimento del provino a trazione monoassiale e velocità di deformazione ad ordine di grandezza differenti (3-30-300 $\text{mm}/\text{min}^{-1}$) (Figura 1.10). Nonostante l'ormai comprovato carattere viscoelastico del tessuto, questo non sembra essere influenzato dalle tre diverse velocità secondo cui la deformazione viene applicata, producendo una risposta simile nei tre casi, confermato anche successivamente da un risultato affine nel calcolo del modulo di elasticità.

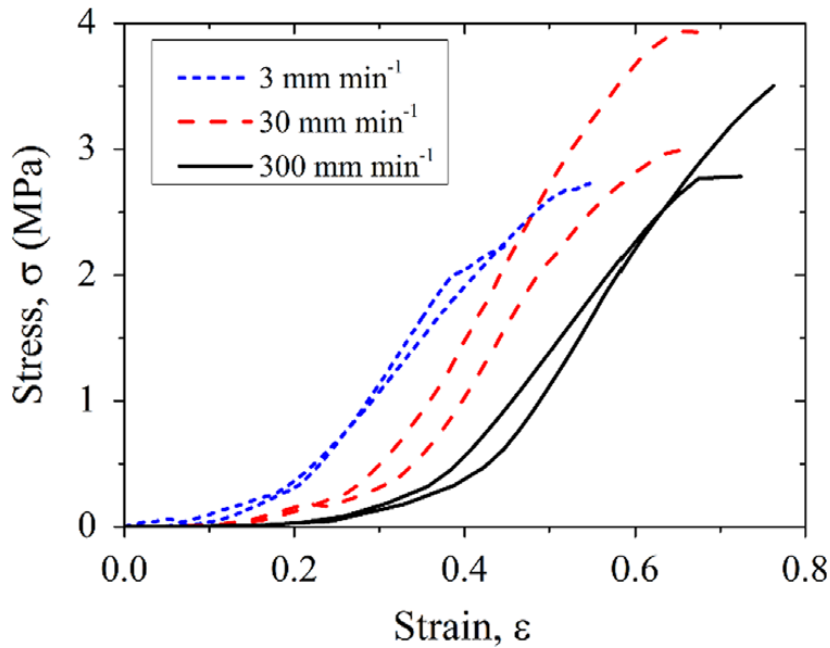


Figura 1.10 - curve di tensione-deformazione su cornea porcina ottenute per trazione monoassiale a tre differenti velocità di deformazione (Tonsomboon et al., 2014)

Un più ampio studio sulla potenziale influenza della velocità di deformazione nei confronti nella risposta meccanica del tessuto corneale è stato portato a termine da Elsheikh prendendo in considerazione otto bulbi oculari suini e otto ovini, tutti prelevati entro sei ore dalla morte dell'animale e mantenuti nel mezzo di coltura Eusol-C. I provini di strisce corneali sono ricavati lungo la direzione superiore-inferiore e sottoposti a prove di trazione monoassiale attraverso sette progressive velocità di deformazione (0.8, 8, 25, 42, 83 e 420 %/min), ognuna associata a tre cicli di carico-scarico (Elsheikh et al., 2011).

I campioni hanno tutti mostrato un tipico comportamento non lineare nella risposta tenso-deformativa, con un passaggio ad un modulo tangenziale più elevato parallelamente all'aumento della deformazione, caratteristica che si mantiene a prescindere dalla velocità di deformazione e dalla provenienza animale del provino.

Analizzando le curve medie provenienti dalle due famiglie di campioni è possibile notare come generalmente un aumento nella velocità di deformazione contribuisca a una maggiore rigidità (Figura 1.11). In particolare, i campioni di cornea porcina mostrano una significativa variazione nello stress in conseguenza del passaggio da una velocità di deformazione di 0.8 %/min a 25 %/min, seguita da leggerissimi aumenti di pendenza nelle curve successive, statisticamente poco importanti. Al contrario, le cornee provenienti da ovini presentano un aumento di rigidità progressivo e significativo correlato ad ogni innalzamento nella velocità di deformazione.

Inoltre, i dati provenienti dai diversi cicli di carico-scarico relativi alla medesima velocità di deformazione mostrano come, successivamente ad una maggiore rigidità provocata dal primo di questi, i seguenti cicli mostrano una stabilizzazione nell'andamento del modulo tangenziale in relazione alla tensione, giustificando così la scelta di considerare solo i valori relativi all'ultimo ciclo per ogni velocità di deformazione.

In conclusione, in questo particolare studio la rigidità corneale porcina è risultata essere influenzata in maniera significativa da incrementi a bassi livelli di velocità di deformazione, come il passaggio da 0.8 %/min a 8 %/min e da quest'ultimo a 25 %/min, mentre gli intervalli corrispondenti ai successivi incrementi di velocità portano a moduli tangenziali con valori simili.

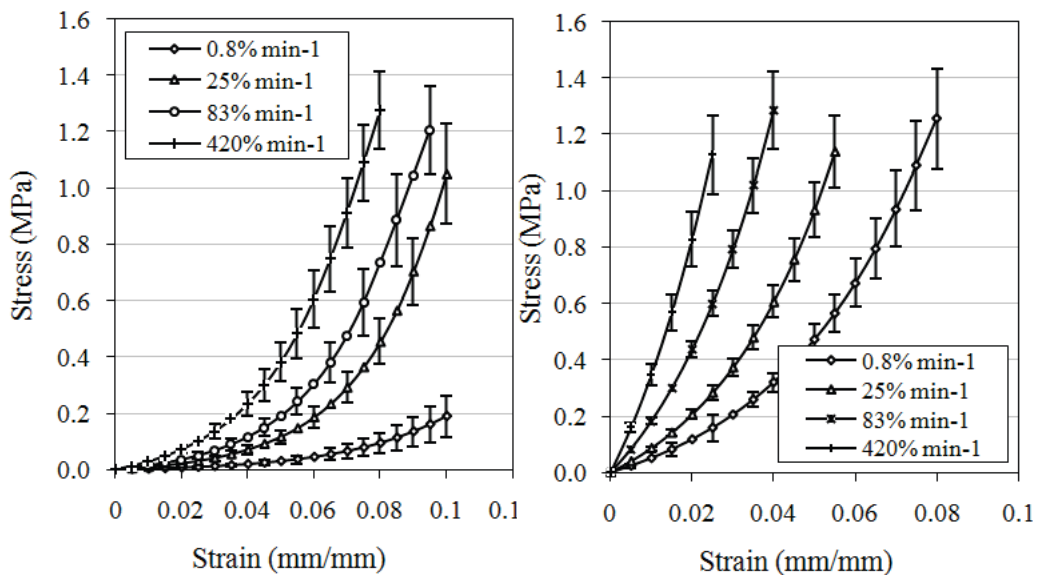


Figura 1.11 - Comportamento medio di cornee porcine (a) e ovine (b) a differenti velocità di deformazione (Elsheikh et al., 2011)

Una accurata scelta della velocità di deformazione e la conseguente influenza nella risposta meccanica di un materiale altamente viscoelastico deve essere quindi presa in considerazione nello sviluppo di nuovi modelli microstrutturali e protocolli sperimentali.

CAPITOLO 2

PROVE SPERIMENTALI SU CORNEA SANA

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 La cornea suina

L'impiego di cornee suine negli studi sulle proprietà meccaniche come modello approssimativo delle cornee umane è dovuto principalmente alla difficoltà di ottenimento in grande quantità di cornee da donatori umani (Elsheikh et al., 2008).

Sebbene cornea porcina e umana siano caratterizzate entrambe da una relazione sforzo-deformazione non lineare e da una simile risposta meccanica a carichi sia brevi che prolungati, prove meccaniche di insufflazione e trazione uniassiale in letteratura (Boschetti et al., 2012) hanno mostrato come la risposta tenso-deformativa nel caso delle cornee porcine presenti una più marcata viscoelasticità, mettendo più in risalto il comportamento bilineare del tessuto, e una minore rigidità complessiva rispetto ai campioni di cornea umana.

Le cornee porcine presentano ulteriori lievi differenze nella risposta meccanica, caratterizzate principalmente da una minore rigidità in ogni fase di sopportazione del carico, da una inferiore capacità di opposizione alla tensione e una notevole minore attitudine al ripristino della forma iniziale una volta terminata la fase di sforzo (Elsheikh et al., 2008). Al contrario, cornee suine e umane trovano terreno comune nel carattere anisotropo, presentando in entrambe le famiglie di campioni una marcata anisotropia dovuta alla direzione preferenziale delle fibrille di collagene, esibendo una maggior rigidità nell'asse verticale (superiore-inferiore) rispetto all'orizzontale (temporale-nasale) o diagonale.

Abbandonando la caratterizzazione meccanica e analizzando il tessuto dal punto di vista anatomico, l'occhio del suino domestico è stato dimostrato rispecchiare fisiologicamente e strutturalmente, sebbene con qualche differenza, l'occhio umano. Tra le principali difformità possiamo trovarne di trascurabili, come l'assenza della membrana di Bowman, differenza considerata fisiologicamente ininfluyente dato che la sua funzionalità nell'occhio umano è ad oggi considerata pressoché nulla. Diversità più marcata è invece lo spessore corneale, che nel campione suino risulta maggiore di quello primate, fino ad arrivare al doppio (Abhari et al., 2018).

Dunque, nonostante alcune leggere differenze nella risposta meccanica, nella struttura anatomica e una complessiva minor rigidità, la cornea suina rimane un ottimo modello per l'analisi del comportamento meccanico della cornea umana, vista la scarsità di ottenimento di quest'ultime.

2.1.2 Strumentazione

Necessari per lo svolgimento delle prove di trazione monoassiale presenti in questo lavoro di Tesi sono due dispositivi in dotazione presso il Laboratorio dei Tessuti Biologici dell'Università degli Studi di Padova: il Mach-1 v500csst Biomomentum e il Bose® ElectroForce® Planar TestBench.

Il primo fa parte di una gamma di sistemi per test micromeccanici originariamente creata per test cartilaginei. Si tratta di un dispositivo multi-assiale possedente diverse configurazioni e funzionalità modulabili, in grado di valutare le proprietà meccaniche di diversi tessuti e materiali molli. Il macchinario è in grado di performare prove di compressione, trazione, taglio e torsione in un contesto multi-assiale e con grande precisione nonostante le poco marcate proprietà meccaniche e la ridotta dimensione, anche micrometrica, dei possibili campioni in esame. Il dispositivo è correlato a un reparto software formato da un primo *Mach-1 Motion*, programma in grado di ricevere in input parametri e protocolli per le prove inseriti dall'utente e visualizzare in tempo reale spostamenti, forze e torsioni provenienti dalle celle di carico. Successivamente alla prova, il secondo software *Mach-1 Analysis* colleziona ed analizza i dati, poi esportabili nel formato di interesse. In questo lavoro di Tesi il Mach-1 v500csst Biomomentum verrà sempre utilizzato in modalità monoassiale, con la possibilità di montare due celle di carico, rispettivamente da 250 N e 1,5 N. La cella deve essere calibrata giornalmente antecedentemente ai test tramite degli appositi pesi standard da 500 g e 100 g, i quali vengono montati tramite un supporto alla cella di carico. Il protocollo di calibrazione è standard e fornirà un coefficiente di calibrazione che dev'essere compreso in un determinato range di accettazione.

Il dispositivo Bose ® ElectroForce® Planar TestBench è anch'esso uno strumento sviluppato per la caratterizzazione meccanica di tessuti molli e biomateriali. La sua configurazione è formata da quattro motori elettromagnetici lineari (due nel caso di prove uniassiali) montati su un piano lineare, i quali sviluppano una forza massima di 400 N, 200 N in tensione e compressione e uno spostamento massimo di 6.5 mm. Il macchinario, grazie al software di

supporto, permette il controllo indipendente dei due motori lineari, concedendo l'applicazione di cicli di carico o spostamento ad alta frequenza.

Tutti i dati sperimentali provenienti dai macchinari sono in seguito elaborati tramite il software MATLAB (R2021a, The MathWorks Inc., Natick, MA, US).

2.1.3 Preparazione del campione

Gli occhi di maiale utilizzati in questo esperimento sono ottenuti in accordo con le norme italiane ed europee (96/609/EEC) riguardo il benessere dell'animale durante il processo di macello a fini commerciali.



Figura 2.1 - Estrazione del campione corneale

I campioni costituiti da strisce corneali vengono estratti e tagliati con un bisturi (Figura 2.1) in conformità con precedenti protocolli sperimentali lungo la direzione mediale-laterale, risultando in delle strisce corneali di una grandezza approssimativa di 5 x 10 mm possedenti alle estremità dei residui di sclera fondamentali per il fissaggio del campione al macchinario. Queste dimensioni, insieme allo spessore del campione, verranno poi confermate con l'utilizzo di carta millimetrata e un software per le misurazioni, *ImageJ*. Prendendo in considerazione diverse misure del campione nella sua larghezza e spessore (Figura 2.2), e successivamente

mediandole, è possibile ottenere una stima accurata dell'area della sezione trasversale della cornea in esame, necessaria in seguito per il calcolo della tensione nominale.

I campioni vengono fissati ad un supporto di carta o balsa con l'aiuto di velcro e colla per facilitarne la presa, per poi essere chiusi nei morsetti del macchinario. Un fattore importante già evidenziato in precedenza come possibile variabile condizionante il risultato finale della prova è l'idratazione del campione, per questo motivo i campioni di cornea vengono immersi in soluzione fisiologica precedentemente al test e poi continuamente idratati durante lo stesso.

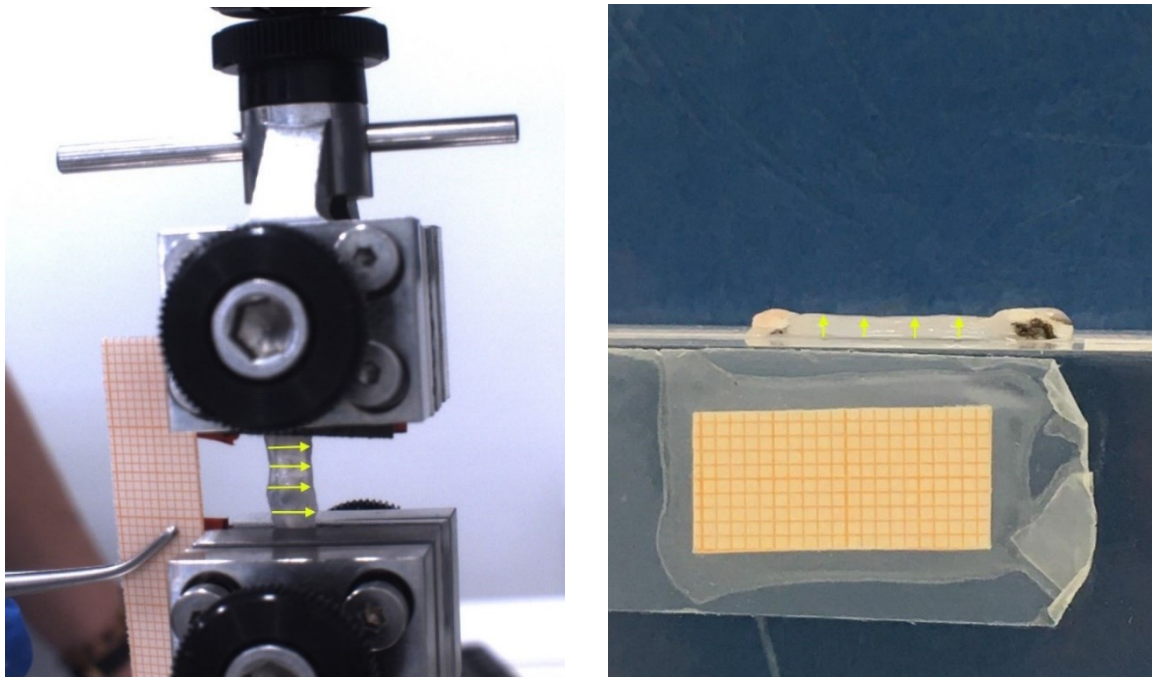


Figura 2.2 – Misure di spessore e larghezza ricavate dal campione

Le prove a trazione monoassiale presenti nei successivi paragrafi di questo Capitolo vengono eseguite esclusivamente tramite macchinario Mach-1 v500csst Biomomentum e utilizzano campioni corneali definiti come sani e freschi, ovvero provini di tessuto ottenuti da bulbi oculari suini che risultano chiari, senza presenza di opacità o tessuto cicatriziale e trasportati nell'arco di ore in maniera sterile al laboratorio. Successivamente al montaggio del campione corneale, il macchinario viene mosso manualmente sui tre assi di mobilità, aggiustandone la posizione finché il provino non risulta orientato e teso al meglio sull'asse di trazione in esame.

Precedentemente all'attuazione delle prove esposte in seguito, il campione subisce una fase comune di preparazione conforme a una serie di istruzioni inserite nel software *Mach-1 Motion*. *Zero Load - Find Contact - Zero position*: questi primi tre step del protocollo si occupano in primo luogo di azzerare nel software il carico sostenuto dal campione, e successivamente di tirarlo nel verso negativo dell'asse z (essendo il macchinario predisposto a prove di compressione, il suo verso negativo monoassiale indica una prova di trazione) fino a misurare

un contatto prestabilito di 10 gf (0.0980665 N). Infine, la nuova posizione viene definita come posizione zero e sarà quella considerata di partenza per le fasi di preconditionamento e, successivamente, della prova di trazione vera e propria.

Move Relative – Sinusoid – Move Absolut – Wait: la fase di preconditioning è composta dall'applicazione di 10 cicli di carico-scarico tramite una funzione sinusoidale (comando *Sinusoid*) di ampiezza proporzionale alla lunghezza del campione, deformazione fino a un massimo dell'8%, frequenza fissa a 0.5 Hz e velocità di deformazione $1\%s^{-1}$. I comandi di *Move* spostano il macchinario a una specifica posizione o ampiezza. Il comando *Wait* permette l'acquisizione di dati da parte delle celle di carico per la durata prestabilita in input.

2.2 Prove di trazione a fallimento

2.2.1 Protocollo

Prove di trazione monoassiale fino al fallimento del campione corneale sono state eseguite in precedenza nel laboratorio dei Tessuti Biologici dell'Università degli Studi di Padova per testarne il protocollo di trazione e valutarne la risposta biomeccanica del tessuto dovuta a una progressiva deformazione.

Sette strisce di cornea proveniente da occhi suini sani e senza coltura sono state ricavate come esposto nel paragrafo di preparazione dei campioni e deformate in configurazione mono-assiale tramite il macchinario Biomomentum equipaggiato con cella di carico a 250 N.

La prova di fallimento vera e propria è preceduta dalla fase di *preconditioning* esposta in precedenza, durante la quale i provini sono deformati ciclicamente tramite una funzione sinusoidale caratterizzata da una frequenza di 0.5 Hz, velocità 0.5 mm/s e ampiezza 0.4 mm. Le successive singole prove di trazione a fallimento vengono effettuate tramite l'applicazione di una deformazione progressiva ad una velocità di 0.1 mm/s o 0.01 mm/s e sono arrestate alla visualizzazione nel software di un cedimento nella curva tenso-deformativa, sintomo di fallimento del campione corneale.

2.2.2 Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali

Il primo passo per l'estrazione delle curve tenso-deformative consiste nel riportare i valori di forza registrati dalla cella di carico (in output dal software del macchinario Biomomentum) alle misure di sezione trasversale del campione corneale in esame, ricavate dalle foto ottenute precedentemente alla prova (Tabella 2.1). In questo modo è possibile ottenere la tensione nominale e rappresentarne il suo andamento rispetto l'aumento progressivo di deformazione.

Famiglia di campioni	Lunghezza (mm)	Spessore (mm)	Larghezza (mm)	Area (mm ²)
Sani	10	1.548 ± 0.238	8.443 ± 2.940	12.632 ± 3.457

Tabella 2.1 – Misurazioni ottenute per le prove di trazione a fallimento

La Figura 2.3 mostra il suddetto andamento per i campioni corneali in esame, le curve sono state successivamente elaborate scartando l'andamento successivo al punto di massima tensione, punto oltre il quale il tessuto non oppone più alcuna resistenza alla trazione. In realtà, analizzando l'evoluzione della risposta meccanica, è possibile vedere come il comportamento del campione risulti alterato ben prima del punto di massima tensione. La pendenza della curva muta per quasi la totalità dei campioni superata una deformazione del 40%, mostrando come il provino superata quella soglia non sviluppi più la resistenza caratteristica della sua struttura e del suo comportamento.

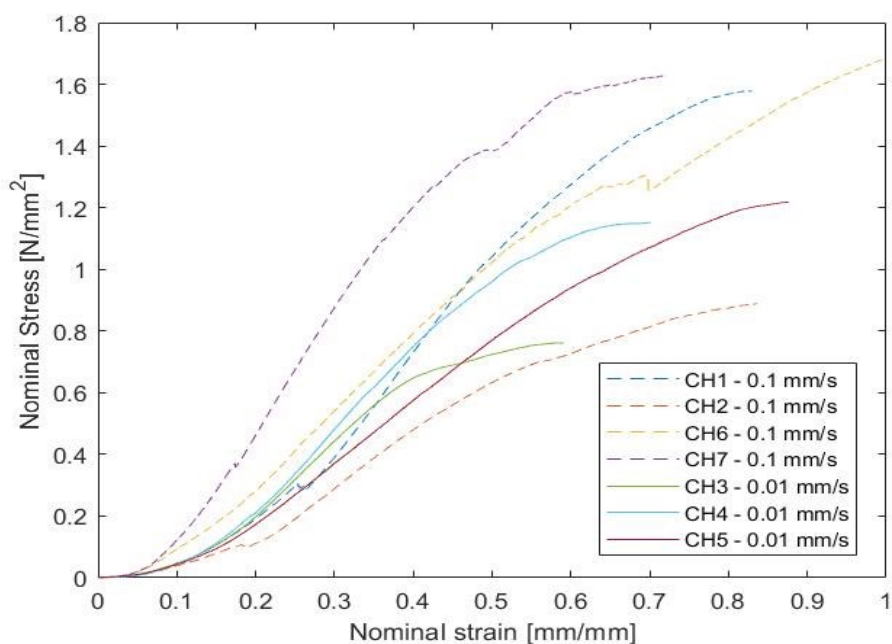


Figura 2.3 - Andamento tenso-deformativo risultato della prova di fallimento

Con lo scopo di analizzare e caratterizzare la risposta meccanica risultato di questa prova a trazione monoassiale sono stati estratti diversi parametri dalle curve tenso-deformative sopra riportate. Nella Tabella 2.2 riportata di seguito, sono mostrati il modulo di elasticità longitudinale, o modulo di Young, E1, calcolato nella porzione iniziale della curva, approssimativamente fino a una deformazione del 5%, e il modulo elastico E2, ricavato dalla porzione centrale lineare della curva, comprendendo una zona di deformazione che va dal 15% al 40%. Nella terza e quarta colonna della Tabella 2.2 sono riportati rispettivamente i valori di tensione e deformazione in corrispondenza del fallimento del campione, termine con il quale viene identificato non un punto di rottura fisica vera e propria ma uno stadio oltre il quale la struttura di collagene non è più in grado di sviluppare tensioni interne in risposta alla trazione monoassiale.

Campioni sani	E1 (MPa)	E2 (MPa)	Tensione a rottura (MPa)	Deformazione a rottura (-)
CH1	0,312	2,288	1,576	0,821
CH2	0,249	1,925	0,889	0,835
CH3	0,333	2,484	0,765	0,589
CH4	0,277	2,728	1,152	0,700
CH5	0,312	1,974	1,219	0,875
CH6	0,430	2,516	1,687	1,023
CH7	0,447	3,670	1,628	0,717

Tabella 2.2 - Valori dei parametri estratti dalle curve tenso-deformative in seguito alle prove di trazione a fallimento

Dalla visualizzazione delle curve è possibile notare come il tessuto corneale presenti una risposta non lineare in seguito all'applicazione della deformazione, comportamento tipico dei tessuti molli costituiti da collagene. Come riscontrato più volte in letteratura, il progressivo irrigidimento della risposta meccanica è dovuto al graduale orientamento delle fibrille di collagene in direzione dell'applicazione dello sforzo deformativo. La rappresentazione statistica tramite box plot dei moduli di Young estratti dalle due zone della risposta bilineare conferma questo notevole aumento di rigidità nell'andamento della risposta meccanica (Figura 2.4). È doveroso sottolineare nuovamente come questi valori di rigidità longitudinale non siano estendibili o confrontabili con altri studi a causa dell'ampia numerosità di variabili che possono potenzialmente influenzare la meccanica corneale, dalla provenienza del campione alla sua preparazione, fino al protocollo utilizzato per la prova.

Dalle ultime due colonne della Tabella 2.2 è possibile riscontrare come, nonostante i campioni di tessuto presentino un cambiamento di pendenza nella porzione finale della curva tenso-deformativa, l'attuale fallimento del provino avviene in media ad una deformazione del $79.43 \pm 14.04 \%$, relativa ad una tensione di 1.274 ± 0.368 MPa.

Analizzando numerosi articoli in letteratura che si servono di prove di stress-relaxation per la caratterizzazione della meccanica corneale, è possibile notare come molte di queste si limitino ad un range di deformazione relativamente ristretto, arrivando fino ad una alterazione massima che non supera il 15%. Dalle curve e dai valori ricavati attraverso le prove svolte in questo lavoro di Tesi, è riscontrabile un mantenimento della struttura corneale anche a più alti livelli deformativi, e questo è uno dei motivi per cui le successive prove di stress-relaxation in questo studio sono state svolte fino a una deformazione del 32%.

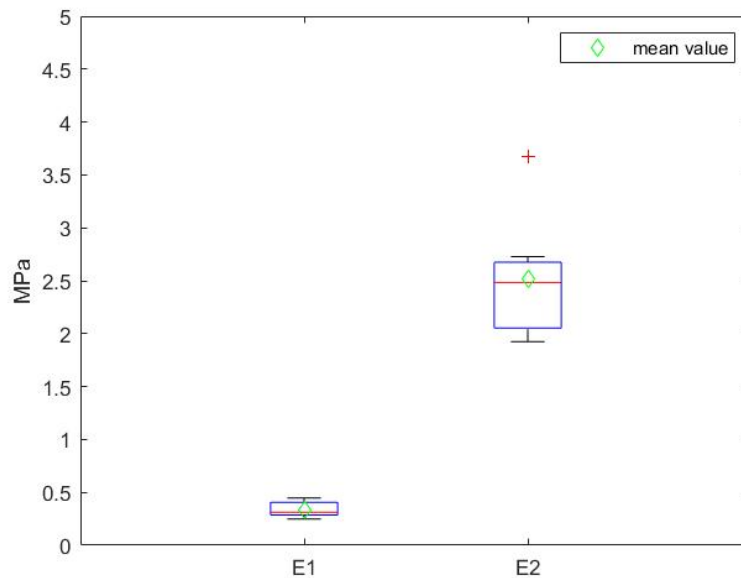


Figura 2.4 – Rappresentazione statistica tramite boxplot dei moduli di young estratti dalle due diverse zone della curva tenso-deformativa in seguito alle prove di fallimento

2.3 Prove di Carico – Scarico

2.3.1 Protocollo

Un ulteriore tipologia di prova a trazione monoassiale è stata eseguita tramite il macchinario Biomomentum, consistente nel sottoporre a cicli di Carico-Scarico il tessuto corneale a diverse velocità di deformazione con lo scopo di constatare e quantificare l'eventuale l'influenza della velocità di deformazione nella rigidità corneale.

Il protocollo della prova, inserito come input nel software del macchinario, consiste in una prima fase di *preconditioning* analoga a quella esposta in precedenza, durante la quale il provino viene deformato ciclicamente tramite una sinusoide caratterizzata da bassa deformazione in preparazione ai carichi successivi. La prova vera e propria si compone di due serie di tre rampe ciascuna di carico-scarico a due velocità di deformazione diverse ($v_1 = 1\%/s$, $v_2 = 10\%/s$) con un'attesa di 360 secondi tra una serie e l'altra (Figura 2.5). L'ampiezza (espressa in mm) e le due velocità (esprese in mm/s) di deformazione saranno quindi calcolate sulla base della lunghezza del campione ricavata precedentemente l'inizio della prova. Nelle due serie di cicli l'ampiezza di deformazione resta invariata, a differenza della velocità di deformazione. Per testare la validità del protocollo in relazione al comportamento del campione, inizialmente era stata imposta per ogni rampa di carico una deformazione pari al 15%, incrementata poi fino al 30% nei successivi campioni.

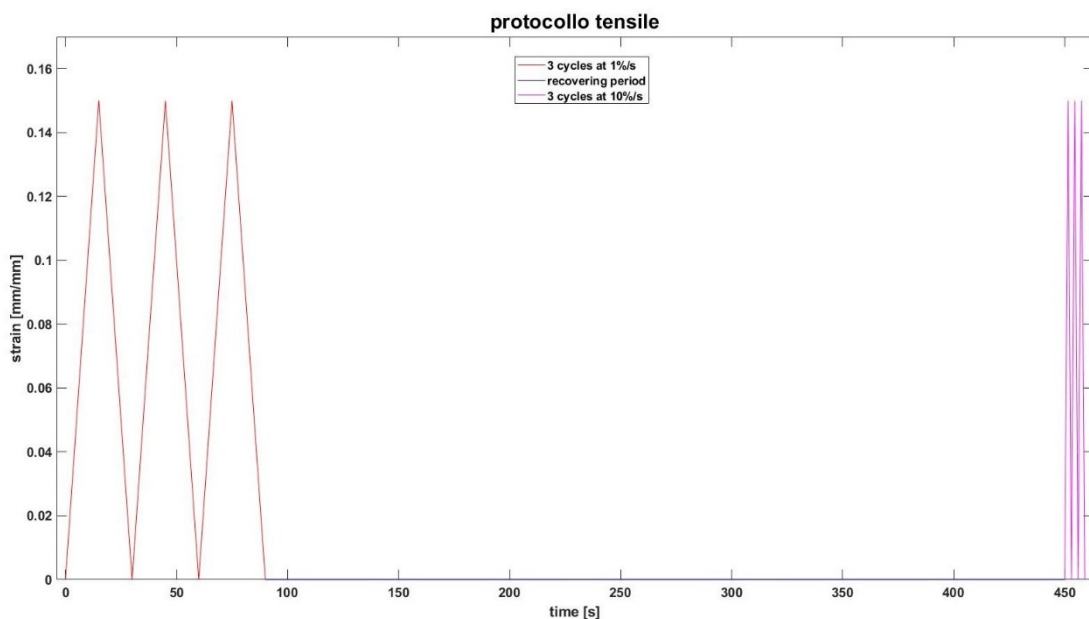


Figura 2.5 - Protocollo di prova carico-scarico

Sette campioni corneali sono ottenuti dal sezionamento di altrettanti occhi sani di suino trasportati al laboratorio nell'arco di qualche ora successivamente al macello. Le strisce corneali vengono poi fotografate per la misurazione e montate sul macchinario Biomomentum per l'attuazione del protocollo.

2.3.2 Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali

Seguendo lo stesso procedimento relativo alle analisi precedenti che si avvalgono di questa strumentazione, i dati in output provenienti dal software del macchinario si dividono nella posizione e nella forza misurata dalla cella di carico. La prima viene conseguentemente convertita in deformazione rapportandola alla lunghezza iniziale del provino, mentre la seconda viene trasformata in tensione nominale dividendola per l'area della sezione trasversale del campione (dati delle misurazioni riportati in Tabella 2.3).

Famiglia di campioni	Lunghezza (mm)	Spessore medio (mm)	Larghezza media (mm)	Area (mm ²)
Sani	11.143 ± 0.690	2.646 ± 1.258	3.206 ± 0.741	7.712 ± 2.362

Tabella 2.3 – Misurazioni ottenute per le prove di Carico-Scarico

Come esposto nel paragrafo antecedente, i primi due campioni sottoposti a una deformazione del 15% e 20% rispettivamente sono serviti solo per una valutazione progressiva del protocollo e peraltro non verranno elaborati successivamente.

Ogni prova fornisce i dati provenienti dalle due serie di cicli, ed essendo ogni serie composta da tre cicli di carico-scarico, sono estraibili sei curve distinte raffiguranti il comportamento tenso-deformativo del singolo campione (in Figura 2.6 l'esempio del campione corneale CH15 deformato al 30%). Come è possibile notare dalla loro rappresentazione, e successivamente confermato dai valori espressi nella Tabella 2.4, la risposta tenso-deformativa del provino all'interno della stessa serie di cicli segue un andamento di stabilizzazione. Il primo ciclo di ogni serie mostra una elevata tensione e una superiore area tra le curve di carico e scarico (soprattutto relativamente alla prima, inferiore, velocità di deformazione), valori che tendono poi a diminuire nei due cicli successivi.

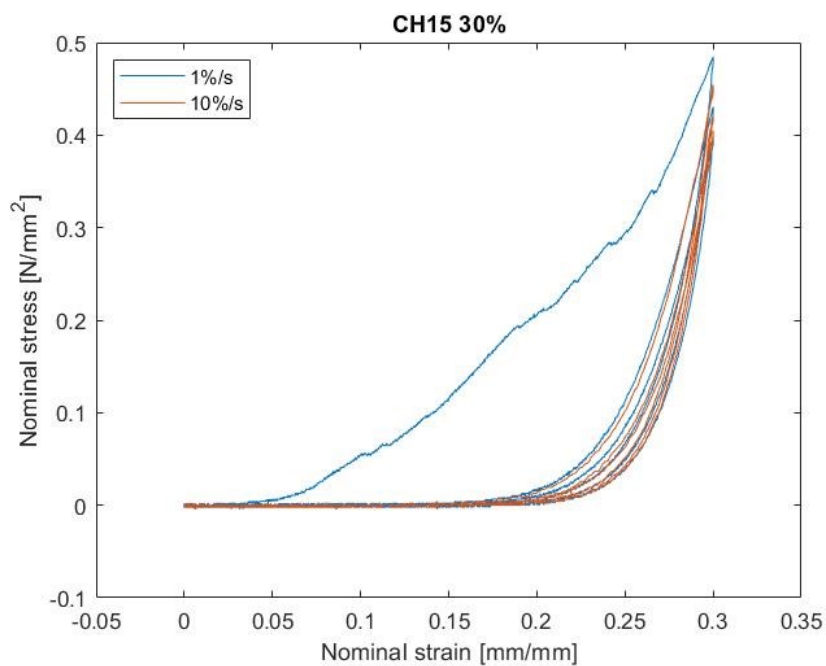


Figura 2.6 - Andamento delle curve tenso-deformative di carico-scarico relative al campione corneale 15

Campione	Velocità di deformazione	Area ciclo 1	Area ciclo 2	Area ciclo 3	Stress massimo ciclo 1 (N/mm ²)	Stress massimo ciclo 2 (N/mm ²)	Stress massimo ciclo 3 (N/mm ²)
CH15	1 %/s	0.033	0.006	0.004	0.485	0.431	0.396
	10 %/s	0.004	0.002	0.002	0.454	0.422	0.405
CH16	1 %/s	0.086	0.023	0.017	1.101	1.007	0.953
	10 %/s	0.018	0.010	0.008	1.043	0.984	0.948
CH17	1 %/s	0.027	0.011	0.008	0.461	0.413	0.387
	10 %/s	0.009	0.006	0.005	0.473	0.442	0.424
CH18	1 %/s	0.075	0.018	0.010	1.209	1.047	0.953
	10 %/s	0.0133	0.007	0.007	1.003	0.941	0.898
CH19	1 %/s	0.021	0.005	0.004	0.319	0.291	0.274
	10 %/s	0.004	0.002	0.001	0.330	0.304	0.290

Tabella 2.4 - Valori di area e stress massimo raggiunto dai cicli successivi di carico-scarico

Per un'analisi più rapida e corretta vengono presi in considerazione solamente i valori estratti dall'ultimo ciclo di carico-scarico relativo ed entrambe le velocità di deformazione, ciclo nel quale la tensione massima raggiunta e l'andamento del modulo di rigidezza tangenziale sembrano stabilizzarsi.

Successivamente, per poter valutare l'incidenza della velocità di deformazione nel comportamento di carico sono state estratte, raggruppate e visualizzate tutte le curve di carico relative alla velocità di 1%/s e comparate con quelle ottenute dalla velocità deformativa del 10%/s. Visivamente le curve di carico mostrano il tipico carattere viscoelastico del tessuto corneale, evidenziando le già analizzate due zone lineari di risposta alla trazione. Inoltre, le curve relative alle due differenti velocità di deformazione a cui ogni singolo campione è sottoposto risultano molto simili (Figura 2.7) e sembrano presupporre per il tessuto un comportamento tenso-deformativo pressoché indipendente dalla velocità di deformazione a cui esso viene sottoposto. Questo coincide con diversi risultati riscontrati in letteratura (Tonsomboon et al., 2014, Elsheikh et al., 2011), per i quali determinati rapporti deformativi applicati non sembrano influenzare in modo concreto la risposta del tessuto, portando a una curva caratterizzata da simili moduli elastici in entrambe le zone della bi-linearità.

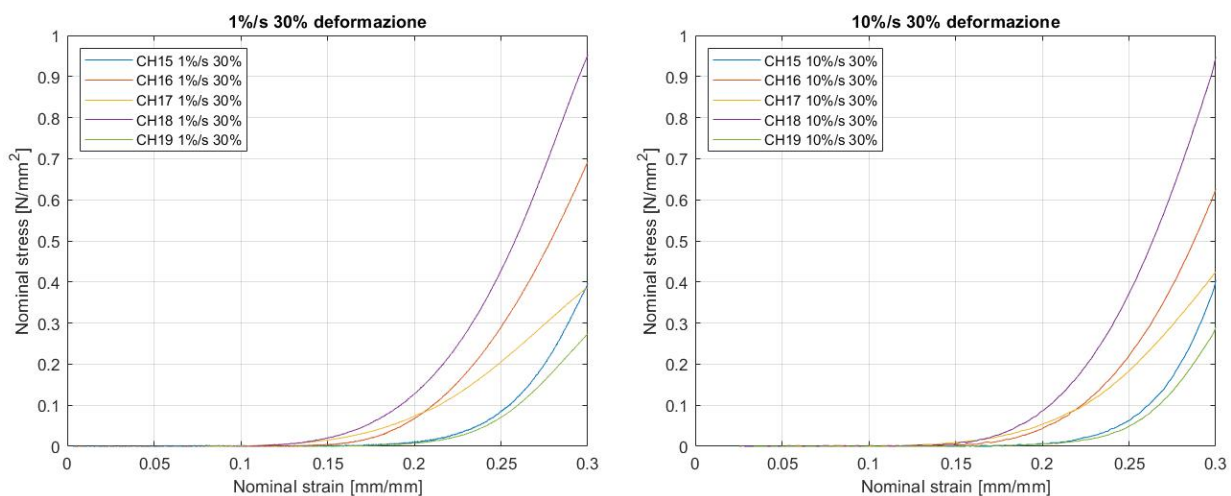


Figura 2.7 - Curve di carico relative alle due differenti velocità di deformazione

Per individuare e quantificare eventuali differenze nella risposta tenso-deformativa sono stati estratti i moduli di rigidezza longitudinale, o moduli di Young, similmente a come precedentemente eseguito per le prove di fallimento. I dati provenienti dalle curve di carico del singolo campione, considerando entrambe le velocità di deformazione, sono stati interpolati linearmente nelle due zone di linearità per poter estrarre la pendenza della curva, corrispondente al modulo di Young.

I dati sono poi rappresentati statisticamente tramite box plot in Figura 2.8, indicando con E1 ed E2 i moduli elastici estratti relativamente dalla prima e seconda zona della bilinearità, e con 1% e 10% le differenti velocità deformative. Dalla rappresentazione dei dati è possibile notare come i moduli elastici longitudinali relativi alle curve di carico ottenute con diverse velocità di deformazione risultino molto simili, mostrano un'ampia eterogeneità di valori nei campioni e un leggero aumento di rigidità media relativo alla seconda velocità, sottolineando come quest'ultima non influenzi in maniera statisticamente significativa la risposta tenso-deformativa, o almeno non con i rapporti deformativi qui presi in considerazione.

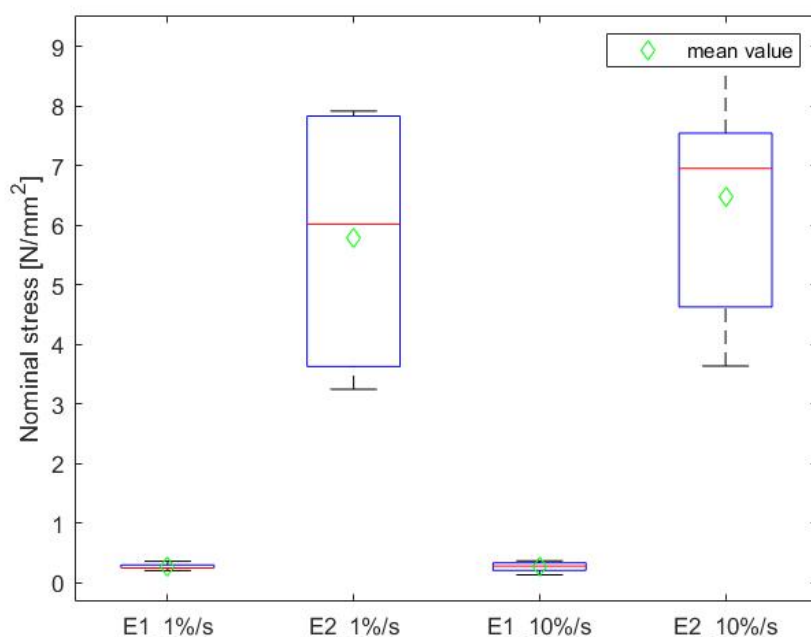


Figura 2.8- Rappresentazione box plot dei moduli di Young relativi alle prove di carico - scarico

Essendo l'equazione che lega tensione nominale e deformazione di tipo esponenziale, se differenziata produce una relazione lineare che lega il valore del modulo tangenziale all'aumento di tensione ($E - \sigma$). Questo andamento è rappresentato in Figura 2.9 e nuovamente, oltre a mostrare la variabilità dei campioni, presenta due curve di irrilevante differenza.

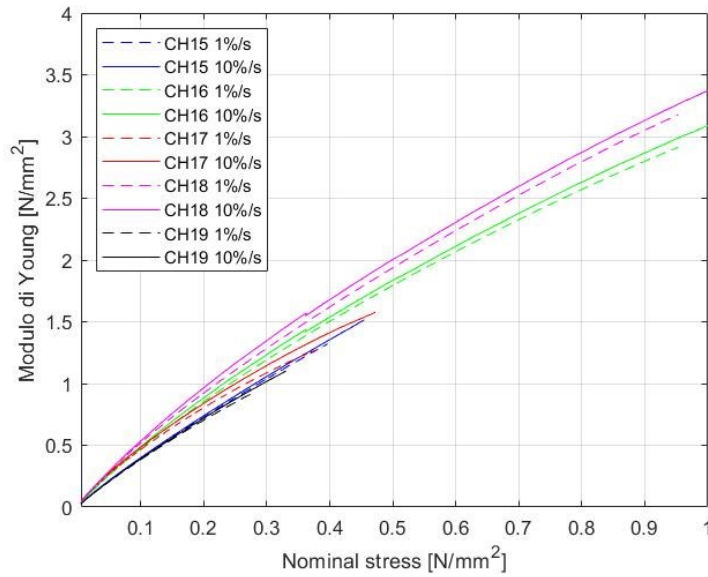


Figura 2.9 - Variazione del modulo tangenziale rispetto la tensione nominale

Come informazione aggiuntiva per la comparazione è stato estratto, e poi mediato sulla famiglia di campioni, il valore di tensione raggiunto da entrambe le curve di carico per i livelli deformativi pari al 25% e 30%. Questa elaborazione è stata svolta relativamente ad entrambe le velocità di deformazione e raffigurata statisticamente tramite box plot in Figura 2.10.

Dalla rappresentazione dei dati è possibile notare come, nonostante l'ampia variabilità nelle tensioni raggiunte da parte dei campioni (riscontrabile anche in Figura 2.8), mediamente i provini tendono a raggiungere un valore di stress molto simile raggiunti gli stati deformativi di 25% e 30%, considerando entrambe le velocità di deformazione.

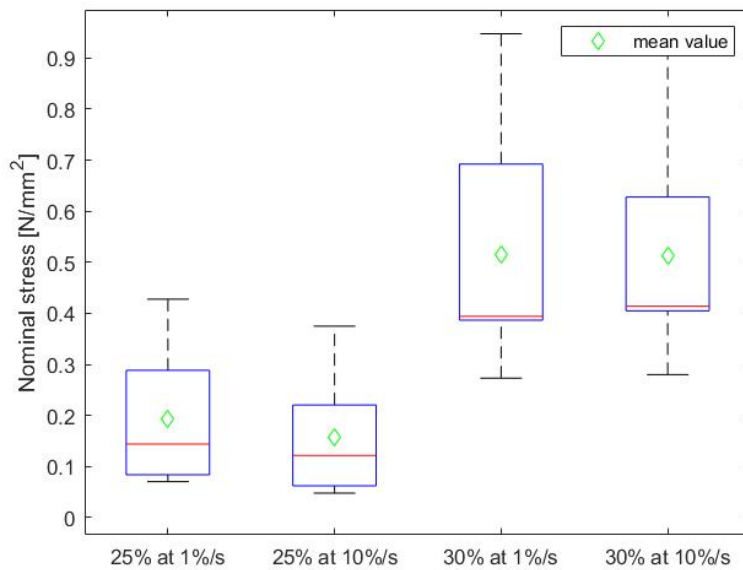


Figura 2.10 - Rappresentazione box plot delle tensioni agli stati deformativi del 25% e 30%

CAPITOLO 3

TRATTAMENTI E PROVE SPERIMENTALI SU CORNEA SANA, LESIONATA E TRATTATA

Nelle ultime decadi sono state ipotizzate e introdotte numerose terapie con lo scopo di rallentare e addirittura arrestare il corso di diverse patologie corneali. Una delle più comuni patologie è la cheratite, una risposta infiammatoria sintomatica ad eventi avversi come traumi o elementi estranei. Nella maggior parte dei casi le cheratiti sono di tipo infettivo, provocate da agenti patogeni come batteri, funghi o virus, ma non mancano le cheratiti provocate da penetrazione di oggetti nel bulbo oculare o traumi chirurgici. In generale la sintomatologia comprende dolore oculare, fotofobia, iperemia, progressiva opacizzazione corneale e annebbiamento della vista. Altre patologie possono interessare la cornea principalmente dal punto di vista strutturale, come la cheratectasia, un locale assottigliamento della cornea, e il cheratocono. Quest'ultimo è definito come una malattia cronica degenerativa che si presenta come una dilatazione progressiva e non infiammatoria del tessuto corneale. La graduale perdita di struttura e rigidità è da attribuirsi all'indebolimento dei legami tra le fibre di collagene, le quali scivolano tra di loro aumentando la curvatura e producendo un assottigliamento nella zona centrale, assumendo la caratteristica forma a cono. Questo cambiamento strutturale può portare il paziente a percepire una distorsione delle immagini, miopia e astigmatismo irregolare.

3.1 Cross-Linking

Vi sono diversi metodi in letteratura (Adamiak e Sionkowska, 2020) che prendono in esame la possibilità di creazione di nuovi legami tra le fibre di collagene, in un processo definito come cross-linking, con lo scopo di migliorare struttura e resistenza del tessuto. Principalmente possono essere classificati in metodi chimici e fisici: i primi sfruttano l'interazione tra collagene e agenti chimici tramite gruppi funzionali, con lo svantaggio di una potenziale tossicità e incompatibilità biologica; i secondi invece si avvalgono di fenomeni fisici come irradiazione, disidratazione e riscaldamento, con il beneficio di non introdurre nessun prodotto chimico nel tessuto e causare un eventuale danno biologico.

Un metodo fisico di ottenimento di cross-linking corneale (CXL) comune e molto frequente in letteratura vede l'utilizzo dell'azione combinata di riboflavina, o vitamina B2, e irradiazione UV a 370 nm, metodo introdotto nei lavori di Wollensak come possibile cura corneale del cheratocono (Wollensak et al., 2003). I principi di funzionamento di questo metodo si basano

sull'attitudine da parte della irradiazione UV nel formare radicali liberi partendo da gruppi aromatici di amminoacidi presenti nel collagene, come tirosina e fenilalanina. I radicali liberi così generati interagiscono tra loro sotto forma di legame chimico covalente, modificando la futura risposta biomeccanica del collagene e della struttura corneale (Adamiak e Sionkowska, 2020). Nonostante i vantaggi dovuti alla sterilizzazione, alla fisicità della metodologia e il relativo non utilizzo di potenziali agenti citotossici, l'utilizzo di sola radiazione UV non permette di ottenere una sufficiente densità finale di cross-linking. Per questo motivo è necessario l'utilizzo parallelo di una specie fotoreattiva, come la riboflavina, in grado di aumentare notevolmente la formazione di legami inter e intramolecolari tra le fibre di collagene e raggiungere un adeguato miglioramento.

Successivamente alle prime dimostrazioni di efficacia nell'applicazione di questo trattamento per la cura umana del cheratocono, numerosi studi nelle ultime decadi hanno confermato come una terapia di CXL risulti in un miglioramento della biomeccanica della cornea tramite la formazione di nuovi legami chimici, stabilizzando e arrestando la progressione della malattia. In seguito, nel campo delle patologie oftalmiche, l'attenzione si è spostata su casi di cheratectasia e cheratite infettiva, dimostrandosi una terapia efficace e poco invasiva (Zhang et al., 2015). Meritevole di menzione è anche la comprovata capacità sterilizzante dimostrata dalla radiazione UV alla specifica lunghezza di 235 nm, in grado di danneggiare il materiale biologico dei microrganismi patogeni.

Nonostante i numerosi benefici dimostrati da questo trattamento nella sterilizzazione, nell'arrestamento della progressione di diverse patologie oculari e un miglioramento generale delle condizioni del tessuto corneale, esso è comunque soggetto a diverse limitazioni (Spoerl et al., 2007). Un processo caratterizzato da elevata accelerazione o alta intensità di flusso (limite stimato a 3 mW/cm^2) potrebbe danneggiare diverse strutture tessutali come retina, cristallino ed endotelio corneale. Inoltre, una scorretta irradiazione della riboflavina potrebbe dare origine a una condizione di ipossia, ovvero una carenza di ossigeno a livello del tessuto, impendendo la formazione di radicali liberi e la conseguente creazione di legami covalenti tra le molecole di collagene. L'esposizione a luce ultravioletta e radicali liberi ha in aggiunta un effetto avverso sulla principale componente cellulare dello stroma, i cheratociti, i quali subiscono un lieve processo di morte cellulare. Questo evento sfavorevole non è considerabile come critico vista la capacità di riproduzione dei cheratociti stessi, che riporteranno il tessuto a una condizione di controllo in approssimativamente sei mesi.

In conclusione, l'utilizzo di irradiazione UV in combinazione con riboflavina come metodo di ottenimento di cross-linking, se applicato seguendo determinati limiti e parametri, è risultato

efficace nel contrastare numerose patologie che affliggono il tessuto corneale, migliorandone anche la risposta meccanica.

Recentemente nel Laboratorio dei Tessuti Biologici dell'università di Padova è stata valutato l'effetto della nota terapia con azione combinata di irradiazione UV e riboflavina sulle proprietà meccaniche viscoelastiche del tessuto corneale (Fontanella et al., 2021). I risultati delle prove mostrano come le famiglie di campioni lesionati e trattati subiscano delle modificazioni strutturali sia a livello degli elementi fibrosi che alla matrice di base, provocando una progressiva e significativa modifica di rigidità e risposta del tessuto. A differenza dello studio a cura di Wollensak, precedentemente menzionato, in questo caso sia le famiglie di campioni lesionati che trattati mostrano una notevole diminuzione di rigidità, contrariamente ai benefici che il trattamento di CXL dovrebbe portare al tessuto. Tutto questo può essere dovuto ad una comprovata peggior risposta al trattamento di cross-linking nel caso della cornea porcina rispetto a quella umana. Inoltre, la grande eterogeneità nei campioni corneali, precisamente nel loro spessore, può influire sulla caratteristica misura di assorbimento dell'irradiazione UV, condizionando il risultato finale di cross-linking e la relativa risposta meccanica.

3.2 Plasma

L'utilizzo di plasma, ovvero gas ionizzato a bassa temperatura e pressione atmosferica (CAP), è una metodologia in fase di studio e sviluppo nell'ambito della medicina umana e veterinaria, con l'obiettivo di ottenere un procedimento di guarigione non invasivo dei tessuti biologici corneali *in vivo*. Numerosi studi hanno già introdotto e dimostrato l'influenza del plasma nel campo della sterilizzazione, infiammazione, proliferazione cellulare e in generale il suo possibile impiego nel processo di guarigione di una ferita.

Un protocollo noto (Martines et al., 2009) per la produzione di plasma si avvale di uno strumento composto da due tubi coassiali, uno esterno costruito con materiale conduttore (rame) e uno interno isolante (polietilene), entrambi chiusi a una propria estremità tramite una griglia in ottone. La fonte energetica del dispositivo risiede in un trasmettitore a potenza costante e frequenza modulabile in serie con un circuito LC, costituendo così un complessivo circuito elettrico in grado di generare in uscita una risonanza ad una frequenza attorno a 5 MHz e applicare una differenza di potenziale tra le due griglie in materiale conduttore. Il gas comunemente utilizzato è elio (He) puro al 99.9999%, immesso nel dispositivo con un flusso ottimale di 1.75 L/min, valore che consente di massimizzare il rapporto tra formazione stabile di plasma e consumo del gas stesso. Il processo di generazione del plasma possiede quindi

diversi parametri di modulazione: è possibile variare la distanza tra la griglia collegata al tubo conduttore rispetto a quella isolante, cambiare la velocità del flusso del gas immesso o utilizzare il trasmettitore a una frequenza variabile.

Fin dai primi approcci a questa tecnologia è risultato fondamentale lo studio di diverse configurazioni dello strumento, a flusso pulsatile o continuo, ad applicazione diretta o indiretta, ed è sorta la necessità del suo ridimensionamento, portando così alla nascita di numerosi array multijet composti da un'alta densità superficiale di micro-canali polimerici per il flusso del plasma (Sun et al., 2012).

Le principali accortezze da prendere nella produzione di plasma sono evitare l'eccessivo surriscaldamento del gas preso in considerazione e la messa a terra del tubo conduttore, evitando un possibile arco e passaggio di corrente tra l'elettrodo e il substrato su cui il test viene performato. Lavorando infatti su aree molto ridotte di materiale biologico un eventuale passaggio di corrente concentrerebbe la sua potenza, danneggiando irreversibilmente il campione in esame.

Le proprietà ad oggi dimostrate di questo trattamento, e quelle ancora sotto osservazione, sono strettamente legate alla produzione di radicali intracellulari atomici e molecolari, creati dall'influenza degli elettroni ad alta temperatura del plasma su molecole di ossigeno, azoto e acqua presenti nel flusso di elio. In particolare, vengono definite come ROS (reactive oxygen species) le famiglie di radicali liberi dell'ossigeno, come l'ossigeno atomico (O) e il gruppo ossidrilico (OH), e come RNS (reactive nitrogen species) le specie radicaliche dell'azoto, come il monossido e biossido di azoto (NO, NO₂). Un'alta concentrazione di quest'ultimo gruppo può essere identificata tramite spettrometro, con una maggioranza di emissioni nello spettro UV (Martines et al., 2009). La presenza di ROS e l'emissione di UV sono potenziali fattori di squilibrio in un tessuto vivente; in particolare, i radicali liberi possono provocare un'instabilità omeostatica chiamata stress ossidativo e la radiazione UV può in principio danneggiare il DNA provocando mutazioni cellulari. Per questo motivo dal tessuto viene estratto il valore di ossidazione intracellulare e viene misurata la presenza di dimeri di timina (TD). Le cellule tissutali sembrano sviluppare meccanismi di difesa e auto-riparazione in contrasto all'azione radicalica, meccanismi che le differenziano da batteri e agenti patogeni.

I primi utilizzi di plasma freddo risalgono al periodo che va dal 1960 al 1990, lasso di tempo in cui questa metodologia passa dall'essere applicata a bassa temperatura come un'efficace alternativa per la sterilizzazione delle superfici, al plasma atmosferico conosciuto oggi in grado di diminuire notevolmente la carica microbica. L'effetto germicida e antibatterico del freddo plasma atmosferico è stato poi successivamente ampiamente dimostrato (Laroussi et al., 2012, Fridman e Friedman, 2013) anche su tessuto corneale *in vitro* ed *ex vivo* (Martines et al., 2009,

Martines et al., 2013) mostrando come le cellule sviluppino un sistema di enzimi antiossidanti come sistema di protezione nei confronti delle ROS, al contrario degli agenti patogeni, i quali rimangono indifesi. La quantità intracellulare di ROS diminuisce infatti con andamento logaritmico, fino a raggiungere livelli di controllo in 24h. Da sottolineare come in nessun caso di studio le specie radicaliche e l'esposizione a UV abbiano provocato cambiamenti morfologici significativi del tessuto corneale, alterazioni del suo DNA o influenze negative su proliferazione di cheratociti e fibroblasti.

Di particolare attenzione la sensibilità a questo tipo di trattamento da parte di diversi patogeni responsabili di cheratiti infettive (Martines et al., 2013, Park et al., 2018), con una rapida diminuzione del loro numero in pochi minuti.

Un recente studio (Martines et al., 2020) ha confermato anche *in vivo* l'azione sterilizzante e antibatterica del trattamento con plasma atmosferico su ferite cutanee superficiali di pecora. Inoltre, l'aumento del livello di ROS intracellulari si è dimostrato un fattore promotore nel processo di guarigione della ferita: riducendo l'infiammazione, stimolando la migrazione e proliferazione cellulare, la vascolarizzazione e la produzione di annessi cutanei.

L'utilizzo di plasma atmosferico a bassa temperatura in combinazione con cellule staminali mesenchimali (MSCs) (Melotti et al., 2021) è stato preso in esame come possibile strumento di rigenerazione tissutale. I due trattamenti hanno dimostrato una reciproca interazione durante il processo di guarigione di ferite esposte su modello animale *in vivo*, portando a un miglior risultato finale di rigenerazione del tessuto rispetto al singolo trattamento plasmatico. Le capacità già note del plasma di modulare infiammazione e proliferazione cellulare si pensa possano aver influenzato l'azione paracrina delle cellule staminali mesenchimali, condizionando la secrezione di fattori di crescita e citochine nelle prime fasi del processo di guarigione. Inoltre, l'azione anti-fibrotica delle MSC è in grado di contrastare l'eccessiva contrazione della ferita indotta dal plasma, promuovendo una più fisiologica formazione e maturazione del tessuto granulare. Il risultato finale è quello di un processo di guarigione efficace ma più lungo rispetto al singolo trattamento con plasma.

Recenti prospettive si sono aperte anche riguardo l'utilizzo di tecnologia CAP nei confronti di cellule tumorali (Braný et al., 2020). La struttura e i principi di funzionamento di queste cellule cancerogene si mostrano inclini ad una potenziale influenza da parte delle specie radicaliche generate dal flusso plasmatico. Le cellule tumorali producono loro stesse ROS e RNS in modo da aumentare il loro potere proliferativo e progredire con lo sviluppo tumorale. Inoltre, una secrezione di specie antiossidanti è necessaria per mantenere un delicato equilibrio nel livello di ROS intracellulari, equilibrio che se alterato può risultare letale per la cellula stessa. Caratteristiche come un maggior numero di acquaporine e una maggior sensibilità alla

formazione di pori di membrana facilitano la diffusione e penetrazione di ROS indotti dal flusso plasmatico, aumentandone il loro livello oltre a una soglia critica per la sopravvivenza cellulare. Prove in vivo su modelli animali e pazienti umani hanno finora evidenziato una notevole capacità di riduzione della crescita tumorale senza portare a significanti effetti collaterali. In generale, l'utilizzo di CAP ha evidenziato in diverse cellule tumorali la promozione di fenomeni di apoptosi cellulare, inibizione della crescita, alterazione del metabolismo cellulare, danneggiamento a livello di DNA e morte cellulare immunogenica.

Dunque, gas ionizzati sotto forma di freddo plasma atmosferico hanno dimostrato numerosi benefici in diversi campi della medicina moderna, conferendo un aumento proliferativo in diverse colture cellulari e staminali, un effetto antitumorale e un importante ruolo nella rigenerazione del tessuto e nel processo di guarigione di una ferita. Quest'ultimo è reso possibile dalla loro abilità di prendere di mira agenti patogeni senza alcun danneggiamento delle cellule sane. Nonostante questo, l'utilizzo di questa tecnologia dev'essere contenuto ad un corretto dosaggio e applicato seguendo protocolli accertati, onde evitare la creazione di elementi dannosi ed effetti avversi delle specie radicaliche. Malgrado gli studi attuali su queste tecnologie siano principalmente focalizzati su strutture superficiali di modelli animali e linee cellulari, vista la maggior facilità di ottenimento e lavorazione, un ampliamento di utilizzo su pazienti umani e strutture interne può rivelarsi vantaggiosa, impattando sia sul lato economico che sull'invasività del paziente (Braný et al., 2020).

3.3 Comportamento meccanico: Prove di Stress-Relaxation

3.3.1 Protocollo

In questa sezione sono esposte diverse prove di stress-relaxation a trazione monoassiale eseguite su campioni di cornea animale conservati e trattati con differenti metodologie, necessari da distinguere e comprendere per la valutazione dei risultati finali.

Viene fatta inizialmente distinzione tra campioni di cornea fresca e in coltura, i primi vengono recuperati da suini macellati il giorno stesso delle prove e trasportati in laboratorio in un arco temporale di ore, mentre i secondi vengono estratti sette giorni precedenti alla prova e conservati in flaconi contenenti Carry-C. Quest'ultimo è definito come un mezzo di coltura specifico per la preservazione corneale, in grado di mantenere la trasparenza tramite uno stato di disidratazione e capace di proteggere il tessuto da batteri e funghi grazie all'aggiunta di una soluzione antimicotica e antibatterica.

Nel caso invece di utilizzo di cornee lesionate si fa riferimento a un protocollo (Perazzi et al., 2020) consistente in una lesione di tipo chimico indotta da un disco imbevuto in idrossido di sodio (commercialmente soda caustica), il quale viene posizionato per un minuto al centro della superficie oculare, per poi essere risciacquata con soluzione PBS. Questa procedura mira a simulare un danno fisiologico alla struttura del tessuto e un relativo indebolimento dal punto di vista meccanico, il quale può essere il risultato di diverse patologie oftalmiche degenerative.

I protocolli relativi ai trattamenti svolti precedentemente alle prove di trazione riportati in questo lavoro di Tesi comprendono il Cross-Linking corneale (CXL), per il quale il campione viene sottoposto a un ciclo di tre minuti di terapia con azione combinata di irradiazione UV e riboflavina; e di elio plasma, durante il quale l'intera superficie del bulbo oculare viene trattata con freddo gas ionizzato a bassa temperatura e pressione atmosferica per cicli della durata di pochi minuti.

I test di stress-relaxation sono fondamentali per valutare il comportamento viscoelastico di un materiale quando questi è sottoposto a una deformazione costante nel tempo. In questo lavoro di Tesi i campioni di cornea porcina sono sottoposti a una trazione uniassiale quasi istantanea fino al raggiungimento di graduali stati deformativi, stati che vengono mantenuti costanti temporalmente così da permettere l'analisi del rilassamento delle tensioni nel tessuto, comportamento tipico dei materiali viscoelastici.

Protocolli di stress-relaxation, le cui specifiche verranno esposte per quanto possibile in seguito, sono stati eseguiti sia tramite macchinario Biomomentum che tramite banco di prova Bose Electroforce.

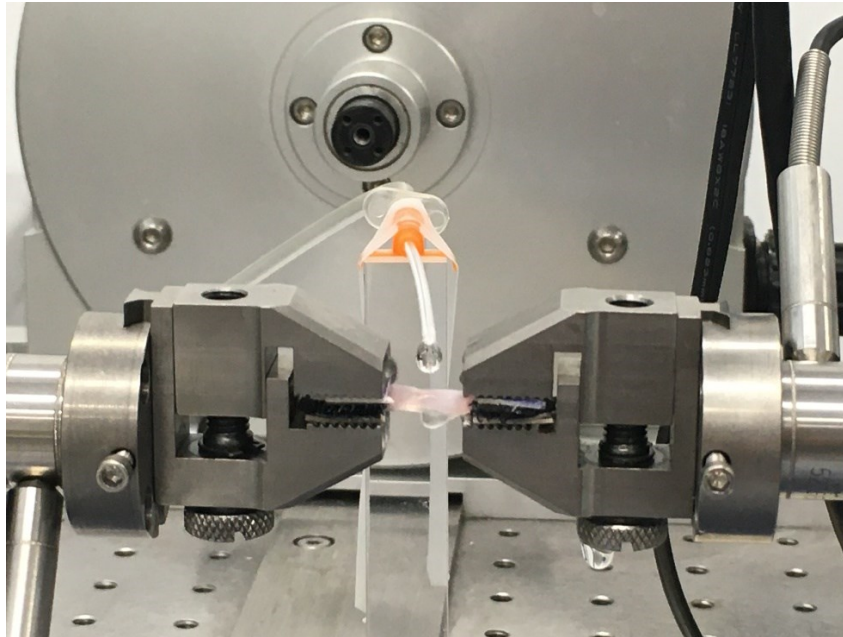


Figura 3.1 - Campione di cornea durante prova di stress-relaxation tramite macchinario Bose® ElectroForce®

Per la serie di prove di stress-relaxation svolte tramite l'utilizzo del macchinario Biomomentum questi viene utilizzato in configurazione monoassiale con una cella di carico con fondo scala a 250 N. Il protocollo validato per questa serie di test si compone di una fase iniziale di calibrazione e preconditioning, composta dalle stesse istruzioni analizzate per le precedenti prove di trazione, seguita dal comando *Stress Relaxation* per l'attuazione della prova vera e propria. L'istruzione consiste nella sottoposizione del campione a 4 rampe di deformazione progressiva, ciascuna mantenuta costante per un tempo di 400 s. Il campione viene così portato con una velocità pressoché istantanea (considerando il limite macchina stimato di 70 mm/s) ad una deformazione incrementale dell'8, 16, 24, 32% e mantenuto in quel determinato stato deformativo per il tempo prestabilito così da poterne analizzarne il rilassamento tensionale (Figura 3.2).

Le prove svolte tramite macchinario Bose Electroforce seguono lo stesso protocollo, costituito da una fase iniziale di preconditioning che precede la prova di trazione in esame, caratterizzata dagli stessi livelli deformativi e tempi di rilassamento.

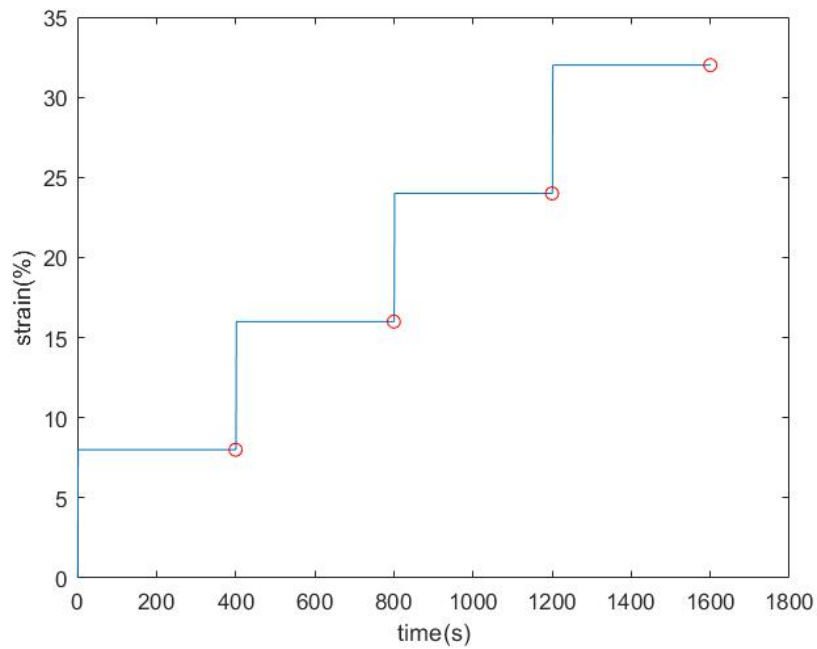


Figura 3.2 - Protocollo di stress-relaxation

Per quanto concerne la scelta dei campioni, nel caso del macchinario Biomomentum è stato utilizzato un solo set di cornee suine sane e fresche, con lo scopo di testare il protocollo sperimentale e produrre una prima elaborazione dei dati.

Successivamente, tramite macchinario Bose Electroforce, sono stati esaminati i campioni evidenziati in Tabella 3.1, comprendenti i principali tessuti in esame in questo lavoro di Tesi, ovvero i campioni corneali sottoposti al trattamento con freddo plasma atmosferico. Queste ultime prove, e quelle future già calendarizzate, andranno a integrare il lavoro già svolto presso il Laboratorio dei Tessuti Biologici focalizzato sulla risposta meccanica del tessuto corneale, comprendente numerose combinazioni di campioni sani, lesionati, freschi, in coltura e trattati.

	n. campioni testati		n. campioni testati
Cornea sana, senza coltura, senza trattamento (HFN)	8	Cornea sana, in coltura, senza trattamento (HCN)	3
Cornea lesionata, senza coltura, senza trattamento (LFN)	5	Cornea lesionata, in coltura, senza trattamento (LCN)	5
Cornea sana, senza coltura, trattamento CXL (HFY)	4	Cornea sana, in coltura, trattamento CXL (HCY)	4
Cornea lesionata, senza coltura, trattamento CXL (LFY)	5	Cornea lesionata, in coltura, trattamento CXL (LCY)	8
Cornea lesionata, in coltura, trattamento al plasma 2 minuti (LCP2)	7	Cornea lesionata, fresca, trattamento al plasma 2 minuti (LFP2)	6
Cornea sana, senza coltura, trattamento al plasma 2 minuti (HFP2)	7	Cornea sana, senza coltura, trattamento al plasma 4 minuti (HFP4)	6
Cornea sana, in coltura, trattamento al plasma 2 minuti (HCP2)	6	Cornea sana, in coltura, trattamento al plasma 4 minuti (HCP4)	6
Cornea lesionata, in coltura, trattamento al plasma 4 minuti (LCP4)	4		

Tabella 3.1 - Elenco dei campioni testati, in evidenza i campioni trattati con plasma

Legenda

H – Cornea sana

L – Cornea lesionata

F – Cornea fresca

C – Cornea in coltura

N – La cornea non ha subito trattamenti

P2 – Trattamento al plasma 2 minuti

P4 – Trattamento al plasma 4 minuti

Y – Trattamento CXL

3.3.2 Analisi ed elaborazione dei dati sperimentali

I valori in output del software per l'analisi della prova si dividono nel vettore deformativo e quello delle forze rilevate dal macchinario rispetto al tempo. Queste ultime per poter essere visualizzate, analizzate e confrontate devono essere prima convertite in Newton, sottoposte a un filtraggio passa-basso di 0.02 N per compensare la sensibilità del macchinario e rapportate alla stima di area trasversale del campione corneale, ottenendo la tensione nominale. Per una corretta visualizzazione dell'andamento della curva è quindi necessario ricavare dalle foto precedentemente scattate al provino un'accurata stima di spessore, larghezza e area trasversale (riportate in Tabella 3.2).

Famiglia di campioni	Lunghezza (mm)	Spessore (mm)	Larghezza (mm)	Area (mm ²)
HFN	10	0.956 ± 0.167	5.335 ± 1.121	4.996 ± 0.927
HCN	10	1.140 ± 0.125	5.903 ± 0.228	6.748 ± 0.996
LFN	10	0.818 ± 1.88	6.850 ± 0.344	5.622 ± 1.457
LCN	10	0.844 ± 0.036	7.826 ± 0.628	6.615 ± 0.719
HFY	10	0.830 ± 0.146	9.405 ± 0.796	7.846 ± 1.730
HCY	10	1.057 ± 0.089	8.367 ± 0.719	8.838 ± 0.934
LFY	10	1.145 ± 0.156	7.586 ± 0.930	8.752 ± 2.045
LCY	10	1.501 ± 0.385	9.967 ± 0.691	13.558 ± 4.108
LCP2	10	1.249 ± 0.257	3.179 ± 0.323	3.947 ± 0.788
LFP2	10	2.189 ± 0.327	3.742 ± 0.199	8.214 ± 1.481
LCP4	10	1.381 ± 0.275	3.399 ± 0.227	4.691 ± 0.979
HFP2	10	1.894 ± 0.343	3.805 ± 0.265	7.264 ± 1.649
HFP4	10	2.187 ± 0.295	3.738 ± 0.191	8.206 ± 1.399
HCP2	10	2.639 ± 0.235	4.136 ± 0.414	10.983 ± 1.966
HCP4	10	2.295 ± 0.289	3.809 ± 0.274	8.789 ± 1.591

Tabella 3.2 - Misurazioni ottenute per le prove di stress relaxation

In Figura 3.3 sono illustrate come esempio quattro curve rappresentanti l'andamento temporale della tensione nominale ottenuta dalle cornee sane di suino testate tramite macchinario Biomomentum. Il suddetto andamento conferma già in un primo momento il carattere viscoelastico e tempo-dipendente del tessuto corneale ampiamente discusso in letteratura. La

visualizzata tensione nominale, infatti, dopo un rapido aumento dovuto all'incremento deformativo, si riduce gradualmente nel tempo, mostrando come il tessuto fatichi a mantenere lo stato deformativo e si riorganizzi internamente per minimizzare gli effetti del carico.

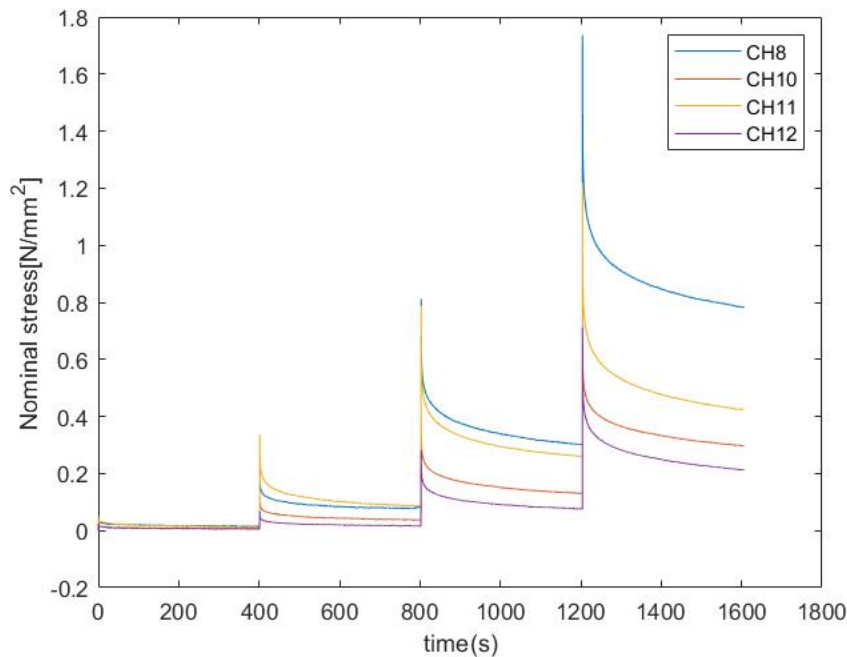


Figura 3.3 - Andamento temporale delle curve di rilassamento per i campioni di cornea sana analizzati tramite Biomomentum

Per analizzare il comportamento delle tensioni durante la prova di stress-relaxation, vengono ricavate principalmente due tipologie di curve: la prima (stress-strain) è costruita sui valori di tensione estratti una volta raggiunto l'equilibrio a 400 s per ogni step deformativo, mentre la seconda (stress-time) considera l'andamento del rilassamento delle tensioni sui 400 secondi in presenza della deformazione.

Per ogni campione di cornea sono stati quindi estratti, e poi mediati, i valori di tensione nominale all'equilibrio in corrispondenza del relativo stato di deformazione, ed è stata costruita la curva tenso-deformativa rappresentata in Figura 3.4 (a), interpolando esponenzialmente i dati sperimentali seguendo il seguente modello esponenziale:

$$\sigma(\varepsilon) = \frac{C}{\alpha} [\exp(\alpha \varepsilon) - 1]$$

La precedente equazione mira a interpretare il già noto andamento non lineare della tensione σ rispetto la deformazione ε in condizioni di carico, implementando inoltre la rigidità iniziale del tessuto C e il coefficiente α legato alla non linearità della risposta.

Le curve relative alla singola famiglia di campioni vengono poi visualizzate statisticamente tramite la loro media e deviazione standard (Figura 3.4 (b)). L'andamento tenso-deformativo e il relativo fit esponenziale confermano la non linearità nella risposta biomeccanica del tessuto, individuando una prima regione caratterizzata da minore rigidità dominata dal comportamento della ECM e una seconda regione che oppone più resistenza dovuta alla complessa organizzazione del collagene e il progressivo orientamento delle fibrille nella direzione di applicazione del carico.

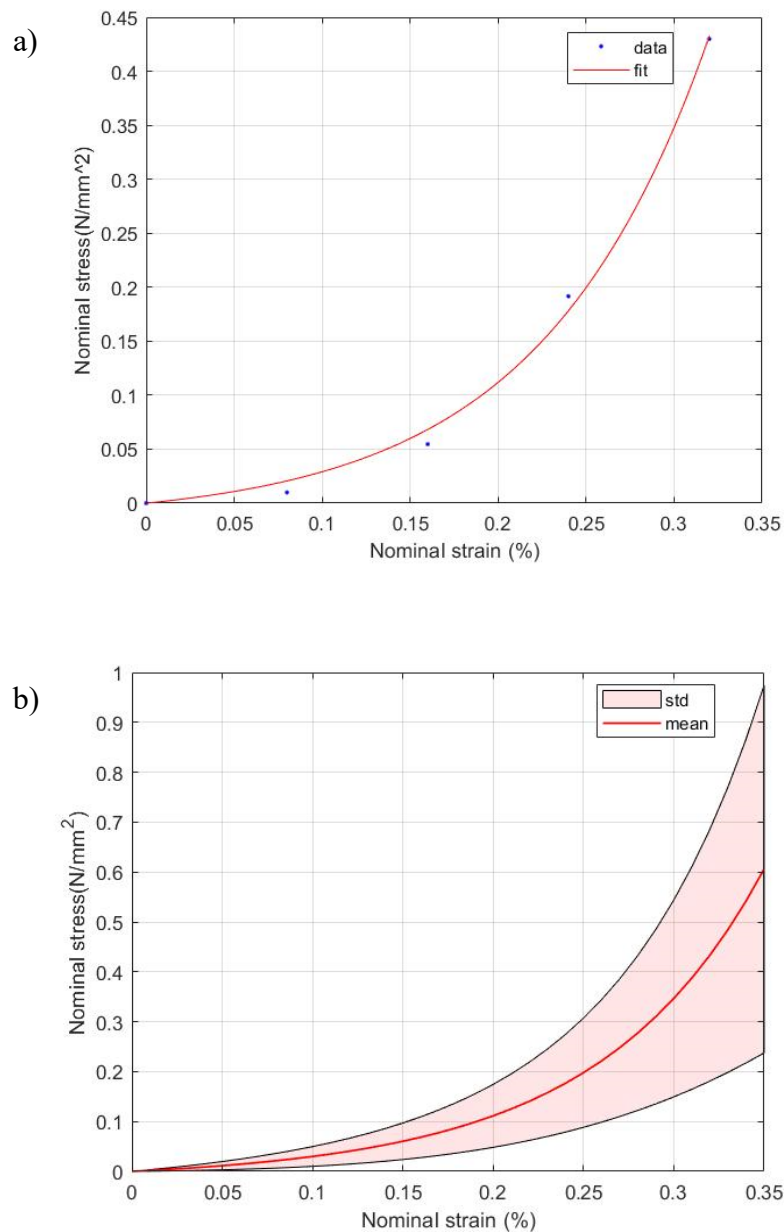


Figura 3.4 - a) applicazione del modello esponenziale ai dati di deformazione e tensione di rilassamento. b) illustrazione di media e SD

Per quanto concerne la seconda tipologia di curva di interesse, ovvero la curva che permette di visualizzare l'andamento del rilassamento delle tensioni di un determinato campione, è necessario svolgere un primo passo che consiste nell'isolare le singole curve di rilassamento

relative agli stadi progressivi di deformazione. Successivamente, eliminando la tensione residua di rilassamento della curva precedente e normalizzando ciascuna rispetto alla relativa tensione di picco, sono ottenute le cosiddette curve di tensione normalizzata (Figura 3.5), così da poterne analizzare un corretto andamento temporale.

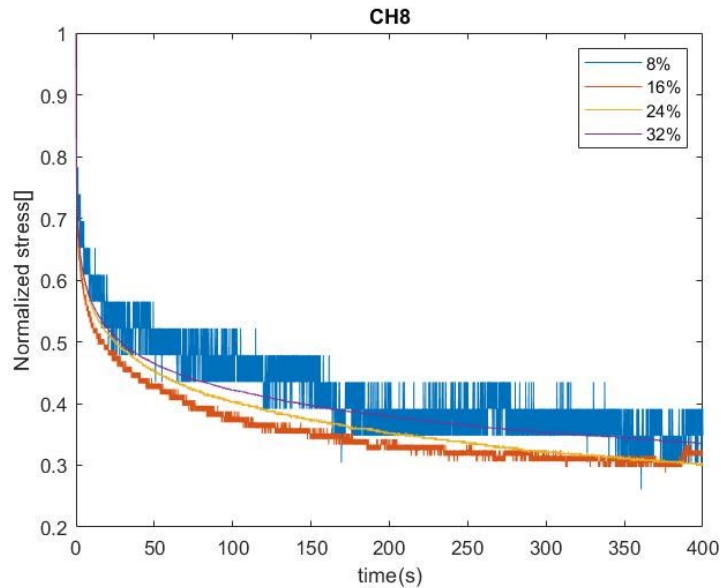


Figura 3.5 - Andamento temporale della tensione normalizzata nei progressivi step deformativi

Per poter infine ottenere un set continuo di dati e aprire la possibilità di confronto tra le diverse famiglie di tessuti corneali alle medesime condizioni di deformazione, i valori delle quattro curve relative al singolo campione sono mediati in un'unica curva di rilassamento e su quest'ultima viene applicato il seguente modello esponenziale di rilassamento a due costanti temporali:

$$\sigma(t)/\sigma_0 = 1 - A_1 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right] - A_2 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right]$$

Dove il termine a sinistra si riferisce alla tensione normalizzata, mentre A_1 , A_2 , τ_1 , τ_2 sono parametri che caratterizzano la risposta viscoelastica del tessuto. In particolare, il termine $A_\infty = 1 - A_1 - A_2$ rappresenta il rapporto tra la tensione all'equilibrio e quella di picco, mentre τ_1 e τ_2 sono definite come costanti temporali di rilassamento (Tabella 2.7). L'equazione è ideata per interpretare il decadimento temporale della tensione normalizzata tramite due principali componenti viscosi, minimizzando il numero di parametri pur valutando correttamente l'andamento dei dati sperimentali (Natali et al. 2016).

Rilevante ai fini dell'elaborazione, è importante sottolineare come la prima curva di rilassamento, ovvero quella ottenuta per una deformazione dell'8%, verrà trascurata nella

successiva costruzione del modello. La motivazione di questa esclusione risiede nella scarsità e poca rilevanza dei dati provenienti per una deformazione così bassa, soprattutto considerando i valori in output del macchinario Bose. Inoltre, sempre considerando quest'ultimo macchinario, i valori in uscita risultano separati nelle misurazioni provenienti dalle due celle di carico. Analizzando le differenze riscontrate tra l'andamento delle curve generate sui dati provenienti dalle due celle si è deciso di utilizzarne il valore medio nei passaggi di elaborazione successivi.

Come svolto precedentemente per la curva tenso-deformativa, il risultato del fit viene statisticamente rappresentato tramite la media dei campioni e la relativa deviazione standard (Figura 3.7). In questo modo è possibile ottenere, allo stesso modo per tutte le diverse tipologie di campioni, una curva rappresentante media e deviazione standard del rilassamento delle tensioni, da poter essere utilizzata come confronto.

A_1	A_2	τ_1 (s)	τ_2 (s)
0.469 ± 0.029	0.269 ± 0.022	1.242 ± 0.175	101.404 ± 1.949

Tabella 3.3 - Coefficienti del modello esponenziale di rilassamento

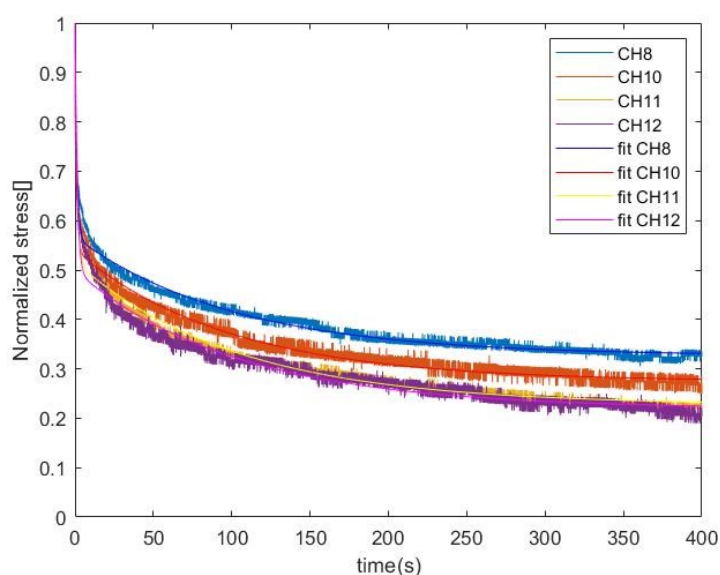


Figura 3.6 - Andamento del rilassamento delle tensioni per i singoli campioni, corretti dal fit

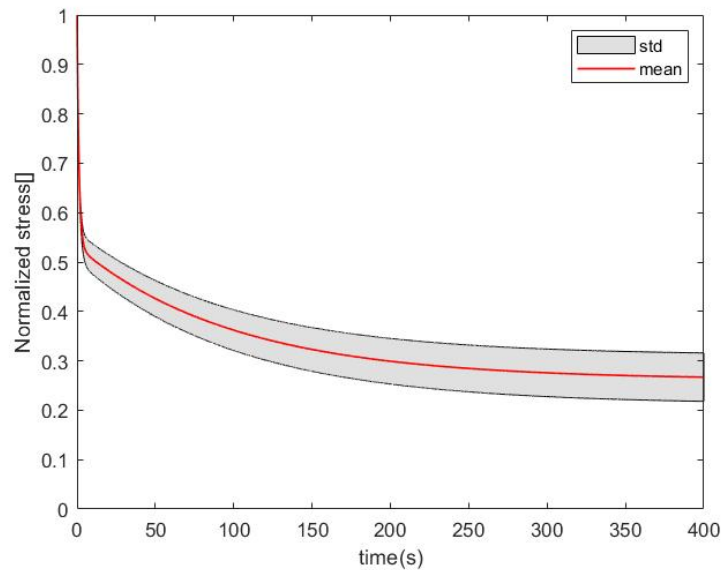


Figura 3.7 - Esempio di andamento del fit tramite media e deviazione standard

La curva di rilassamento delle tensioni normalizzate rappresenta la graduale incapacità del tessuto nel mantenere lo stato deformativo applicato, caratteristica tipica dei materiali viscoelastici, partendo dal suo massimo valore di stress e decrescendo asintoticamente nel tempo. Una curva che mostra un'elevata pendenza indica quindi un elevato grado di rilassamento, ovvero una bassa capacità di resistenza da parte del tessuto nel mantenere il carico applicato.

La precedente metodologia di estrazione ed elaborazione delle curve è applicata relativamente a tutte le combinazioni di campioni testati durante il periodo di produzione di questo lavoro di Tesi, ovvero tessuti corneali sottoposti al trattamento plasmatico, e successivamente confrontate con valori precedentemente ottenuti nel corso di un più ampio lavoro sulla caratterizzazione della meccanica corneale in seguito a differenti potenziali terapie (vedi Tabella 3.1).

I valori provenienti dai campioni corneali lesionati, trattati con plasma e conservati in mezzo di coltura non sembrano evidenziare una significativa differenza di risultati per quanto concerne la variabile della durata del trattamento (Figura 3.8). I campioni trattati per cicli di 2 e 4 minuti risultano avere un'ampia variabilità di risposta meccanica ma in media tendono a seguire una simile curva tenso-deformativa.

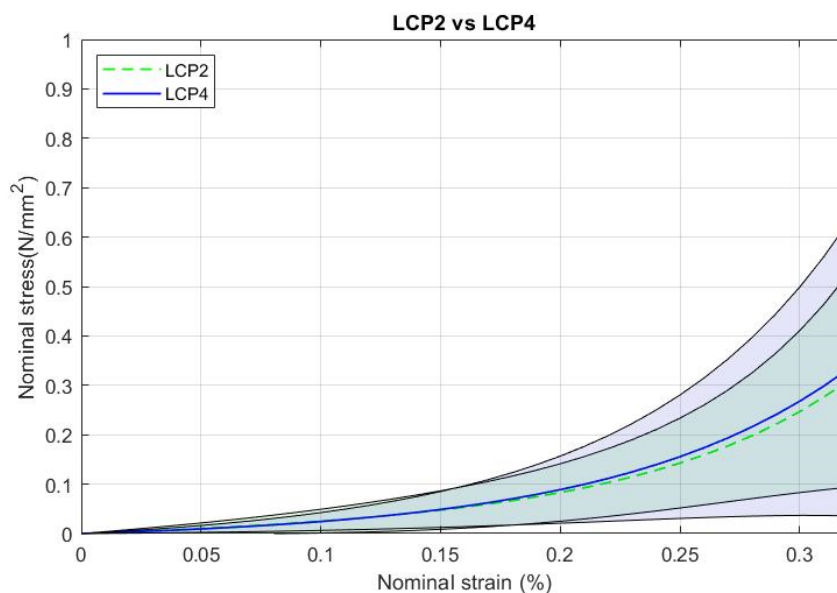


Figura 3.8 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee lesionate, in coltura e trattate con plasma

Analoghe conclusioni possono essere tratte dalle curve di rilassamento costruite sui dati di questi due famiglie di campioni, le quali differiscono in maniera trascurabile (Figura 3.9).

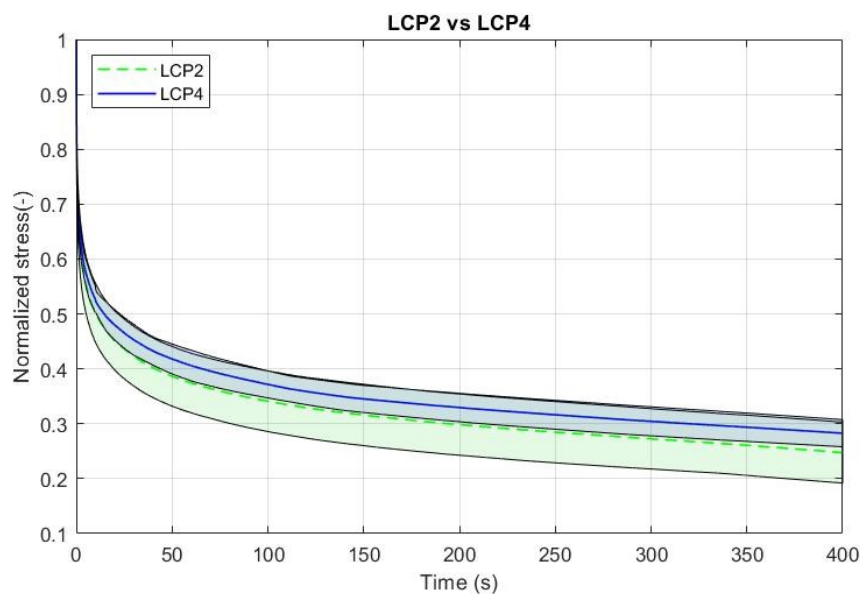


Figura 3.9 - Rilassamento dello stress relativo a cornee lesionate, in coltura e trattate con plasma

Comparando invece queste due risposte a una famiglia di campioni corneali sani, freschi e non trattati (Figura 3.10) è possibile vedere come la risposta tenso-deformativa dei provini sottoposti al trattamento tenda ad assumere valori di rigidità dalle due alle tre volte inferiori, effetto probabilmente dovuto alla condizione di lesione del provino e alla scarsa efficacia del trattamento nel ripristinare il comportamento del tessuto corneale sano.

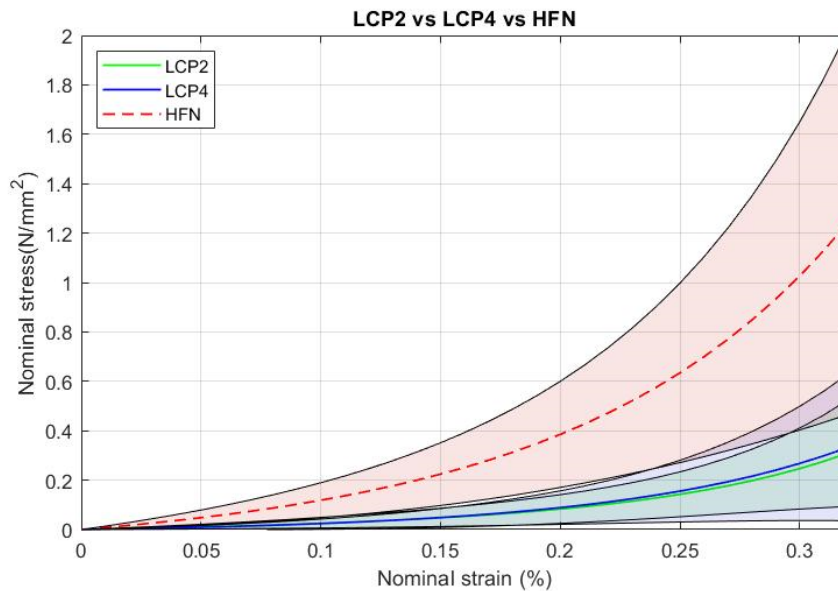


Figura 3.10 - Andamento tenso-dermativo confrontato con campione sano e fresco

Passando alla visualizzazione del rilassamento delle tensioni è possibile notare come le cornee lesionate e trattate con plasma posseggano un grado di rilassamento molto simile a quelle sane, fresche e non trattate (Figura 3.11).

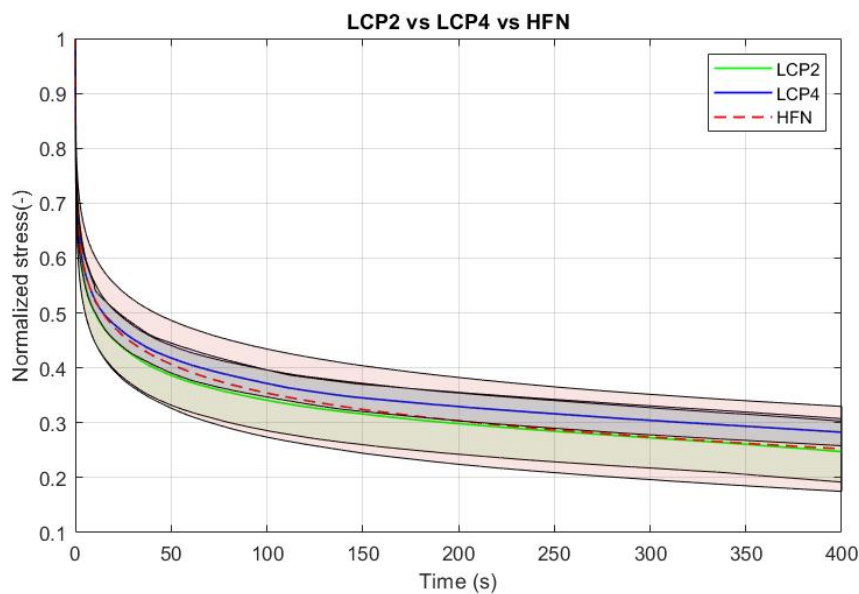


Figura 3.11 - Rilassamento dello stress confrontato con campione sano e fresco

Il processo stesso di conservazione del campione in medium di coltura per i sette giorni precedenti alla prova di trazione dev'essere considerato come fattore condizionante la risposta meccanica del provino. In Figura 3.12 è possibile analizzare il comportamento di famiglie di campioni corneali sia sani che lesionati, paragonati tra di loro tramite la variabile qui presa in considerazione, ovvero la condizione di freschezza e coltura del campione. Riscontrabile come i campioni di cornea fresca (contrassegnati nel grafico da linea tratteggiata), soprattutto nel caso di cornea sana e non lesionata, esprimano un comportamento notevolmente più rigido rispetto a quelli mantenuti in coltura.

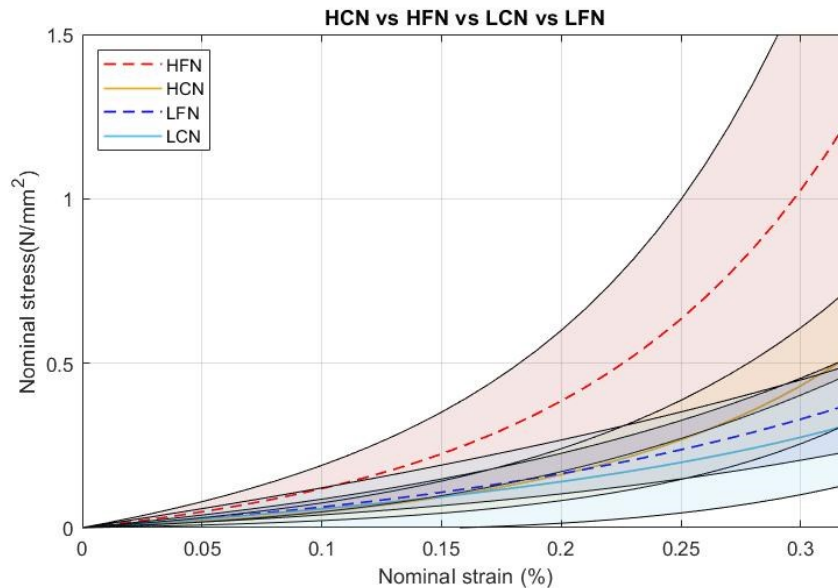


Figura 3.12 - Andamento tenso-deformativo di campioni freschi e in coltura

La condizione di coltura non risulta invece influire in modo rilevante sui tempi di rilassamento dei campioni corneali, portando a curve di rilassamento delle tensioni molto simili (Figura 3.13). L'andamento di queste curve mostra anche come la condizione generale di lesione

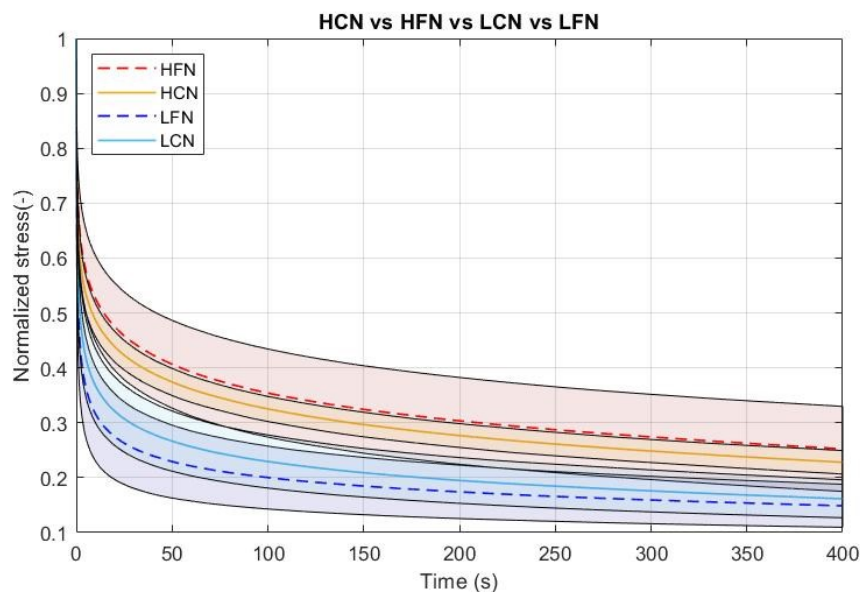


Figura 3.13 - Rilassamento dello stress dei campioni freschi e in coltura

influisca sul carattere viscoelastico del tessuto. La modificazione strutturale subita dalla cornea determina un danneggiamento alle fibre di collagene e una conseguente influenza negativa sulla capacità di sopportazione del carico, la quale è riscontrabile in una inferiore rigidità e un maggior grado di rilassamento.

Per constatare se il trattamento con freddo plasma atmosferico migliori effettivamente la risposta tenso-deformativa di un campione corneale sottoposto a lesione, in Figura 3.14 sono rappresentate le curve relative alle famiglie di campioni lesionati mantenuti in coltura sottoposti, e non, alle diverse tempistiche di terapia plasmatica. Osservabile come la suddetta terapia, considerando entrambi i minutaggi di esposizione al plasma, non sembri alterare in maniera significativa la rigidità meccanica del campione lesionato.

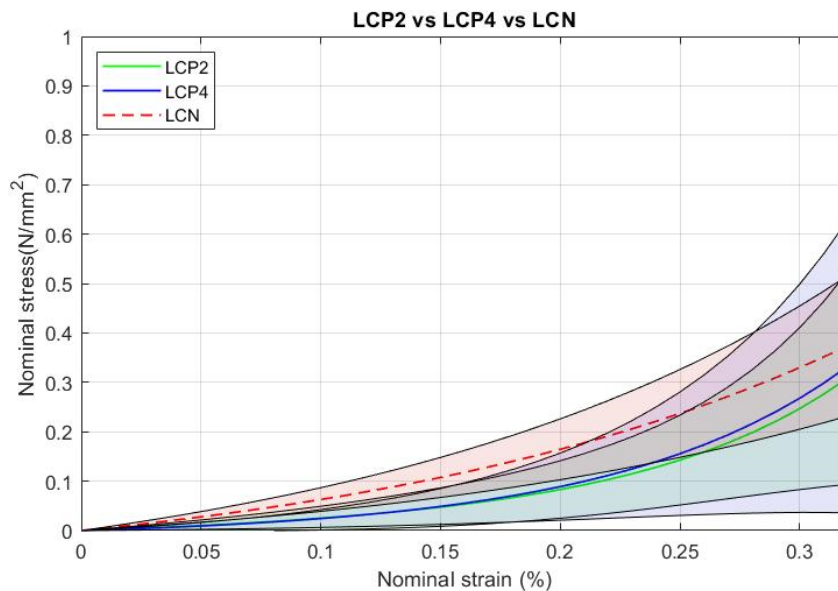


Figura 3.14 - Andamento tenso-dermativo confrontato con campione lesionato e in coltura

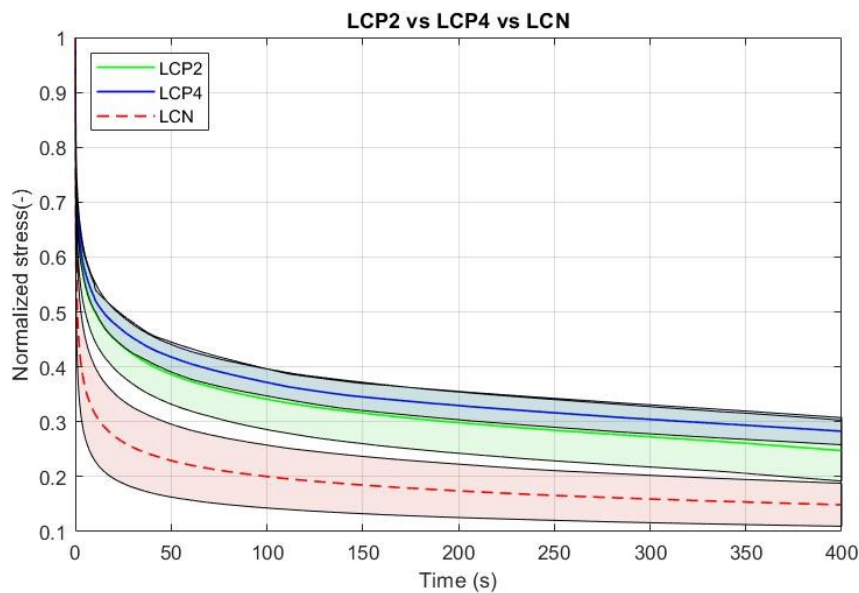


Figura 3.15 - Rilassamento dello stress confrontato con campione lesionato e in coltura

L'applicazione del trattamento sembra invece, nuovamente, migliorare considerevolmente il grado di rilassamento del tessuto, producendo una curva di minore pendenza rispetto a un campione non trattato (Figura 3.15).

Rimanendo nel campo dei campioni corneali sottoposti a lesione, anche nel caso di cornea fresca un ciclo di terapia plasmatica a due minuti non sembra influenzare in maniera apprezzabile la risposta tenso-deformativa del campione (Figura 3.16).

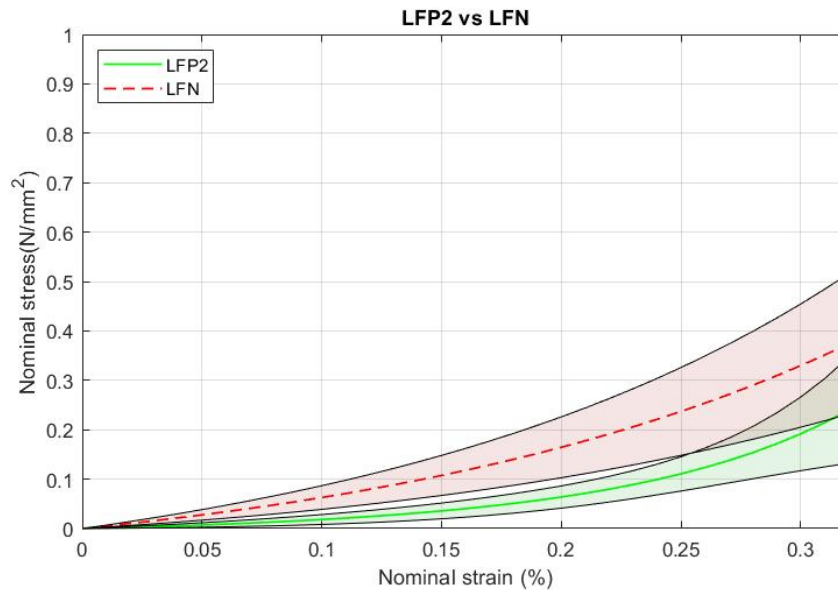


Figura 3.16 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee lesionate, fresche, trattate, e non, con plasma

Analogamente alle cornee mantenute in coltura, anche nella rappresentazione del rilassamento delle tensioni la cornea trattata tramite plasma risulta portare un miglioramento nella sopportazione del carico (Figura 3.17).

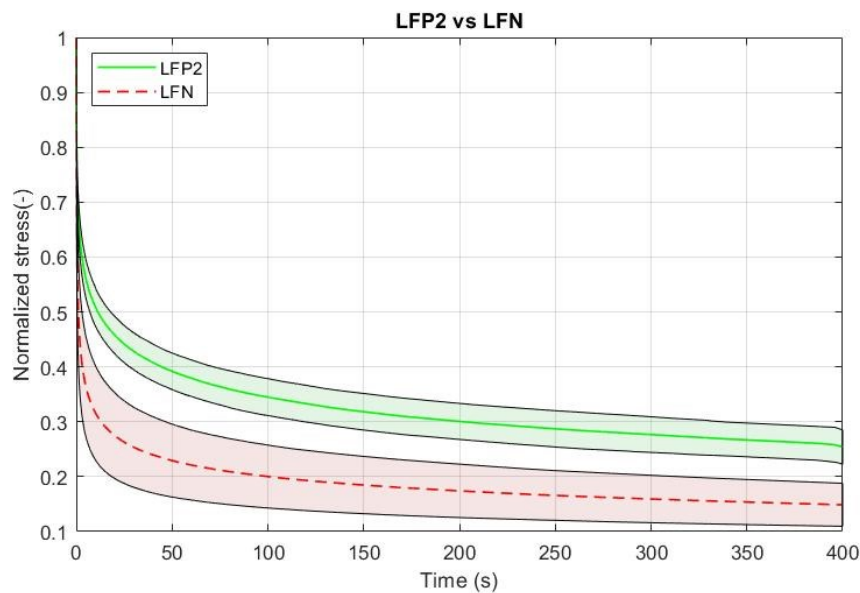


Figura 3.17 - rilassamento dello stress relativo a cornee lesionate, fresche, trattate, e non, con plasma

Una delle ultime grandi classi di campioni fa riferimento a cornee prelevate nell'arco di ore precedentemente alla prova di trazione e considerate prive di lesioni, quindi classificate come fresche e sane. In questo particolare caso, l'applicazione della terapia plasmatica attraverso cicli di 2 e 4 minuti sembra addirittura indebolire la risposta meccanica del provino, producendo delle curve tenso-deformative che si discostano dal comportamento del tessuto sano (Figura 3.18).

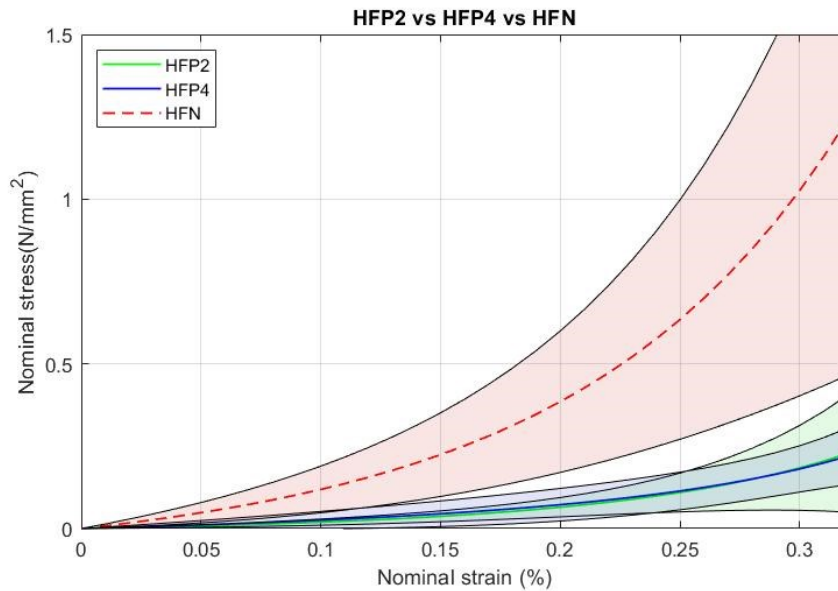


Figura 3.18 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee sane, fresche, trattate, e non, con plasma

Al contrario, analizzando l'andamento del rilassamento delle tensioni la sottoposizione al trattamento non sembra influire in maniera sostanziale sul grado di rilassamento dei campioni corneali sani e freschi (Figura 3.19).

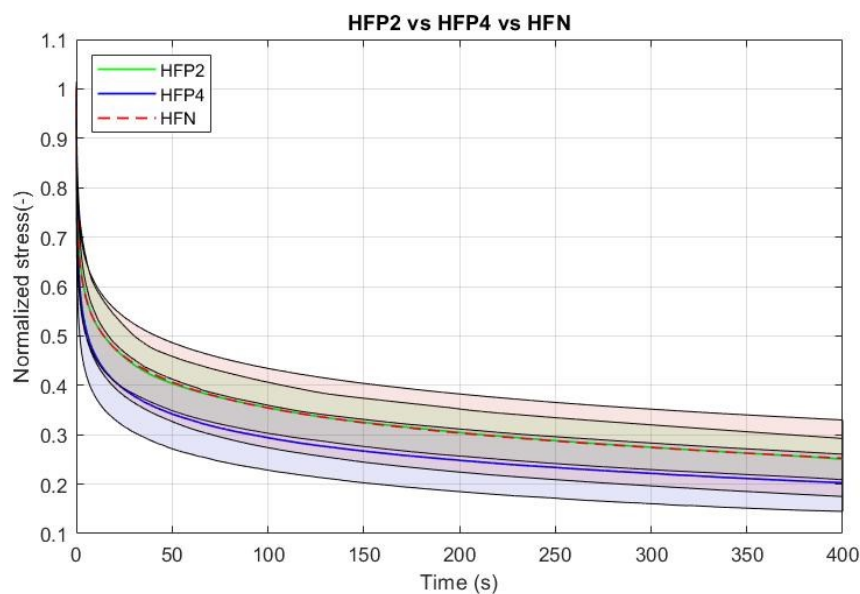


Figura 3.19 - Rilassamento dello stress relativo a cornee sane, fresche, trattate, e non, con plasma

Per completare quest'analisi sull'influenza della terapia plasmatica nella meccanica corneale sono rappresentati nelle figure successive anche le curve di risposta meccanica relative alle medesime tipologie di campioni sottoposti alle due diverse terapie finora analizzate, ovvero l'utilizzo di freddo plasma atmosferico e l'ottenimento di cross-linking.

Nel caso di campioni lesionati e in coltura, presa in considerazione la risposta tenso-deformativa, la terapia plasmatica sembra portare a migliori risultati rispetto al trattamento CXL in termini di potenziale efficacia del trattamento, ricordando che in tutti e tre i casi non è presente un incremento di rigidità se confrontato con la condizione di cornea lesionata senza trattamento (Figura 3.20).

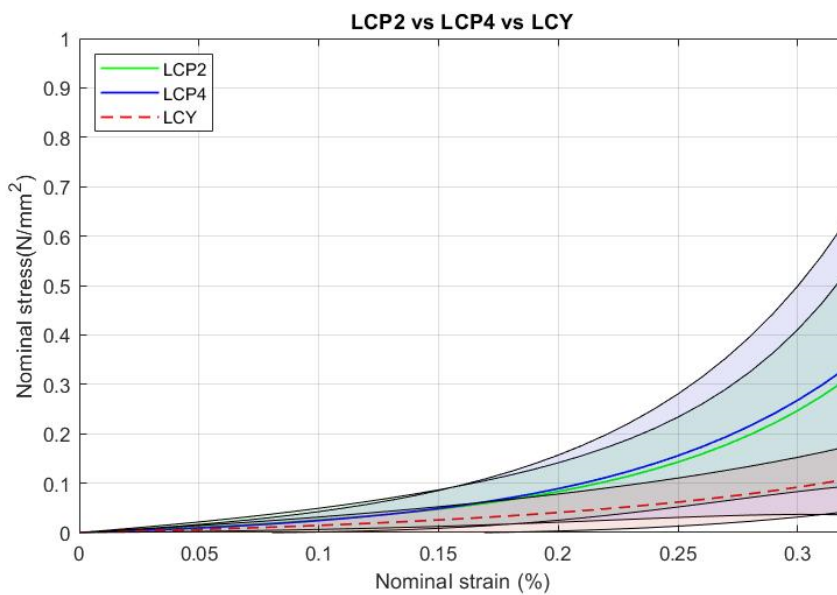


Figura 3.20 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee lesionate, in coltura, trattate tramite CXL o plasma

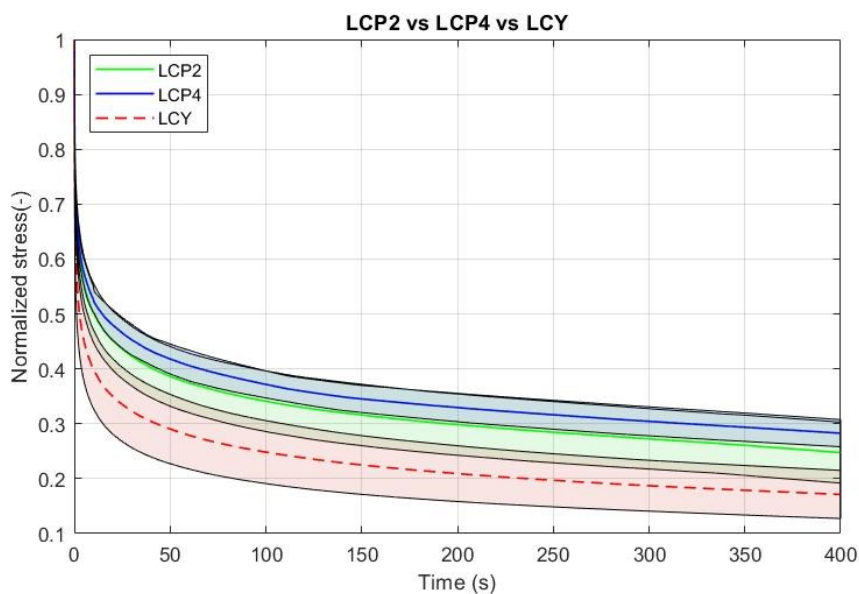


Figura 3.21 - Rilassamento dello stress relativo a cornee lesionate, in coltura, trattate tramite CXL o plasma

Allo stesso modo, esaminando il rilassamento delle tensioni, i campioni trattati con plasma esprimono un miglioramento, anche se in questo caso leggero, nella sopportazione del carico rispetto alla terapia di cross-linking (Figura 3.21).

Nelle famiglie di campioni che comprendono cornee sane e fresche tutti gli effetti indotti dalle diverse tipologie di trattamento sembrano equipararsi, producendo una simile risposta meccanica (Figura 3.22) e un leggero aumento del grado di rilassamento nuovamente per quanto riguarda il trattamento al plasma (Figura 3.23).

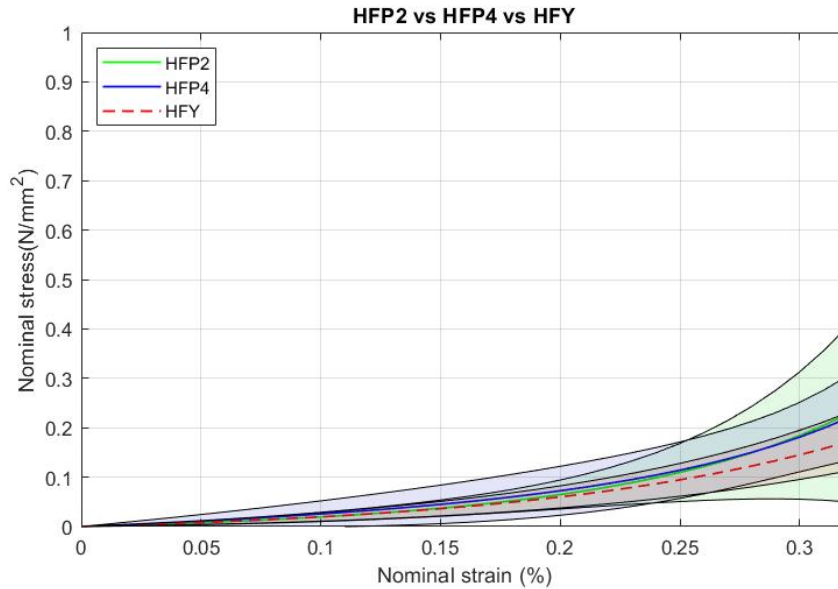


Figura 3.22 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee sane, fresche, trattate tramite CXL o plasma

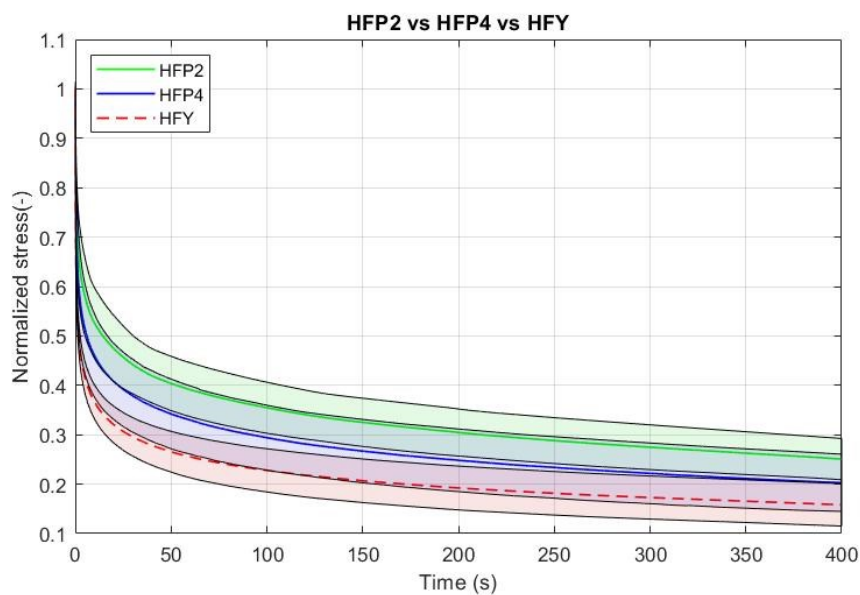


Figura 3.23 - Rilassamento dello stress relativo a cornee sane, fresche, trattate tramite CXL o plasma

Importante ricordare come i campioni non trattati appartenenti a questo gruppo, sebbene esprimano un'ampia rigidità, siano caratterizzati da un simile grado di rilassamento rispetto a quelli trattati. Le curve tenso-deformative ottenute a partire dai campioni trattati si discostano dunque molto rispetto la risposta meccanica dei provini non trattati, mentre i tempi di rilassamento, nonostante un minimo calo, tendono a seguire l'andamento delle cornee senza trattamento.

Valutazioni molto simili posso essere ricavate dai risultati provenienti dalla famiglia di campioni corneali lesionati e freschi. La risposta tenso-deformativa di questi ultimi (Figura 3.24) risulta molto simile in seguito l'applicazione dei due trattamenti, ma comunque distante dal comportamento meccanico di un campione non trattato, mentre il grado di rilassamento delle tensioni risulta, nuovamente, più basso per le cornee trattate con plasma. (Figura 3.25).

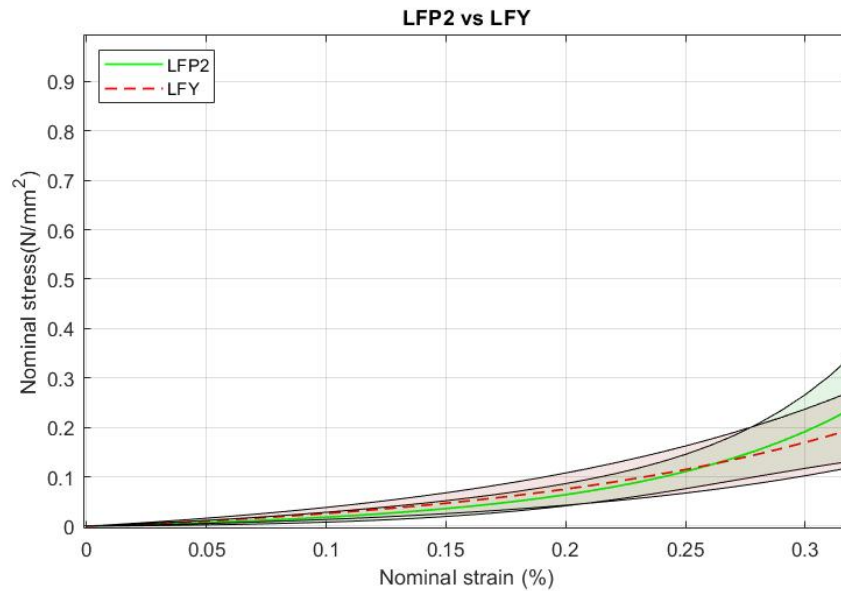


Figura 3.24 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee lesionate, fresche, trattate tramite CXL o plasma

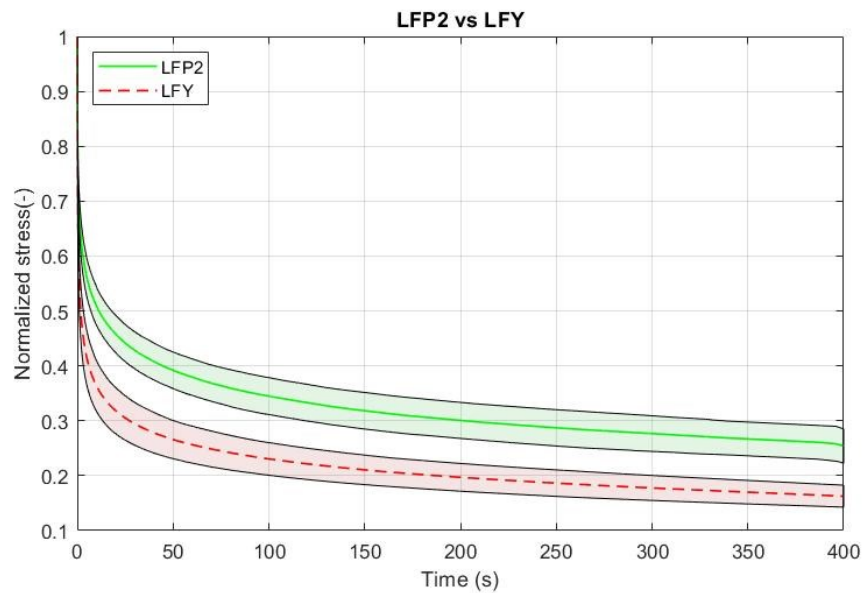


Figura 3.25 - Rilassamento dello stress relativo a cornee lesionate, fresche, trattate tramite CXL o plasma

L'ultima tipologia di campioni presi in esame nel periodo di produzione di questo lavoro di Tesi riguarda il gruppo di cornee sane e mantenute nel mezzo di coltura. In Figura 3.26 sono confrontati gli andamenti tenso-deformativi dei campioni non trattati rispetto alle curve ottenute successivamente alle terapie di sottoposizione a cross-linking e freddo plasma atmosferico. Tutte le risposte meccaniche generate a partire dai dati dei campioni trattati sembrano seguire un andamento molto simile, senza mostrare un particolare miglioramento nelle prestazioni in seguito all'utilizzo di plasma rispetto al trattamento CXL, dimostrando complessivamente inferiore rigidità rispetto alla cornea non sottoposta ad alcuna terapia. Si ritrova quindi nuovamente un caso in cui, partendo da campioni corneali ritenuti sani, l'applicazione di entrambi i trattamenti sembra peggiorarne le caratteristiche meccaniche di rigidità.

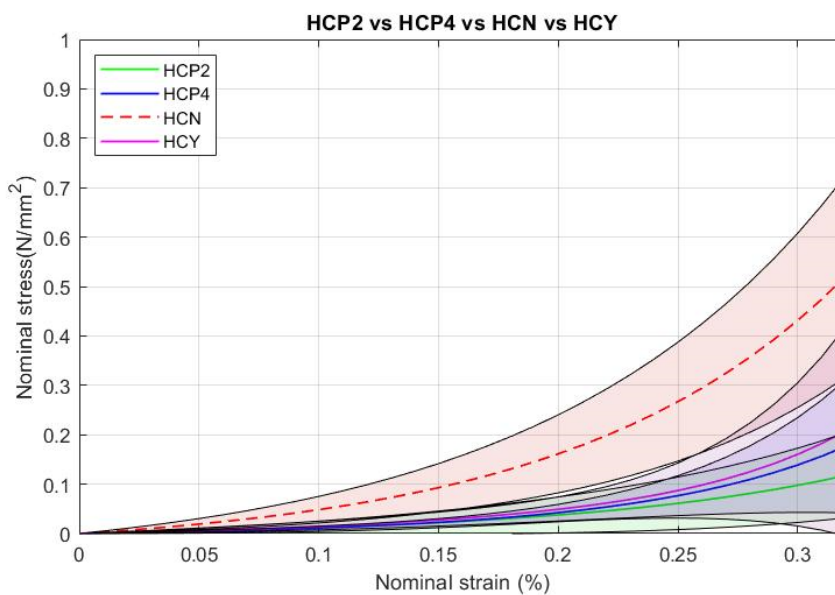


Figura 3.26 - Andamento tenso-deformativo relativo a cornee sane e in coltura

Considerando le curve di rilassamento dello stress ottenute dalle stesse famiglie di campioni corneali (Figura 3.27), è possibile notare come nuovamente la terapia plasmatica influenzi in maniera positiva il carattere viscoelastico del tessuto, producendo delle curve di rilassamento molto simili ai provini non trattati. L'ottenimento di cross-linking corneale, invece, sembra ancora peggiorare le caratteristiche meccaniche del provino, aumentandone il grado di rilassamento.

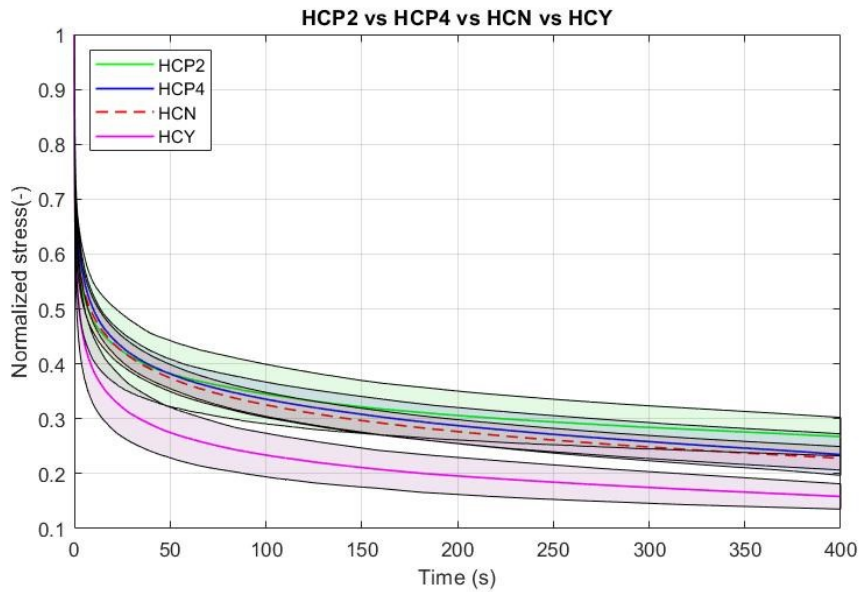


Figura 3.27 - Rilassamento dello stress relativo a cornee sane e in coltura

Come ultima rappresentazione sono visualizzati i valori degli andamenti medi delle tensioni all'equilibrio (Figura 3.28) e del rilassamento dello stress (Figura 3.29) relativi a tutte le famiglie di campioni in precedenza analizzate.

Riscontrabile come i campioni di tessuto corneale considerato sano (rappresentati dal colore rosso nelle successive figure) esprimano una rigidezza notevolmente superiore rispetto a qualunque altro campione, carattere che scende considerevolmente in condizione di lesione. L'applicazione del trattamento plasmatico della durata di 2 o 4 minuti sembra non portare a un miglioramento nel valore della tensione all'equilibrio, portando a curve tenso-deformative che poco si discostano dal comportamento di un campione di tessuto lesionato (rappresentato in verde).

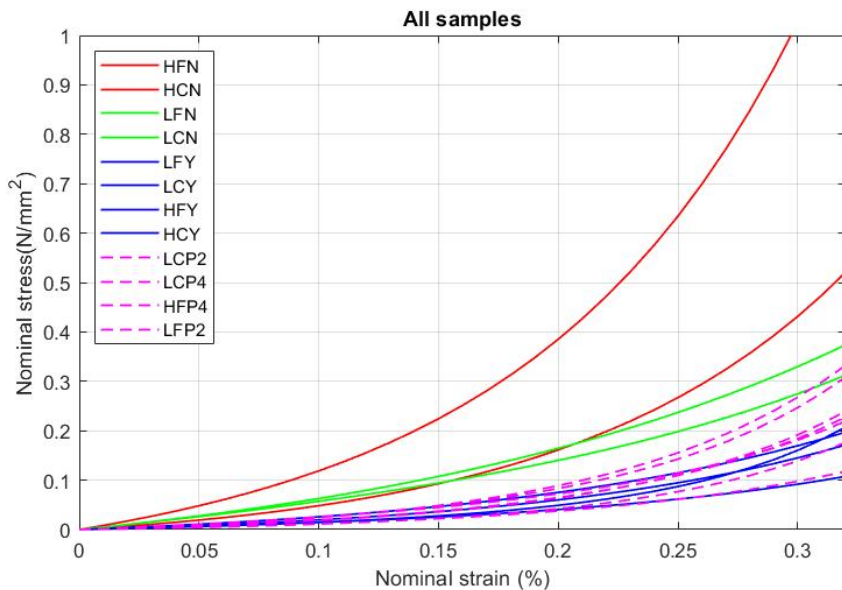


Figura 3.28 - Andamento tenso-deformativo all'equilibrio, relativo a tutti i campioni corneali

Il parametro della rigidità risulta invece superiore rispetto ai campioni di tessuto trattati per mezzo del cross-linking corneale (raffigurati tramite il colore blu), il quale porta nella totalità dei casi ai valori più bassi di tensione all'equilibrio analizzati in questa Tesi.

Relativamente alle curve rappresentanti l'andamento del rilassamento delle tensioni, i dati provenienti dai campioni trattati con plasma risultano in linea con il comportamento del tessuto sano e non trattato, producendo un netto miglioramento rispetto all'alto grado di rilassamento che occorreva nel tessuto lesionato e nel tessuto sottoposto alla terapia di cross-linking.

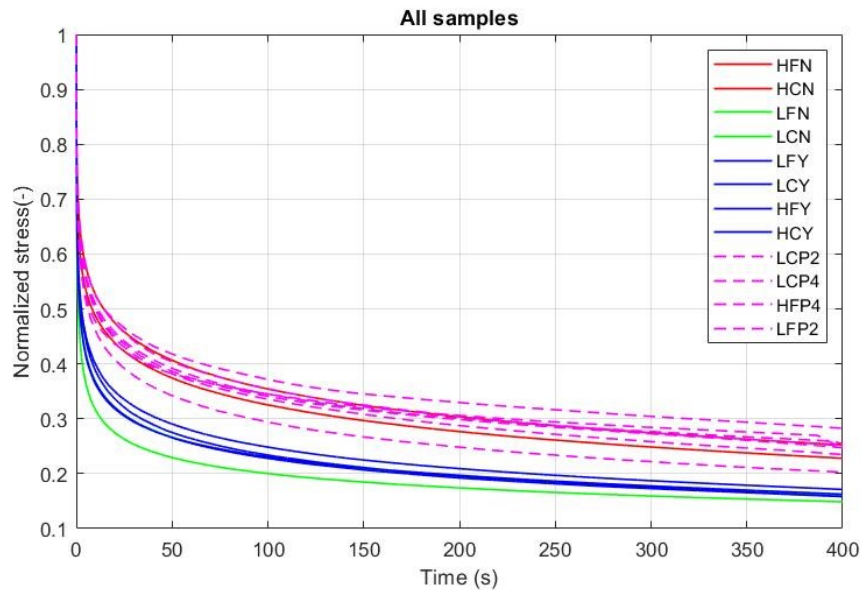


Figura 3.29 - Rilassamento dello stress relativo a tutti i campioni corneali

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo finale di questo studio sugli effetti della terapia plasmatica è quello di fornire i dati e le valutazioni meccaniche di contorno per l'introduzione di un possibile trattamento di guarigione sul tessuto corneale di pazienti in vivo, valutando i giusti parametri e la corretta tempistica per ottenere un impatto quanto più positivo sulla rigidità corneale e sulla capacità di rilassamento delle tensioni in un tessuto potenzialmente compromesso in seguito a un'ampia varietà di patologie oftalmiche.

Esaminando l'andamento delle curve tenso-deformative provenienti da tutte e tre le tipologie di prove sperimentali trattate, ovvero test a trazione monoassiale a fallimento, stress-relaxation e carico-scarico, è possibile notare come venga sempre confermato il carattere viscoelastico del tessuto corneale più volte descritto in letteratura sia nel caso umano che porcino (Boschetti et al., 2012, Tonsomboon et al., 2014, Elsheikh et al., 2011). La risposta meccanica risulta infatti caratterizzata da una bassa rigidità iniziale dovuta all'iniziale stiramento (o *uncrimping*) delle fibrille di collagene presenti nello stroma, fibrille i cui legami inter- e intra- molecolari progressivamente ed esponenzialmente aumentano la tensione registrata, orientandosi lungo la direzione dello sforzo.

I valori risultanti dalle prove di fallimento del campione si discostano da quelli provenienti dagli esempi riportati dalla letteratura, in particolare il lavoro di Boschetti presenta una deformazione media di fallimento notevolmente inferiore (0.192 rispetto a 0.794) e una tensione media di fallimento più elevata (4.763 MPa rispetto a 1.274 MPa) (Boschetti et al., 2012). La capacità del provino di raggiungere questi alti livelli di deformazione, molto più simili a quelli riscontrati nelle prove di trazione a fallimento presenti nel lavoro di Tonsomboon (Tonsomboon et al., 2014), hanno permesso di definire il protocollo di stress-relaxation adottato nelle prove successive, assicurando un comportamento non compromesso del tessuto ad un grado di deformazione del 32%.

Analizzando il quadro generale fornito dai risultati ottenuti in seguito alle prove di rilassamento degli sforzi eseguite sulle numerose combinazioni di campioni fornite al Laboratorio dei Tessuti Biologici durante il periodo di questo lavoro di Tesi, e confrontando questi esiti con quelli ottenuti dalle prove svolte in precedenza, sono possibili ottenere numerose conclusioni. Dal punto di vista del valore di tensione raggiunto all'equilibrio, l'applicazione della terapia plasmatica ad un tessuto precedentemente lesionato, che sia essa della durata di 2 o 4 minuti,

non sembra portare a un miglioramento nella risposta tenso-deformativa nei campioni analizzati, producendo una rigidità molto simile a un campione lesionato ma non trattato. Comportamento diverso invece per quanto concerne il tessuto corneale sano, il quale sembra subire una sfavorevole modifica strutturale a seguito del trattamento plasmatico, portandolo ad esprimere una rigidità notevolmente inferiore rispetto a un campione sano non trattato.

La visualizzazione della seconda curva in esame, quella che raffigura l'andamento del rilassamento delle tensioni, porta alla conclusione che l'applicazione di freddo plasma atmosferico influisca positivamente sulle proprietà viscoelastiche del tessuto, migliorando la sua capacità di sopportazione del carico applicato e aumentando il suo grado di rilassamento. Di considerevole importanza la dimostrazione che campioni di cornea categorizzata come sana, fresca e non trattata presentino lo stesso grado di rilassamento delle tensioni rispetto al tessuto corneale sottoposto a lesione, mantenuto in coltura e sottoposto a terapia plasmatica. Ciò significa che, almeno dal punto di vista di sopportazione del carico, questa condizione di trattamento sembra poter portare un tessuto lesionato e compromesso a comportarsi come un campione sano appena prelevato.

Considerando entrambe le famiglie di campioni sani e lesionati, la condizione di mantenimento del tessuto nel mezzo di coltura del tessuto non influenza il grado di rilassamento del materiale, ma provoca una leggera diminuzione di rigidità. Specificato questo, le considerazioni precedentemente fatte sull'influenza della terapia plasmatica sono valide sia nel caso di tessuto corneale fresco che in coltura.

Apprendo invece un confronto tra le due possibili terapie, ovvero la generazione di cross-linking corneale e la somministrazione di freddo plasma atmosferico, è possibile stabilire come la terapia plasmatica su un tessuto corneale lesionato sembra produrre risultati migliori sotto tutti i punti di vista, migliorando notevolmente la meccanica dei provini nella fase di sopportazione del carico e, seppur non producendo un'ottimizzazione nella risposta tenso-deformativa, questa non viene aggravata come in numerosi casi successivamente al trattamento CXL. L'unico caso in esame in cui le due terapie risultano seguire un simile andamento riguarda la famiglia di campioni corneali sani e freschi, circostanza nella quale entrambi i trattamenti sembrano danneggiare la risposta meccanica del provino, producendo delle curve tenso-deformative dalla bassa pendenza e non migliorandone il grado di rilassamento.

In conclusione, dal punto di vista della risposta meccanica la sottoposizione a cicli di freddo plasma atmosferico su campioni corneali lesionati sembra portare ad un miglioramento generale nelle prestazioni, soprattutto considerando il grado di rilassamento del tessuto e la sua capacità di resistere all'applicazione di una deformazione costante. Al contrario del trattamento CXL, i campioni non risultano danneggiati ulteriormente dalla sottoposizione alla terapia, se non

considerando il particolare caso del tessuto sano e fresco, per il quale l'applicazione dei due trattamenti sembra fornire simili risultati.

Considerando l'ultima tipologia di prova a trazione monoassiale in esame, ovvero l'applicazione del protocollo di Carico-Scarico, si è dimostrato come, prendendo in considerazione due velocità di deformazione caratterizzate da ordini di grandezza differenti (1 %/s e 10 %/s), la risposta meccanica non venga modificata in modo considerevole. Le curve tenso-deformative relative alla superiore velocità di deformazione sono infatti caratterizzate da un lieve aumento nella tensione e da moduli di elasticità longitudinali dalle differenze inconsistenti in entrambe le zone della risposta meccanica.

Questi risultati confermano gli studi presentati in precedenza di Tonsomboon prima ed Elsheikh poi, nei quali si analizzava l'eventuale dipendenza della rigidità meccanica rispetto alla velocità di applicazione di una trazione monoassiale. Nel primo caso di studio vengono prese in considerazione tre differenti velocità deformative, 0.5 %/s, 5 %/s e 50 %/s, ovvero un range di valori più ampio rispetto a quello analizzato in questo lavoro di Tesi, mostrando differenze irrilevanti nel modulo di rigidità longitudinale estratto dalle rispettive curve di risposta meccanica (Tonsomboon et al., 2014).

Il lavoro di Elsheikh ha invece evidenziato un notevole aumento di rigidità a basse velocità di deformazione, in particolare passando da una velocità di deformazione di 0.8 %/min (0.01 %/s) a una di 25 %/min (0.42 %/s), mentre sono risultati statisticamente non rilevanti gli effetti degli incrementi successivi di velocità. Tra questi troviamo due velocità deformative paragonabili a quelle in questo lavoro analizzate, ovvero 42 %/min (0.84 %/s) e 420 %/min (8.4 %/s), le quali pur presentando una lieve maggior rigidità complessiva sono contraddistinte da una variazione del modulo di Young inferiore al 5 % (Elsheikh et al., 2011).

Confermata anche un'ulteriore proprietà osservata nello studio di Elsheikh, per la quale all'interno della stessa serie di cicli di carico-scarico è riscontrata una stabilizzazione progressiva della rigidità e del valore del modulo di rigidità tangenziale, caratteristica che porta alla selezione dell'ultimo ciclo relativo ad ogni velocità di deformazione.

Nonostante la velocità di deformazione a cui il tessuto corneale è sottoposto non sembri modificare in maniera apprezzabile la risposta tenso-deformativa del campione quando questa supera una determinata soglia, rimane un parametro fondamentale da considerare nella progettazione del protocollo di trazione monoassiale.

Per quanto concerne gli sviluppi e gli obiettivi futuri di questo studio, numerose combinazioni non ancora testate di campioni di cornea fresca o in coltura, sana o lesionata, trattata con plasma a 2 minuti o 4 minuti sono già state calendarizzate per essere soggette a prove di stress-relaxation presso il Laboratorio dei Tessuti Biologici, in modo così da ottenere un database completo di risultati ricavati da tutte le possibili variabili caratterizzanti i campioni. Inoltre, è compreso tra le prospettive future la considerazione di un aumento del tempo di sottoposizione alla terapia plasmatica, dopo l'analisi dei 2 e 4 minuti è sicuramente di interesse valutare la comparazione dei risultati con un trattamento di 8 minuti, al fine di giudicare quanto la durata della terapia possa influire sulla rigidità meccanica del tessuto e sulla sua capacità di sopportare alte deformazioni.

Possibili analisi future correlate alle analisi meccaniche presentate in questo studio sono orientate sulla visualizzazione al microscopio elettronico della microstruttura del tessuto corneale, analizzando come diversi tempi di applicazione del flusso plasmatico possano influenzare dal punto di vista istologico il tessuto e come questo venga degradato a seguito dei singoli step progressivi di deformazione.

BIBLIOGRAFIA

Abhari S, Eisenback M, Kaplan HJ, Walters E, Prather RS, Scott PA. (2018) Anatomic Studies of the Miniature Swine Cornea. *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)* vol. 301(11):1955-1967. doi: 10.1002/ar.23890

Adamiak K, Sionkowska A., (2020) Current methods of collagen cross-linking: Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 161:550-560. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075

Al-Aqaba MA, Dhillon VK, Mohammed I, Said DG, Dua HS., (2019) Corneal nerves in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 73:100762. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.05.003

Boote C, Dennis S, Huang Y, Quantock AJ, Meek KM. (2005) Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. *Journal of Structural Biology*, vol. 149(1):1-6. doi: 10.1016/j.jsb.2004.08.009

Boschetti F, Triacca V, Spinelli L, Pandolfi A. (2012) Mechanical characterization of porcine corneas. *Journal of biomechanical engineering*, vol.134(3):031003. doi: 10.1115/1.4006089

Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. (2020) Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International journal of molecular sciences*, vol. 21(8):2932. doi: 10.3390/ijms21082932

de Oliveira RC, Wilson SE. (2020) Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Experimental eye research*, vol. 197: 108090. doi: 10.1016/j.exer.2020.108090

DelMonte DW, Kim T (2011) Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of cataract and refractive surgery*, vol. 37(3):588-98. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037

Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. (2009) The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1(2): a002543. doi: 10.1101/cshperspect. a002543

Elsheikh A, Alhasso D, Rama P. (2008) Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Experimental eye research*, vol. 86(5):783-90. doi: 10.1016/j.exer.2008.02.006

Elsheikh A, Brown M, Alhasso D, Rama P, Campanelli M, Garway-Heath D. (2008) Experimental assessment of corneal anisotropy. *Journal of refractive surgery*, vol. 24(2):178-87. doi: 10.3928/1081597X-20080201-09

Elsheikh A, Kassem W, Jones SW. (2011) Strain-rate sensitivity of porcine and ovine corneas. *Acta of bioengineering and biomechanics*, 2011;13(2):25-36

Martines E. et al. (2009) A novel plasma source for sterilization of living tissues. *New Journal of Physics* vol. 11:115014. doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115014

Martines E. et al. (2013) Towards a plasma treatment of corneal infections. *Clinical Plasma Medicine*, vol. 1, Issue 2. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2013.10.001>.

Martines E. et al. (2020) Wound healing improvement in large animals using an indirect helium plasma treatment. *Clinical Plasma Medicine*, vol. 17–18. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100095>

Fontanella C.G., Carniel E.L., Corain L. et al. (2021) Mechanical behaviour of healthy versus alkali-lesioned corneas by a porcine organ culture model. *BMC Vet Res* vol. 17, 340. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03050-1>

Formisano N, van der Putten C, Grant R, Sahin G, Truckenmüller RK, Bouten CVC, Kurniawan NA, Giselbrecht S. (2021) Mechanical Properties of Bioengineered Corneal Stroma. *Advanced healthcare materials*, vol. 10(20): e2100972. doi: 10.1002/adhm.202100972

Fridman A., Friedman G. (2013) *Plasmamedicine*. Oxford: John Wiley & Sons Ltd

Laroussi M, KongMG, Morfill G. Stolz W (2012) *Plasmamedicine: applications of low-temperature gas plasmas in medicine and biology*. Cambridge: Cambridge University Press

Melotti L, Martinello T, Perazzi A, Martines E, Zuin M, Modenese D, Cordaro L, Ferro S, Maccatrozzo L, Iacopetti I, Patruno M. (2021) Could cold plasma act synergistically with

allogeneic mesenchymal stem cells to improve wound skin regeneration in a large size animal model? *Research in veterinary science*, vol. 136:97-110. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.01.019

Natali AN, Carniel EL, Frigo A, et al. (2016) Experimental investigation of the biomechanics of urethral tissues and structures. *Experimental physiology*. vol.101(5):641-656. doi: 10.1113/EP085476

Park, H.J., Kim, S.H., Ju, H.W. *et al.* (2018) Microplasma Jet Arrays as a Therapeutic Choice for Fungal Keratitis. *Scientific reports*, vol. 8, 2422 doi: 10.1038/s41598-018-20854-8

Perazzi A, Gomiero C, Corain L, Iacopetti I, Grisan E, Lombardo M, Lombardo G, Salvalaio G, Contin R, Patruno M, Martinello T, Peruffo A. (2020) An Assay System to Evaluate Riboflavin/UV-A Corneal Phototherapy Efficacy in a Porcine Corneal Organ Culture Model. *Animals (Basel)*. vol. 23;10(4):730. doi: 10.3390/ani10040730

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018

Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. (2007) Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* vol. 26(4): 3859. doi: 10.1097/ICO.0b013e3180334f78.

Sridhar, Mittanamalli S (2018) Anatomy of cornea and ocular surface, *Indian Journal of Ophthalmology* Volume 66 - Issue 2 - p 190-194 doi: 10.4103/ijo.IJO_646_17

Sun P., J. H. Cho, C. -H. Park, S. -J. Park and J. G. Eden (2012) Close-Packed Arrays of Plasma Jets Emanating From Microchannels in a Transparent Polymer. *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 40, no. 11, pp. 2946-2950 doi: 10.1109/TPS.2012.2218130

Shivalingappa K Swamynathan and Alan Wells (2020) Conjunctival goblet cells: Ocular surface functions, disorders that affect them, and the potential for their regeneration. *The ocular surface* vol. 18,1: 19-26. doi: 10.1016/j.jtos.2019.11.005

Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A. (1991) Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 32(9):2636-44

Tonsomboon K, Koh CT, Oyen ML. (2014) Time-dependent fracture toughness of cornea, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* vol. 34: 116-23. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.015

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003) Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, Volume 29 - Issue 9 - p 1780-1785 doi: 10.1016/S0886-3350(03)00407-3

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. (2003) Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus, *American journal of ophthalmology*, vol. 135(5):620-7. doi: 10.1016/s0002-9394(02)02220-1

Zhang X, Tao XC, Zhang J, Li ZW, Xu YY, Wang YM, Zhang CX, Mu GY. (2015) A review of collagen cross-linking in cornea and sclera. *Journal of Ophthalmology*, vol. 2015;289467. doi: 10.1155/2015/289467