



POLITECNICO
MILANO 1863

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
E DELL'INFORMAZIONE

Caratterizzazione Meccanica e Modellazione Viscoelastica di Sclera Porcina

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOMEDICAL ENGINEERING
INGEGNERIA BIOMEDICA

Author: **Ilaria Valentini**

Student ID: 10653259

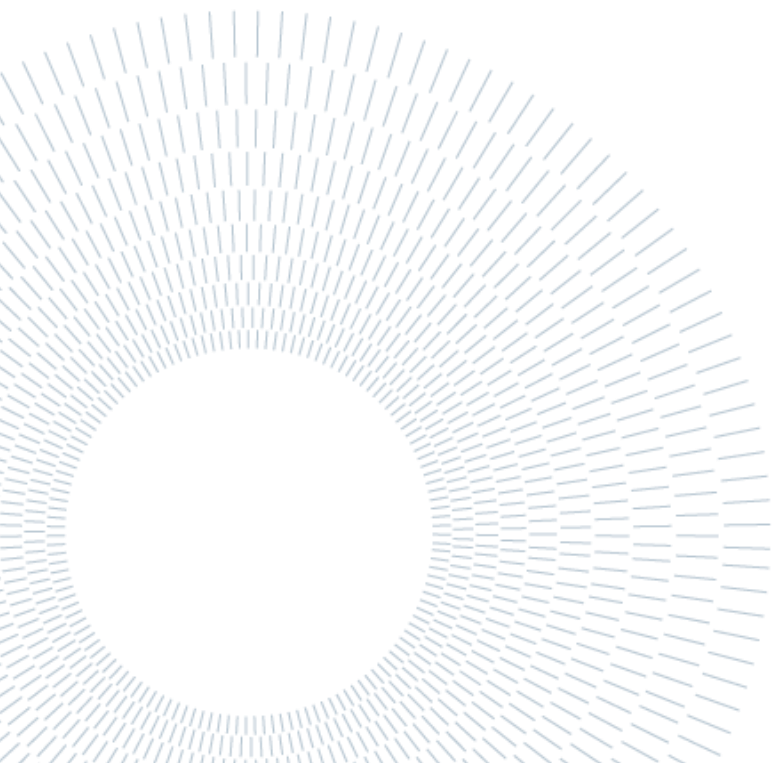
Advisor: Prof. Federica Boschetti

Co – advisor: Dott. Damiano Bertolo

Academic Year: 2024 - 2025

Alla mia famiglia, un grazie non basta.

**“Salgo sopra questo palco per giocare con la vita,
ma se mi si spezza il fiato? Se poi spezzo la matita?
Più in basso è il punto di partenza e più alta è la salita,
ma spero che il panorama valga tutta ‘sta fatica”**



Abstract

Ocular pathologies represent a highly prevalent issue with a significant social impact; therefore, in order to develop safe and effective new therapies, the use of experimental models is often required. In this regard, the porcine animal model stands out as one of the most suitable for the study and investigation of human pathologies, due to the strong anatomical and physiological similarities with human tissues.

The aim of this thesis is to provide a general mechanical and viscoelastic characterization of the porcine sclera, followed by a viscoelastic modelling approach. Furthermore, the study investigates whether sample preservation through freezing affects the mechanical properties of the sclera. Lastly, an analysis was carried out to compare the mechanical properties of cornea and sclera collected from the same ocular globe.

Mechanical and relaxation tests were performed using a uniaxial tensile testing machine with a specific setup to keep the samples hydrated during testing. The cornea was tested, simultaneously with the sclera, using a different uniaxial tensile testing device. Viscoelastic modelling was performed using Julia programming language, equipped with the RHEOS package specifically developed for the viscoelastic modelling of biological tissues. The models adopted for the fitting procedures were: Maxwell, Standard Linear Solid (Zener), and the fractional Maxwell model.

A pronounced viscoelastic behaviour was observed in both the sclera and the cornea, consistent with literature findings. Tissue stiffness was found to be strongly dependent on both the applied strain and the strain rate. Moreover, differences in the elastic modulus and relaxation modulus were identified across samples taken from distinct portions of the globe, showing higher resistance in superior samples and lower resistance in nasal ones. Freezing did not appear to significantly alter the mechanical properties of the sclera. Among the tested models, the fractional viscoelastic model provided the best representation of porcine sclera behaviour. No correlation was found between samples from the cornea and the sclera.

Soft biological tissues exhibit substantial variability in experimental outcomes, due to both interindividual differences and their inherent sensitivity to manipulation and boundary conditions during testing.

Key-words: sclera, cornea, relaxation test, tensile test, fractional Maxwell model

Abstract in Italiano

Le patologie oculari si presentano come una problematica molto diffusa e di grande impatto sociale; per questo, al fine di stabilire la sicurezza e l'efficacia di nuove terapie, è spesso necessario l'utilizzo di un modello. A questo proposito, il modello animale suino si presenta come uno dei migliori per lo studio e la ricerca su patologie umane data la grande somiglianza anatomica e fisiologica del tessuto animale con quelli umani.

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo quello di presentare una caratterizzazione meccanica e viscoelastica generale della sclera porcina seguita da una modellazione viscoelastica. Inoltre, si è voluto indagare se il metodo di conservazione dei campioni mediante congelamento deteriorasse le proprietà meccaniche della sclera. In ultimo, è stata effettuata un'analisi preliminare per confrontare le proprietà meccaniche di cornea e sclera prelevati da uno stesso bulbo oculare. Per effettuare i test meccanici e di rilassamento è stata utilizzata una macchina di trazione uniassiale dotata di un apposito set up per mantenere i campioni idratati durante le prove. La cornea è stata testata tramite un'altra macchina di prova per la trazione uniassiale, contemporaneamente al test effettuato sulla sclera. La modellazione viscoelastica invece, è stata eseguita mediante il linguaggio di programmazione Julia dotato del pacchetto RHEOS, sviluppato appositamente per la modellazione viscoelastica dei tessuti biologici. I modelli che sono stati utilizzati per le procedure di fitting sono: Maxwell, Standard Linear Solid di Zener e il modello di Maxwell frazionale.

È stato osservato un comportamento viscoelastico molto evidente, sia sulla sclera che sulla cornea, risultando coerente con quanto già presente in letteratura. La rigidità dei tessuti è risultata fortemente dipendente della deformazione applicata, nonché dalla velocità di deformazione. Inoltre, è stata individuata una differenza nei moduli elastici dei campioni prelevati in porzioni distinte del globo, dimostrando una resistenza maggiore di quelli superiori e minore di quelli nasali. Il congelamento non ha mostrato di alterare significativamente le proprietà della sclera. Il modello viscoelastico frazionale è quello che rappresenta meglio l'andamento della sclera suina. Non è stata individuata alcuna correlazione fra le coppie di campioni di cornea e sclera.

I tessuti biologici soffici presentano una grande variabilità nei risultati, sia dovuta ad una grande variabilità interindividuale, sia per la loro difficoltà di manipolazione, nonché per via della loro sensibilità alle condizioni al contorno del test sperimentale.

Parole chiave: sclera, cornea, test di rilassamento, trazione, Maxwell frazionale

Indice

Abstract	i
Abstract in Italiano	iii
Indice	v
Introduzione e Obiettivi	1
1 Capitolo 1: Anatomia dell’Occhio e Caratteristiche Meccaniche	5
1.1 Caratteristiche Meccaniche dell’Occhio Umano.....	5
1.1.1 Cornea.....	8
1.1.2 Sclera.....	11
1.2 Caratteristiche Meccaniche.....	15
1.2.1 Cornea.....	16
1.2.2 Sclera.....	20
1.3 Occhio Porcino: Anatomia e Caratteristiche Meccaniche.....	24
2 Capitolo 2: Patologie Bulbari	33
2.1 Glaucoma.....	33
2.2 Miopia.....	37
3 Capitolo 3: Caratterizzazione Biomeccanica	41
3.1 Test di Trazione.....	42
3.2 Viscoelasticità nei Tessuti Biologici.....	46
3.2.1 Modelli Viscoelastici Classici, o Lineari a Derivate Intere.....	51
3.2.2 Modelli Viscoelastici Frazionari.....	53
4 Capitolo 4: Metodi per l’Estrazione dei Campioni	55
4.1 Estrazione, Preparazione e Conservazione dei Campioni di Sclera....	55
4.2 Estrazione, Preparazione e Conservazione dei Campioni per Prove Parallele:58	
5 Capitolo 5: Procedure Sperimentali	61
5.1 Test di Trazione Uniassiale.....	61
5.1.1 Definizione Set Up Sperimentale.....	61
5.1.2 Metodi per l’Esecuzione dei Test.....	63
5.1.3 Elaborazione dei Dati.....	64
5.2 Modellazioni Viscoelastiche.....	67

5.3	Test di Trazione Uniassiale su Cornea e Sclera “in Parallelo”	71
5.3.1	Definizione Set Up Sperimentale	71
5.3.2	Protocollo Sperimentale	72
5.3.3	Elaborazione dei Dati.....	73
6	Capitolo 6: Risultati e Discussione	75
6.1	Prove su Campioni Freschi	76
6.1.1	Analisi Elastica.....	76
6.1.2	Analisi Viscoelastica.....	84
6.2	Confronto Campioni Freschi e Congelati	88
6.3	Analisi Modelli Viscoelastici.....	92
6.4	Prove in Parallelo	98
7	Capitolo 7: Conclusioni e Sviluppi Futuri.....	103
8	Bibliografia.....	107
A	Appendice A: Sistema di Riferimento Occhio Umano	119
B	Appendice B: Dimensioni Supporto e Sede O’ring	121
C	Appendice C: Codice di MATLAB.....	123
D	Appendice C: Codici Julia	127
D.1.	Fitting Maxwell Classico	127
D.2.	Fitting SLS Zener	129
D.3.	Fitting Maxwell Frazionale con Molla.....	131
	List of Figures	133
	List of Tables	137
	List of symbols	139
	Ringraziamenti.....	141

Introduzione e Obiettivi

La funzione visiva rappresenta uno dei pilastri fondamentali attraverso i quali l'essere umano interagisce con l'ambiente circostante. Gli occhi, organi deputati alla visione, consentono la percezione di immagini dettagliate, permettendo non solo l'esplorazione dello spazio, ma anche la costruzione di relazioni sociali nonché l'esecuzione delle attività quotidiane. La vista, pertanto, non è soltanto uno dei sensi più complessi dal punto di vista fisiologico, ma anche quello più determinante per la qualità della vita.

Secondo stime recenti, circa 2,2 miliardi di persone a livello globale presentano problematiche visive di diversa gravità, partendo da difetti rifrattivi, cataratta, miopia patologica fino ad arrivare, nei casi più severi, a condizioni di cecità irreversibile.

L'impatto di tali patologie non si limita al deficit sensoriale in sé, ma si riflette sull'intero benessere psicologico, fisico e sociale dell'individuo (1). La riduzione dell'acuità visiva compromette, infatti, la mobilità e le attività fondamentali come la capacità di mantenere relazioni sociali e lo svolgimento di mansioni lavorative, determinando un progressivo isolamento del paziente e una riduzione significativa dell'indipendenza personale (2).

Risulta interessante notare che la cornea costituisce uno dei tessuti più innervati del corpo umano, 300 – 600 volte più della pelle e 20 – 40 volte più della radice dentale (3). Questa peculiarità sottolinea quanto sia cruciale la protezione della salute oculare.

In questo scenario, la ricerca scientifica riveste un ruolo fondamentale nell'individuare nuove soluzioni terapeutiche, volte non solo alla prevenzione e al contenimento del danno visivo, ma anche al recupero funzionale laddove possibile. Lo sviluppo di approcci farmacologici, chirurgici e tecnologici innovativi costituisce, infatti, un obiettivo prioritario.

Per il progresso in ambito oftalmologico, risulta imprescindibile disporre di modelli sperimentali affidabili sui quali testare la sicurezza e l'efficacia di nuove procedure. In tale contesto, l'occhio porcino si è affermato come uno dei migliori modelli animali disponibili, grazie alla sua notevole somiglianza anatomica e fisiologica con l'occhio umano (4). La disponibilità di tessuti oculari suini rappresenta, inoltre, una risorsa rilevante sia per la ricerca di base sia per gli xenotrapianti.

Attualmente, i tessuti oculari porcini trovano applicazione in molteplici ambiti: dalla valutazione preclinica di nuove terapie farmacologiche, alla sperimentazione di biomateriali, dall'analisi dell'eziopatogenesi delle patologie oculari, fino allo sviluppo

e al perfezionamento di dispositivi impiantabili e tecniche chirurgiche innovative (5; 6). Ne consegue la necessità di approfondire e consolidare le conoscenze sulle proprietà fisiologiche e biomeccaniche dei tessuti oculari porcini, al fine di definire con maggiore precisione le somiglianze e le differenze rispetto ai tessuti umani.

Lo studio di tessuti oculari porcini è essenziale per una comprensione approfondita delle loro proprietà, sia in termini fisiologici che meccanici, al fine di poter colmare il divario tra ricerca sperimentale e pratica clinica.

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi consiste nell'effettuare una caratterizzazione meccanica e viscoelastica generale della sclera dell'occhio porcino, con ulteriori approfondimenti relativi alla modellazione viscoelastica della stessa. A tal fine sono stati eseguiti test di trazione a velocità di carico differenti e prove di rilassamento imponendo gradini di deformazione crescente. Entrambe le tipologie di prova sono state eseguite utilizzando il medesimo set – up sperimentale montato su una macchina per la trazione uniassiale. Questa scelta ha permesso di ottenere una visione complessiva delle proprietà del tessuto, garantendo al contempo la stabilità delle condizioni al contorno tra le due tipologie di prova e riducendo così la variabilità legata all'impiego di differenti set up sperimentali.

In secondo luogo, è stata condotta un'analisi per indagare se fosse presente una correlazione fra coppie di campioni di cornea e sclera prelevati dallo stesso bulbo oculare.

È stata effettuata un'analisi approfondita sulla sclera testando 80 campioni di tessuto separati in due gruppi equivalenti a seconda del metodo di conservazione: il primo gruppo è stato analizzato da fresco, i campioni una volta estratti sono stati conservati in frigorifero fino al momento del test. I campioni appartenenti al secondo gruppo sono stati conservati mediante congelamento e testati previo scongelamento. In questo modo è stato possibile anche osservare l'effetto del metodo di conservazione sulle proprietà meccaniche del tessuto. La totalità dei campioni è stata estratta secondo delle direzioni anatomiche specifiche e consistenti fra gli esperimenti; in questo modo è stato possibile anche indagare se fossero presenti variazioni regionali nelle proprietà della sclera. La modellazione viscoelastica è stata eseguita mediante il linguaggio di programmazione Julia equipaggiato con il pacchetto RHEOS, il quale ha permesso di eseguire delle procedure di fitting sulle curve di rilassamento sperimentali. Tale fitting è stato seguito poi dall'ottimizzazione dei parametri costitutivi di tre modelli reologici differenti, allo scopo di individuare quello che meglio rappresentasse il comportamento viscoelastico della sclera.

Le analisi preliminari volte ad indagare una correlazione fra cornea e sclera, sono state eseguite su un totale di 10 coppie di campioni estratti ognuna dallo stesso bulbo oculare. Le coppie sono state testate contemporaneamente con due macchine di trazione uniassiale e imponendo lo stesso protocollo di prova utilizzato in precedenza, composto da prove di trazione e test di rilassamento.

Anche in questo caso, l'estrazione dei campioni è stata effettuata con sistematicità rispetto alla direzione anatomica ed è stata effettuata circa 30 minuti prima dell'inizio del test. La totalità dei campioni sclerali e corneali utilizzati per questa tipologia di analisi sono stati testati da freschi ed immersi in soluzione fisiologica per prevenire la disidratazione.

1 Capitolo 1: Anatomia dell'Occhio e Caratteristiche Meccaniche

Nel corso di questo capitolo verranno esposte le principali caratteristiche anatomiche e meccaniche dell'occhio umano e dell'occhio porcino, con un'analisi più approfondita dei tessuti di nostro interesse: la cornea e la sclera.

Si esaminerà la struttura microscopica di questi tessuti, mettendo in evidenza il legame con le loro proprietà meccaniche.

Inoltre, verrà descritta l'anatomia dell'occhio porcino, evidenziandone le similitudini e le differenze rispetto a quello umano, al fine di sottolineare la sua validità come modello di studio.

1.1 Caratteristiche Meccaniche dell'Occhio Umano

L'occhio è un organo di forma sferoidale posto nella parte anteriore della cavità orbitaria del cranio, protetto da vari annessi oculari come le palpebre e i muscoli oculari. Sebbene non abbia la forma di una sfera perfetta, un occhio umano emmetrope privo di difetti di rifrazione ha dimensioni pressochè costanti nelle varie direzioni (7). Vedi appendice A, pg. 119, per sistema di riferimento:

- Diametro antero – posteriore: 24 mm
- Diametro superiore – inferiore 23 mm
- Diametro medio – laterale 23.5 mm

L'occhio risulta essere leggermente schiacciato in direzione verticale e allungato lungo l'asse interno. La forma del bulbo oculare risulta altresì formato da due sfere di diametro diverso unite frontalmente a livello del limbus; la cornea sarebbe rappresentata dalla sfera più piccola (raggio di $7.8 - 8\text{ mm}$), mentre la sclera da quella più grande (diametro $11.5 - 12\text{ mm}$) (8).

I movimenti oculari sono a carico di sei muscoli extraoculari, la cui inserzione si trova sul bulbo. In Figura 1.1 è mostrata una sezione sagittale del cranio che evidenzia l'anatomia di questi ultimi e le loro inserzioni.

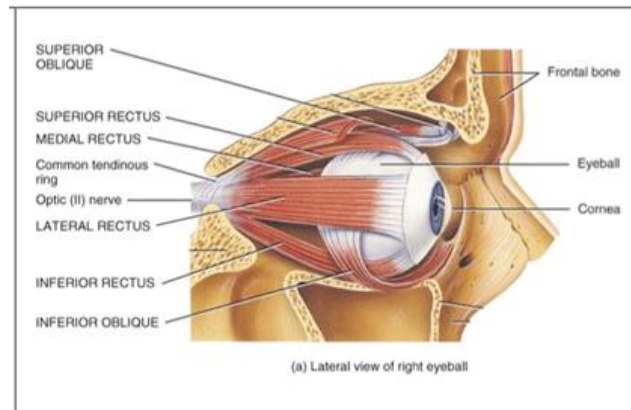


Figura 1.1: Sezione sagittale del cranio, muscoli extraoculari e bulbo oculare.

L'occhio è protetto frontalmente dalle palpebre, le quali sono ricoperte nella faccia interna dalla congiuntiva palpebrale; questa, si riflette al di sopra del bulbo, ricoprendolo nella sua porzione anteriore, prendendo il nome di congiuntiva bulbare.

Il bulbo oculare è costituito da molte strutture complesse, ognuna con una specifica funzione, posizione e struttura; per analizzarle consideriamo le principali camere in cui è suddiviso l'occhio: camera anteriore, posteriore e camera vitrea (Figura 1.2).

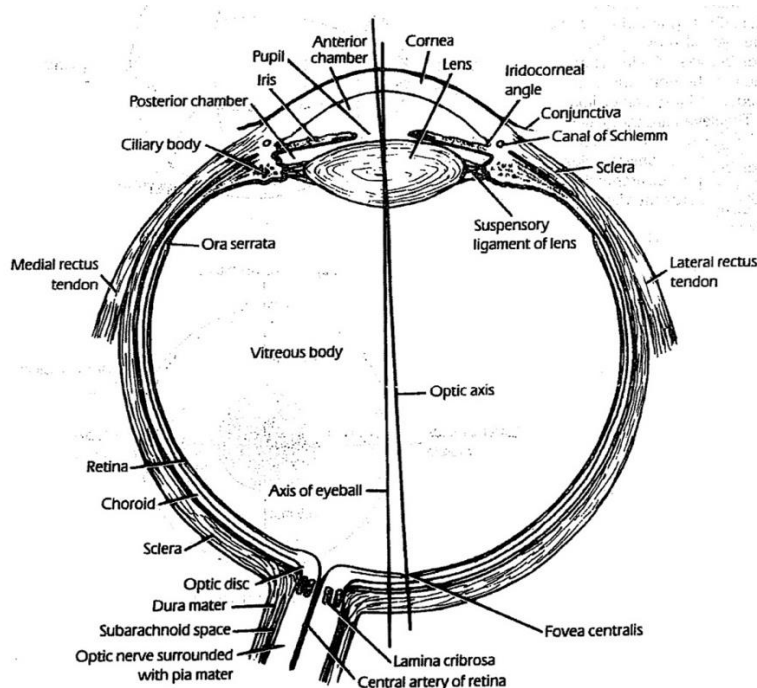


Figura 1.2: Sezione trasversale del bulbo oculare.

La camera anteriore è delimitata dalla faccia posteriore della cornea, dalla faccia anteriore dell'iride e lateralmente dall'angolo di drenaggio.

La camera posteriore è delimitata anteriormente dalla faccia posteriore dell'iride, posteriormente dalla faccia anteriore del cristallino e dalle fibre zonulari (fibre molto

sottili che tengono in sospensione il cristallino) mentre lateralmente è delimitata dal corpo ciliare.

Le camere anteriore e posteriore sono riempite dall'umor acqueo: una sostanza acquosa prodotta dai processi ciliari ad una velocità di $2 - 2.5 \text{ ml}/\text{min}$ (8). Tale fluido scorre nella camera anteriore attraverso la pupilla e viene drenato nell'angolo della stessa camera (Figura 1.3) dopo aver attraversato il filtro corneosclerare (traecular meshwork) ed essere entrato nel canale di Schlemm (Figura 1.4).

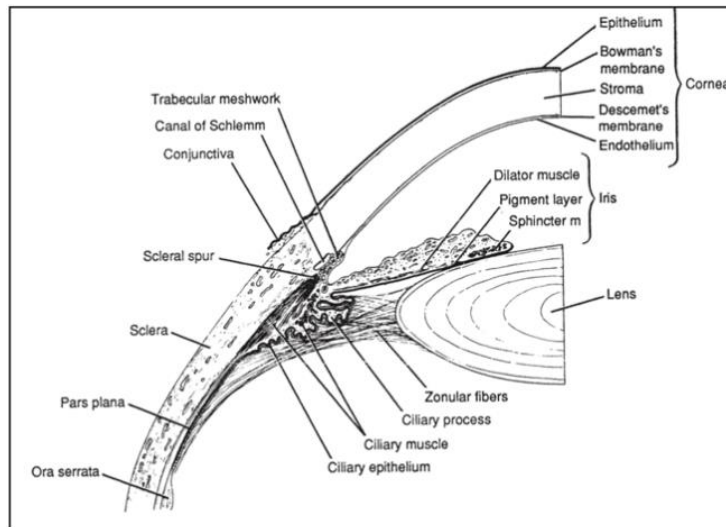


Figura 1.3: Dettaglio dell'angolo della camera anteriore.

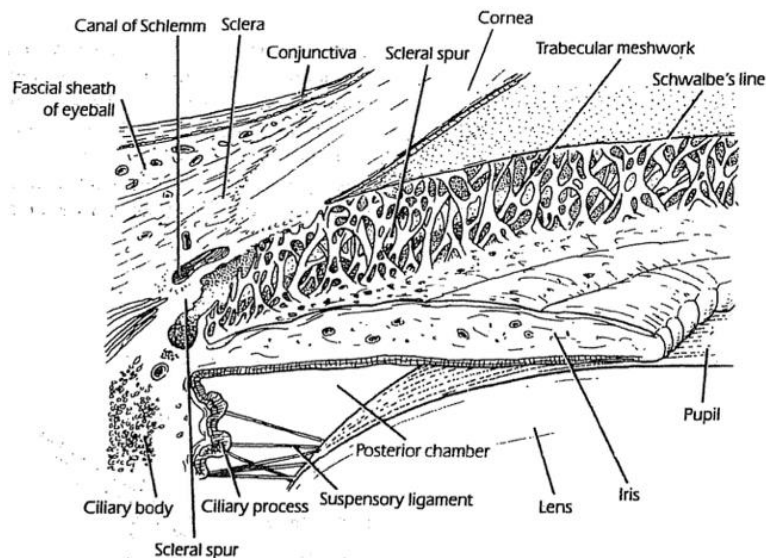


Figura 1.4: Sistema di drenaggio dell'umor acqueo.

La camera vitrea è delimitata anteriormente dalla faccia posteriore del cristallino, dalle fibre zonulari e dal corpo ciliare, e posteriormente dalla retina e dalla papilla ottica. Tale spazio è riempito dal corpo vitreo: una sostanza gelatinosa, composta al 99% da acqua, la cui funzione principale è quella di consentire alla luce di raggiungere la

retina, perciò è trasparente. Essa costituisce circa i 2/3 del volume e del peso di un occhio.

La cornea, l'umor acqueo, il forame dell'iride (pupilla), il cristallino ed il corpo vitreo sono i mezzi diottrici che consentono alla luce di essere focalizzata sulla retina, un tessuto nervoso fotosensibile che tramette al cervello le informazioni ricevute, il quale le elabora e permette l'esperienza della visione.

Le strutture sopra citate si possono suddividere in tre strati che costituiscono il bulbo oculare:

1. **Tonaca fibrosa:** strato esterno con funzione protettiva e di supporto, comprende la cornea e la sclera che si fondono anteriormente in corrispondenza del limbus, o giunzione corneosclerale, formando un ispessimento del tessuto.
2. **Tonaca vascolare (uvea):** strato intermedio caratterizzato da una forte pigmentazione, vasi sanguigni e muscoli intraoculari. Comprende l'iride, il corpo ciliare e la coroide. L'iride regola la quantità di luce che colpisce la retina, contribuendo alla formazione di un'immagine nitida. È esperienza comune notare come la pupilla cambi dimensioni a seconda delle condizioni ambientali di luce; ciò è dovuto all'azione del muscolo dilatatore della pupilla e dal muscolo sfintere della pupilla, i due sono innervati dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico rispettivamente (9). La coroide riveste l'interno dei due terzi del bulbo oculare, è interposta tra la sclera e la retina ed ha proprio la funzione di portare nutrimento a quest'ultima. Interposta tra la coroide e l'iride vi è il corpo ciliare con il suo muscolo ciliare che permette l'accomodazione del cristallino.
3. **Tonaca nervosa:** strato più interno formato dalla retina, che comunica con il cervello tramite il nervo ottico. La papilla ottica, o disco ottico, rappresenta il punto di congiunzione tra i due, dove si raccolgono le fibre nervose. La parte ottica della retina, cioè la sua porzione fotosensibile, si estende aderendo alla faccia profonda della coroide, fino all'ora serrata.

1.1.1 Cornea

La cornea costituisce circa un sesto della tonaca fibrosa ed è l'elemento diottrico principale, possedendo circa due terzi del potere rifrattivo dell'occhio. Possiede la funzione di proteggere le strutture interne al bulbo oculare da traumi ed infezioni, consente alla luce di attraversarla e concorre alla rifrazione della stessa sulla retina (10). Si presenta come una calotta sferica trasparente con un diametro orizzontale leggermente maggiore di quello verticale (8). La zona centrale, in corrispondenza della pupilla è detta "zona ottica" e costituisce il punto in cui si ha la visione centrale.

Lo spessore corneale non è uniforme lungo la sua estensione: la superficie anteriore e quella posteriore presentano raggi di curvatura differenti, pari rispettivamente a

7.7 mm e 6.9 mm (7). Questa conformazione determina un ispessimento in corrispondenza del limbus, di circa $700 \mu\text{m}$, e un assottigliamento nella zona ottica, dove lo spessore medio è di circa $540 \mu\text{m}$ (11; 7; 8). La trasparenza della cornea è garantita da vari fattori come l'assenza di vasi sanguigni, dal ridotto contenuto di acqua, dall'orientazione microscopica degli elementi che la compongono, dalla regolarità della sua superficie e dall'uniformità del film lacrimale che la ricopre.

La cornea è composta da cinque strati di tessuto (Figura 1.6) ognuno con una funzione distinta:

- 1) L'epitelio: strato più esterno coperto da un sottile film lacrimale che permette la diffusione dell'ossigeno ambientale alle cellule che lo compongono. L'epitelio è stratificato, spesso circa $50 - 60 \mu\text{m}$ e consta di circa cinque strati cellulari al centro e una decina vicino al limbus ancorati, in tutta l'estensione della cornea, alla membrana basale sottostante.
- 2) La membrana di Bowman è una membrana acellulare molto sottile ($8 - 12 \mu\text{m}$) costituita da fibre di collagene di $20 - 30 \text{ nm}$ di diametro, intrecciate e arrangiate in modo casuale in una matrice.
- 3) Lo stroma, o sostanza propria, costituisce circa il 90% dello spessore della cornea ed è il tessuto che contribuisce maggiormente alle proprietà meccaniche della cornea (10; 12). Il tessuto è composto per la maggior parte da collagene di tipo I organizzato in fibrille. Queste, sono immerse in una matrice acquosa contenente collagene di altro tipo, proteoglicani, glicoproteine e sali disciolti (13). Le fibre di collagene sono a loro volta organizzate in lamelle sovrapposte. Lo spessore dello stroma è costituito da $200 - 300$ lamelle, ciascuna con spessore variabile tra $0.2 \mu\text{m}$ e $2.5 \mu\text{m}$. Le lamelle di collagene non possiedono orientamento costante nello spessore dello stroma; infatti, la parte anteriore dello stroma corneale, $100 - 120 \mu\text{m}$ al di sotto della lamina di Bowman, possiede lamelle intrecciate casualmente che formano una struttura tridimensionale, la quale aderisce con forza alla membrana di Bowman (14; 15), mentre le lamelle nella porzione medio - posteriore dello spessore corneale risultano quasi parallele fra loro (10; 16). È stato dimostrato che nella porzione anteriore, le fibrille di collagene connettono più lamelle, rinforzando il tessuto e connettendosi in molti punti con lo strato superiore. Data la struttura di questa zona, si ritiene che sia responsabile delle proprietà strutturali, come il mantenimento della curvatura (17) e il comportamento meccanico dello stroma (15). Le lamelle nella parte posteriore, circa due terzi dello spessore, sono disposte regolarmente, ad un angolo di circa 90° l'una rispetto all'altra e non in modo casuale, distribuendosi in direzione supero - inferiore e nasale - temporale seguendo l'orientazione dei muscoli retti extra - oculari (13). Tale disposizione potrebbe spiegarsi con la necessità del tessuto di resistere efficacemente ai carichi applicati dai muscoli extra - oculari, data la proprietà

tipica dei tessuti connettivi per cui ad un aumentato sforzo corrisponde una maggiore resistenza ai carichi (18). A livello del limbus le lamelle sono disposte circolarmente.

In Figura 1.5 è possibile osservare la mappa dei vettori polari che mostrano l'orientazione preferenziale delle lamelle di collagene in una cornea umana normotipo.

All'interno dello stroma si trovano fibroblasti cheratociti che producono collagene.

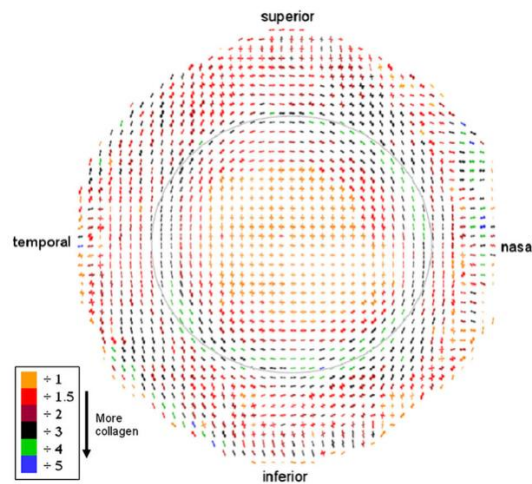


Figura 1.5: Mappa dei vettori polari che indicano l'orientazione preferenziale delle lamelle in una cornea umana normotipo.

- 4) La membrana di Descemet è la lamina basale dell'endotelio, viene continuamente prodotta da quest'ultimo e ne mantiene la struttura. È composto da fibre di collagene (principalmente di tipo IV e III) disposte a formare un pattern esagonale ed immerse in una matrice. Contribuisce a proteggere le strutture più interne del bulbo.
- 5) L'endotelio è organizzato in un singolo strato di cellule esagonali aderenti alla membrana di cui sopra ed in contatto diretto con l'umor acqueo. Le cellule endoteliali sono strettamente connesse e possiedono protrusioni verso la camera anteriore volte ad aumentare la superficie disponibile all'assorbimento dei nutrienti. La funzione principale dell'endotelio consiste nel mantenere lo stato di deidratazione dello stroma, e per adempiere a tale scopo le cellule sono dotate di pompe ioniche nella porzione basolaterale della membrana che spostano attivamente ioni nell'umor acqueo. In questo modo lo stroma risulta ipotonico, si mantiene la trasparenza corneale e si aumenta lo scambio di nutrienti.

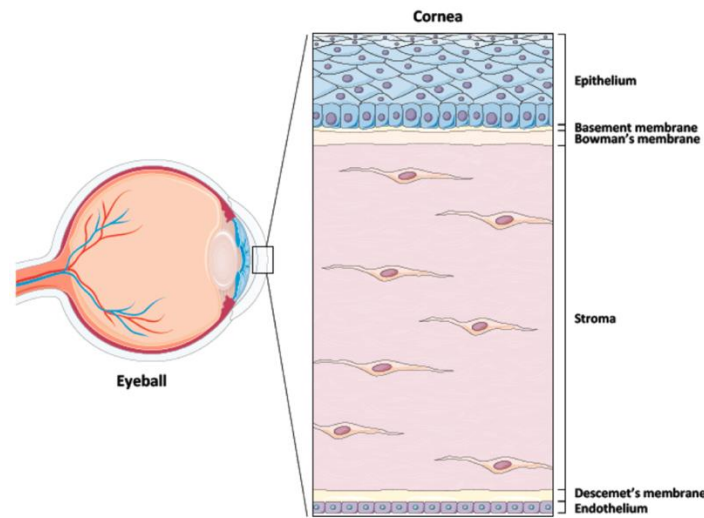


Figura 1.6: Stratificazione dei tessuti corneali.

La trasparenza della cornea è garantita da un equilibrio tra struttura e fisiologia; gioca un ruolo fondamentale la dimensione delle lamelle (molto ridotta rispetto alla lunghezza d'onda della luce) e la loro disposizione spaziale (11). Lo stato di idratazione dello stroma deve mantenersi intorno al 75% per garantire trasparenza, un'idratazione maggiore causa edema, rigonfiamento corneale e perdita di trasparenza (8).

1.1.2 Sclera

La sclera, estendendosi per cinque sestimi del bulbo oculare, rappresenta la parte più estesa della tonaca fibrosa dell'occhio. Si fonde anteriormente alla cornea in corrispondenza della giunzione corneo sclerale e possiede un'apertura in corrispondenza dell'uscita del nervo ottico, anche detta "forame sclerale posteriore". La funzione principale della sclera è quella di fornire un supporto meccanico alla retina, proteggere le strutture interne dell'occhio ed evitare che penetri luce al di fuori della cornea, perciò è opaca. Si tratta di un tessuto metabolicamente quiescente, pochi fibrociti, in condizioni fisiologiche ma tutt'altro che inerte dal punto di vista biomeccanico; infatti, dev'essere in grado di fornire stabilità ottica sostenendo condizioni di carico dinamiche imposte dai muscoli extra – oculari e dalle fluttuazioni costanti della pressione intraoculare (19). La rigidità della struttura, unitamente alla pressione interna, mantengono le strutture interne in posizione.

Lo spessore della sclera varia nella sua estensione (Figura 1.7), raggiungendo un massimo in corrispondenza dell'uscita del nervo ottico e un minimo nei pressi dell'equatore.

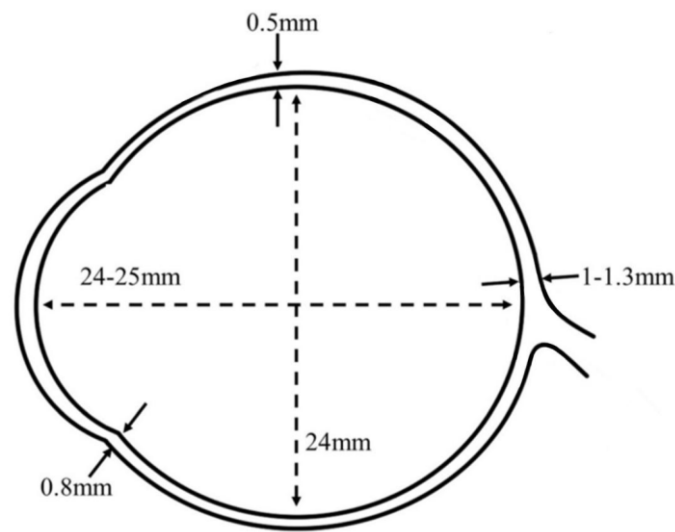


Figura 1.7: Sezione sagittale del bulbo oculare.

Nel punto di uscita del nervo ottico la sclera possiede una struttura perforata che la rende intrinsecamente più debole dal punto di vista meccanico; tale porzione è detta “lamina cribrosa” (LC) mentre la regione che la circonda è detta “sclera peripapillare” (PPS) di 1 – 2 mm di ampiezza. Una magnificazione di tali strutture si può apprezzare in Figura 1.8

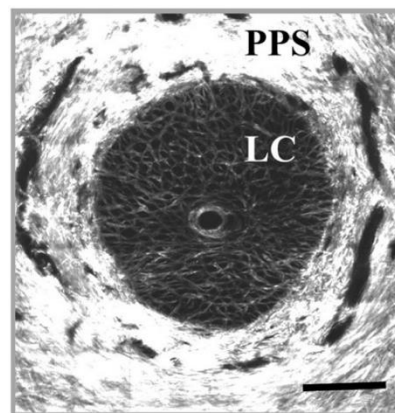


Figura 1.8: Sezione della papilla del nervo ottico che mostra la struttura finestrata della lamina cribrosa (LC) e della sclera peripapillare circostante (PPS).

La sclera è prevalentemente avascolare ma è comunque perforata in alcuni punti da piccoli vasi e nervi (7).

La struttura della sclera è divisibile in tre strati: l'episclera, lo stroma e la lamina fusca. L'episclera è lo strato più esterno, riccamente vascolarizzato e posto al di sotto della capsula di Tenone, alla quale si fonde, assieme alla congiuntiva bulbare, nel limbus. In Figura 1.9 è possibile apprezzare tale caratteristica anatomica.

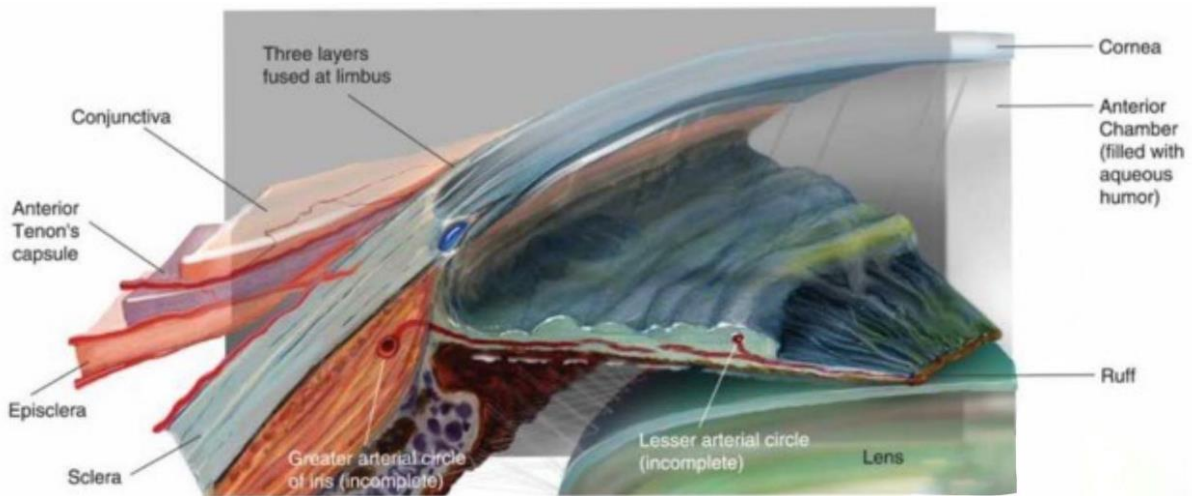


Figura 1.9: Dettaglio dell'angolo della camera anteriore.

Si tratta di uno strato di tessuto connettivo formato principalmente da fibre di collagene ed in misura minore da fibre elastiche, è popolato da melanociti e macrofagi. L'episclera si assottiglia nelle zone posteriori del bulbo e si fonde allo stroma nella porzione inferiore (7; 8; 19).

Lo stroma costituisce lo strato caratterizzante della sclera sia in termini dimensionali che strutturali. La composizione del tessuto, così come la sua organizzazione, sono fondamentali nel determinarne le caratteristiche meccaniche. La matrice extracellulare di quest'ultimo è principalmente composta da lamelle di collagene (tipo I e III) spaziate e da alcune fibre elastiche. La composizione della sclera e della cornea sono molto simili, ma la differenza nell'idratazione dei tessuti, sclera è tessuto idratato, e nella disposizione delle lamelle li rende molto diversi. Nella sclera l'orientamento delle lamelle è casuale ed irregolare nonostante vi siano differenze nelle varie regioni che influenzano le proprietà meccaniche del tessuto.

Le lamelle, spesse $0.5 - 6 \mu m$, sono formate da fibrille di collagene con diametro $25 - 230 nm$, formate a loro volta molte microfibrille parallele, ciascuna con diametro di $4 nm$. In Figura 1.10 è rappresentato uno schema della disposizione delle molecole di collagene e delle microfibrille all'interno di ogni fibrilla.

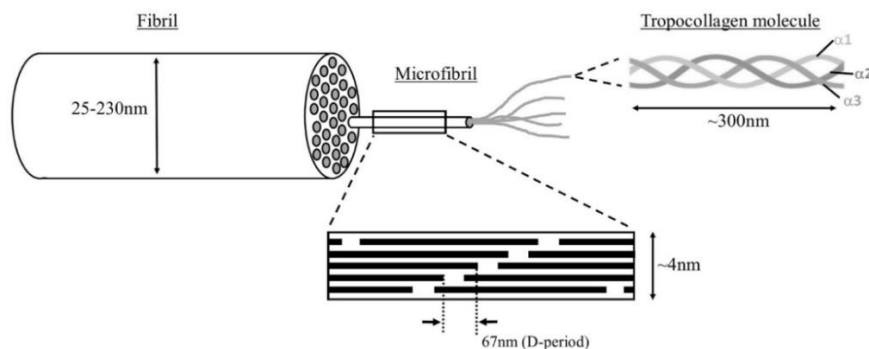


Figura 1.10: Organizzazione delle molecole di collagene e delle fibrille all'interno delle fibre di collagene.

Le microfibrille si allineano a 5° dall'asse della fibra, mentre le fibrille si assemblano in fasci irregolari a costituire le lamelle.

Le fibre elastiche sono formate da un core di elastina ricoperto da microfibrille ricche di fibrillina. Sono presenti in proporzione minore ma la loro funzione non è ancora molto chiara.

Lo spazio tra le fibrille è occupato da proteoglicani (PGs) che regolano l'organizzazione e la dimensione delle fibrille mediante il grado di idratazione del tessuto. I PGs sono macromolecole formate da un core proteico a cui sono legati dei glicosamminoglicani (GAG), cioè catene polisaccaridiche cariche negativamente grazie alla presenza di gruppi solfato (condrotin solfato, cheratin solfato, aggrecani, ecc.) altamente idrofilici. Si forma così una matrice gelatinosa funzionale per la trasmissione dei carichi tra le fibre di collagene (19).

La lamina fusca è lo strato più interno, è irregolare e sottile e connesso lassamente alla corioide sottostante.

Come precedentemente accennato, l'orientazione delle lamelle presenta direzioni preferenziali in alcune regioni come la zona peripapillare e della lamina cribrosa. È stata infatti evidenziata un'elevata anisotropia (lamelle orientate circolarmente a costituire uno pseudo - annulus) probabilmente dovuta alla necessità di limitare le deformazioni in quella zona per preservare l'integrità del nervo ottico e dell'informazione restituita al cervello dalla retina.

In Figura 1.11 è mostrato il grafico dei vettori polari indicanti l'orientazione delle lamelle di collagene. Il grado di anisotropia si evince dalla scala, mentre la direzione preferenziale delle fibrille è evidenziata dalle direzioni dei vettori. Ergo, l'allineamento delle lamelle aumenta passando da vettori blu scuro a vettori rossi, secondo la legenda.

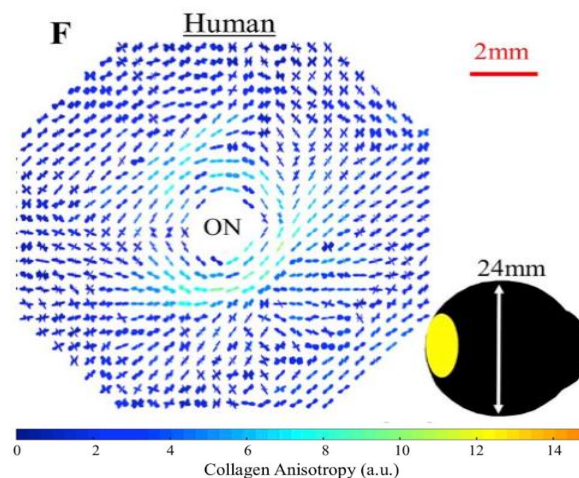


Figura 1.11: Mappa dei vettori polari indicanti l'orientazione delle lamelle di collagene.

Anche in corrispondenza dell'inserzione del muscolo superiore obliquo (SO) ed inferiore obliquo (IO) si nota un allineamento preferenziale delle lamelle. A supporto di tale si può osservare la Figura 1.12 che mostra l'orientazione, più generale, delle lamelle di collagene. Si può notare come, in corrispondenza delle inserzioni muscolari, vi sia una configurazione più ordinata delle lamelle.

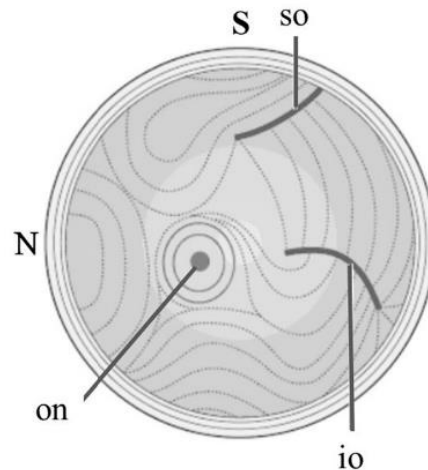


Figura 1.12: Sezione sagittale del bulbo che mostra l'orientazione delle lamelle nella sclera.

1.2 Caratteristiche Meccaniche

La risposta meccanica di un materiale all'applicazione di forze è la diretta conseguenza della sua composizione molecolare, struttura e morfologia (20). Per indagare le proprietà meccaniche di un materiale, cioè la capacità di resistere all'applicazione un carico e la conseguente deformazione che ne deriva, si possono effettuare diversi test sperimentali in cui si applica una forza, o una deformazione, a campioni più o meno grandi, in domini di tempo variabili. Nel caso di un tessuto biologico, in un ridotto intervallo di tempo si ottengono principalmente informazioni riguardo la risposta elastica di un materiale, mentre in un regime temporale più ampio si possono indagare le proprietà viscosi dello stesso (12). Anche la dimensione del campione analizzato impatta sui risultati ottenuti nel caso in cui il materiale non abbia una struttura omogenea. Tuttavia, se la dimensione del campione è sufficientemente grande rispetto all'ordine di grandezza delle strutture che lo compongono, il materiale si può assumere come un continuo.

In letteratura sono stati effettuati molteplici test con metodologie differenti ma i cui risultati non convergono in un range consistente di valori per via di protocolli diversi, condizioni di carico e condizioni al contorno; quindi, non sono direttamente confrontabili. Nel caso dei tessuti oculari, la dimensione del campione è particolarmente rilevante, poiché risulta complicato testare separatamente le diverse strutture. Inoltre, essendo la tonaca fibrosa del bulbo oculare una struttura continua,

vi è il rischio di ottenere risultati non realistici se non si considera l'interazione tra le varie componenti.

La cornea e la sclera, come la maggior parte dei tessuti biologici, possiedono un comportamento viscoelastico non-lineare (12): le molecole di collagene ed elastina forniscono la risposta elastica, mentre la matrice acquosa e le componenti cellulari determinano la risposta viscosa (21). L'elasticità di un materiale è una proprietà tipica dei solidi ed è tempo indipendente e consente al materiale di tornare nella forma originale una volta che il carico è rimosso. Al contrario la viscosità è una proprietà tempo dipendente, tipica dei fluidi, ed è legata alla dissipazione di energia in seguito all'applicazione di una deformazione. Le proprietà meccaniche di cornea e sclera devono essere misurate ex vivo.

La curva di carico – deformazione che si ottiene sottoponendo un campione di tessuto biologico a trazione ha un andamento crescente non lineare (Figura 1.13), a forma di J, in cui si distinguono chiaramente tre zone (20):

- 1) O-A zona in cui lavora fisiologicamente il tessuto: lo carico aumenta esponenzialmente con la deformazione;
- 2) A-B corrisponde alla riserva di resistenza del tessuto: la forza aumenta prima linearmente con la deformazione e poi non più, terminando con la rottura in C
- 3) B-C B corrisponde alla riserva di resistenza del tessuto: il carico aumenta non linearmente con la deformazione, terminando con la rottura in C

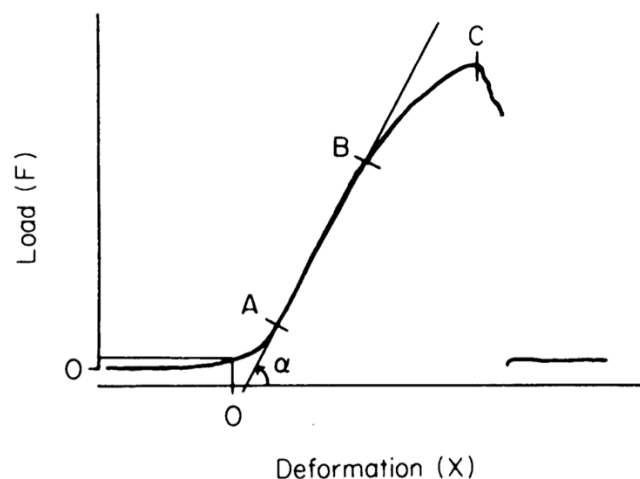


Figura 1.13: Curva di sforzo – deformazione tipica di un materiale biologico.

1.2.1 Cornea

La risposta di un campione di cornea in termini di sforzo è dovuta alle sue componenti. Nella prima zona, caratterizzata da basso modulo elastico, si ha una risposta elastica istantanea causata dalla matrice non collagenosa del tessuto e dalla distensione delle fibre di collagene (uncrimping). A questo andamento contribuisce anche il ri orientamento delle lamelle, che si dispongono nella direzione di applicazione del

carico. Successivamente, per valori di deformazione maggiori, la risposta meccanica è prevalentemente dominata dalla resistenza delle fibre di collagene ed il modulo elastico cresce molto (22).

Il modulo di Young della cornea risulta molto variabile negli studi effettuati, andando da 0.1 a 57 MPa (12) e cambiando in base alla regione testata, all'età del donatore, al periodo di conservazione del tessuto e al metodo di test utilizzato. Nello studio di Hamilton et al., il modulo di Young è risultato pari a 0.29 ± 0.06 MPa a seguito di studi in vivo (23). Nello studio di Song et al (24), il modulo di Young calcolato a partire da campioni ex vivo è risultato pari a 0.204 ± 0.189 MPa nella regione a bassa deformazione (tratto O - A) e 5.114 ± 1.958 MPa nel tratto lineare ad elevata deformazione (A - B). In un altro studio ancora (25), è stato valutato un modulo di Young nella zona a bassa deformazione pari a 1.17 ± 0.43 MPa in direzione orizzontale e 1.32 ± 0.50 MPa in direzione verticale; mentre nel tratto a deformazione maggiore è stato valutato pari a 43.59 ± 7.96 MPa in reazione orizzontale e 51.26 ± 8.23 MPa in quella verticale. Vi è una grande variabilità nei valori, spesso dovuta alle modalità di conservazione dei campioni, metodi di test e successivi calcoli per ottenere i parametri di interesse.

La distribuzione spaziale delle lamelle si riflette in una sostanziale anisotropia del tessuto (13; 22). Infatti; le proprietà meccaniche della cornea variano in base alla profondità (26; 12), alla direzione e zona testata (12).

In letteratura sono stati effettuati vari test sperimentali per valutare le proprietà meccaniche in base alla profondità; sebbene i risultati ottenuti non siano direttamente confrontabili per le limitazioni di cui sopra, si evince una sostanziale diminuzione delle proprietà meccaniche in funzione della profondità corneale, sia in individui giovani che anziani (27). Tale valutazione si traduce in una diminuzione del modulo di taglio (28; 29) e modulo di Young (22; 27; 30) e forza di coesione nello stroma (31).

Testando campioni corneali a profondità diverse M.H. Nambiar et al. hanno osservato una diminuzione lineare della rigidità all'aumentare della profondità: i campioni centrali sono risultati 18% più deboli di quelli anteriori, mentre i posteriori addirittura il 38% meno rigidi. La Figura 1.14 mostra un grafico che rapporta il valore rigidità, normalizzata, in funzione della profondità della cornea.

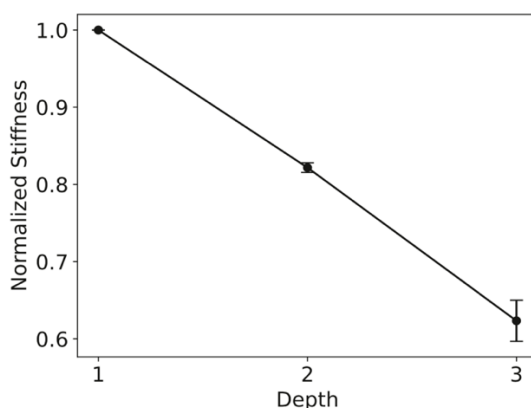


Figura 1.14: Rigidezza normalizzata della cornea rispetto alla profondità della stessa.

Tale andamento è si evidenzia anche dalle curve di sforzo deformazione ottenute tramite test di trazione uniassiale (Figura 1.15); tale andamento risulta consistente con le osservazioni effettuate riguardo il grado di intreccio delle lamelle (nella parte anteriore sono maggiormente intrecciate (12)) e presentano una densità maggiore (32); quindi, il tessuto risulta più rigido.

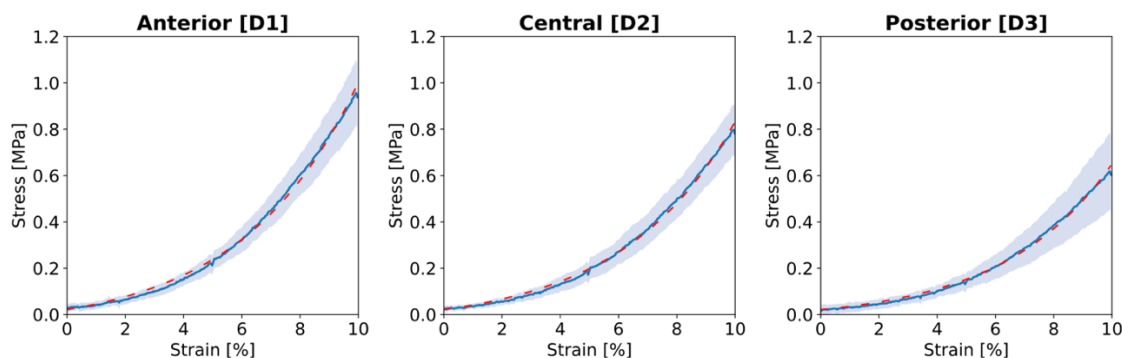


Figura 1.15: Curve di sforzo – deformazione di cornea a profondità diverse.

La maggiore rigidezza dello stroma nella sua porzione anteriore fa si che questa sia la responsabile delle proprietà strutturali (mantenimento della curvatura (17; 13)) e meccaniche dello stroma (15), resistendo efficacemente a sforzi di taglio e alla pressione intraoculare IOP (33). Mentre la struttura dei due terzi inferiori potrebbe conferirgli la capacità si assorbire gli urti dissipando l'energia cinetica di un eventuale impatto (13). Secondo Dias and Ziebarth, che hanno effettuato delle prove di nanoindentazione, la porzione anteriore dello stroma è più rigida del 40% rispetto alla porzione posteriore (32).

La cornea risulta più rigida in direzione verticale rispetto che orizzontale e diagonale. In uno studio i moduli di Young ottenuti tramite test di trazione uniassiale sulla cornea in direzione verticale, orizzontale e circonferenziale sono risultati rispettivamente: 3 MPa , 1 MPa e 13 MPa (34). Anche nello studio di Elsheikh et al. si è potuto constatare che la cornea è più rigida in direzione verticale e orizzontale piuttosto che diagonale (rigidezza maggiore del 53% e 40%, rispettivamente, rispetto a campioni diagonali).

Sempre Elsheikh et al. ha osservato che tale andamento rimane valido anche al variare della velocità di deformazione (35).

Le proprietà meccaniche della cornea sono strettamente legate all'età (irrigidimento della cornea) (36), al livello di idratazione, ai cambiamenti ormonali e all'insorgere di patologie (12).

La Figura 1.16 mostra due tipologie di curve di sforzo – deformazione ottenute tramite test di insufflazione della cornea, pressurizzandola a velocità diversi: (a) 3.75 mmHg/min e (b) 37.5 mmHg/min . Osservando i grafici si nota precisamente come, all'aumentare dell'età del paziente, aumenti la pendenza della curva, mostrando un irrigidimento del tessuto. Inoltre, pressurizzando la cornea a velocità maggiori (Figura 1.16 (b)), si nota un irrigidimento precoce del tessuto, evidenziando una dipendenza delle proprietà meccaniche del tessuto dalla velocità deformazione.

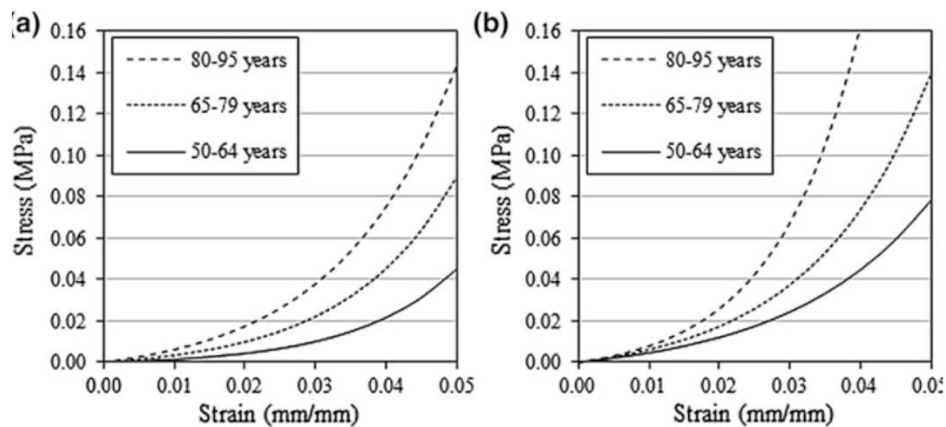


Figura 1.16: Curve di sforzo – deformazione ottenute pressurizzando a valori diversi e per cornee di pazienti con età differenti.

La cornea è un tessuto viscoelastico, ciò significa che il suo comportamento meccanico risente anche del periodo di applicazione di un carico, oltre che della magnitudo della forza stessa. Applicando una deformazione con una certa velocità ad un campione e mantenendo costante poi tale deformazione, si assiste al fenomeno di rilassamento: per cui lo sforzo resistente nel materiale diminuisce nel tempo (37; 38). Allo stesso modo, un materiale viscoelastico esibisce il fenomeno di creep, secondo cui ad un carico costante, corrisponde una deformazione che aumenta nel tempo data dal fatto che le strutture che compongono il materiale si riorientano nella direzione di applicazione del carico (38). A tal proposito, la Figura 1.17 mostra come la deformazione di un campione, pressurizzato ad un valore costante, aumenti nel tempo

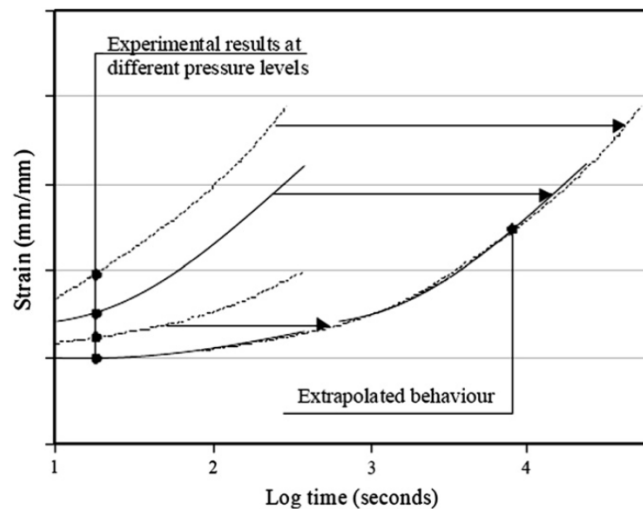


Figura 1.17: Curva di creep della cornea ottenuta tramite insufflazione.

Come si può apprezzare dal grafico ottenuto tramite test di insufflazione, la deformazione aumenta nel tempo per ogni livello di pressurizzazione (mantenuta costante). Inoltre, le proprietà viscoelastiche della cornea sembrano diminuire con l'età.

1.2.2 Sclera

Le proprietà meccaniche della sclera sono fondamentali tanto quanto quelle della cornea nel proteggere l'occhio e garantire acuità visiva; infatti, quando si verificano cambiamenti strutturali sono spesso seguiti da problemi nella vista come la miopia.

Come precedentemente affermato, il comportamento meccanico di un materiale dipende dalla sua composizione e architettura intrinseca e ciò vale anche per la sclera, il cui spessore varia nella sua estensione, così come la dimensione delle fibre di collagene. Lo stroma della sclera è lo strato di tessuto che maggiormente determina le proprietà meccaniche della stessa. Dalla porzione anteriore della sclera, a quella posteriore, le fibre cambiano dimensione, raggiungendo un minimo in corrispondenza della zona equatoriale ed un massimo in quella posteriore. Cambia anche la loro compattezza e ampiezza dell'angolo con cui si intrecciano. Bisogna notare come cambi la morfologia delle fibre di collagene anche nello spessore del tessuto, essendo più grandi e separate negli strati superficiali rispetto a quelli più profondi. (22)

Nonostante lo spessore della cornea aumenti in direzione antero - posteriore, la rigidità del tessuto diminuisce nella stessa direzione. Tali regioni risentono di maggiori sforzi nella parete, dovuti sia all'inserzione dei muscoli retti, che alla necessità di mantenere il cambio di curvatura del bulbo in corrispondenza della giunzione corneo - sclerale.; tali porzioni sono fondamentali per fornire supporto e stabilità al bulbo oculare. Mentre la parte posteriore è meno rigida e ciò potrebbe spiegarsi con la necessità di accomodare variazioni della pressione intraoculare che potrebbero danneggiare la vista. Tali osservazioni sono state confermate da J. Park et

al. (39) in uno studio condotto su campioni ex vivo testati a trazione ed estratti in diverse zone del bulbo: anteriore, equatoriale e posteriore; per ognuna è stato calcolato il modulo elastico a deformazioni diverse (3% e 7%) evidenziando la risposta iperelastica non lineare del tessuto.

La sclera anteriore risulta rigida più del doppio di quella posteriore per entrambi i livelli di deformazione, con la zona equatoriale che possiede proprietà intermedie. Le proprietà non lineari della sclera permettono a diverse zone della sclera di avere moduli elastici molto simili in zone a bassa deformazione, mentre moduli molto più diversi per deformazioni elevate (Figura 1.18).

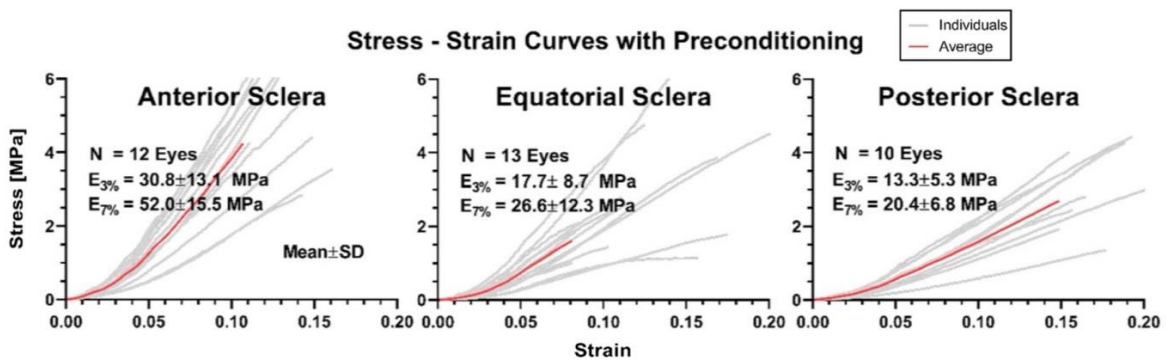


Figura 1.18: Curve di sforzo – deformazioni ottenute per porzioni diverse della sclera.

In un altro studio (40), condotto testando a trazione uniassiale campioni posteriori di sclera, verticali e orizzontali, è stato ottenuto un modulo elastico pari a 24 ± 22 kPa e 33 ± 29 kPa, rispettivamente, per la regione a bassa deformazione (toe modulus) e pari a 4395 ± 2720 kPa e 4470 ± 4181 kPa per la regione a deformazione maggiore (heel modulus). Il toe modulus ed heel modulus, sono i moduli elastici calcolati rispettivamente all'inizio della curva e nel punto a maggior pendenza della stessa. La differenza di modulo comunque, non è risultata statisticamente significativa nelle due direzioni. Secondo un altro studio (41), il modulo elastico della sclera calcolato a partire da test di insufflazione, risiede intorno ai 1.7 MPa.

Anche la sclera è un tessuto iperelastico, non lineare e viscoelastico che esibisce quindi comportamento complesso, difficile da quantificare univocamente perchè molto dipendente dalle condizioni di carico, dai metodi di conservazione dei provini e da molti altri fattori come l'età dell'individuo. È stato osservato (Figura 1.19) (42) un'irrigidimento della sclera in tutte le porzioni del bulbo all'avanzare dell'età, ma risulta statisticamente significativo solo nella porzione anteriore.

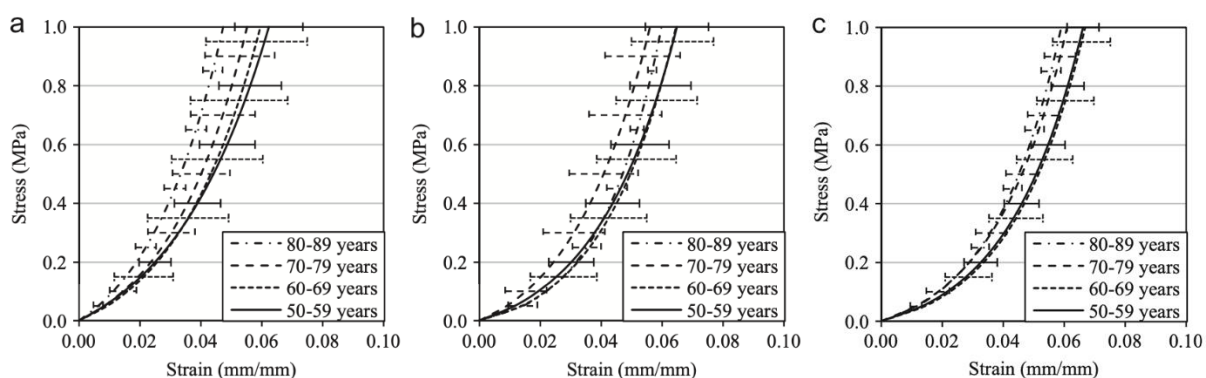


Figura 1.19: Grafico di sforzo – deformazione per la sclera estratta in porzione (a) anteriore, (b) equatoriale e (c) posteriore.

Risultati simili sono stati ottenuti in altri studi, ma quantificando un'aumento di rigidità diverso; ancora una volta vi è molta variabilità nei risultati ottenuti, imputabile a varie spiegazioni. Con l'avanzare dell'età, si ritiene che le proprietà viscoelastiche della sclera diminuiscano, in quanto è stato osservato che nei soggetti anziani il tessuto mostra una minore dipendenza dal tempo nel suo comportamento meccanico rispetto a quello dei soggetti più giovani.

La sclera può essere testata in molti modi e ognuno produce risultati diversi, tra i più comuni si trovano i test a trazione uniassiale, biassiale, test di insufflazione oppure di indentazione.

Il comportamento non lineare, è dovuto al fatto che all'aumentare della deformazione, aumenta anche il numero di fibre di collagene reclutate per sopportare il carico; ed in particolare, gioca un ruolo importante il grado di crimp delle fibre di collagene perchè in una zona con fibre crimpate a gradi diversi, queste verranno distese progressivamente, determinando il caratteristico irrigidimento del tessuto all'aumentare della deformazione (19) (Figura 1.20).

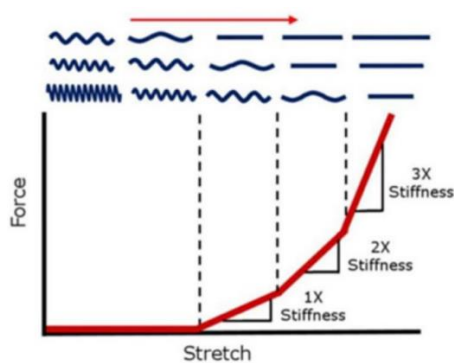


Figura 1.20: Grafico di forza – allungamento della sclera, rispetto all'uncrimping delle fibre.

Se le fibre di collagene sono crimpate alla stessa maniera, l'aumento di rigidità, avviene molto meno gradualmente, seguendo un andamento bi – lineare, piuttosto che esponenziale come nel caso precedente (Figura 1.21).

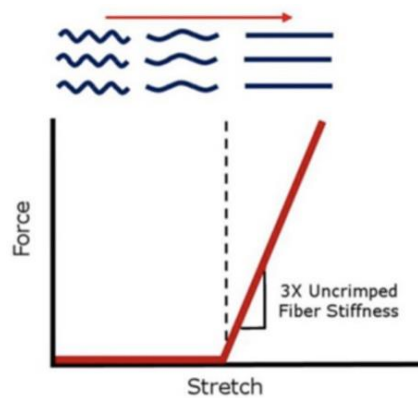


Figura 1.21: Grafico di forza – allungamento della sclera, rispetto all'uncrimping delle fibre

Il bulbo oculare è un organo soggetto a carichi dinamici e altamente variabili nel tempo causati da movimenti muscolari, fluttuazioni della pressione intraoculare, impatti accidentali, cambiamenti posturali, dall'amicciamento e da sfregamenti degli occhi. Le proprietà viscoelastiche del tessuto determinano come il tessuto si deforma nel tempo, nonché lo sforzo che si sviluppa nello stesso; nello studio di D. Song (43) è stato calcolato il modulo di rilassamento normalizzato a partire da prove di creep eseguite su porzioni di sclera anteriore, equatoriale e posteriore. In Figura 1.22 è mostrato l'andamento del modulo di rilassamento normalizzato delle tre porzioni di tessuto testate. Si evince che la porzione anteriore è la più resistente al rilassamento mentre quella equatoriale la più cedevole. I tempi di rilassamento per le tre porzioni di tessuto sono risultati, rispettivamente, 73, 30 e 35 sec.

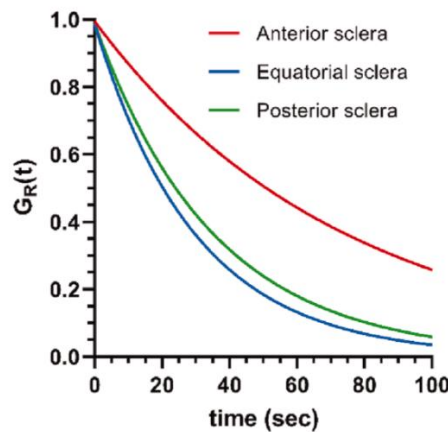


Figura 1.22: Andamento del modulo di rilassamento normalizzato porzioni della sclera diverse.

B. Coudrillier et al. (44) hanno eseguito prove di creep mediante test di insufflazione a 15 e 30 mmHg (Figura 1.23) e, diversamente da quanto riportato in precedenza nei campioni di occhi sani, non hanno riscontrato variazioni significative della risposta di creep con l'età. I meccanismi che regolano il comportamento a creep della sclera non sono ancora del tutto chiariti, ma sembrano coinvolgere sia le proprietà viscoelastiche della matrice ricca di proteoglicani, sia lo scorrimento reciproco delle fibrille collagene necessario ad accomodare le variazioni della pressione intraoculare (IOP). È plausibile che a diversi livelli di sforzo si attivino meccanismi differenti. A 15 mmHg, che

corrisponde al punto di cambiamento di pendenza della curva pressione – deformazione, la risposta sembra principalmente legata al raddrizzamento (uncrimping) delle fibre collagene. Al contrario, a 30 mmHg, dove la curva di carico risulta pressoché lineare, la deformazione appare governata dallo stiramento effettivo delle fibre collagene.

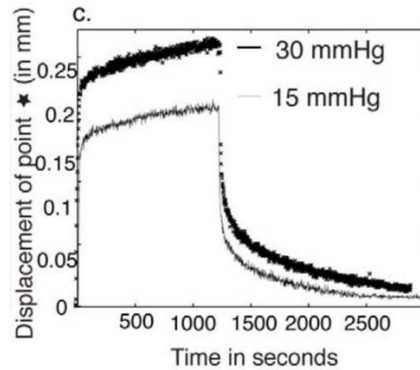


Figura 1.23: Curve di creep della sclera ricavata per valori di pressione diversi.

L'anisotropia e le proprietà viscoelastiche della sclera sono state ulteriormente confermate da uno studio (45) che ha impiegato prove di pressurizzazione ad alta velocità sull'intero bulbo oculare. In tali condizioni è stato calcolato uno sforzo reale massimo di 13 ± 4.31 MPa prima della rottura, sia lungo la direzione equatoriale sia lungo quella meridionale. La deformazione reale, invece, è risultata significativamente diversa tra le due direzioni, con valori pari a 0.041 ± 0.014 e 0.058 ± 0.018 rispettivamente; si conclude perciò che la sclera in direzione equatoriale è più rigida.

1.3 Occhio Porcino: Anatomia e Caratteristiche Meccaniche

Gli occhi di maiale rappresentano un modello sperimentale di grande valore per la ricerca grazie alla stretta somiglianza con quelli umani e alla facile reperibilità. In condizioni ideali, gli studi dovrebbero avvenire su occhi umani appena prelevati da cadavere, ma ciò risulta spesso impraticabile a causa di vincoli regolatori e difficoltà logistiche. In questo contesto, il maiale si propone come alternativa ottimale: la sua ampia disponibilità legata all'industria alimentare, il basso costo e l'assenza di restrizioni normative – diversamente da quanto avviene, ad esempio, per i primati – lo rendono una risorsa estremamente utile. A rafforzare ulteriormente questa tendenza vi è la notevole somiglianza morfologica degli occhi suini con quelli umani, sia per dimensioni sia per microstruttura e composizione.

Le caratteristiche dell'orbita e le dimensioni oculari variano molto a seconda dell'età dell'animale, delle sue dimensioni e in base alla razza dello stesso; in generale il bulbo

(Figura 1.24) è più ovale rispetto a quello umano con diametri 22.5, 24.5 e 21.6 mm in direzione medio – laterale, superiore – inferiore e anteriore – posteriore (46).

Sia nell'uomo che nel maiale i movimenti oculari sono a carico dei 6 muscoli extraoculari con l'aggiunta nel maiale del muscolo retrattore oculare (nell'uomo è una struttura vestigiale), la cui inserzione si trova posteriormente all'equatore.

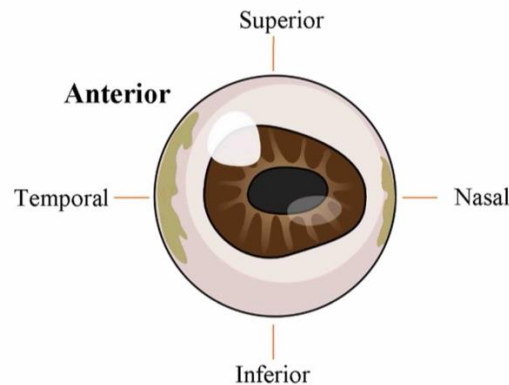


Figura 1.24: Rappresentazione del bulbo oculare porcino con direzioni anatomiche.

La cornea porcina è più grande e più spessa di quella umana ma entrambe sono leggermente allungate in direzione orizzontale (diametro verticale 12.09mm e orizzontale 14.23 mm) e lo spessore è maggiore al limbus e minimo nell'apice. Lo spessore della cornea è stato misurato in vari studi ottenendo misure diverse: $887 \pm 14 \mu m$, $1013 \pm 10 \mu m$ e $666 \mu m$ (47). Istologicamente cornea umana e porcina sono molto simili, eccezion fatta per la membrana di Bowmann che non è presente nella cornea porcina.

Le lamelle di collagene della cornea suina sono orientate prevalentemente in senso circonferenziale, ma una piccola parte presenta un orientamento perpendicolare, in modo analogo a quanto avviene nell'uomo.

Questa caratteristica potrebbe essere correlata alla minore acuità visiva del maiale: infatti, muovendo l'occhio con minore frequenza e ampiezza rispetto all'uomo, i suoi tessuti sono sottoposti a uno stress inferiore. Di conseguenza, la disposizione delle fibre potrebbe essere meno condizionata dalle direzioni anatomiche di trazione dei muscoli estrinseci (18).

In Figura 1.25 è mostrata una mappa dei vettori polari indicanti la direzione preferenziale di orientamento delle lamelle in una cornea porcina. Il colore dei vettori si riferisce alla quantità di collagene presente nella porzione di tessuto considerata.

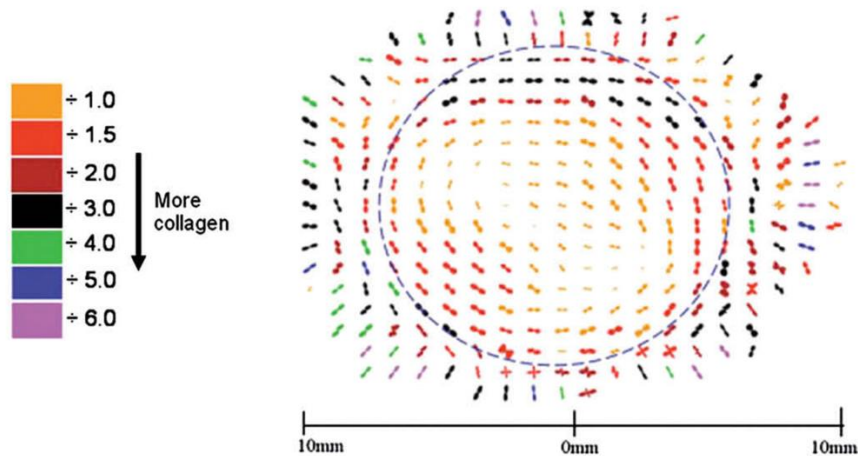


Figura 1.25: Mappa dei vettori polari indicante la direzione preferenziale delle lamelle in una cornea porcina.

La cornea porcina condivide con quella umana una differenza delle proprietà meccaniche in funzione della sua profondità, risultando più rigida nella porzione anteriore (12).

La sclera porcina è carica negativamente come quella umana e una struttura che appare istologicamente molto simile a quella umana, seppur l'organizzazione del collagene appaia meno organizzata (47). Anche riguardo lo spessore della sclera si trovano range discordanti in letteratura, che vanno da $0.25\text{ mm} - 0.9\text{ mm}$ (46) a $0.83 - 1.23\text{ mm}$ (47) a $0.43 - 1.12\text{ mm}$ (48). È importante sottolineare che lo spessore della sclera varia a seconda della posizione considerata nel bulbo (48; 49) (Figura 1.26).

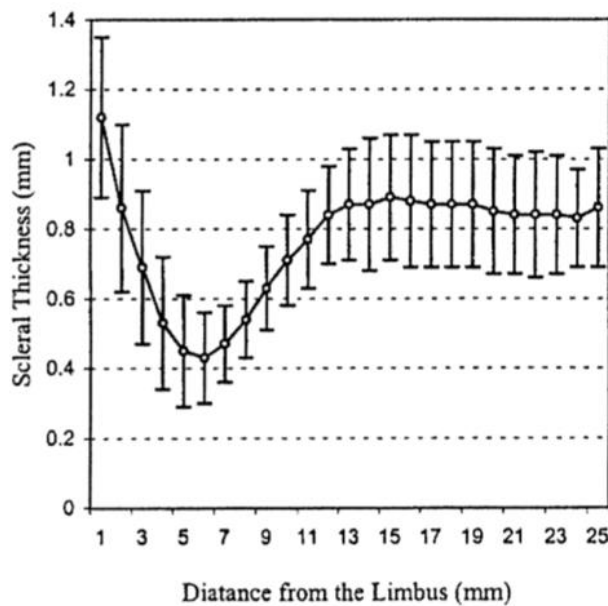


Figura 1.26: Andamento dello spessore sclerale rispetto alla distanza dal limbus.

Alla giunzione corneosclerale corrisponde il massimo spessore, che diminuisce al minimo a circa 6 mm dal limbo. Procedendo verso il nervo ottico lo spessore rimane

pressochè costante aumentando in corrispondenza dell'inserzione del nervo. Secondo S. M. Duma (46) invece, lo spessore massimo si raggiunge nell'intorno del polo posteriore.

Dal punto di vista biomeccanico anche la cornea porcina è iperelastica, con una curva sforzo – deformazione molto simile a quella umana (37). In Figura 1.27 si possono osservare le curve di sforzo – deformazione di cornea umana e porcina: la curva relativa alla cornea umana risulta più pendente, implicando una maggiore rigidità della stessa rispetto alla cornea porcina.

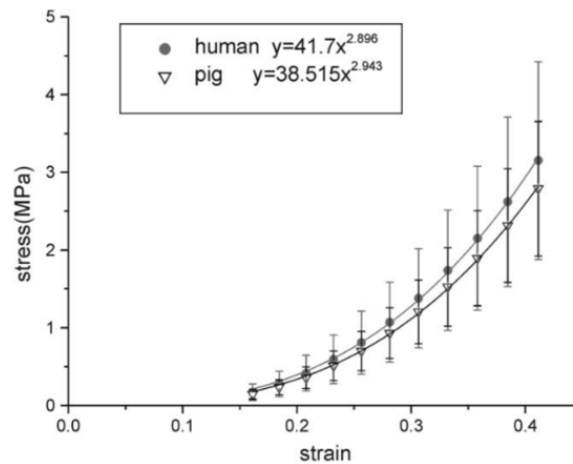


Figura 1.27: Curva sforzo – deformazione della cornea umana porcina e porcina.

Lo studio di A. Elsheikh et al. (38) evidenzia nella cornea porcina un incremento della rigidità all'aumentare della deformazione, tipico dei materiali viscoelastici. La relativa curva che relaziona la pressione intraoculare allo spostamento apicale, si caratterizza per un andamento bi-lineare, in contrasto con l'andamento tipicamente esponenziale osservato nella cornea umana (Figura 1.28). Tale comportamento determina una separazione più marcata tra la regione a basso sforzo e quella a sforzo elevato; nei test di insufflazione, la transizione tra le due fasi si manifesta a una pressione intraoculare posteriore di circa 10 mmHg. Il rapporto tra la rigidità finale e quella iniziale è pari a 5.

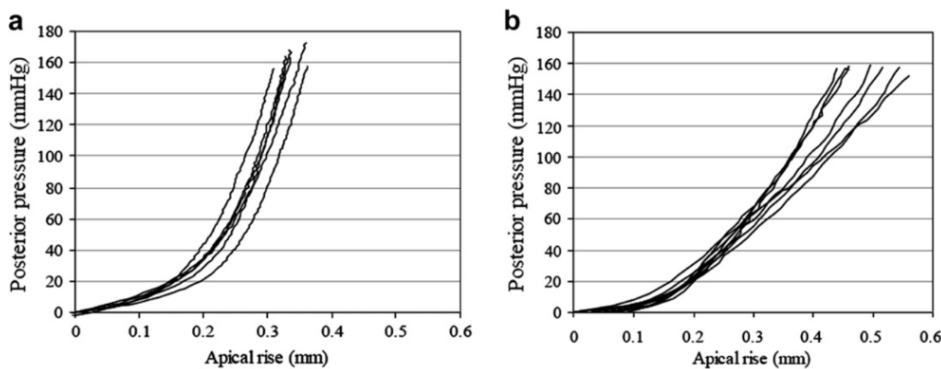


Figura 1.28: Curva che relaziona la pressione intraoculare allo spostamento apicale della cornea (a) umana e (b) porcina.

In letteratura vi sono opinioni discordanti riguardo all'isotropia delle proprietà meccaniche della cornea. I risultati riportati da A. Elsheikh et al. (35) evidenziano un comportamento anisotropico: la direzione verticale risulta la più rigida e resistente, seguita da quella orizzontale, mentre la diagonale appare la più debole. In particolare, i campioni verticali hanno mostrato una resistenza superiore del 10–20% rispetto a quelli orizzontali. Nei test di trazione uniassiale, i campioni verticali e orizzontali presentano rigidità simile (comunque maggiore rispetto ai diagonali) quando sottoposti a basse velocità di deformazione (1%/min); a velocità più elevate (500%/min), invece, i campioni verticali risultano più rigidi degli orizzontali di circa il 10–20%. L'anisotropia individuata è compatibile con l'orientazione preferenziale delle lamelle di collagene nella cornea.

In uno studio successivo (50), lo stesso autore descrive la cornea porcina come sostanzialmente isotropica, poiché non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra campioni estratti in direzione verticale, orizzontale e diagonale. Tuttavia, a basse velocità di deformazione (0.8%/min) è stata osservata una maggiore rigidità nei campioni diagonali, ma in tutte le direzioni anatomiche i dati hanno mostrato un'elevata dispersione. A tal proposito si può dedurre che velocità di deformazione maggiori sono più efficienti nel distendere le fibre di collagene ed allinearle nella direzione del carico, producendo così dei risultati più affidabili. All'interno dello stesso lavoro viene inoltre riportato che il comportamento corneale può variare in maniera consistente tra diversi animali, pur mantenendo l'andamento generale appena descritto.

Uno studio più recente (51) conferma la sostanziale isotropia della cornea porcina a seguito di test di trazione uniassiali e biassiali; nonchè la dipendenza della rigidità rispetto alla velocità di carico. Infatti, osservando la Figura 1.29 si nota come, a parità di velocità di carico, i campioni prelevati da direzioni diverse si comportino molto similmente, generando curve praticamente sovrapponibili.

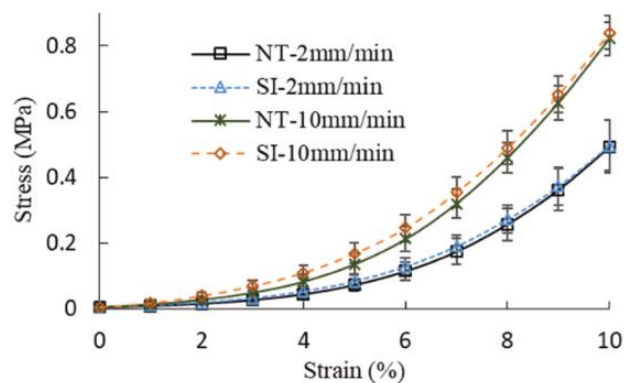


Figura 1.29: Curva di sforzo – deformazione per campioni corneali porcini prelevati in direzioni diverse.

Campioni estratti in direzione superiore – inferiore (SI) e nasale – temporale (NT) mostrano comportamenti simili se caricati alla stessa velocità, ma statisticamente diversi quando quest'ultima cambia.

L'isotropia della cornea trova giustificazione nel fatto che la cornea possiede lamelle orientate principalmente in direzione circonferenziale.

Riguardo le analisi di tipo viscoelastico, Y. Zeng et al. hanno evidenziato come la cornea porcina non rappresenti un modello adeguato per quella umana, poiché le due risultano significativamente differenti nel modulo di rilassamento. In particolare, la cornea porcina tende a rilassarsi più rapidamente rispetto a quella umana, rendendo inaffidabile l'utilizzo delle sue proprietà viscoelastiche come riferimento per il tessuto umano.

Osservando la Figura 1.30 infatti, si può osservare come la curva prodotta tramite il tessuto di provenienza animale sia molto più pendente e, a parità di secondi, raggiunga valori di modulo di rilassamento più bassi della controparte umana; la cornea porcina risulta quindi più cedevole di quella umana.

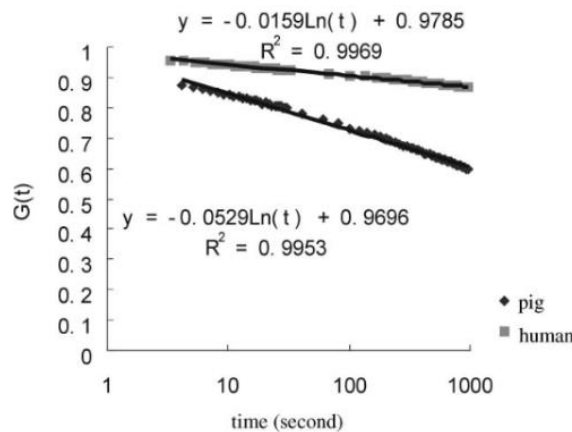


Figura 1.30: Curve di creep per la sclera porcina e umana.

Tale evidenza è confermata anche da uno studio comparativo (38) nel quale risulta che lo sforzo perso dalla cornea porcina a 400s, 800s e 1200s è in media il $49.2 \pm 8.3\%$, $55.6 \pm 8.2\%$ e $59.2 \pm 8.1\%$ dello sforzo di picco. La cornea porcina manifesta una viscoelasticità più accentuata rispetto alla cornea umana, come dimostrato dalla ridotta capacità di preservare la conformazione originaria a seguito dell'applicazione di un carico. Come per il rilassamento, anche la deformazione da creep risulta significativamente superiore a quella riscontrata nel tessuto umano.

Il comportamento meccanico della sclera risulta strettamente dipendente dal grado di idratazione; quando questa diminuisce, il tessuto manifesta un incremento della rigidità e una riduzione delle proprietà viscoelastiche evidenziata da un minor rilassamento nel tempo. In tali circostanze, sia lo sforzo massimo sia lo sforzo di equilibrio tendono ad aumentare in maniera significativa (52).

Come riportato da D. S. Schultz (53), la sclera umana presenta una rigidità superiore di circa 75% rispetto a quella porcina quando sottoposta a una deformazione dell'1%. In tali condizioni di prova, il modulo elastico (E) è stato quantificato in 2.6 ± 2.13 MPa per la sclera umana e in 0.65 ± 0.53 MPa per quella porcina.

Altri studi (54; 52) hanno riportato valori di sforzo ricavati al 5% di deformazione, pari a:

- 0.09 ± 0.02 MPa con velocità di carico di $v = 0.2$ mm/min
- 0.12 ± 0.02 MPa con velocità di carico di $v = 1$ mm/min
- 0.14 MPa con velocità di carico di $v = 0.6$ mm/min

Il grado di idratazione della sclera è condizionato da diversi fattori, tra cui le modalità di conservazione dei campioni, eventuali trattamenti effettuati e la specifica composizione tissutale. L'idratazione dipende in larga misura dal contenuto di glicosamminoglicani (GAG) presenti nella matrice extracellulare: una loro riduzione o rimozione determina una minore capacità del tessuto di trattenere acqua e comporta un conseguente aumento della rigidità sclerale (35; 55). Valutazione confermata anche da Z. Ndlovu et al. (56) e da F. Zhang et al. (57), secondo cui il modulo elastico della sclera porcina in direzione equatoriale è maggiore rispetto al modulo elastico in direzione antero-posteriore del 15-30%. Tale condizione di anisotropia resta valida anche nella zona posteriore della sclera, come afferma B.C. Perez et al. (58) che effettua test biassiali. Nella porzione posteriore l'orientamento circonferenziale riduce di gran lunga le deformazioni a carico del nervo ottico, limitando eventuali danni. La sclera porcina risulta, nello studio appena citato, meno rigida rispetto a quella umana circa dell'85%, con valori pari a: $477 - 344$ kPa per i suini e $2.9 - 2.8$ MPa per l'uomo.

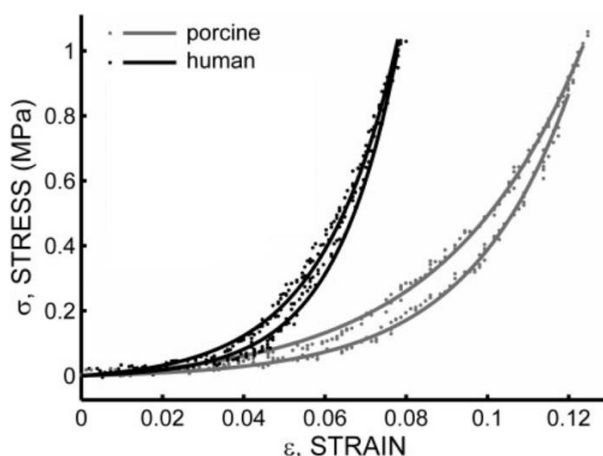


Figura 1.31: Curva di sforzo – deformazione con area di isteresi per sclera umana e porcina.

Contrariamente a quanto osservato per i test di trazione, la sclera porcina possiede un modulo di rilassamento maggiore di quello umano se la sclera viene sottoposta a test di rilassamento mediante compressione non confinata (59). In particolare, al 5% di deformazione, sono stati misurati dei moduli di rilassamento pari a 1.1 ± 0.08 kPa per

l'uomo rispetto a $3.9 \pm 0.57 \text{ kPa}$ per il maiale (Figura 1.32). È stato inoltre valutato un aumento più che lineare del modulo di rilassamento all'aumentare della deformazione applicata.

In un altro studio (60) che ha compiuto compressione non confinata, il modulo di rilassamento è risultato pari a $10.0 \pm 3.2 \text{ kPa}$.

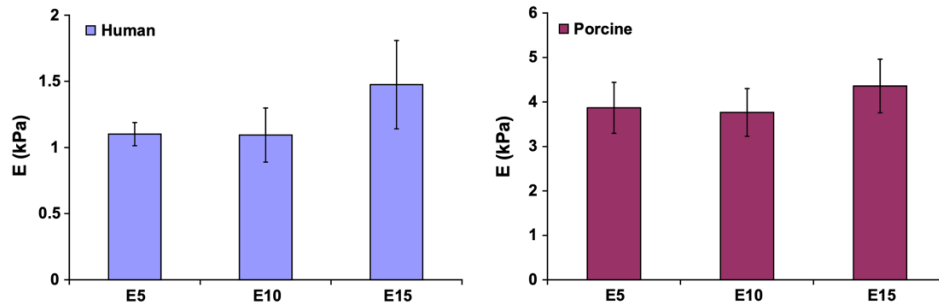


Figura 1.32: Istogramma con i moduli di rilassamento a varie deformazioni per sclera umana e porcina.

Effettuando prove di stress – relaxation tramite trazione (54), sono invece stati misurati i seguenti valori di modulo di rilassamento al variare della deformazione e della velocità di carico:

- $v = 0.2 \text{ mm/min}$
 - $\varepsilon = 5\% \rightarrow 0.84 \pm 0.16 \text{ MPa}$
 - $\varepsilon = 10\% \rightarrow 2.44 \pm 0.7 \text{ MPa}$
 - $\varepsilon = 25\% \rightarrow 4.17 \pm 1.31 \text{ MPa}$
- $v = 1 \text{ mm/min}$
 - $\varepsilon = 5\% \rightarrow 1.03 \pm 0.24 \text{ MPa}$
 - $\varepsilon = 10\% \rightarrow 2.76 \pm 1.07 \text{ MPa}$
 - $\varepsilon = 15\% \rightarrow 4.85 \pm 1.95 \text{ MPa}$

2 Capitolo 2: Patologie Bulbari

Patologie di grande impatto clinico, come il glaucoma o la miopia, trovano nella risposta meccanica della sclera e della cornea un elemento chiave del loro sviluppo e della loro progressione. Ad esempio, un'eccessiva rigidità o, un indebolimento strutturale del tessuto, possono modificare il carico meccanico a livello della testa del nervo ottico o causare una deformazione del bulbo oculare.

Sebbene in questo capitolo tali condizioni verranno trattate in maniera introduttiva, senza approfondimenti clinici dettagliati, l'obiettivo è evidenziare come esista una relazione diretta tra le proprietà meccaniche dei tessuti oculari, lo sviluppo di tali condizioni e la progressione delle stesse. Mettere in luce tali aspetti è di cruciale importanza per identificare i parametri biomeccanici rilevanti di cornea e sclera; permettendo di conseguenza lo sviluppo di strumenti sensibili per la diagnosi, oltre che approcci terapeutici mirati, in grado di rallentare o modificare il decorso delle patologie oculari.

2.1 Glaucoma

Il glaucoma rappresenta un gruppo eterogeneo di condizioni patologiche accomunate da una progressiva perdita delle cellule ganglionari retiniche (RGCs) e da un danno al nervo ottico, che conducono inevitabilmente a un deterioramento della funzione visiva. Si tratta di una patologia ad elevato impatto socioeconomico, poiché attualmente interessa circa 95 milioni di individui a livello globale, con una prevalenza in costante aumento a causa del progressivo invecchiamento della popolazione. Il glaucoma costituisce la principale causa di perdita progressiva della vista nel mondo. Sebbene non esistano terapie in grado di curare tale patologia, un trattamento precoce consente di rallentarne significativamente la progressione. Tuttavia, la diagnosi tempestiva risulta complessa, poiché il glaucoma rimane spesso asintomatico nelle fasi iniziali e tende a manifestarsi clinicamente solo in stadi avanzati.

Sono descritti diversi fenotipi di glaucoma, sebbene la correlazione più rilevante sia quella tra l'aumento della pressione intraoculare (IOP) e l'insorgenza della malattia. Tale relazione non è tuttavia assoluta: quasi la metà dei pazienti glaucomatosi presenta valori pressori nella norma, mentre numerosi individui con valori di IOP superiori a

21 mmHg – soglia considerata di riferimento per la popolazione sana caucasica – non sviluppano la patologia (61).

Inoltre, il glaucoma può insorgere come conseguenza secondaria di altre malattie, condizioni sistemiche o eventi traumatici. L'elevata IOP determina un danno progressivo a carico della testa del nervo ottico, una perdita del tessuto retinico e il conseguente peggioramento della funzione visiva, caratterizzato tipicamente dall'infossamento della papilla ottica (Figura 2.1).

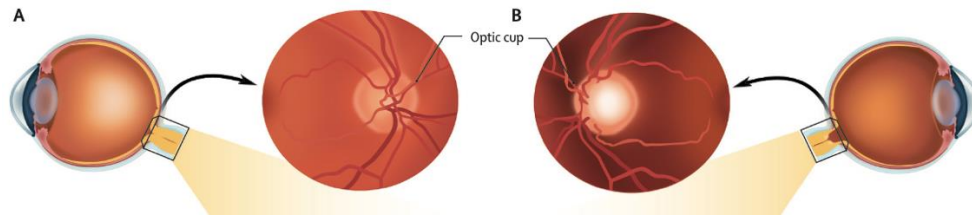


Figura 2.1: Confronto papilla ottica di un occhio sano (A) con uno affetto da glaucoma (B).

I principali fattori di rischio includono un'elevata IOP, l'età avanzata e la familiarità per la malattia. Anche la miopia rappresenta un importante fattore di rischio: individui con almeno 3 diottrie di difetto presentano un rischio tre volte maggiore di sviluppare glaucoma. Considerando l'aumento della prevalenza della miopia a livello globale, tale associazione delinea uno scenario epidemiologico preoccupante. Il glaucoma comporta un progressivo peggioramento della qualità di vita, poiché la sua natura degenerativa porta a una crescente perdita di autonomia funzionale e a un isolamento sociale del paziente.

Tra i fattori di rischio, l'aumento della pressione intraoculare rappresenta l'unico elemento inequivocabilmente associato al danno del nervo ottico. Tale condizione deriva da una disregolazione dell'equilibrio tra produzione e drenaggio dell'umor acqueo, con conseguente accumulo a livello del bulbo oculare. Le terapie attualmente disponibili mirano a ridurre la IOP mediante approcci chirurgici, con l'ausilio del laser o mediante trattamenti farmacologici, agendo sia sulla produzione che sul deflusso dell'umor acqueo. La riduzione della pressione intraoculare rappresenta, a oggi, l'unica strategia terapeutica dimostratasi realmente efficace (62).

È stato osservato che le sclere glaucomatose di soggetti anziani risultano più spesse rispetto a quelle di individui sani (44), ma anche lo spessore corneale centrale è stato identificato come un fattore di rischio indipendente. Inoltre, prove di creep su sclera peripapillare hanno evidenziato una velocità di deformazione ridotta. Tali osservazioni suggeriscono un potenziale collegamento tra alterazioni delle proprietà meccaniche e danno assonale a livello del nervo ottico. In particolare, nei pazienti glaucomatosi, con o senza danno evidente al nervo ottico, la sclera peripapillare mostra una maggiore rigidità lungo l'asse meridionale e un rapporto di deformazione meridionale/circonferenziale ridotto, associati a una disposizione più omogenea delle fibre collagene e a un incremento del modulo di taglio della matrice extracellulare (19).

Tuttavia, poiché tali evidenze derivano da studi di insufflazione, non è stato possibile stabilire con certezza se la minore deformabilità del tessuto rifletta un reale aumento del modulo elastico. Inoltre, dati sperimentali contrastanti non consentono di definire se una sclera più rigida possa esercitare un effetto protettivo o peggiorativo nella progressione della malattia.

Evidenze emergenti indicano una relazione tra proprietà biomeccaniche di cornea e sclera ed il rischio di sviluppare glaucoma, influenzando anche la suscettibilità del tessuto allo sviluppo di lesioni. Rimane tuttavia da chiarire in che modo le proprietà corneosclerali influenzino il profilo dinamico della pressione intraoculare (63). La pressione intraoculare è infatti soggetta a fluttuazioni fisiologiche legate ad attività quotidiane e condizioni sistemiche. Alcuni studi, come quello di Asrani et al. (64), hanno evidenziato una correlazione significativa tra variazioni giornaliere o infrasettimanali della IOP e rischio di progressione del glaucoma, mentre altri non hanno confermato tale associazione.

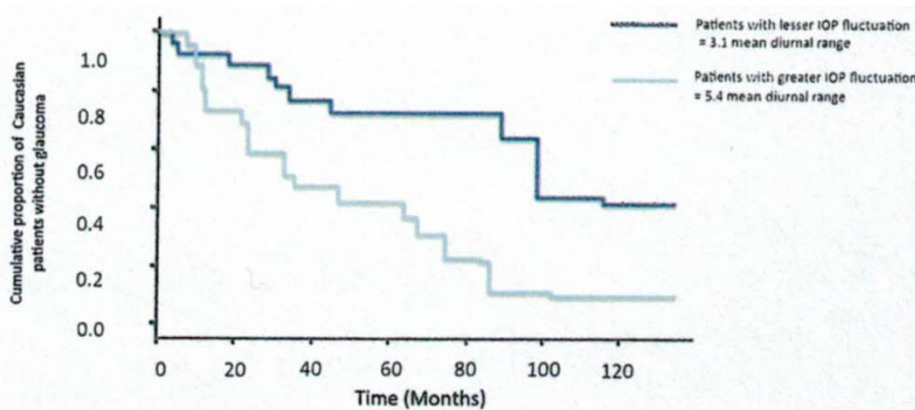


Figura 2.2: Proporzione di individui senza glaucoma all'aumentare del tempo rispetto alle variazioni di IOP a cui sono sottoposti.

In Figura 2.2 è mostrato l'andamento temporale della proporzione di individui senza glaucoma a seconda delle fluttuazioni medie di IOP giornaliera. La curva azzurra è relativa agli individui con fluttuazioni che raggiungono valori maggiori ed infatti, evidenzia una maggiore incidenza della malattia.

Di conseguenza non è stato chiarito il legame fra fluttuazioni dell'IOP e il rischio di sviluppare glaucoma, o un danno da quest'ultimo. La mancanza di una definizione condivisa di fluttuazione pressoria e la difficoltà di misurarla in maniera rappresentativa contribuiscono a tale incertezza.

Inoltre, bisogna tener conto del ruolo centrale delle proprietà viscoelastiche di cornea e sclera nello smorzamento delle oscillazioni pressorie, riducendone l'impatto sul nervo ottico. Esperimenti condotti su cornee trattate con glutaraldeide hanno mostrato un incremento proporzionale della IOP rispetto a occhi di controllo, suggerendo una correlazione positiva tra rigidità corneale e aumento pressorio (Figura 2.3).

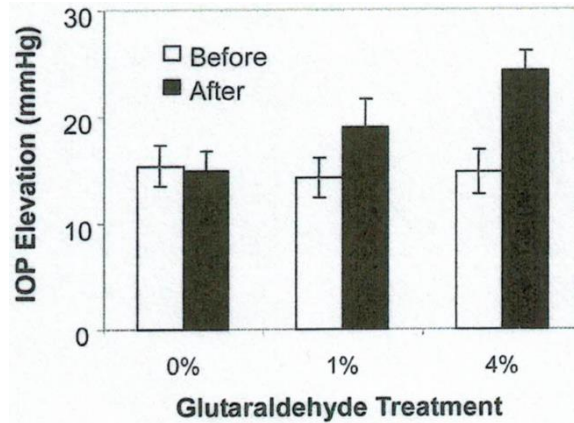


Figura 2.3: Aumento della IOP in seguito all'intensità del trattamento corneale con glutaraldeide.

Analogamente, test di insufflazione condotti su bulbi oculari suini hanno dimostrato che la IOP dipende non solo dal volume di fluido iniettato, ma anche dalla velocità di infusione, confermando il ruolo centrale delle proprietà viscoelastiche sclero-corneali.

La misura della IOP è fondamentale per i pazienti predisposti allo sviluppo di glaucoma, che ne soffrono, o che soffrono di ipertensione oculare. Il valore della pressione intraoculare, se non misurata in maniera invasiva tramite un manometro inserito nella camera anteriore dell'occhio, rappresenta una semplice stima di quella reale (11). Tale valore viene in ogni caso utilizzato per dare una stima del grado di severità del glaucoma, della sua progressione e dell'efficacia del trattamento terapeutico in atto.

Le misure non invasive della IOP avvengono tramite tonometri ad indentazione oppure ad appianazione; in particolare è il tonometro ad appianazione di Goldmann ad essere considerato il gold standard per la misurazione.

Tale strumento viene posizionato sulla cornea precedentemente anestetizzata, e tramite opportune calibrazioni permette di appiattire una la porzione di cornea a contatto con la punta dello strumento.

La misura dell'IOP si basa sulla legge di Imbert – Fick, descritta dall'Equazione (2.1).

$$P = \frac{F}{S} \quad (2.1)$$

Secondo tale equazione lega la pressione esercitata sulla superficie S appiattita, alla forza F necessaria ad appiattirla. La forza necessaria ad appiattire la superficie della cornea è direttamente proporzionale al valore della IOP, il cui valore si ricava in mmHg tramite una scala graduata sullo strumento, oppure viene direttamente calcolata nelle versioni digitali dello strumento.

Nonostante esistano altri tipi di tonometri, ognuno con specifici vantaggi, quello di Goldmann rimane il più utilizzato nella pratica clinica per via della sua facilità d'utilizzo, basso costo e riproducibilità.

La stima della pressione intraoculare è influenzata dallo spessore corneale centrale, dalla curvatura corneale, dalla lunghezza assiale e dalle proprietà meccaniche del tessuto stesso (65). In particolare, uno spessore corneale troppo ridotto porta ad una sottostima della IOP e viceversa.

In conclusione, risulta fondamentale approfondire come le caratteristiche biomeccaniche della sclera e della cornea influenzano la IOP. Se le proprietà biomeccaniche venissero identificate come fatto di rischio indipendenti per lo sviluppo e la progressione del glaucoma, si aprirebbe la strada a strategie terapeutiche mirate e innovative.

2.2 Miopia

La miopia è un difetto refrattivo dell'occhio, caratterizzato dalla messa a fuoco dei raggi luminosi davanti alla retina anziché su di essa, determinando difficoltà nella visione da lontano. Tale condizione può derivare da un'eccessiva lunghezza assiale del bulbo oculare o, meno frequentemente, da un'aumentata potenza diottrica delle strutture oculari, in particolare della cornea e del cristallino.

Attualmente, circa il 30–34 % della popolazione mondiale è affetta da miopia, con un trend in progressivo aumento. Studi più recenti stimano che entro il 2050 quasi la metà della popolazione mondiale (circa il 50 %) sarà miope (66). Oltre all'impatto sulla qualità della vita quotidiana, la miopia, soprattutto nelle forme elevate, rappresenta un rilevante fattore di rischio per patologie oculari degenerative, quali il distacco di retina, la maculopatia miopica e il glaucoma, rendendo essenziale una gestione clinica mirata e strategie preventive a lungo termine.

Un occhio privo di difetti refrattivi è definito emmetrope: in esso i raggi luminosi vengono messi a fuoco esattamente sulla retina. Al contrario, nell'occhio miope i raggi si focalizzano anteriormente alla retina, causando la tipica visione sfocata. Tale condizione è generalmente dovuta a un allungamento della porzione posteriore del bulbo oculare (Figura 2.4). L'allungamento assiale si ritiene conseguenza di una combinazione di fattori genetici e ambientali.

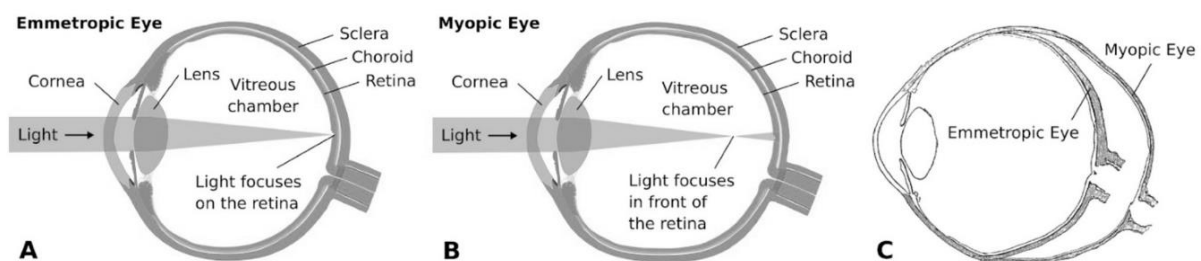


Figura 2.4: Confronto tra un occhio emmetrope ed uno miope.

Il processo di emmetropizzazione è dinamico e dipende da stimoli visivi: la lunghezza assiale dell'occhio viene modulata per adattarsi al piano focale. È stato dimostrato

sperimentalmente che la dimensione del bulbo può modificarsi in risposta a spostamenti del piano focale (67). Il meccanismo alla base dell'emmetropizzazione non è ancora del tutto chiarito, ma è attribuito a un rimodellamento della sclera. Si ipotizza l'esistenza di un meccanismo di *feedback* tra retina e sclera, attraverso il quale segnali retinici inducono modificazioni strutturali sclerali che portano a un progressivo allungamento del bulbo.

Nei bulbi miopici sono stati osservati diversi cambiamenti istologici e biochimici: una sottoregolazione della sintesi di collagene, una riduzione della quantità di glicosamminoglicani e un incremento della degradazione enzimatica (19). Questi processi determinano un assottigliamento della sclera e un aumento della lunghezza assiale; in casi di miopia elevata lo spessore sclerale può risultare ridotto fino al 31% rispetto a quello di una sclera sana (68). Il rimodellamento sclerale è un processo conservativo dal punto di vista volumetrico, basato sul riarrangiamento del materiale esistente mediante microdeformazioni.

È stato inoltre rilevato un ridimensionamento del diametro delle fibre collagene e un aumento del grado di *crimp*, associati a un riassetto delle lamelle sclerali in sede peripapillare: da una disposizione circonferenziale si passa a un orientamento più meridionale (Figura 2.5). Questo fenomeno, che necessita di ulteriori conferme, potrebbe rappresentare un adattamento meccanico a una tensione sclerale elevata nei bulbi altamente miopici. Infatti, lo stress parietale risulta maggiore in un occhio più grande e con sclera più sottile, a parità di pressione intraoculare (69).

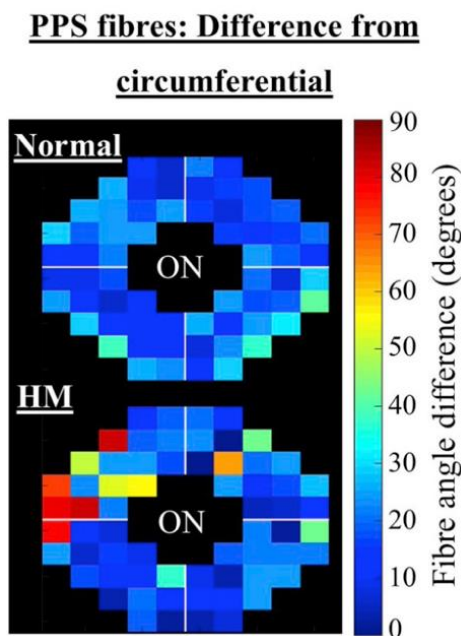


Figura 2.5: Confronto nell'orientazione delle lamelle di collagene fra un occhio emmetrope ed uno miopico.

È stato inoltre documentato che la velocità di creep aumenta negli occhi con miopia sperimentalmente indotta, e che tale incremento è proporzionale al grado di

allungamento assiale e dunque alla severità della miopia (19). Anche la deformazione alla quale si distendono le fibre di collagene, nota come “transition strain”, cresce parallelamente all’entità della miopia.

Nel complesso, queste evidenze sottolineano la stretta relazione tra composizione e struttura del tessuto sclerale, i processi di rimodellamento e le proprietà biomeccaniche.

3 Capitolo 3: Caratterizzazione Biomeccanica

La caratterizzazione di un tessuto biologico consiste nel processo di identificazione delle proprietà che ne determinano il comportamento meccanico e funzionale. La conoscenza di tali proprietà è fondamentale non solo per comprendere e predire i comportamenti fisiologici, ma anche per rilevare precocemente eventuali alterazioni patologiche. Inoltre, essa rappresenta un passaggio essenziale per la costruzione di modelli biomeccanici accurati, impiegati sia nelle simulazioni chirurgiche sia nella progettazione di dispositivi biomedici in grado di integrarsi con i tessuti stessi. L'analisi delle proprietà meccaniche dei tessuti biologici risulta tuttavia complessa, in particolare quando si tratta di tessuti molli. Questi ultimi, infatti, sono caratterizzati da un'elevata idratazione che li rende deformabili e fragili, complicando la realizzazione di provini con geometrie regolari e riproducibili. Le loro proprietà sono fortemente influenzate dall'architettura interna, che conferisce un marcato comportamento anisotropo. Per questo motivo, la preparazione dei campioni richiede particolare attenzione, al fine di garantire ripetibilità nelle misure e ridurre al minimo i potenziali bias sperimentali.

Un'ulteriore criticità riguarda l'ordine di grandezza delle sollecitazioni applicate: spesso i test vengono condotti su campioni di dimensioni ridotte, che richiedono l'impiego di forze altrettanto piccole. Ciò rende necessario disporre di set-up sperimentali ad alta sensibilità e precisione. Inoltre, l'eterogeneità intrinseca dei tessuti si manifesta in maniera più evidente al diminuire delle dimensioni del campione: in questi casi, l'influenza delle strutture interne locali diventa più rilevante, complicando ulteriormente l'identificazione delle proprietà meccaniche globali.

I tessuti biologici iniziano a subire processi di degradazione e invecchiamento immediatamente dopo l'espanto dall'organismo vivente. Per questo motivo, è fondamentale mantenere i campioni in condizioni controllate di temperatura, idratazione e concentrazione salina, così da preservarne quanto più possibile le caratteristiche originarie. Al fine di ottenere una risposta meccanica rappresentativa del comportamento fisiologico, i test dovrebbero essere condotti in condizioni sperimentali che riproducano quelle presenti in vivo.

Le principali proprietà oggetto di indagine sono di natura meccanica, ma la letteratura mostra come l'impiego di differenti protocolli e tecniche sperimentali porti spesso a risultati variabili e talvolta contrastanti. Questa eterogeneità metodologica non solo rende complessa la comparazione diretta dei dati tra studi differenti, ma ostacola anche l'individuazione di procedure standardizzate che possano essere considerate le più affidabili per nuove indagini (70; 20).

Nel presente capitolo verranno presentate le teorie e le leggi matematiche impiegate, i test sperimentali condotti e i parametri ricavati da ciascuna prova. Caratterizzare il comportamento dei materiali implica l'identificazione delle leggi costitutive, ovvero la definizione di relazioni sistematiche e prevedibili tra deformazioni e sollecitazioni applicate. L'obiettivo di questo lavoro, tuttavia, non consiste nella determinazione di tali leggi per la sclera e della cornea, ma piuttosto in un'analisi di carattere esplorativo volta a descrivere e investigare il comportamento generale di tali tessuti.

Nel campo delle scienze biologiche, gli organismi viventi possono essere analizzati e studiati a differenti livelli, ognuno corrispondente ad una diversa organizzazione: atomico, molecolare, cellulare, tissutale, d'organo e dell'intero organismo. A seconda dell'ordine di grandezza del campione testato rispetto alle strutture che lo costituiscono, si possono sfruttare teorie diverse. Quando la distanza tra due particelle costituenti il tessuto risulta significativamente inferiore rispetto alla dimensione caratteristica del campione, come nel caso in esame, ordine dei millimetri rispetto a pochi micrometri, risulta appropriato adottare l'ipotesi del continuo. In tale prospettiva, la struttura discreta del materiale, costituita da particelle elementari, può essere trascurata e il tessuto può essere trattato come un mezzo omogeneo divisibile in porzioni via via più piccole, mantenendo invariata la distribuzione omogenea delle proprietà fisiche al suo interno (20; 71). Più precisamente, l'ipotesi di mezzo continuo si fonda sull'assunzione che vi sia una corrispondenza biunivoca tra i punti dello spazio euclideo tridimensionale e le particelle del materiale. In altri termini, tra due particelle qualsiasi se ne può sempre individuare un'altra, rendendo il mezzo matematicamente trattabile come un continuo. Un approccio simile semplifica molto la trattazione matematica, consentendo anche la successiva formulazione di leggi costitutive.

3.1 Test di Trazione

Il test di trazione costituisce una delle tecniche più diffuse e consolidate per lo studio delle proprietà meccaniche di un materiale (70; 72). L'esperimento prevede il fissaggio di un campione di tessuto alle estremità, che vengono vincolate ad una macchina di prova. Durante l'esecuzione, le estremità vengono progressivamente allontanate ad una certa velocità in funzione della forza o dello spostamento applicati, mentre la macchina registra in continuo i dati sperimentali. Da tali misurazioni è possibile

ricavare la curva sforzo – deformazione, che descrive la relazione tra lo sforzo sviluppato nel provino e la deformazione imposta. Tra i parametri principali ottenibili mediante il test di trazione figurano il modulo di Young, lo sforzo di snervamento e lo sforzo a rottura. Nei materiali biologici, la curva di sforzo – deformazione (Figura 3.1) è non lineare elastica, poiché la composizione interna del materiale è eterogenea e determina un aumento dello sforzo con la deformazione, il quale riflette la modifica della configurazione delle fibre di collagene (73).

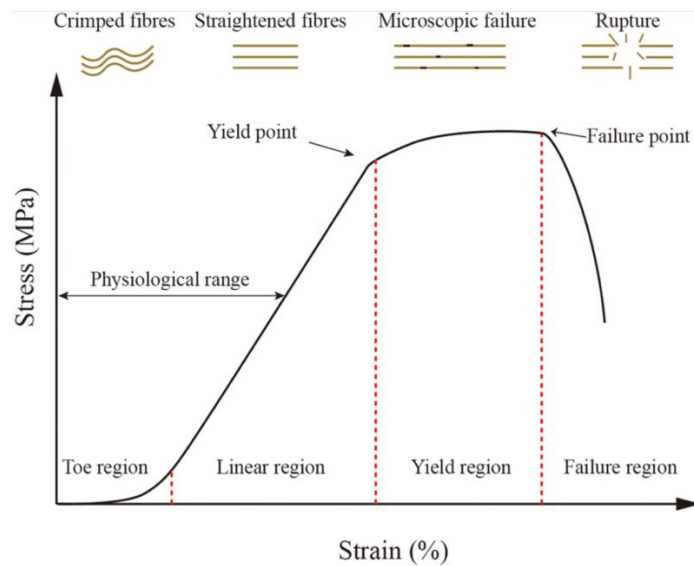


Figura 3.1: Curva sforzo – deformazione tipica di un materiale biologico.

I materiali biologici possono dunque essere considerati non lineari ed elasticamente reversibili a basse deformazioni, mentre a deformazioni elevate o se sollecitati per tempi prolungati manifestano comportamenti viscoelastici e inelastici, caratterizzati da deformazioni irreversibili o dipendenti dal tempo.

Una delle criticità principali quando si effettua un test di trazione su un materiale biologico soffice riguarda la modalità di afferraggio del campione e la geometria dello stesso. Per questo tipo di materiali non sono presenti degli standard definiti che stabiliscono le dimensioni del provino, la geometria dello stesso o il protocollo da applicare (74).

Si tratta di parametri molto importanti per garantire la ripetibilità degli esperimenti ed una coerenza fra i risultati ottenuti; a tal proposito, è stato osservato che la geometria del campione e le condizioni di afferraggio sono in grado di modificare sostanzialmente la distribuzione dello sforzo all'interno del campione. In particolare, in tessuti caratterizzati da una matrice ricca di collagene, la modalità di afferraggio può essere determinante nella discrepanza dei risultati ottenuti per via della discontinuità tra le fibre che sostengono il carico. La geometria del provino più comune per quanto riguarda i test di trazione è quella rettangolare seguita da ipotesi semplificative per cui si trascurano eventuali stati complessi di sforzo alle estremità.

Anche la lunghezza del campione ha un'influenza sui risultati ottenuti: è stata osservata una differenza nella deformazione di tessuti con composizione simile a quelli della sclera, a seconda lunghezza iniziale del campione. Se la distanza degli afferraggi è simile alla lunghezza delle fibre che sostengono il carico nel tessuto, la deformazione tissutale combacia con quella delle fibre e aumenta anche il modulo elastico alla macroscale (75); presumibilmente, ciò accade perché non si dà la possibilità alle componenti viscosi di contribuire alla deformazione.

Lo sforzo di Cauchy σ rappresenta la forza interna agente sulla superficie trasversale del provino quando esso è sottoposto a un carico esterno; questa forza interna si sviluppa per mantenere l'equilibrio del materiale (Figura 3.2).

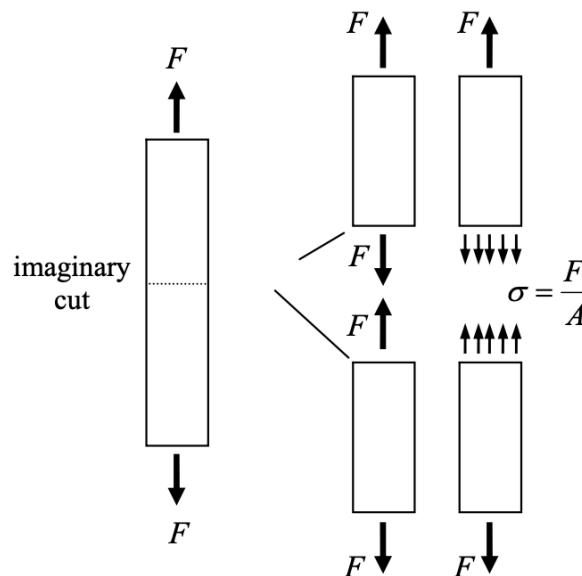


Figura 3.2: Schema in un provino soggetto a trazione.

Definiamo lo sforzo nominale, o ingegneristico, come il rapporto tra la forza applicata e l'area della sezione iniziale del provino, nella sua configurazione indeformata.

Matematicamente, lo sforzo è definito tramite l'Equazione (3.1) esposta di seguito.

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad [Pa] \quad (3.1)$$

La deformazione ingegneristica ε , o nominale, è definita tramite l'Equazione (3.2):

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad [-] \quad (3.2)$$

Dove L è la lunghezza deformata, L_0 la lunghezza originale del provino.

Lo sforzo, così come la deformazione, sono calcolati rispetto alle dimensioni dei provini al fine di consentire un confronto adeguato fra campioni. Affinché il confronto sia logico, bisogna normalizzare le quantità rispetto alle dimensioni.

Il modulo elastico, o modulo di Young, esprime la rigidità di un materiale in campo elastico, prima della comparsa di deformazioni permanenti ed è definito mediante l'Equazione (3.3):

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad [Pa] \quad (3.3)$$

Nei materiali biologici soffici, il comportamento non può essere descritto univocamente da un singolo valore di modulo elastico, poiché la loro rigidità non è costante lungo l'intera curva di deformazione (20). La relazione che lega sforzo e deformazione è proporzionale, ma né lineare né costante. Il modulo elastico ad uno specifico grado di deformazione si può visivamente interpretare come la pendenza della curva di sforzo – deformazione nel punto in questione.

Lo sforzo di snervamento indica il passaggio dalla zona elastica, in cui il materiale non accumula deformazioni permanenti, alla zona plastica. Lo sforzo a rottura, invece, corrisponde al massimo valore di sforzo sopportabile dal materiale prima del cedimento (76).

Il vantaggio principale nell'effettuare test di trazione uniassiale risiede nella semplicità del test e nell'elevata ripetibilità e nell'immediatezza dei risultati ottenuti; tuttavia, si tratta di una tecnica che possiede alcuni svantaggi, specialmente se vengono testati campioni biologici soffici le cui estremità tendono a scivolare agli afferraggi, introducendo errori nella curva. La modalità di afferraggio deve garantire anche che la rottura del campione avvenga lontano dalle ganasce stesse (77). Inoltre, data l'anisotropia dei tessuti, bisogna prestare molta attenzione al montaggio del campione, la cui dimensione principale deve essere allineata con il carico applicato per evitare che si sviluppino sforzi di taglio all'interno dello stesso che non vengono considerati nell'analisi.

Lo sforzo nominale interpreta adeguatamente i dati quando si lavora a piccole deformazioni ma non è adeguato a rappresentare la situazione in risposta ad ampie deformazioni perché è calcolato rispetto alla sezione trasversale iniziale, che invece si restringe, per via dell'effetto Poisson, all'aumentare della deformazione longitudinale per effetto della conservazione del volume.

Quando si trattano materiali biologici che raggiungono ampie deformazioni, sarebbe più adeguato utilizzare lo sforzo reale che è calcolato dividendo la forza applicata per l'area della sezione trasversale istantanea, che varia nel tempo. Per poter utilizzare questa formulazione è necessario quantificare precisamente la restrizione dell'area e la variazione di volume durante il test tramite simulazioni agli elementi finiti oppure tramite un sistema di tracciamento ottico del campione.

Gli aspetti teorici appena introdotti sono estremamente semplificati rispetto alla complessità del comportamento dei tessuti biologici.

Alternativamente a quanto effettuato, si possono effettuare test di trazione biassiale, che sottopongono porzioni quadrate di campione a forze su due assi perpendicolari. In questo modo si riproducono condizioni più simili a quelle che si verificano in vivo, ottenendo risultati più affidabili riguardo il comportamento del tessuto. In tal caso però, si complica sia il set up sperimentale, che la trattazione matematica.

3.2 Viscoelasticità nei Tessuti Biologici

Non è possibile trascurare la viscoelasticità nell'analisi del comportamento meccanico dei tessuti biologici, poiché ciò condurrebbe a una rappresentazione eccessivamente semplificata delle loro reali proprietà. Come discusso nei capitoli precedenti, la componente viscosa influisce in modo determinante sulla risposta meccanica dei materiali biologici, rendendone più complessa la caratterizzazione. Tali fenomeni possono originare dall'attrito molecolare tra le strutture costitutive, e nel caso di cornea e sclera, dalle interazioni tra le fibre di collagene e la matrice acquosa che le avvolge.

Un comportamento viscoelastico può essere causato dalla frizione molecolare interna al materiale, alla frizione tra componente solida e fluida all'interno di un materiale poroso e deformabile, oppure al continuo rompersi e riformarsi di legami molecolari deboli all'interno dello stesso materiale (78). Nel primo caso si fa riferimento alla viscosità intrinseca del materiale, nel secondo si ha a che fare con un materiale bifasico o poro – elastico nel quale la frizione interna è governata dalla permeabilità idraulica della matrice, il terzo caso invece è relativo al comportamento viscoelastico dei polimeri.

Sebbene vi siano emergenti evidenze del fatto che un modello poro – elastico sia più adatto a descrivere il comportamento della sclera, in questo lavoro è stato adottato un approccio semplificato, considerando la sclera come un tessuto uni – fasico viscoelastico (79; 60; 80).

In un materiale viscoelastico, lo sforzo non dipende soltanto dallo stato deformativo ϵ , ma anche dal tempo t di applicazione del carico, o della deformazione. Di conseguenza, la risposta meccanica risulta funzione sia dello stato di carico istantaneo, sia della storia di carico cui il materiale è stato sottoposto (81).

Un materiale è considerato viscoelastico quando possiede proprietà intermedie fra quelle di un fluido e di un solido e, se sottoposto ad una prova di trazione, esibisce le seguenti caratteristiche (76):

1. Le curve di carico e scarico non coincidono, formando un'area di isteresi che rappresenta la quantità di energia dissipata sotto forma di calore durante il processo deformativo (Figura 3.3 (a));

- Lo sforzo che si sviluppa nel provino aumenta all'aumentare della velocità di deformazione (Figura 3.3 (b)). Velocità di deformazione che è definita dall'Equazione (3.4).

$$\dot{\epsilon} = d\epsilon/dt \quad (3.4)$$

- Non è detto che vi sia una deformazione permanente al completo scarico.

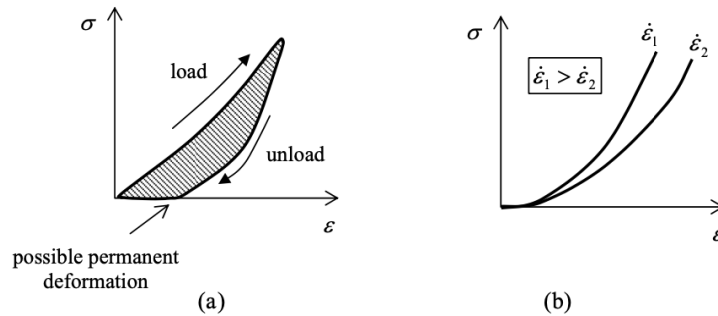


Figura 3.3: Grafico sforzo – deformazione che mostra (a) carico e scarico e (b) due curve a velocità di carico ottenute diverse.

Un altro aspetto rilevante nei tessuti viscoelastici è la loro capacità di assorbire e dissipare energia vibrazionale e d'impatto; molto utile in tessuti come la cornea e la sclera che devono proteggere le strutture interne dell'occhio da potenziali insulti.

I test di rilassamento sono ottimi per caratterizzare le proprietà viscoelastiche di un materiale e si svolgono imponendo un gradino di deformazione, mantenendo poi tale deformazione nel tempo, assistendo ad una riduzione progressiva dello sforzo. Il rilassamento, si verifica per via del riarrangiamento delle strutture molecolari.

In Figura 3.4 è mostrato l'andamento della deformazione e dello sforzo rispetto al tempo in una prova di rilassamento.

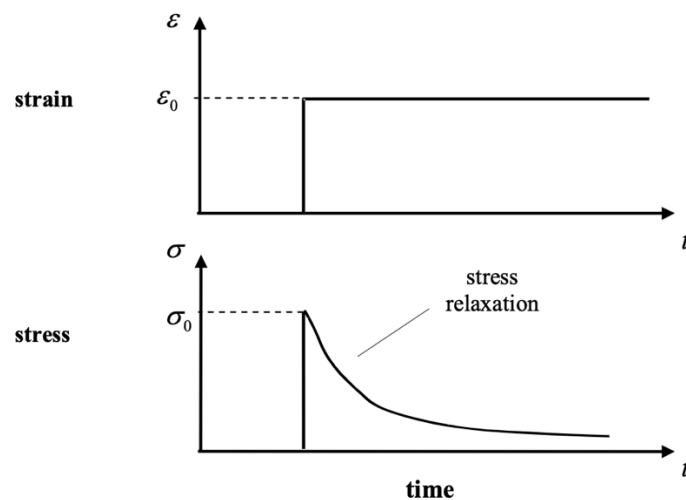


Figura 3.4: Andamento della deformazione e dello sforzo in una prova di rilassamento.

Un test di rilassamento si può effettuare tramite la macchina per la trazione uniassiale. I parametri di interesse sono il valore dello sforzo di picco e dello sforzo di equilibrio

(Figura 3.5), ottenuti rispettivamente all'inizio del periodo di rilassamento ed al termine dello stesso. Lo sforzo di equilibrio σ_{eq} è definito come il valore al quale lo sforzo $\sigma(t)$ converge per tempi sufficientemente lunghi. Formalmente, si fa riferimento all'Equazione (3.5).

$$\sigma_{eq} = \lim_{t \rightarrow \infty} \sigma(t) \quad (3.5)$$

Nella pratica sperimentale, lo sforzo di equilibrio non si può misurare a tempo infinito, ma si considera raggiunto quando si stabilizza entro variazioni trascurabili.

Questo, rappresenta la componente elastica residua dopo che la risposta viscosa si è stabilizzata.

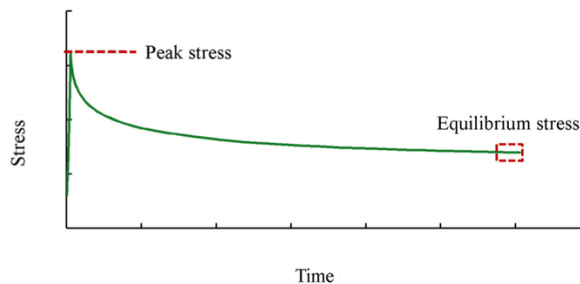


Figura 3.5: Sforzo di picco e sforzo di rilassamento in una curva di rilassamento.

L'Equazione (3.6) mostra come ricavare la percentuale di rilassamento.

$$R_{\%} = \frac{\sigma_{picco} - \sigma_{eq}}{\sigma_{picco}} \cdot 100 = 1 - \frac{\sigma_{eq}}{\sigma_{picco}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

In un test di rilassamento lo sforzo varia nel tempo e per quantificare la rigidità istantanea del materiale si considera il modulo di rilassamento $G(t)$ e non più il modulo elastico E . $G(t)$ descrive come lo sforzo evolve nel tempo in risposta a una deformazione istantanea ed è definito dall'equazione (3.7):

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon} \quad (3.7)$$

Analogamente a quanto fatto per lo sforzo, si possono definire due grandezze fondamentali: il modulo istantaneo e il modulo di rilassamento all'equilibrio. Il modulo istantaneo, o vetroso, è definito dall'Equazione (3.8) come il rapporto tra lo sforzo iniziale di picco σ_{picco} e la deformazione imposta ε . Esso riflette la rigidità apparente del materiale, immediatamente dopo l'applicazione della deformazione. In questa fase, le componenti viscosi non hanno ancora avuto tempo di rilassarsi, contribuendo ad un valore di modulo più elevato:

$$G_g = \frac{\sigma_{picco}}{\varepsilon} \quad (3.8)$$

Il modulo di rilassamento all'equilibrio è invece definito, dall'Equazione (3.9) come il rapporto tra lo sforzo di equilibrio σ_{eq} e la deformazione imposta ε , misurato dopo un tempo sufficientemente lungo affinché i fenomeni viscosi abbiano completato il

rilassamento. Questo modulo rappresenta quindi la rigidità effettiva legata esclusivamente alla componente elastica del materiale:

$$G_{\infty} = \frac{\sigma_{eq}}{\varepsilon} \quad (3.9)$$

$G(t)$ rappresenta l'andamento temporale della rigidità apparente del materiale che decresce dal valore iniziale G_g , che riflette la risposta istantanea comprendente i contributi viscosi transitori, al valore asintotico G_{∞} , che rappresenta il modulo di equilibrio elastico residuo a lungo termine.

Il modulo di rilassamento $G(t)$ descrive la risposta viscoelastica di un materiale a seguito dell'applicazione istantanea di una deformazione costante. Tale deformazione può essere formalmente rappresentata come un gradino di ampiezza ε , espresso mediante la funzione gradino di Heaviside $\Theta(t)$. L'Equazione (3.10) mostra la relazione tra l'ampiezza del gradino di deformazione e la funzione Heaviside.

$$\varepsilon(t) = \varepsilon \cdot \Theta(t), \quad \Theta(t) = \begin{cases} 0, & t < 0 \\ 1, & t > 0 \end{cases} \quad (3.10)$$

La risposta in termini di sforzo è quindi data dall'Equazione (3.11).

$$\sigma(t) = G(t) \cdot \varepsilon \quad (3.11)$$

Il comportamento dei materiali viscoelastici può essere descritto mediante modelli reologici, i quali combinano elementi ideali con risposta puramente elastica, elementi con risposta puramente viscosa ed elementi con risposta intermedia, collegati tra loro secondo diverse configurazioni. Tali modelli consentono di rappresentare, in maniera semplificata, i principali meccanismi di deformazione e rilassamento tipici di questi materiali.

Gli elementi che si configurano nei modelli che verranno presentati sono (76; 82; 83; 84):

- La molla (Figura 3.6) possiede una risposta puramente elastica e l'Equazione (3.3) mostra la relazione costitutiva di un materiale puramente elastico.

$$\sigma = k \cdot \varepsilon \quad (3.3)$$

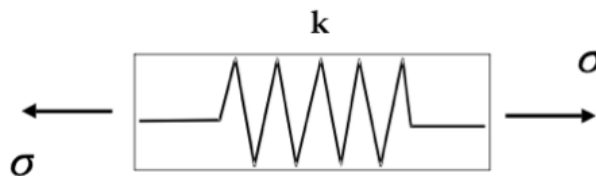


Figura 3.6: Schema della molla.

Un materiale governato dalla precedente equazione costitutiva non è viscoelastico ma solo elastico, non possiede né creep né rilassamento. Lo

spostamento della molla virtuale è dato dalla semplice applicazione di una forza;

- Il pistone, o pistone – cilindro, che rappresenta la risposta viscosa del materiale (Figura 3.7). lo spostamento dell'elemento avviene in seguito al movimento di fluido all'interno del pistone, movimentato a sua volta dall'applicazione virtuale di una forza.

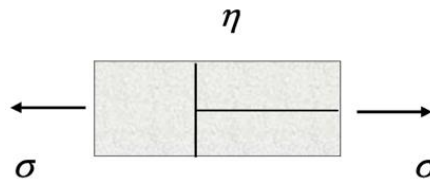


Figura 3.7: Schema dello smorzatore.

Tale elemento è governato dall'Equazione (3.12):

$$\dot{\varepsilon} = \frac{1}{\eta} \sigma \quad (3.12)$$

Dove: $[\eta] = Pa \cdot s$

Dove η è la viscosità del materiale. Si tratta della risposta classica dei fluidi per cui all'aumentare dello sforzo applicato, corrisponde una velocità di deformazione maggiore.

- L'elemento di Scott – Blair, o springpot (Figura 3.8), modella un materiale con comportamento intermedio fra quello puramente elastico e puramente viscoso.

La relazione costitutiva definita tramite l'Equazione (3.13):

$$\sigma(t) = c_a \frac{d^a \varepsilon}{dt^a}, \quad [c_a] = Pa \cdot s^a, \quad 0 \leq a \leq 1 \quad (3.13)$$

La relazione tra sforzo e deformazione è sempre di tipo lineare, ma coinvolge derivate di ordine frazionario. c è un parametro reologico, mentre β quantifica la somiglianza del materiale con un materiale puramente elastico e puramente viscoso; infatti, se

- $a = 0$ l'elemento si comporta come una molla, seguendo la legge di Hooke;
- $a = 1$ l'elemento si comporta come un pistone, seguendo la legge di Newton.

a , in altre parole, quantifica la frazione di viscosità (85).

Schematicamente, tale elemento è raffigurato come:

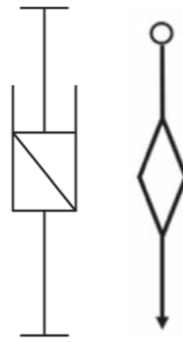


Figura 3.8: Schema dello springpot: le due icone sono equivalenti.

I modelli viscoelastici sono utilizzati di buon grado per modellizzare il comportamento dei tessuti biologici proprio per la loro risposta meccanica dipendente dal tempo. Di seguito vedremo solo alcune delle modalità con cui tali elementi si possono configurare al fine di rappresentare al meglio il comportamento dei tessuti biologici (86).

3.2.1 Modelli Viscoelastici Classici, o Lineari a Derivate Intere

La combinazione in serie e in parallelo degli elementi meccanici ideali appena esposti, quali molle ed ammortizzatori viscosi, consente di costruire modelli reologici a parametri concentrati in grado di descrivere un'ampia varietà di comportamenti viscoelastici. Tra le numerose configurazioni possibili, in questa sede verranno presentati esclusivamente i modelli che si sono dimostrati più adeguati alle analisi condotte.

3.2.1.1 Modello di Maxwell

Il modello di Maxwell è uno dei più semplici; è costituito da una molla e un pistone in serie (Figura 3.9) e tale modello è governato dall'Equazione (14).

$$\sigma + \frac{\eta}{k} \dot{\sigma} = \eta \dot{\epsilon} \quad (3.14)$$

Dove E è il modulo elastico della molla e η rappresenta la viscosità del pistone.

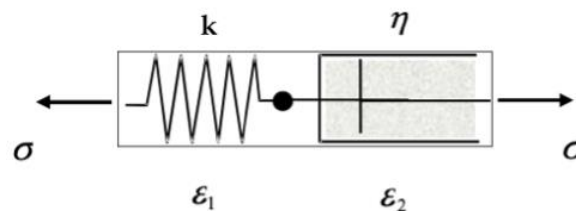


Figura 3.9: Schema del modello di Maxwell

Il modello di Maxwell può modellare sia la risposta a creep che quella a rilassamento; in particolare si definisce il modulo di rilassamento tramite l'Equazione (15).

$$G(t) = ke^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.15)$$

Dove l'Equazione (16) definisce il modulo di rilassamento.

$$\tau = \frac{\eta}{k} \quad (3.16)$$

τ da una misura del tempo necessario allo sforzo per rilassare: minore è τ e più velocemente rilassa il materiale.

Applicando una deformazione costante al modello di Maxwell, lo sforzo totale decresce secondo un andamento esponenziale negativo, tendendo teoricamente a zero per tempi molto lunghi. Nei due elementi in serie lo sforzo rimane identico, mentre la deformazione totale è data dalla somma della deformazione della molla e di quella dello smorzatore: quest'ultima aumenta progressivamente nel tempo, mentre la deformazione della molla diminuisce di conseguenza. È importante sottolineare che si tratta di un modello ideale, in grado di descrivere comportamenti viscoelastici elementari, ma che non riproduce completamente le caratteristiche dei materiali reali.

Il modello di Maxwell classico può essere utilizzato come punto di partenza per comprendere le risposte viscoelastiche dei tessuti biologici. In particolare, il modello di Maxwell classico può essere applicato a tessuti che presentano una risposta viscoelastica semplice, caratterizzata da un'unica costante di rilassamento.

3.2.1.2 Modello di Zener

Il modello di Zener, o standard linear solid II, è composto da tre elementi: due molle ed uno smorzatore, connessi sia in serie che in parallelo (Figura 3.10).

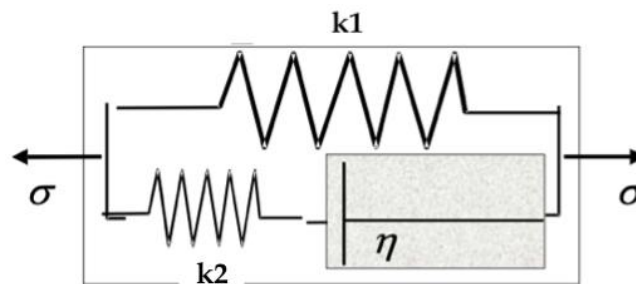


Figura 3.10: Schema del modello Standard Linear Solid di Zener.

L'Equazione (3.17) è quella costitutiva del modello:

$$\sigma + \frac{\eta}{k_2} \dot{\sigma} = k_1 \varepsilon + \frac{\eta(k_1 + k_2)}{k_2} \dot{\varepsilon} \quad (3.17)$$

Questo modello rappresenta in modo più realistico il comportamento di solidi viscoelastici perché risponde istantaneamente all'applicazione di una forza e recupera la deformazione una volta che il carico è rimosso.

Il modulo di rilassamento per questo modello è definito dall'Equazione (3.18):

$$G(t) = k_1 + k_2 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.18)$$

Dove il tempo di rilassamento è definito dall'Equazione (3.19):

$$\tau = \frac{\eta}{k_2} \quad (3.19)$$

Applicando una deformazione costante si assiste ad un rilassamento parziale dello sforzo; quest'ultimo non si annulla come accade nel modello di Maxwell; perciò, risulta adatto a modellizzare il comportamento di tessuti biologici molli (87; 88; 85).

3.2.2 Modelli Viscoelastici Frazionari

Sfruttando anche l'elemento di Scott – Blair è possibile costruire modelli più complessi, che modellizzano meglio il comportamento dei tessuti biologici. In particolare, è possibile generalizzare i modelli viscoelastici classici sostituendo ad uno, o più, degli elementi costitutivi la springpot.

3.2.2.1 Modello Frazionale di Maxwell

Il modello considerato è del tipo Maxwell Fractional Spring e possiede uno springpot in serie ad uno smorzatore (Figura 3.11). Per praticità, da qui in avanti si farà riferimento al modello "fractional spring" come "frazionale".



Figura 3.11: Schema del modello di Maxwell Frazionale.

Il modello frazionale è governato dall'Equazione (3.20), mentre l'Equazione (3.21) definisce il modulo di rilassamento ed il tempo di rilassamento (82; 89).

$$\sigma(t) + \frac{c_a}{E} \frac{d^a \sigma}{dt^a} = c_a \frac{d^a \varepsilon}{dt^a}, \quad 0 \leq a \leq 1 \quad (3.20)$$

$$G(t) = E \cdot E_a \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^a \right], \quad \tau^a = \frac{c_a}{E} \quad (3.21)$$

Il parametro $E_a(\cdot)$, rappresenta la funzione di Mittag – Leffler che è una generalizzazione della funzione esponenziale che permette di descrivere il rilassamento dei materiali viscoelastici con comportamento frazionario. Mentre nel modello di Maxwell classico il modulo di rilassamento decresce esponenzialmente fino ad annullarsi, la funzione di Mittag – Leffler introduce un decadimento più graduale, che segue un andamento intermedio tra esponenziale e legge di potenza.

In questo modo si riesce a rappresentare in maniera più realistica la risposta a lungo termine di materiali complessi, come i tessuti biologici molli, nei quali il rilassamento non avviene con un'unica costante di tempo ma in maniera distribuita.

4 Capitolo 4: Metodi per l'Estrazione dei Campioni

I test sperimentali sono stati effettuati sfruttando campioni di sclera e corea porcina estratti da bulbi oculari freschi. I bulbi sono stati approvvigionati da un macello locale e sono stati trasportati in contenitori isolati termicamente nei quali sono stati inseriti piastre eutettiche precedentemente congelate per rallentare la degradazione dei tessuti. Gli occhi sono stati conservati in frigorifero a $+4^{\circ}\text{C}$. Il tempo intercorso tra l'enucleazione, l'estrazione e il test dei campioni non ha mai superato le 48 ore. I bulbi oculari sono stati trasportati in contenitori isotermeici contenenti piastre eutettiche precedentemente congelate, al fine di rallentare la degradazione tissutale, e successivamente conservati in frigorifero.

4.1 Estrazione, Preparazione e Conservazione dei Campioni di Sclera

L'estrazione dei campioni di sclera è stata eseguita secondo la procedura seguente:

- 1) Preparazione: rimozione dei tessuti muscolari e adiposi annessi al bulbo oculare mediante forbici, seguita dalla rimozione della congiuntiva. Identificazione delle direzioni anatomiche del bulbo e conseguente marcatura effettuata sulla sclera tramite pennarello chirurgico. Le direzioni sono state identificate in seguito ad esame visivo, utilizzando riferimenti anatomici quali l'inclinazione del nervo ottico e la forma caratteristica dell'iride (55) (Figura 4.1).



Figura 4.1: Schema bulbo porcino e bulbo porcino.

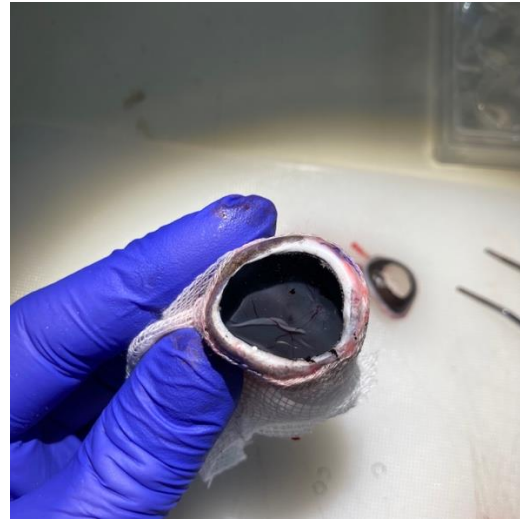
Ad ogni direzione è stato associato un valore numerico per semplificare la catalogazione dei campioni:

- Superiore – 1;
- Inferiore – 2;
- Temporale – 3;
- Nasale – 4;

2) Apertura del bulbo oculare: il bulbo è stato stabilizzato con una garza e inciso con bisturi e forbici a 2–3 mm dal limbo (Figura 4.2 (a)). È stata successivamente asportata la cornea e le strutture oculari facenti parte della camera anteriore. Sono stati poi rimossi cristallino e corpo vitreo, ottenendo una cavità semisferica costituita da sclera, coroide e retina (Figura 4.2 (b)).



(a) Incisione del bulbo.



(b) Calotta semisferica.

Figura 4.2: Procedure di incisione pulizia del bulbo oculare.

Seguendo le marcature effettuate in precedenza, il tessuto è stato sezionato in quattro porzioni, avendo cura di mantenere intatte le regioni di interesse; quindi, i tagli sono stati effettuati fra le suddette porzioni (Figura 4.3). Ad ogni lembo di tessuto sono state poi rimosse la coroide e la retina.

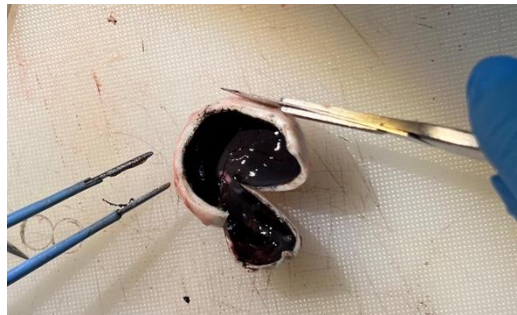
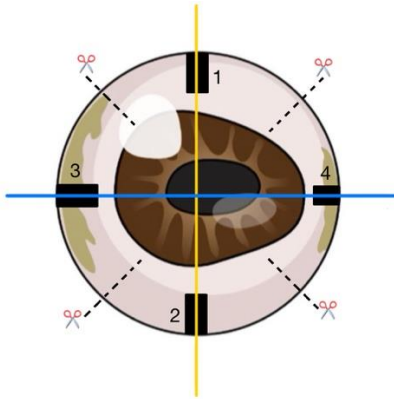


Figura 4.3: Procedura di incisione della sclera in quattro porzioni.

- 3) Sezionamento dei campioni: mediante una guida realizzata in acido polilattico, o PLA, tramite stampa 3D, sono state ritagliate con il bisturi delle strisce rettangolari di tessuto. Tale guida era costituita da un parallelepipedo rettangolare di dimensioni $6\text{mm} \times 10.5\text{mm}$. I campioni sono stati sezionati in modo tale che la base del rettangolo fosse orientata parallelamente al limbo e l'altezza fosse parallela al meridiano centrale della porzione considerata (Figura 4.4).



(c) Schema estrazione campioni.



(d) Campione di sclera estratto.

Figura 4.4: Estrazione dei campioni di sclera.

Per ogni occhio sono stati quindi estratti 4 campioni, ognuno corrispondente ad una specifica porzione anatomica e prelevato radialmente, ossia in direzione anteroposteriore ma lungo meridiani diversi.

- 4) Conservazione dei campioni: successivamente i campioni sono stati collocati ciascuno in un pozzetto distinto di una piastra di Petri multipla, avendo cura di inserire ogni campione, nel pozzetto corrispondente. Così facendo, la provenienza anatomica di ogni campione è stata identificata tramite la combinazione lettera – valore del pozzetto. Le striscioline di tessuto sono state conservate in soluzione fisiologica fino al momento del test. La piastra è stata poi riposta in frigorifero o in congelatore a seconda che i campioni venissero testati da freschi o da scongelati.

Per i test effettuati su campioni freschi dall'enucleazione all'estrazione dei campioni non sono passate più di 48h; alcuni test sono stati compiuti entro 4h dall'enucleazione, altri il giorno successivo. I campioni che sono stati posti in congelatore sono stati mantenuti in tale condizione per un tempo minimo di una settimana.

I campioni congelati sono stati scongelati singolarmente, riportandoli a temperatura ambiente circa 30 minuti prima dell'inizio dei test sperimentali. Ciascun campione è stato immerso in soluzione fisiologica a temperatura ambiente per effettuare lo scongelamento. In considerazione della ridotta dimensione dei campioni e del

significativo gradiente termico, un intervallo temporale di circa 30 minuti è risultato adeguato a garantire il completo scongelamento.

4.2 Estrazione, Preparazione e Conservazione dei Campioni per Prove Parallele:

Per eseguire tali prove, è stato necessario estrarre campioni di tessuto corneale e sclerale di uguali dimensioni e dallo stesso occhio.

La procedura di pulitura e apertura del bulbo oculare sono le stesse indicate in precedenza; l'unica differenza risiede nel punto in cui viene fatta l'incisione con il bisturi, che in questo caso è effettuata un paio di millimetri più distante dal limbo.

Una volta estratta la cornea (Figura 4.5), si è proceduto a ricavare il campione mediante l'utilizzo di una guida, simile a quella usata in precedenza le cui dimensioni sono: $10\text{mm} \times 3\text{mm}$. Tale guida, in resina fotopolimerizzata, è stata ottenuta mediante stampa 3D.



Figura 4.5: Cornea con porzione di sclera oltre il limbus.

Si è posta attenzione nel preservare una porzione di tessuto sclerale ai bordi del campione di cornea, per consentire il successivo afferraggio durante i test. I campioni sono stati estratti posizionando la guida parallelamente al meridiano orizzontale dell'occhio.

I campioni di sclera sono stati estratti dalla porzione di sclera dello stesso bulbo mediante la stessa guida (Figura 4.6). La totalità dei campioni è stata estratta lateralmente al campione corneale, ricavando una strisciolina di tessuto che seguisse il meridiano orizzontale ma senza prestare attenzione che venisse ricavato sul lato temporale o nasale.



Figura 4.6: Procedura per ritagliare campioni di sclera.

La conservazione dei campioni è stata effettuata immergendoli in soluzione salina fino al momento del test. L'estrazione dei campioni è stata effettuata a ridosso dell'inizio del test, circa 30 *min* prima, per minimizzare la degradazione tissutale della cornea.

Lo spessore e la larghezza della sclera sono stati misurati con un calibro digitale, rispettivamente, in 6 e 4 punti distinti.

Lo spessore della cornea è stato misurato con una procedura più complessa data la difficoltà nel manipolarla. È stata scattata una fotografia, per ogni campione di cornea ponendolo a contatto con carta millimetrata. Si è poi proseguito effettuando un'analisi dei pixel dell'immagine, ottenendo di conseguenza lo spessore.

La lunghezza del tratto di cornea è stata misurata con un calibro digitale.

5 Capitolo 5: Procedure Sperimentali

I test sperimentali eseguiti, descritti nelle sezioni successive, possono essere suddivisi in tre categorie principali: prove su campioni di sclera fresca, prove su campioni precedentemente congelati e prove parallele. Tutti i campioni sono stati sottoposti al medesimo protocollo sperimentale, articolato nelle seguenti fasi: preconditionamento, rampe di rilassamento seguite da prove di trazione a velocità differenti e, infine, rottura dei provini. Complessivamente, sono stati testati 40 campioni di sclera fresca e 40 campioni scongelati, dato che per ogni occhio sono stati estratti 4 campioni, gli occhi sezionati in totale sono stati 20.

Per le prove parallele sono stati invece utilizzati 10 coppie di campioni di cornea e sclera, ciascuna prelevata dallo stesso animale; quindi, sono stati sezionati 10 occhi in totale per questa analisi.

Per i campioni di sclera fresca e scongelata, i dati acquisiti dalla macchina di prova sono stati analizzati al fine di caratterizzarne sia il comportamento a trazione sia le proprietà viscoelastiche. In particolare, si è cercato il modello viscoelastico più idoneo a rappresentare la risposta meccanica dei provini.

Le prove parallele sono state condotte contemporaneamente su due macchine di prova distinte; i dati ottenuti sono stati poi elaborati con l'obiettivo di indagare un'eventuale correlazione tra le coppie di tessuto.

La totalità delle prove è stata effettuata in soluzione salina a temperatura ambiente.

5.1 Test di Trazione Uniassiale

Di seguito verranno dettagliatamente illustrati il set up sperimentale, la procedura di assemblaggio dello stesso, i protocolli utilizzati per condurre le prove ed i calcoli effettuati sui dati estratti.

5.1.1 Definizione Set Up Sperimentale

Il set up utilizzato è composto da:

- Macchina di prova "BOSE, EnduraTEC ELF 3200" alloggiata su di un apposito banco prova. La ganascia inferiore è fissa, ma la sua altezza è regolabile

manualmente, mentre quella superiore trasla in verticale per la forza o eseguire lo spostamento imposto.

- Software associato alla macchina: WinTest; questo; permette di impostare parametri di prova e controllo;
- Camera per mantenere l'idratazione composta da: cilindro in polimetilmetacrilato, o PMMA, un supporto scomponibile in PLA e due guarnizioni discoidali polimeriche. Tutte le dimensioni sono indicate in Tabella B.1 e Tabella B.2, vedi appendice B, pg. 121.

Il supporto (Figura 5.1) è stato ideato appositamente per lo scopo ed è formato da una base, elemento 1, con dei fori passanti ed un bordo filettato all'interno che agisce da madrevite, ed un anello, elemento 2, che si avvita sulla base. Nella parte interna dell'anello è presente una scanalatura la cui funzione è quella di far da sede per un o'ring di silicone.

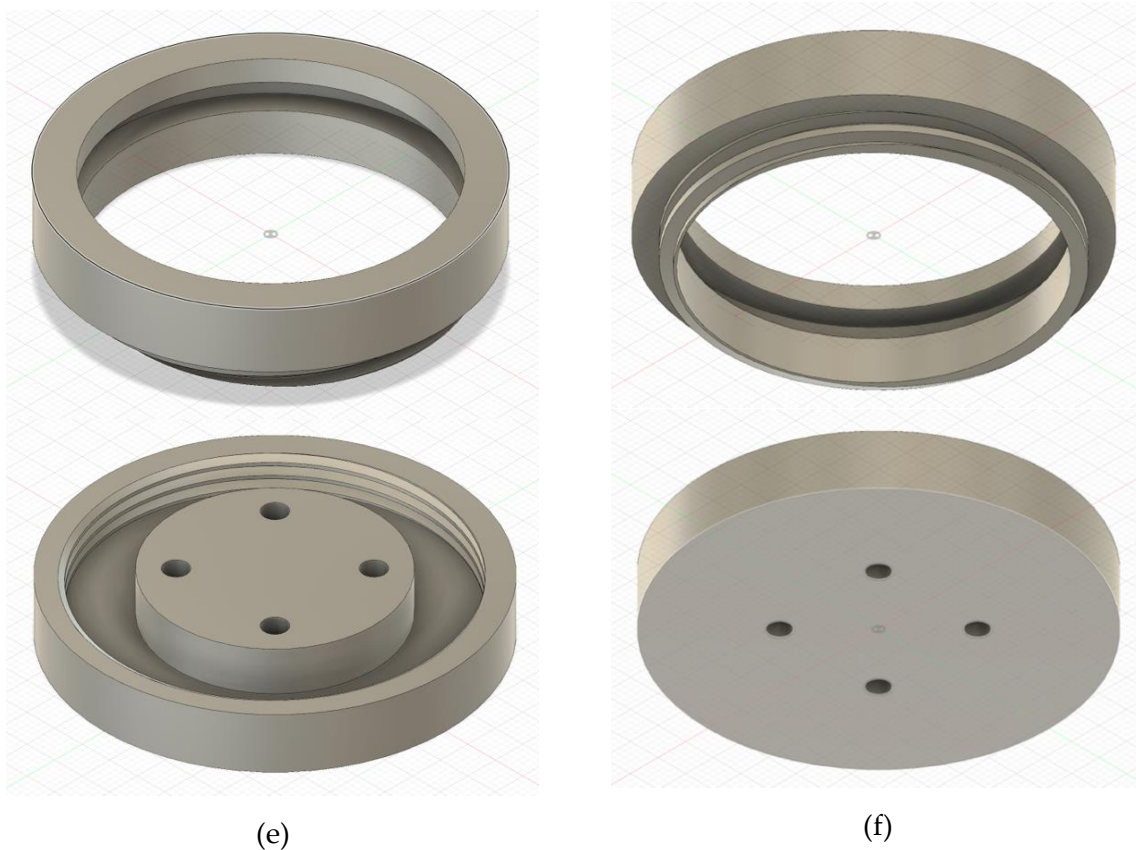


Figura 5.1: Viste diverse del supporto.

- Cella di carico da 200N necessaria per misurare la forza e posizionata al di sotto della camera.
- Afferraggi per vincolare i campioni alla macchina.

Il set up, una volta montato, con il campione immerso in soluzione si presenta come in (Figura 5.2).



Figura 5.2: Set up sperimentale con campione di sclera.

5.1.2 Metodi per l'Esecuzione dei Test

Lo spessore e la larghezza dei provini di sclera sono stati misurati con un calibro digitale, rispettivamente, in 5 e 3 punti distinti del campione. La lunghezza del campione L_0 è stata misurata dopo aver montato il campione, considerando la distanza tra i due afferraggi.

I test sono stati effettuati in controllo di spostamento e con il medesimo protocollo costituito da indicato in Tabella 5.1.

Tabella 5.1: Protocollo sperimentale

Fase	Procedimento
Pre-condizionamento	Impostando L_0 ad un precarico di $0.05N$, si effettuano 10 cicli di precondizionamento deformando il campione da L_0 a $L = L_0 + 2\% \cdot L_0$
Precarico	Si reimposta L_0 ad un precarico di $0.05N$.
Rampe di rilassamento	Si effettuano tre rampe di rilassamento consecutive, deformando il campione, rispettivamente, a $L_{2\%}$, $L_{4\%}$, $L_{6\%}$ della lunghezza. Fra una rampa e la successiva il campione non viene riportato ad L_0 , ma si impone lo spostamento successivo partendo dal precedente. Il campione viene deformato con velocità $v_3 = 0.001 \cdot L_0$. La deformazione del campione viene mantenuta per

	tempi differenti nel corso delle tre rampe; in particolare, il periodo di rilassamento dura rispettivamente, 200s, 600s e 1800s.
Riposo	Si riporta il campione alla lunghezza iniziale L_0 , che viene mantenuta per 60 sec. Tale operazione si esegue a velocità v_3 .
Rampe a velocità diverse	Si effettuano tre rampe di trazione consecutive a velocità diversa e deformazione del $\varepsilon = 10\%$ per le prime due, mentre la terza termina con la rottura, che si realizza imponendo uno spostamento degli afferraggi pari alla corsa massima della macchina. Le rampe sono eseguite nell'ordine v_1, v_3 e v_2 . Le rampe di scarico sono state eseguite alla stessa velocità del carico.

Le lunghezze imposte al campione nei vari rilassamenti sono ricavate come:

$$L_{2\%} = L_0 + 2\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

$$L_{4\%} = L_0 + 4\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

$$L_{6\%} = L_0 + 6\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

Le velocità delle rampe di trazione sono calcolate come:

$$v_1 = 0.0001 \cdot L_0 \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right]$$

$$v_2 = 0.01 \cdot L_0 \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right]$$

$$v_3 = 0.001 \cdot L_0 \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right]$$

5.1.3 Elaborazione dei Dati

La macchina di prova restituisce un file in formato .txt con i valori di spostamento imposti, tempo e carico misurati. Come software principale per l'elaborazione dei dati è stato usato Excel.

I valori di carico estratti dalla macchina sono stati in primo luogo filtrati mediante un codice MATLAB (appendice C, pg.123) che si basa su due algoritmi di filtraggio distinti: Savitzky – Golay e Loess. In Figura 5.3: Grafico sforzo – tempo con curva originale e filtrate. è possibile osservare qualitativamente la bontà del filtraggio e la rumorosità dei dati.

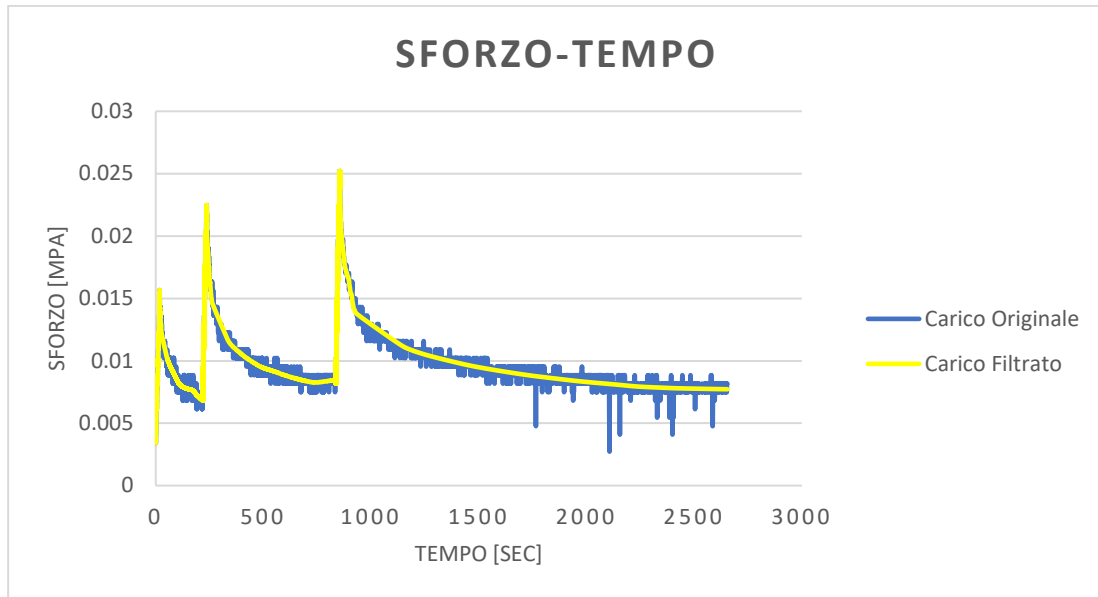


Figura 5.3: Grafico sforzo – tempo con curva originale e filtrate.

Per ogni campione è stato calcolato lo spessore medio tramite l'Equazione (5.1).

$$s_{mean} = \frac{\sum_{i=1}^5 s_i}{5} \quad [mm] \quad (5.1)$$

E la larghezza media mediante l'Equazione (5.2).

$$w_{mean} = \frac{\sum_{i=1}^3 w_i}{3} \quad [mm] \quad (5.2)$$

Di conseguenza è stata calcolata l'area della sezione resistente iniziale, definita dall'Equazione (5.3):

$$A_0 = s_{mean} \cdot w_{mean} \quad [mm^2] \quad (5.3)$$

A questo punto, per ogni prova è stato calcolato, ad ogni istante di tempo campionato, lo sforzo σ e la deformazione ε come indicato nei cenni teorici.

Per ogni rampa di rilassamento è stata calcolata la percentuale di rilassamento $R_{\%}$ ed il modulo di rilassamento all'equilibrio mediante l'Equazione (5.4)

$$G_{\varepsilon\%} = \frac{\Delta\sigma_{eq}}{\Delta\varepsilon_{\%}} \quad (5.4)$$

Il modulo di rilassamento viene calcolato considerando la differenza di sforzo e deformazione rispetto al rilassamento precedente, non rispetto alla condizione iniziale; quindi, $\Delta\varepsilon_{\%}$ è sempre pari al 2%. Data l'oscillazione dei valori, lo sforzo di equilibrio è stato calcolato come la media degli ultimi cinque valori di sforzo del rispettivo rilassamento.

Nelle prove di rilassamento effettuate imponendo gradini di deformazione, il modulo di rilassamento è determinato considerando l'incremento di deformazione e lo sforzo di equilibrio associato a ciascuno step. Questa procedura consente di isolare la risposta

viscoelastica associata esclusivamente all'incremento di deformazione appena applicato, sottraendo l'effetto dei rilassamenti precedenti. In tal modo, si evita di sottostimare o sovrastimare il modulo di rilassamento per ogni step.

Ad esempio, il modulo di rilassamento al 6% di deformazione è stato calcolato tramite l'Equazione (5.4):

$$G_{6\%} = \frac{\sigma_{6\%} - \sigma_{4\%}}{0.02} \quad (5.4)$$

In Figura 5.4 è mostrato un esempio di come è stato ricavato il numeratore per il calcolo del modulo di rilassamento al 6%.

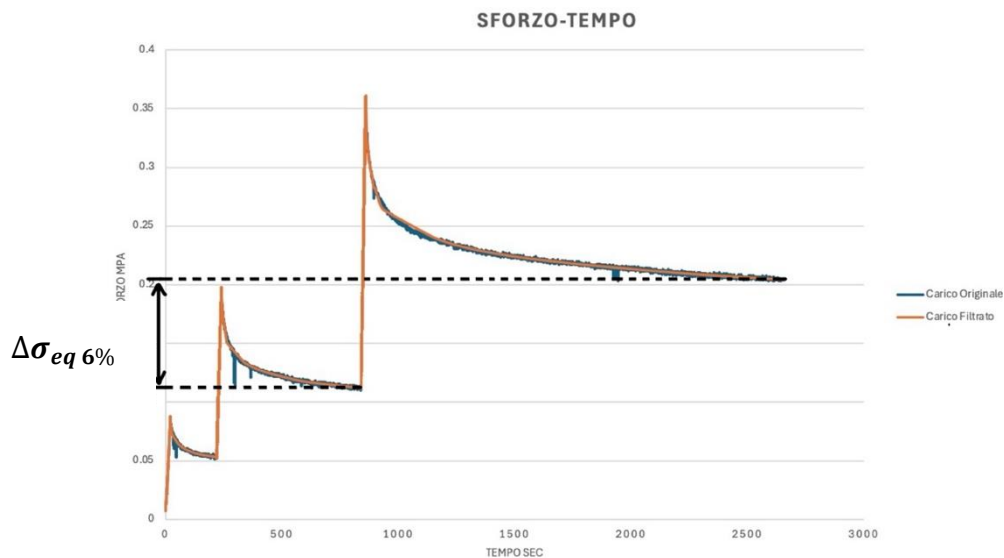


Figura 5.4: Procedura per ricavare $\Delta\sigma_{eq}$

effettuato, a partire dall'Equazione (3.3), considerando un intervallo di valori di sforzo e di deformazione, nell'intorno della deformazione di interesse.

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (3.3)$$

Effettuando questo calcolo si ottiene il valore di modulo di Young per la "toe region" e per la "heel region" relativi ad ogni prova. Nella Figura 5.5 di seguito sono mostrate le tre curve a trazione eseguite con velocità diverse ottenute testando campioni di sclera. Il comportamento viscoelastico è molto evidente nella dipendenza dello sforzo dalla deformazione (irrigidimento all'aumentare della deformazione) e dalla velocità di deformazione (irrigidimento all'aumentare della velocità di deformazione).

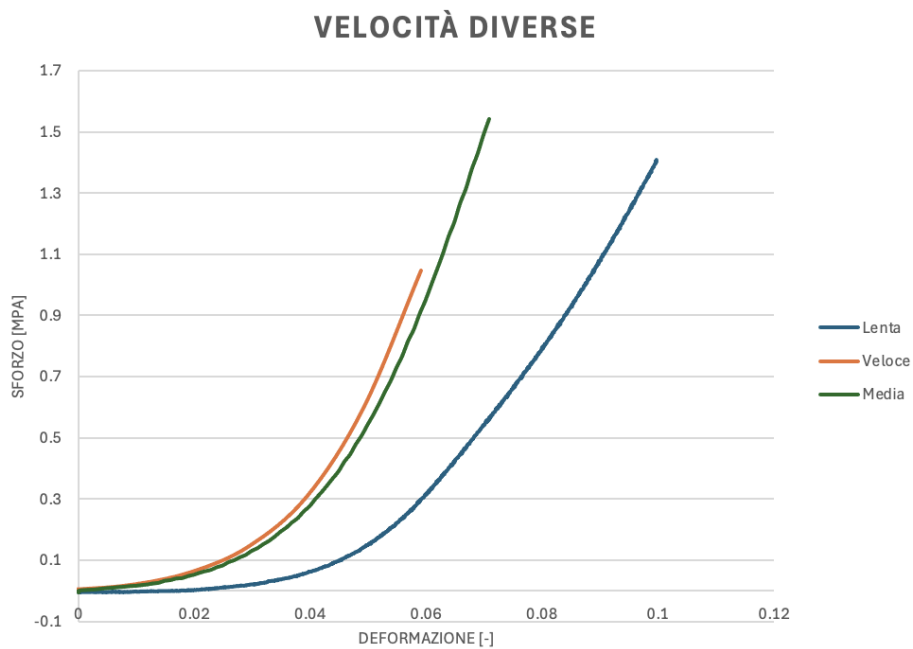


Figura 5.5: Esempio delle curve a trazione eseguite a velocità diversa.

È stato poi estratto anche il valore dello sforzo a rottura, che dà una misura della resistenza meccanica del materiale; questo, è rappresentato dal più alto valore di sforzo raggiunto nella curva a rottura (Figura 5.6).

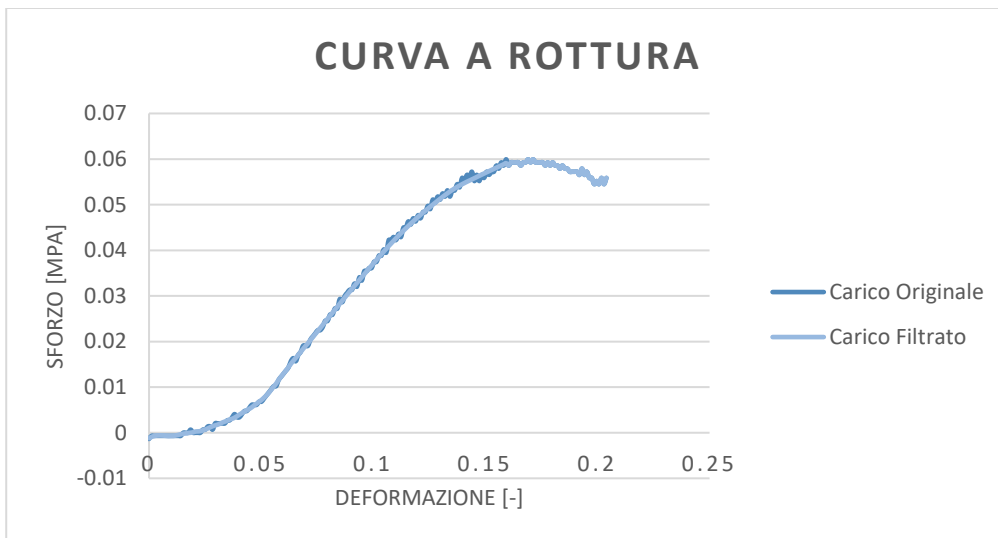


Figura 5.6: Curva di sforzo – deformazione fino a rottura.

5.2 Modellazioni Viscoelastiche

Le analisi viscoelastiche effettuate hanno trovato il loro focus nella ricerca di un modello viscoelastico che rappresentasse bene il comportamento della sclera. Per ogni rampa di rilassamento, è stato quindi cercato il modello che meglio la rappresentasse fra quelli esposti nei cenni teorici. Tale operazione è stata compiuta sfruttando Julia

(90): un linguaggio di programmazione, progettato specificamente per applicazioni scientifiche e numeriche che richiedono elevate prestazioni computazionali. Per questo motivo si presta in modo ottimale allo sviluppo di modelli matematici, simulazioni e analisi di dati complessi. Nel caso specifico, Julia è stato utilizzato attraverso l'ambiente JupyterLab (91), che consente di integrare in un'unica piattaforma codice, visualizzazioni e testo descrittivo. In particolare, si è fatto ricorso al pacchetto RHEOS (92), una libreria per la reologia computazionale, sviluppata appositamente per la simulazione e l'analisi di materiali viscoelastici mediante l'impiego di diversi modelli costitutivi.

Modellizzare il comportamento viscoelastico implica, per ogni rilassamento, trovare i parametri del modello che meglio rappresentano il comportamento sperimentale.

A partire dai valori di tempo, sforzo e deformazione calcolati in precedenza, si è proceduto ad eseguire delle procedure di fitting, separatamente per ogni rampa di rilassamento. In questo modo è stato possibile identificare i modelli reologici che meglio rappresentano il comportamento osservato. Per ciascun modello sono stati quindi estratti i relativi parametri costitutivi, quali le costanti elastiche, viscosi, i tempi caratteristici di rilassamento, il modulo di rilassamento asintotico e i parametri specifici dell'elemento di Scott-Blair. In particolare, il pacchetto RHEOS mette a disposizione funzioni che consentono di eseguire il fitting dei dati sperimentali a specifici modelli viscoelastici, individuando i parametri che meglio approssimano la curva osservata. Successivamente, attraverso apposite funzioni, è possibile predire il comportamento del materiale utilizzando i parametri estratti, imponendo che esso segua il modello viscoelastico selezionato. Calcolando poi l'errore fra le due curve, quella sperimentale e quella predetta da RHEOS, si può dare una misura effettiva della bontà del modello nel rappresentare il comportamento del materiale.

Nella Figura 5.7 di seguito, è mostrato come esempio l'insieme delle curve ricavate per una rampa di rilassamento al 6%: la curva dei dati originali sottostà a quella dei dati filtrati, indicando che il filtraggio segue bene l'andamento. Inoltre, sono mostrati gli andamenti delle curve predette dai modelli di Maxwell, di Zener e da quello di Maxwell frazionale.

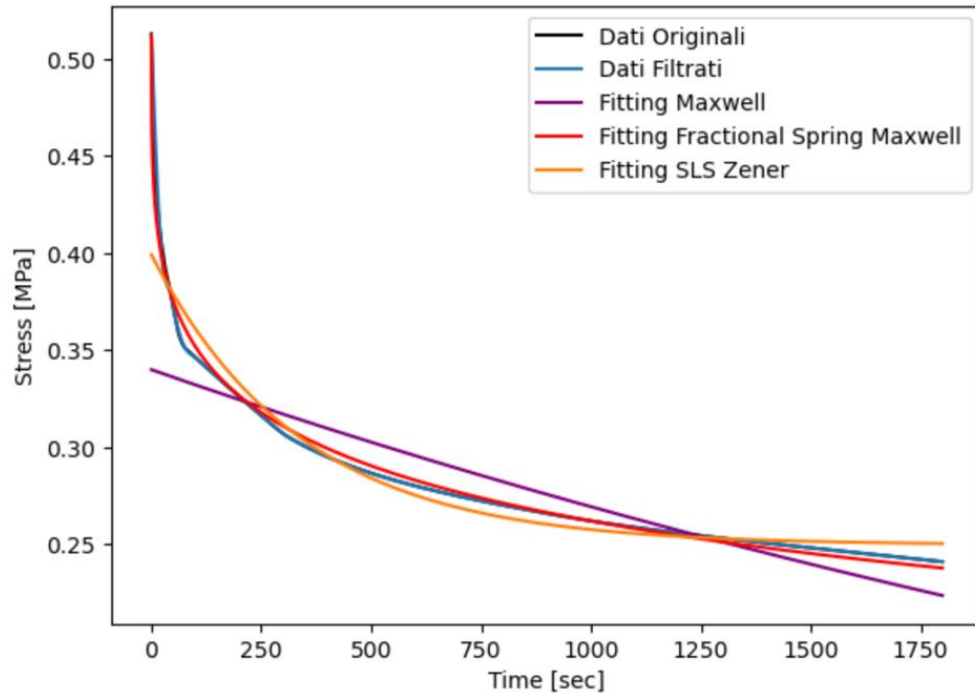


Figura 5.7: Esempio di rampa di rilassamento al 6% e curve predette dai modelli viscoelastici.

Il codice di Julia filtra ulteriormente i valori dello sforzo mediante una funzione implementata in RHEOS che sfrutta l'algoritmo di Savitzky – Golay. Sebbene i valori di sforzo che Julia utilizza come input siano frutto del precedente filtraggio effettuato sui valori del carico con MATLAB, in certi casi è necessario applicare un ulteriore filtraggio. La Figura 5.8 ne contiene infatti un esempio: si nota come nella parte iniziale della curva siano presenti delle oscillazioni, magari dovute a disturbi durante il test sperimentale che non sono stati eliminati dal filtraggio su MATLAB.

I parametri necessari al filtraggio sono due: uno riguarda l'ampiezza della finestra di dati filtrata e l'altro è relativo al grado del polinomio con cui si approssima la curva. L'ampiezza della finestra è stata selezionata pari a:

- $window_size = 301$ per il rilassamento al 2%
- $window_size = 201$ per il rilassamento al 4%
- $window_size = 101$ per il rilassamento al 6%

Tale scelta è stata dettata dalla necessità di trovare un compromesso fra la bontà del filtraggio e il fatto che venisse seguito l'andamento della curva sperimentale.

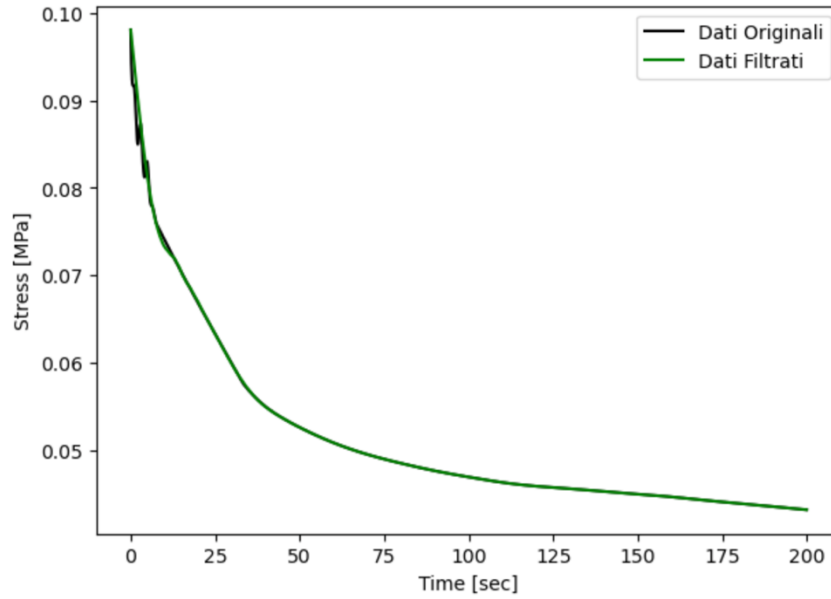


Figura 5.8: Esempio di una curva sperimentale e della stessa in seguito al filtraggio.

Sono stati implementati tre codici distinti, ognuno per uno dei modelli viscoelastici considerati ma tutti con le medesime funzionalità di base.

Per eseguire queste operazioni, i dati di tempo, di sforzo e deformazione relativi a ciascuna prova sono stati trasferiti in un file .csv, fornito in input al codice, che è stato implementato in modo tale da processare automaticamente i file di tutte le prove effettuate.

Ogni codice è stato automatizzato per eseguire il fitting e la previsione del comportamento del materiale, processando sequenzialmente i tre cicli di rilassamento di una prova e assegnando a ciascuno i parametri di filtraggio appropriati. Inoltre, il codice estrae i parametri caratteristici del modello, il modulo di rilassamento all'equilibrio e l'errore tra la curva filtrata e quella prevista, registrando tutti questi valori in un file di output, anch'esso in formato .csv. I codici generano in output, ciascuno tre file .csv, ognuno contenente i valori dei parametri estratti dal fitting dello stesso rilassamento, effettuato per tutte le prove.

Per quantificare la differenza tra la curva filtrata dei dati sperimentali e quella predetta dal modello, si calcola l'errore medio relativo percentuale (MAPE) che fornisce una misura dell'accuratezza del modello; per cui, valori più bassi indicano una corrispondenza migliore tra predizione e dati sperimentali.

L'errore MAPE è calcolato, per ogni curva, mediante l'Equazione (5.5):

$$MAPE = 100 \cdot \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \quad (5.5)$$

Dove:

- y_i : è il valore di sforzo ottenuto sperimentalmente in un punto;

- \hat{y}_i : è il valore di sforzo predetto dal modello in un punto;
- N: numero di osservazioni totali.

Nell'appendice D, pg.127 sono riportati i tre codici.

5.3 Test di Trazione Uniassiale su Cornea e Sclera “in Parallelo”

Questa tipologia di test è stata effettuata tramite due macchine per la trazione uniassiale in contemporanea, una utilizzata per la cornea e l'altra per la sclera. I test sono stati svolti nello stesso momento per minimizzare la variabilità dovuta a fattori estrinseci.

5.3.1 Definizione Set Up Sperimentale

Il set up utilizzato per testare la sclera è lo stesso esposto in precedenza.

Il set up tramite cui è stata testata cornea comprende:

- Una macchina di prova per la trazione;
- Una cella di carico da 100N;
- Una vasca per eseguire il test in soluzione fisiologica;
- Afferraggi e ganasce. Il campione di sclera è stato prima bloccato all'interno di porzioni di carta vetrata sfruttando della colla a presa rapida. Successivamente le estremità sono state inserite e bloccate all'interno delle ganasce della macchina.

Il campione immerso in soluzione e montato all'interno del set up si presenta come in foto:



Figura 5.9: Dettaglio degli afferraggi e campione corneale montato all'interno del set up.

5.3.2 Protocollo Sperimentale

Il protocollo sperimentale applicato a cornea e sclera è lo stesso esposto in precedenza e riassunto in Tabella 5.1; questa è riportata di seguito per praticità.

Fase	Procedimento
Pre-condizionamento	Impostando L_0 ad un precarico di $0.05N$, si effettuano 10 cicli di precondizionamento deformando il campione da L_0 a $L = L_0 + 2\% \cdot L_0$
Precarico	Si reimposta L_0 ad un precarico di $0.05N$.
Rampe di rilassamento	Si effettuano tre rampe di rilassamento consecutive, deformando il campione, rispettivamente, a $L_{2\%}$, $L_{4\%}$, $L_{6\%}$ della lunghezza. Fra una rampa e la successiva il campione non viene riportato ad L_0 , ma si impone lo spostamento successivo partendo dal precedente. Il campione viene deformato con velocità $v_3 = 0.001 \cdot L_0$. La deformazione del campione viene mantenuta per tempi differenti nel corso delle tre rampe; in particolare, il periodo di rilassamento dura rispettivamente, 200s, 600s e 1800s.
Riposo	Si riporta il campione alla lunghezza iniziale L_0 , che viene mantenuta per 60 sec. Tale operazione si esegue a velocità v_3 .
Rampe a velocità diverse	Si effettuano tre rampe di trazione consecutive a velocità diversa e deformazione del $\varepsilon = 10\%$ per le prime due, mentre la terza termina con la rottura, che si realizza imponendo uno spostamento degli afferraggi pari alla corsa massima della macchina. Le rampe sono eseguite nell'ordine v_1, v_3 e v_2 . Le rampe di scarico sono state eseguite alla stessa velocità del carico.

Le lunghezze imposte al campione nei vari rilassamenti sono ricavate come:

$$L_{2\%} = L_0 + 2\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

$$L_{4\%} = L_0 + 4\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

$$L_{6\%} = L_0 + 6\% \cdot L_0 \text{ [mm]}$$

Le velocità delle rampe di trazione sono calcolate come:

$$v_1 = 0.0001 \cdot L_0 \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right]$$

$$v_2 = 0.01 \cdot L_0 \left[\frac{mm}{s} \right]$$
$$v_3 = 0.001 \cdot L_0 \left[\frac{mm}{s} \right]$$

5.3.3 Elaborazione dei Dati

Sono state ricavate, per ciascun campione, le dimensioni di spessore, larghezza e lunghezza e successivamente si è proseguito calcolando per ogni prova lo sforzo nominale σ e la deformazione ε . In seguito, sono stati calcolati i parametri di rilassamento percentuale $R_{2\%}$, $R_{4\%}$, $R_{6\%}$, gli sforzi di rilassamento σ_{eq} e conseguentemente i moduli di rilassamento per i tre rilassamenti.

Per le tre rampe di trazione a velocità diversa è stato calcolato il modulo elastico E solamente all'8% di deformazione.

6 Capitolo 6: Risultati e Discussione

Nel corso del presente capitolo verranno mostrati i risultati delle prove sperimentali e dei modelli, con annessa discussione. Per rendere tutto più chiaro, i risultati sono organizzati in diverse sezioni, ciascuna dedicata a un aspetto dello studio. Chiaramente, tutte le conclusioni sono state tratte da considerazioni di tipo oggettivo e statistico.

Le analisi statistiche effettuate sui dati sono state eseguite tramite l'applicativo online del sito Statistics Kingdom relativo al test di Kruskal – Wallis (93) e al test di Mann – Whitney (94), previa verifica relativa alla normalità dei dati, la quale è stata effettuata tramite il test di Shapiro – Wilk (95).

Le distribuzioni dei dati non sono risultate normali, di conseguenza le successive indagini sono state eseguite mediante test non parametrici, utilizzati per confrontare gruppi indipendenti quando i dati non seguono una distribuzione normale. Sia il test di Mann – Whitney che quello di Kruskal – Wallis permettono di verificare se esistono differenze significative tra i gruppi; in particolare, il primo è specifico per il confronto tra due gruppi, mentre il secondo è indicato per più gruppi.

Il test di Kruskal – Wallis consente di verificare l'ipotesi nulla di uguaglianza delle distribuzioni tra più gruppi, con particolare riferimento alle mediane. La statistica del test, indicata con H , permette di determinare se vi siano differenze complessive tra i gruppi, senza tuttavia identificare quali coppie di gruppi siano responsabili di tali differenze. Il parametro H è uguale a zero se non si ha differenza tra i gruppi e le distribuzioni sono uguali, mentre aumenta più le differenze tra i gruppi sono marcate. H da quindi una misura della discrepanza tra le distribuzioni; da quest'ultimo si può ricavare il p – *value*, parametro che indica se la differenza tra i gruppi è statisticamente significativa. Si ha:

- $p < \alpha$: si rifiuta l'ipotesi nulla, suggerendo che almeno un gruppo differisce dagli altri.
- $p \geq \alpha$: non ci sono evidenze sufficienti per affermare che esistano differenze significative tra i gruppi.

Dove α , solitamente 0.05, rappresenta il livello di significatività del test. È la soglia che si sceglie prima di condurre l'analisi per decidere quanto raramente si è disposti a tollerare un falso positivo, cioè rifiutare l'ipotesi nulla quando in realtà è vera (errore di tipo I).

Per approfondire eventuali differenze tra i gruppi, si ricorre all'analisi post – hoc mediante il test di Dunn, che consente confronti multipli a coppie con correzione del rischio di errore di tipo I. Oltre all'evidenza statistica H , è possibile quantificare la grandezza dell'effetto attraverso l'indice η^2 , il quale indica la misura in cui le differenze tra i gruppi contribuiscono ai risultati complessivi, fornendo un'indicazione della rilevanza pratica dei risultati oltre che della significatività statistica.

Nel test di Mann – Whitney la statistica è indicata con U e, come nel caso precedente, da questa si ricava il p – *value*. U assume valori maggiori (minori), quanto più i valori del primo gruppo superano (sono inferiori) quelli del secondo.

Per analizzare se fra due distribuzioni vi fosse correlazione è stato utilizzato il test di Kendall, il quale serve proprio per quantificare la relazione tra coppie di variabili. Si tratta di un test non parametrico, quindi adatto a distribuzioni non normali dato che non effettua assunzioni sulla normalità dei dati. La forza e la direzione della correlazione sono espresse dal coefficiente τ , i cui valori assumono i seguenti significati:

- $\tau = 1 \rightarrow$ perfetta concordanza positiva tra i dati;
- $\tau = 0 \rightarrow$ nessuna correlazione tra i dati;
- $\tau = -1 \rightarrow$ perfetta concordanza negativa tra i dati.

Tale test è stato eseguito mediante l'applicativo online della piattaforma GIGAcaculator (96).

6.1 Prove su Campioni Freschi

Divideremo la presentazione dei risultati mostrando prima il comportamento elastico del materiale, evidenziato dalle rampe di trazione e successivamente quello viscoelastico.

6.1.1 Analisi Elastica

I 40 campioni di sclera freschi sono stati sottoposti a tre rampe di trazione consecutive a velocità di deformazione crescente per indagare se vi fosse una dipendenza del modulo di Young dalla velocità (Figura 6.1). La terza rampa terminava con la rottura del campione.

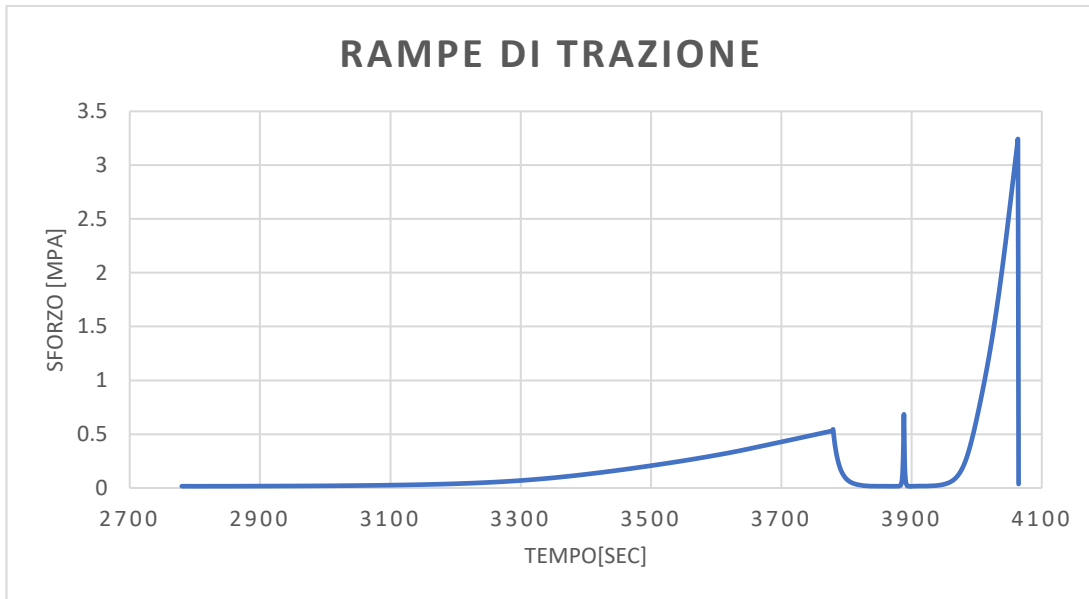


Figura 6.1: Sequenza delle rampe di trazione, a velocità diverse, in funzione del tempo.

Anche osservando solo qualitativamente il grafico si nota una differenza nel comportamento meccanico in base allo strain rate, o velocità di deformazione, con cui è stato deformato il campione.

Le curve si possono rappresentare anche rispetto alla deformazione (Figura 6.2).

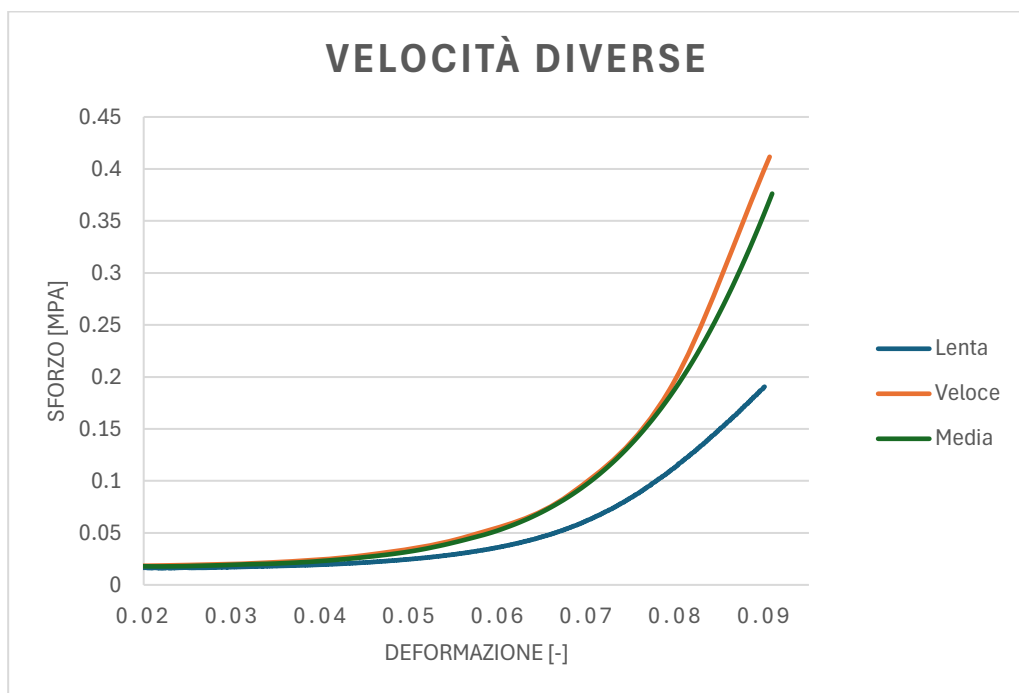


Figura 6.2: Esempio di rampe di trazione eseguite a velocità diversa.

Per ogni curva è stato calcolato il modulo elastico del campione, per deformazione del 2% e dell'8%. Successivamente sono state condotte delle analisi statistiche per verificare se lo strain rate influenzasse la rigidità del campione, confrontando i vari moduli di Young (E) per le tre velocità testate. Nel corso di questa analisi non sono

state considerate le differenze nella direzione di estrazione dei campioni; quindi, sono stati raggruppati tutti e quaranta i moduli elastici calcolati al 2% per la rampa lenta, veloce e media; ottenendo così tre gruppi di dati da quaranta valori ciascuno.

Confrontando i moduli elastici al 2% di deformazione così raggruppati mediante il test di Kruskal – Wallis, è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i gruppi. Il test post - hoc ha poi evidenziato una differenza tra i moduli elastici relativi alla curva lenta e media (indicata con *), e tra la curva lenta e veloce (indicata con °). L'effetto di queste differenze è valutato di magnitudo medio. In altre parole, risulta che la rigidità della curva lenta al 2% di deformazione è statisticamente diversa da quella che si misura sulle curve a velocità media e veloce a parità di deformazione. Perciò si può concludere che i moduli elastici della curva lenta al 2% di deformazione sono statisticamente maggiori di quelli delle altre due curve.

Infatti, osservando la Figura 6.3, che mostra le tre curve di trazione a velocità diverse, si nota come la curva lenta al 2% possieda una rigidezza maggiore per via della pendenza più evidente.

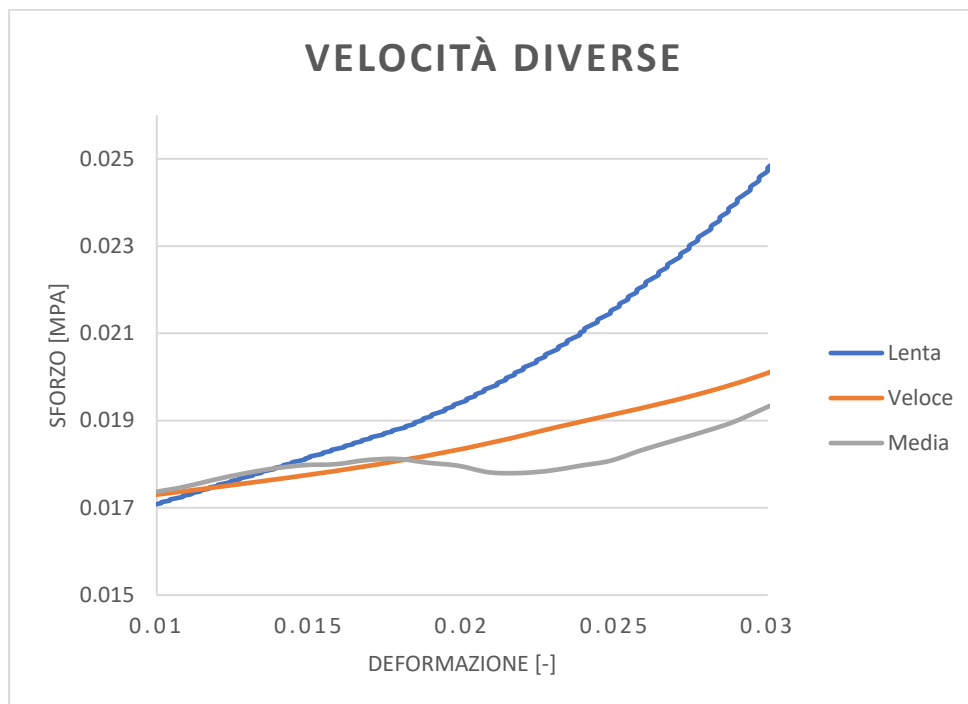


Figura 6.3: Dettaglio delle tre rampe al 2% di deformazione.

All'8% invece, le analisi statistiche hanno mostrato una differenza statisticamente significativa (indicata con *) dei moduli elastici fra i gruppi; tuttavia, la differenza evidenziata dal test di Dunn ha riguardato solamente il gruppo a velocità lenta e veloce, con una ridotta differenza tra la media dei gruppi. Il gruppo 1, relativo alla velocità lenta possiede una mediana pari a 8.24 MPa, mentre quella del gruppo 3, curva veloce, è pari a 14.51 MPa. Si delinea quindi un comportamento diametralmente opposto, per cui la curva veloce risulta rigida quasi il doppio di quella lenta. Ciò si traduce in una curva veloce più pendente di quella lenta in corrispondenza di una

deformazione dell'8% (Figura 6.2). In figura Figura 6.4 è mostrato un istogramma contenente la media dei moduli elastici estratti, all'8% di deformazione, per le curve di trazione a velocità crescente.

I valori dei parametri estratti dei test statistici sono raggruppati nella Tabella 6.1.

Tabella 6.1: Parametri statistici delle prove di trazione.

ε	H	$p - value$	η^2
2%	16.31	0.0002871	0.13
8%	6.12	0.045	0.038

Le mediane dei moduli elastici ricavati per le curve a velocità diverse sono riportate nella Tabella 6.2:

Tabella 6.2: Mediane dei moduli elastici delle prove di trazione eseguite a tre velocità diverse.

ε	$v_1 = 0.01\% * L_0$	$v_2 = 0.1\% * L_0$	$v_3 = 1\% * L_0$
2%	0.52*° MPa	0.18* MPa	0.24° MPa
8%	8.24* MPa	13.35 MPa	14.51* MPa

Queste evidenze dimostrano come la velocità di deformazione sia influente sul comportamento meccanico del tessuto, ed in particolare come la rigidità dello stesso aumenti all'aumentare della deformazione, mostrando il tipico comportamento di un tessuto viscoelastico.

Le curve di trazione hanno confermato la viscoelasticità della sclera; mostrano il tipico andamento a J, con il modulo di Young che cresce all'aumentare della deformazione.

La componente viscosa del tessuto risulta evidente anche nella dipendenza del modulo di Young dalla velocità di deformazione. Il risultato ottenuto all'8%, dove il modulo cresce all'aumentare dello strain rate è intuitivo, basti pensare alla legge costitutiva dello smorzatore indicata nel capitolo 3.2, in cui risulta che lo sforzo è proporzionale alla velocità di deformazione. Ciò si traduce in curve di carico diverse e non sovrapponibili per velocità di deformazione crescenti.

Il risultato ottenuto al 2% di deformazione è controintuitivo e contraddice quanto affermato da precedenti studi di letteratura relativi a tessuti viscoelastici, secondo cui il tessuto è meno rigido e si deforma maggiormente a strain rate bassi. Ciò accade perché predominano effetti viscosi dovuti allo scorrimento delle fibrille e delle fibre di collagene all'interno della matrice (97). La deformazione che si realizza a basse velocità risulta maggiore della deformazione delle singole fibre; questo processo risulta protettivo nei confronti delle fibre stesse, consentendo al tessuto di sopportare più carico e deformarsi maggiormente senza che le fibre siano giunte a rottura.

Alla luce di tali caratteristiche, il risultato ottenuto al 2% di strain risulta molto particolare e potrebbe essere stato causato da un'impresione nelle misure effettuate a bassa deformazione e bassa velocità; cioè da un artefatto sperimentale.

Come affermato nel capitolo 1, la sclera possiede un comportamento intermedio fra quello puramente elastico, in cui lo sforzo dipende solamente dalla deformazione, e quello puramente viscoso, in cui lo sforzo dipende dallo strain rate. La risposta elastica, legata allo stiramento delle fibre di collagene, si mostra con evidenza una volta che si esce dalla "toe region", caratterizzata da ampie deformazioni e valori di sforzo molto bassi. Nella "heel region" infatti, lo sforzo aumenta molto e continua a crescere insieme ad ϵ .

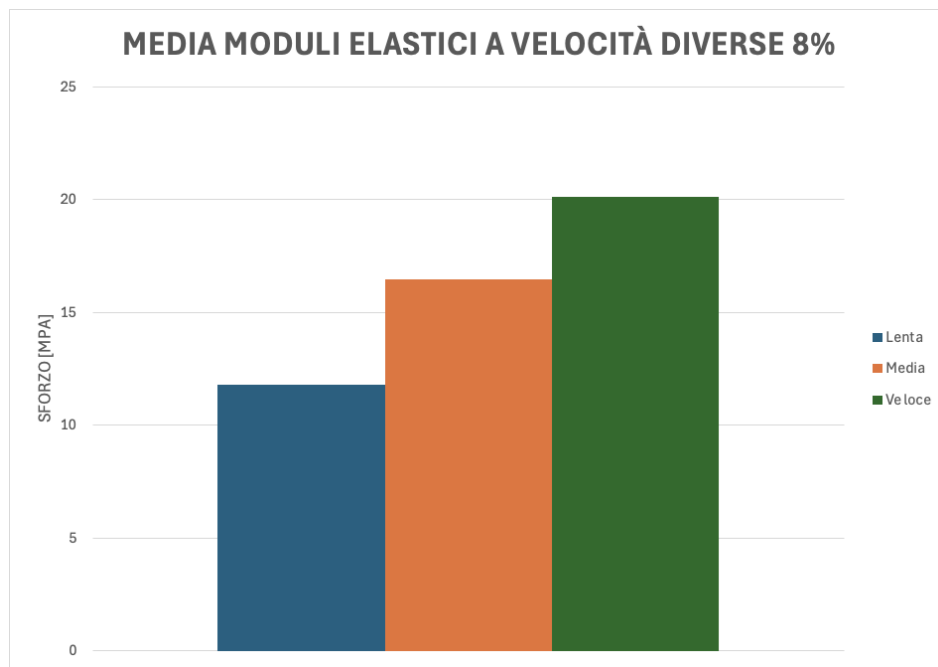


Figura 6.4: Istogramma che contiene la media dei moduli elastici estratti dalle curve a velocità diverse per una deformazione dell'8%.

L'aumento della rigidità della sclera conseguente ad un aumento dello strain rate (98) (velocità di deformazione) può essere interpretato alla luce delle microscopiche del tessuto. Infatti, a velocità di deformazione maggiori, il fluido extracellulare contenuto nella matrice non ha tempo sufficiente per distribuirsi e facilitare l'allineamento delle fibre di collagene; quindi, sia assiste anche a deformazioni minori in proporzione. In letteratura, inoltre, è stato documentato un aumento della resistenza a rottura all'aumentare dello strain rate (78).

A livelli di strain elevati, le fibre collagene sono già distese ed il contributo della matrice è meno rilevante; aumentando anche lo strain rate, cresce la pressione interstiziale del fluido che non potendo muoversi, trasferisce il carico direttamente alle fibre.

Successivamente è stata effettuata un'analisi statistica confrontando i moduli elastici provenienti da campioni estratti fra direzioni anatomiche diverse. Sono stati raggruppati 10 valori per ogni direzione, per ogni velocità di carico e per gli stessi valori di deformazione, 2 e 8%. Vista e considerata la dipendenza del modulo elastico dalla deformazione, sono stati effettuati test separati per i moduli al 2% e moduli all'8%.

Al 2% di deformazione:

- Curva lenta: il test di Kruskal-Wallis ha segnalato la presenza di differenze significative tra i gruppi, ma i confronti post-hoc non hanno mostrato evidenze di differenze sufficienti tra coppie specifiche. Il test globale rileva una variabilità generale $p - value = 0.026$ e $H = 9.32$, mentre l'analisi a coppie, che possiede criteri più stringenti, non individua differenze tra le coppie.
- Curva a velocità media: è stata individuata una differenza significativa dal test di Kruskal - Wallis ($p - value = 0.013$ e $H = 10.75$), confermata dal test di Dunn che ha valutato con $\eta^2 = 0.22$ l'effetto delle differenze tra le direzioni: superiore e nasale e tra la direzioni superiore e la temporale.
- Curva veloce: il test di Kruskal - Wallis non ha evidenziato differenze tra i gruppi, con un $p - value = 0.055$.

Al 8% di deformazione:

- Curva lenta: non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra i gruppi, $p - value = 0.077$;
- Curva a velocità media: non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra i gruppi, $p - value = 0.079$;
- Curva a velocità veloce: non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra i gruppi, $p - value = 0.349$;

In generale, non vi è differenza statistica fra la rigidità dei campioni estratti da punti diversi del bulbo. Tuttavia, le mediane dei gruppi considerati possiedono una tendenza comune: i moduli ricavati dalle direzioni superiore ed inferiore, risultano maggiori di quelli ricavati dalle direzioni nasale e temporale. Specialmente la direzione superiore è quella che ha valori di modulo elastico maggiori, mentre quella nasale inferiori.

È importante sottolineare che il numero limitato di campioni (10 per gruppi) riduce la potenza statistica delle analisi, aumentando la probabilità di non rilevare come significative differenze che in realtà potrebbero essere presenti (errore di II tipo). Esiste anche il rischio opposto, ovvero di identificare come significative differenze che in realtà non sono presenti (errore di I tipo). Pertanto, è bene tenere a mente tali limitazioni nell'interpretazione dei risultati.

I valori di modulo elastico possiedono un elevato grado di dispersione che aumenta all'aumentare della deformazione: al 2% di deformazione i valori sono più uniformi

tra loro, mentre all'8% si nota una differenza maggiore tra le curve a velocità di carico diversa. Inoltre, si può osservare, mediante i boxplot di seguito (Figura 6.5 e Figura 6.6), come la dispersione all'8% aumenti anche all'aumentare della velocità di carico.

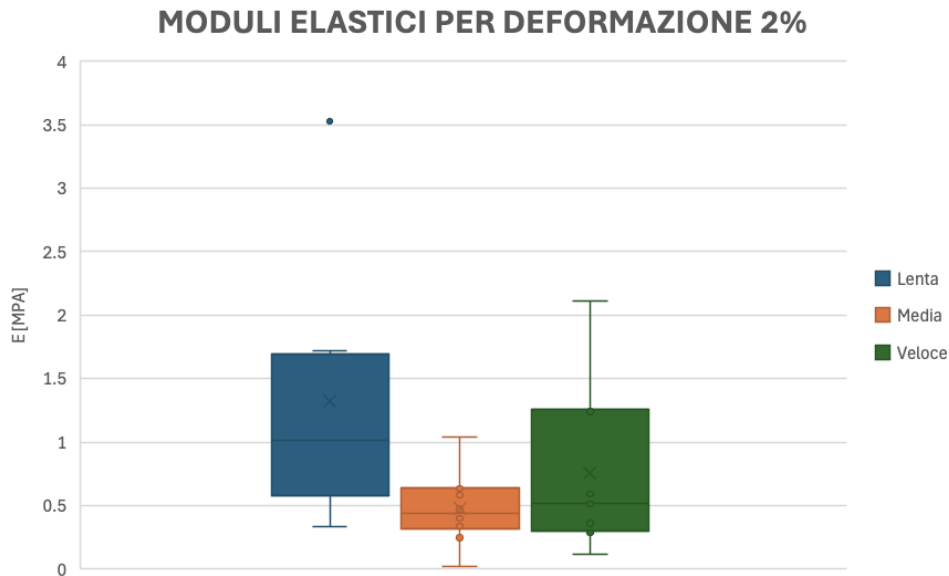


Figura 6.5: Boxplot con i moduli elastici delle curve a velocità crescente, estratti al 2% di deformazione

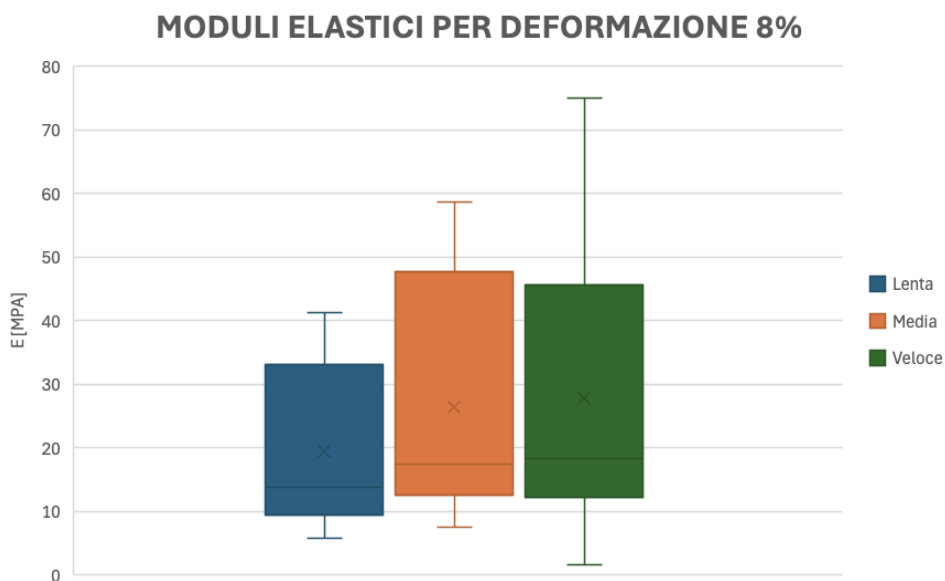


Figura 6.6: Boxplot con i moduli elastici delle curve a velocità crescente, estratti all'8% di deformazione

La dispersione dei dati si può quantificare, nel caso di distribuzioni non normali tramite l'intervallo interquartile (IQR) perché meno sensibile agli outliers rispetto alla varianza e alla deviazione standard ed è rappresentato dalla differenza tra il terzo quartile (Q3) e il primo quartile (Q1) dei dati. Tale parametro è stato calcolato per entrambi i livelli di deformazione e per tutte e tre le velocità di carico ed è riportato in Tabella 6.3.

Tabella 6.3: Intervallo interquartile (IQR) calcolato sui moduli elastici delle curve a velocità crescente, al 2% e 8% di deformazione.

ε	$v = 0.01\% * L_0$	$v = 0.1\% * L_0$	$v = 1\% * L_0$
2%	0.607	0.23	0.43
8%	10.75	15.63	16.81

I valori ottenuti confermano una maggiore variabilità dei dati all'8%; infatti, tanto più è elevato l'IQR e maggiore è la loro dispersione.

La variabilità nei dati può spiegarsi in vari modi, sicuramente è in parte dovuta alla naturale differenza biologica fra individui (98), per cui non esistono due individui con la stessa identica struttura microscopica. Il set up sperimentale rappresenta un'altra potenziale fonte di variabilità perché le condizioni di test possono non essere sempre perfettamente identiche. Anche la precisione con cui viene montato il campione all'interno degli afferraggi influisce sull'affidabilità dei risultati ottenuti, per questo è fondamentale fare ricorso a procedure e metodi il più possibile standardizzati. Questa variabilità richiede una particolare attenzione nella progettazione sperimentale e nell'interpretazione dei risultati, nonché l'adozione di misure statistiche robuste per effettuare le analisi statistiche.

Lo sforzo di rottura è stato calcolato per ogni campione; tuttavia, non tutti i campioni si sono rotti, perché alcuni sono scivolati. Inoltre; i valori ottenuti sono molto dispersi e per questo motivo non è stato considerato come un dato affidabile per produrre delle conclusioni.

La rottura in un tessuto biologico viscoelastico è rappresentata dalla condizione più estrema che segue un danno al tessuto. Il danneggiamento del tessuto determina un deterioramento delle proprietà del materiale con conseguente riduzione del modulo elastico e può terminare, se la sollecitazione è sufficientemente elevata, nella rottura che determina la frammentazione del tessuto (78). La rottura si verifica quando l'energia meccanica trasferita al tessuto supera quella dei legami molecolari forti del tessuto.

L'utilizzo di test di trazione è uno soltanto fra i molti metodi esistenti per caratterizzare meccanicamente un tessuto ma sicuramente costituisce il più pratico e versatile. Inoltre, sia la sclera che la cornea sono sottoposte a trazione in vivo; perciò, si tratta di una metodologia di test che riproduce in parte la sollecitazione fisiologica del tessuto.

Quando si utilizzano risultati ottenuti mediante trazione uniassiale bisogna tener conto che probabilmente le deformazioni sono maggiori di quelle che sosterebbe il tessuto con un altro metodo di test come l'insufflazione; questo per via del fatto che il tessuto non è confinato lateralmente e ciò aumenta la capacità distensiva del materiale (99).

6.1.2 Analisi Viscoelastica

Per ogni rampa di rilassamento sono stati calcolati il modulo di rilassamento, lo sforzo di equilibrio e la percentuale di rilassamento.

Nei materiali viscoelastici, il modulo di rilassamento estratto da prove a gradini di deformazione dipende sia dall'ampiezza del gradino sia dalla storia di deformazione precedente. Questo comporta che il modulo misurato a deformazioni diverse non rappresenta solamente una proprietà del materiale, ma riflette una combinazione di risposta non lineare e memoria viscoelastica (100; 101)

In particolare, in questo tipo di materiali, la risposta meccanica cambia con la deformazione. Pertanto, il modulo di rilassamento $G(t)$ varia con l'ampiezza del gradino perché al variare della deformazione vengono sollecitate strutture diverse all'interno del materiale; quindi, confrontare direttamente moduli a deformazioni diverse implica assumere, erroneamente, che la risposta sia lineare, introducendo un bias interpretativo.

Quando i gradini di deformazione sono imposti consecutivamente sullo stesso campione, la risposta a un gradino successivo è influenzata dal rilassamento e dallo stato strutturale già modificato dai gradini precedenti. Ciò può far apparire il modulo più alto o più basso rispetto a quello che si otterrebbe applicando lo stesso gradino a un campione "fresco". In altre parole, il modulo misurato non è indipendente dalla storia di deformazione. In altre parole, il modulo di rilassamento estratto da materiali con un comportamento viscoelastico rappresenta un parametro dipendente dalla deformazione e dallo stato pregresso, e non una costante materiale.

Di conseguenza, il confronto statistico tra moduli ottenuti a deformazioni diverse non ha significato come misura della variabilità intrinseca del materiale, ma riflette semplicemente la diversa risposta non lineare e la memoria viscoelastica.

È stato condotto il test di Kruskal – Wallis per indagare eventuali differenze del modulo di rilassamento nelle varie direzioni per i tre livelli di deformazione. I parametri ricavati sono elencati nella Tabella 6.4 di seguito.

Tabella 6.4: Parametri statistici ricavati confrontando i moduli di rilassamento nelle quattro direzioni anatomiche.

ε	H	$p - value$	η^2
2%	10.02	0.018	0.19
4%	9.22	0.026	0.17
6%	12.10	0.007	0.25

In tutte e tre le analisi, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa (indicate con *) tra la direzione superiore e la nasale; quest'ultima possiede valori di modulo di rilassamento statisticamente inferiori rispetto a quelli in direzione superiore. Le mediane dei moduli di rilassamento calcolate per le quattro direzioni a livelli di deformazione crescenti sono riportate in Tabella 6.5

Tabella 6.5: Mediane dei moduli di rilassamento per le quattro direzioni anatomiche.

ε	Direzione 1	Direzione 2	Direzione 3	Direzione 4
2%	1.65*	1.23	1.03	0.82*
4%	2.02*	1.04	1.064	0.72*
6%	3.28*	1.76	1.24	0.63*

A parità di deformazione, i moduli elastici nelle direzioni superiore ed inferiore sono maggiori dei moduli di rilassamento nelle altre due direzioni; ne risulta che i campioni nelle prime due direzioni resistono di più al rilassamento rispetto alle altre due.

In tutti i casi, la direzione 1 risulta la meno cedevole al rilassamento. In Figura 6.7 è illustrato un istogramma contenente, per ogni direzione anatomica, le mediane dei moduli di rilassamento.

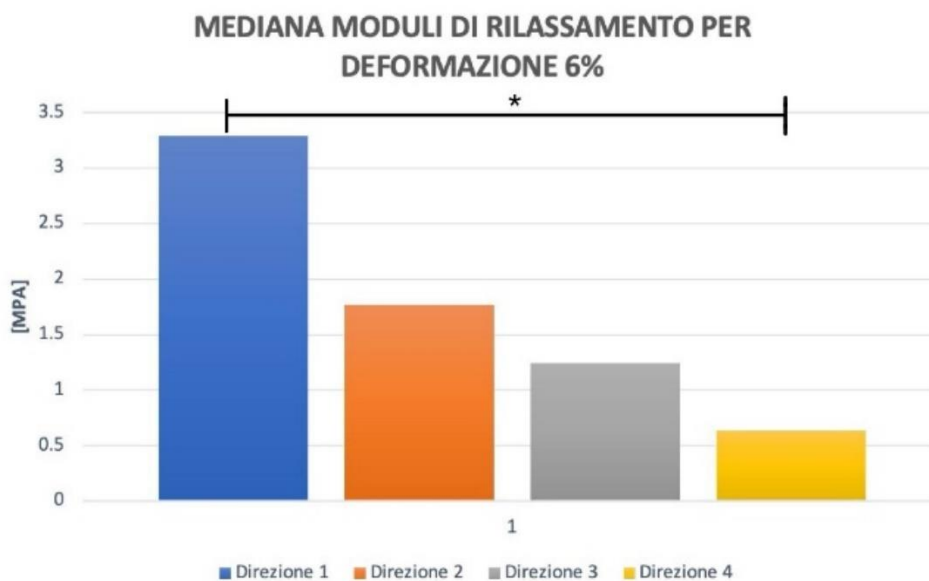


Figura 6.7: Istogramma che contiene la mediana dei moduli di rilassamento per le varie direzioni anatomiche al 6% di deformazione.

Osservando i valori in Tabella 6.5, si nota che in alcuni casi il modulo di rilassamento aumenta con la deformazione (direzione 1 e 3), mentre per i campioni in direzione 4 si verifica l'opposto. Nel primo caso si assiste ad un irrigidimento del materiale, o strain stiffening, dovuto al reclutamento di maggiori fibre di collagene per sostenere il carico. Nel caso della direzione 4 invece, si assiste ad un ammorbidimento del materiale, o

softening, che potrebbe essere causata da una riorganizzazione delle strutture interne della matrice oppure da un danno indotto dalle deformazioni consecutive. Il modulo di rilassamento valutato in un certo punto dipende dall'ampiezza della deformazione, dal tempo di rilassamento e dalla storia pregressa di deformazione.

La combinazione di questi meccanismi potrebbe spiegare perché il modulo non mostri una tendenza monotona ad aumentare con la deformazione, ma dipenda dalle condizioni sperimentali.

Successivamente è stato effettuato un confronto fra i rilassamenti percentuali calcolati separando i tre rilassamenti per indagare se la sclera rilassa della stessa quantità al variare della deformazione. Il test di Kruskal – Wallis condotto confrontando i rilassamenti percentuali calcolati ad una deformazione del 2% (gruppo 1) con quelli calcolati al 4% (gruppo 2) e al 6% (gruppo 3), ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi. In particolare, il gruppo 1 è risultato diverso sia dal gruppo 2 (indicata con *) che dal terzo (indicata con °). I parametri ricavati hanno i seguenti valori: $H = 22.58$, $p - value = 0.0000124$ ed $\eta^2 = 0.18$. Si delinea quindi una grande differenza tra le percentuali di rilassamento, le cui mediane hanno valore indicato in Tabella 6.6.

Tabella 6.6: Mediane delle percentuali di rilassamento ricavate per i tre valori di deformazione.

$R_{\%}$	<i>Mediana</i>
2%	48.4*°
4%	54.3*
6%	59.8°

Si osserva una tendenza della sclera a rilassare maggiormente in seguito ad un aumento della deformazione imposta. Questo comportamento è in linea con le caratteristiche di un materiale viscoelastico, per cui all'aumentare della deformazione cresce lo sforzo, che viene dissipato tramite meccanismi di scorrimento all'interno della matrice acquosa extracellulare.

Risulta appropriato notare che il tessuto nella prima rampa di rilassamento non ha ancora rilassato pienamente; lo si nota dal fatto che la curva non ha raggiunto un plateau orizzontale stabile. Per ottenere un rilassamento completo del materiale sarebbe quindi necessario mantenere la deformazione per più tempo oltre ai 200sec iniziali in modo tale da permettere ai fenomeni transitori viscosi di esaurirsi completamente. La differenza che è stata ottenuta in seguito al confronto dei rilassamenti percentuali confermata in uno studio successivo aumentando la durata del primo rilassamento.

In seguito, è stata indagata un'eventuale dipendenza della percentuale di rilassamento dalle direzioni anatomiche, confrontando con il test di Kruskal – Wallis gli

$R_{\%}$ nelle varie direzioni. I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna differenza significativa per i rilassamenti al 2% mentre, per i successivi livelli di deformazione sono state rilevate (indicate con *), mostrando come il gruppo 1 (direzioe superiore) fosse diverso dal 3 (direzioe temporale) per entrambi i livelli di deformazione. Osservando i valori delle mediane riportati in Tabella 6.7, si evince che i campioni estratti in direzione temporale sono meno rigidi, rilassano maggiormente e perdono una quota parte maggiore dello sforzo di picco rispetto agli altri campioni.

Tabella 6.7: Mediane delle percentuali di rilassamento ricavate per le quattro direzioni considerate.

$R_{\%}$	<i>Superiore – 1</i>	<i>Superiore – 2</i>	<i>Temporale – 3</i>	<i>Nasale – 4</i>
4%	45.25*	57.50	59.46*	53.42
6%	48.67*	61.02	63.82*	57.86

Al 4% di deformazione è stata rilevata anche una differenza significativa tra il gruppo 1 (direzioe superiore) ed il gruppo 2 (direzioe inferiore). La direzione 2, cioè quella inferiore, sembra essere più cedevole, similmente alla direzione nasale rispetto a quella superiore che in assoluto si prospetta come la più rigida.

Considerando nel complesso i risultati ottenuti per i campioni di sclera freschi si può confermare che il tessuto è di tipo viscoelastico; infatti, lo sforzo che si sviluppa al suo interno dipende sia dalla velocità di deformazione che dall'entità di deformazione stessa. Inoltre, possiede una grande capacità di rilassamento degli sforzi, che diminuiscono anche più del 50% se viene mantenuta una piccola deformazione. Si tratta di un tessuto piuttosto cedevole, che deve accomodare variazioni di pressione interna, e come sappiamo è soggetto a carichi altamente dinamici e variabili.

Le prove di rilassamento hanno evidenziato un comportamento anisotropo della sclera, con moduli maggiori lungo i meridiani superiore e inferiore rispetto a quelli nasale e temporale. Questo risultato può essere interpretato considerando l'organizzazione delle fibre collagene, che non è omogenea lungo l'intera superficie sclerale. Nei meridiani superiore e inferiore sembrerebbe che le fibre siano più organizzate e orientate, il che si traduce in una maggiore resistenza al rilassamento dello stress e quindi in valori di modulo più elevati. Al contrario, nei meridiani nasale e temporale la disposizione delle fibre potrebbe essere più intrecciata e meno organizzata, determinando un comportamento più cedevole e una riduzione del modulo di rilassamento. Tali differenze, potrebbero derivare da una diversa sollecitazione fisiologica del tessuto nei quattro meridiani considerati. Inoltre, la maggiore rigidità dei campioni superiori ed inferiori potrebbe essere legata alle inserzioni dei muscoli superiore ed inferiore obliquo, che potrebbe aumentare la densità e l'orientamento delle fibre collagene, contribuendo alla rigidità maggiore.

I risultati da noi ottenuti contrastano rispetto a quanto osservato da Safa et al. (102) i campioni di sclera peripapillare prelevati nel quadrante nasale sono risultati più rigidi

e meno cedevoli al rilassamento rispetto a quelli prelevati dalla sclera peripapillare negli altri quadranti. Un'osservazione simile a quanto fatto negli umani, dove in corrispondenza dell'asse nasale – temporale è stata osservata una struttura collagenosa più densa.

Il fatto che vi siano differenze regionali fra i quattro quadranti della sclera è stato rilevato anche in un altro studio (103) osservando differenze nella risposta elettro – attiva del tessuto.

Le curve di trazione a diversi strain rate, pur non mostrando differenze statisticamente significative tra i meridiani, evidenziano una tendenza coerente: le mediane dei moduli elastici dei campioni superiori e inferiori risultano sistematicamente più elevate rispetto a quelle dei meridiani nasale e temporale. Questo suggerisce che, seppur la rigidità dei campioni sia relativamente uniforme tra le direzioni, l'architettura locale delle fibre collagene non sia uniforme tra i meridiani considerati.

Nel complesso, i dati confermano la natura anisotropa della sclera e suggeriscono che tali differenze nella risposta meccanica lungo le direzioni sia dovuta alla microstruttura del tessuto e alla funzione biomeccanica dello stesso.

6.2 Confronto Campioni Freschi e Congelati

I risultati ottenuti sperimentalmente testando i campioni di sclera freschi sono poi stati confrontati con quelli ottenuti testando lo stesso numero di campioni precedentemente congelati.

Poiché la risposta meccanica dei campioni freschi dipende sia dall'entità della deformazione che dalla velocità di applicazione, tutte le analisi sono state effettuate confrontando valori ottenuti a pari strain rate e a uguale livello di deformazione.

Per prima cosa è stata confrontata la risposta elastica del materiale conducendo il test di Mann – Whitney con i moduli elastici calcolati al 2% e all'8% di deformazione. Non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa tra i moduli elastici ricavati dalle curve di campioni freschi e scongelati; i due mostrano un comportamento elastico equivalente se sollecitate al medesimo strain rate.

Il test di Mann – Whitney è stato condotto anche per confrontare i moduli di rilassamento estratti dalle tre rampe di rilassamento eseguite su ogni campione.

Analogamente a quanto osservato nelle prove di trazione, anche il comportamento viscoelastico nei test di rilassamento non ha mostrato differenze statisticamente significative tra campioni freschi e scongelati. Infatti, il confronto dei moduli di rilassamento di campioni freschi e scongelati, effettuato a coppie per la stessa deformazione, non ha evidenziato variazioni rilevanti.

Infine, sono state confrontate le percentuali di rilassamento dei campioni freschi e scongelati per i tre valori di deformazione senza osservare alcuna differenza statistica.

Tuttavia, i campioni scongelati possiedono valori con mediane lievemente maggiori, indicando una capacità maggiore di rilassare lo sforzo.

Per approfondire l'analisi, sono confrontati i valori di modulo elastico e modulo di rilassamento dei soli campioni congelati, fra le direzioni anatomiche. A tal proposito si vuole osservare se il processo di congelamento preserva completamente le proprietà elastiche e viscoelastiche del tessuto, oppure se in qualche modo influisce sul comportamento meccanico.

Con lo stesso ordine seguito per i campioni freschi, verranno presentati i risultati ottenuti per i campioni scongelati.

Confrontando i moduli elastici ricavati per le curve al 2% è stato osservato una differenza statisticamente significativa tra la curva lenta e media (indicata con *) e tra la curva lenta e quella veloce (indicata con °, i parametri dell'analisi sono indicati nella Tabella 6.9). Inaspettatamente però la curva media possiede una mediana maggiore delle altre due, mostrando un comportamento anomalo perché la rigidità non aumenta costantemente all'aumentare dello strain rate.

Si verifica un effetto di stiffening (irrigidimento) passando dalla curva lenta alle successive, ma inaspettatamente la tendenza si inverte passando dalla curva media a quella veloce. Un valore di η^2 pari a 0.17 mostra che la magnitudo della differenza tra le medie è grande.

Similmente, per i moduli elastici calcolati all'8% si evidenzia una differenza significativa tra la curva lenta e media (indicata con *) e tra quella media e la veloce (indicata con °). Un valore di η^2 pari a 0.13 mostra che la magnitudo della differenza tra le medie è ridotta Tabella 6.9.

Nella Tabella 6.8 di seguito sono mostrati i valori dei moduli elastici delle curve sperimentali relative a velocità diverse.

Tabella 6.8: Moduli elastici ricavati dalle curve di trazione a velocità crescente

ε	$v = 0.01\% * L_0$	$v = 0.1\% * L_0$	$v = 1\% * L_0$
2%	0.42*°	0.22*	0.19°
8%	7.99*°	13.27*	10.32°

Osservando le mediane dei moduli elastici ricavati all'8%, si nota la stessa tendenza individuata precedentemente al 2%.

Questo comportamento non monotono suggerisce che la dipendenza della risposta meccanica dallo strain rate, tipicamente osservata nei tessuti freschi, possa risultare alterata dal processo di congelamento e successivo scongelamento.

Una possibile interpretazione è che la crioconservazione modifichi la microstruttura della sclera, alterando i meccanismi di interazione tra matrice solida e componente fluida. In particolare, a velocità intermedie si potrebbe verificare una condizione in cui

la mobilità residua del fluido extracellulare non è sufficiente a consentire un efficace rilassamento delle sollecitazioni, ma è comunque tale da generare un accoppiamento con la matrice fibrosa che massimizza la resistenza al carico. Questo porterebbe a un incremento apparente della rigidità rispetto alle condizioni di strain rate più elevate, in cui domina prevalentemente la componente fibrosa.

Tale risultato, sebbene inaspettato, è coerente con l'ipotesi che il congelamento introduca modifiche microstrutturali e di permeabilità che alterano le proprietà viscoelastiche della struttura.

Tabella 6.9: Parametri statistici ricavati confrontando le curve a velocità crescente.

ε	H	$p - value$	η^2
2%	21.64	0.00002	0.17
8%	16.78	0.00026	0.13

Successivamente, sono stati confrontati, con il test di Kruskal – Wallis, i moduli elastici estratti nelle varie direzioni senza che venissero evidenziate alcune differenze statisticamente significative, sia al 2% di deformazione che all'8% ($p - value < 0.05$ in tutti i casi). L'unica eccezione è rappresentata dal confronto dei moduli all'8% per la curva veloce; in tal caso è stata evidenziata una differenza significativa tra il gruppo 1 (direzione superiore) ed il gruppo 4 (direzione nasale), con $p - value = 0.030$, $H = 8.90$ e $\eta^2 = 0.16$ che indica una grande differenza tra i due gruppi.

Sebbene non vi siano differenze significative in termini statistici, le mediane dei moduli elastici risultano sempre maggiori per i campioni estratti in direzione superiore ed inferiore rispetto a quelli di direzione nasale e temporale. Si ritrova quindi lo stesso andamento identificato per i campioni freschi.

I moduli di rilassamento dei campioni congelati nelle varie direzioni, al 2% di deformazione, è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra le direzioni superiori – temporale (indicata con *) e superiore – nasale (indicata con °) ($p - value = 0.007$, $H = 12.2$ e $\eta^2 = 0.26$). I valori di $p - value$ e di η^2 evidenziano una differenza importante fra i campioni e valutando le mediane, risulta che la direzione 1 (superiore) è più rigida delle altre due, coerentemente con le evidenze emerse dai campioni freschi.

Tuttavia, i moduli di rilassamento al 4 ed al 6% di deformazione sono risultati statisticamente uguali fra le direzioni, seppur i campioni estratti in direzione superiore risultino più rigidi.

Di seguito, nella Tabella 6.10 sono elencate le mediane dei moduli di rilassamento per le varie direzioni.

Tabella 6.10: Mediane dei moduli di rilassamento ricavati per le quattro direzioni anatomiche.

ε	<i>Superiore – 1</i>	<i>Superiore – 2</i>	<i>Temporale – 3</i>	<i>Nasale – 4</i>
2%	1.48 ^{*°}	1.33	0.88*	0.80 [°]
4%	1.82	1.07	0.78	0.88
6%	2.76	1.72	1.50	1.47

Questa tendenza è coerente con ciò che è stato osservato per i campioni freschi.

Inoltre, sono state confrontate le percentuali di rilassamento dei campioni scongelati senza rilevare differenze statisticamente significative tra le direzioni dei campioni. In seguito, sono stati confrontati le percentuali di rilassamento rispetto alla deformazione imposta. In tal caso, è stata evidenziata una differenza significativa (indicata con *) tra il gruppo relativo alla percentuale di rilassamento al 2% e quella calcolata al 4% e fra i rilassamenti percentuali al 2% ed al 6% (indicata con °). I parametri estratti tramite il test di Kruskal -Wallis sono i seguenti: $p - value = 8.29 \cdot 10^{-9}$, $H = 37.21$ e $\eta^2 = 0.3$, indicando una grande differenza tra i gruppi. In Tabella 6.11 sono riportati i valori mediani delle percentuali di rilassamento, per ogni valore di deformazione:

Tabella 6.11: Mediane delle percentuali di rilassamento per i tre livelli di deformazione.

$R_{\%}$	<i>Mediana</i>
2%	50.45 ^{*°}
4%	57.08*
6%	59.66 ^à

Coerentemente con quanto osservato per i campioni freschi, si assiste ad un aumento del rilassamento percentuale all'aumentare della deformazione.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può affermare che la sclera mantiene sostanzialmente le proprie caratteristiche meccaniche anche dopo un processo di congelamento. Il confronto tra campioni freschi e congelati non ha evidenziato differenze statisticamente significative, e molte delle evidenze riscontrate nei campioni freschi sono state confermate anche nei congelati. Nelle prove sui campioni scongelati sono tuttavia emersi alcuni risultati controintuitivi, che potrebbero essere spiegati sia con considerazioni di natura biologica e fisica, sia come effetto della variabilità sperimentale o di potenziali artefatti.

Sebbene a livello statistico il macrogruppo dei campioni scongelati si comporti in maniera analoga a quello dei freschi, alcune discrepanze sono comunque presenti; queste differenze potrebbero riflettere la formazione di microdanni tissutali dovuti alla formazione e fusione dei cristalli di ghiaccio, alla comparsa di microfratture nelle fibre di collagene, o ad alterazioni nell'idratazione della matrice extracellulare. In

accordo con quanto riportato in precedenti studi (104; 105), i dati confermano che la crioconservazione non modifica in maniera rilevante il comportamento meccanico della sclera.

Tali differenze sono da tenere in considerazione in fase di analisi per evitare di giungere a conclusioni fuorvianti. In linea di massima il congelamento dei campioni di presenta come un'ottima alternativa all'utilizzo di campioni freschi qual ora non fossero disponibili.

6.3 Analisi Modelli Viscoelastici

Le rampe di rilassamento acquisite sperimentalmente sono state utilizzate per eseguire procedure di fitting mediante modelli viscoelastici, sia classici che frazionali. Ai fini della modellazione sono stati considerati esclusivamente i tratti di rilassamento, tralasciando la fase di applicazione del gradino di deformazione, e ciascun rilassamento è stato analizzato singolarmente.

I risultati ottenuti riguardano quindi in maniera specifica le proprietà di rilassamento della sclera fresca, senza fornire una descrizione globale del suo comportamento meccanico. In particolare, per ogni curva sperimentale sono stati modellati i tre rilassamenti, ottenendo di conseguenza tre curve distinte.

I valori di sforzo sono stati ulteriormente filtrati in Julia, adottando un'ampiezza della finestra di filtraggio diversa a seconda della durata del rilassamento, come già indicato in precedenza. Questa procedura si è rivelata essenziale per garantire che la curva filtrata seguisse fedelmente l'andamento sperimentale. A conferma di ciò, si può osservare come controesempio l'andamento di una curva relativa al terzo rilassamento in Figura 6.8: la curva filtrata (blu) non segue bene la curva dei dati sperimentali (nera) perché è stata scelta una finestra per il filtraggio di 301 punti anziché 101 (valore ottimale per la terza rampa).

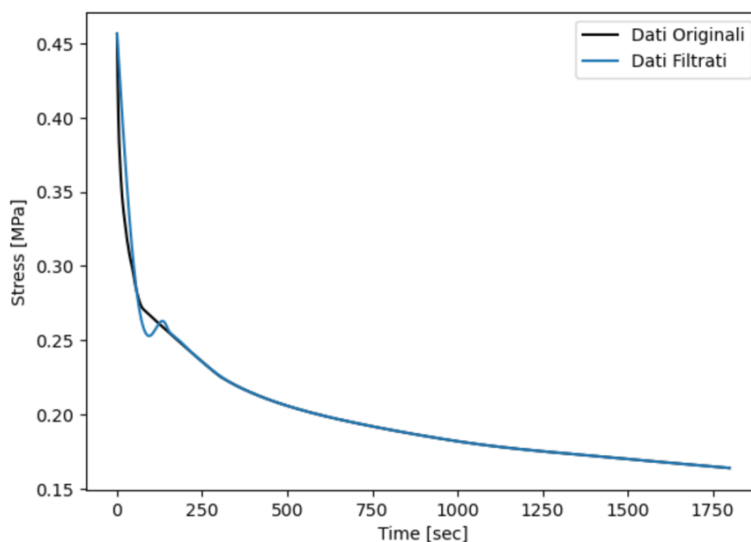


Figura 6.8: Esempio di una curva del terzo rilassamento filtrata con una finestra errata.

Nei grafici che seguono (Figura 6.9, Figura 6.10, Figura 6.11) sono riportati gli andamenti dei tre modelli utilizzati, ciascuno calibrato per rappresentare il comportamento della prova analizzata.

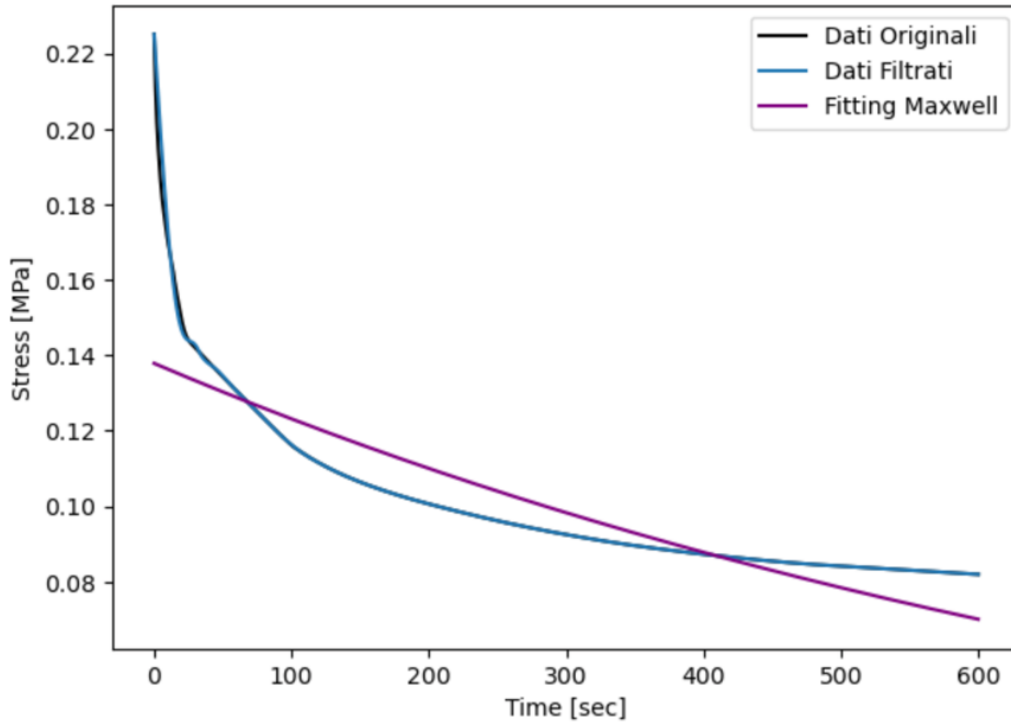


Figura 6.9: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello di Maxwell.

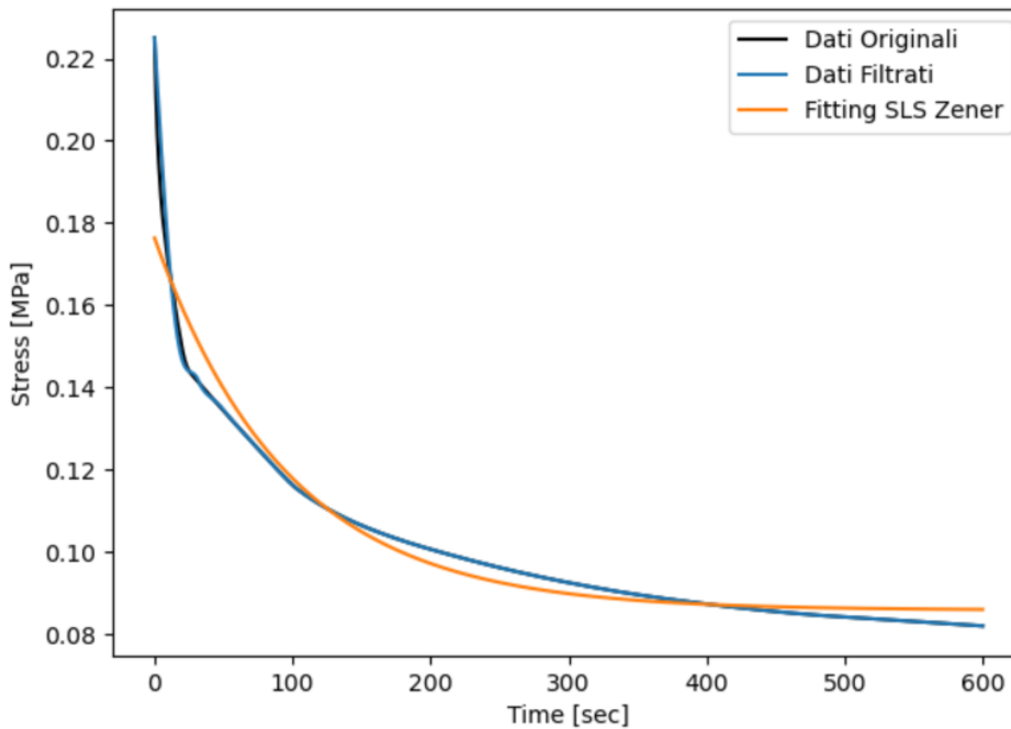


Figura 6.10: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello SLS Zener.

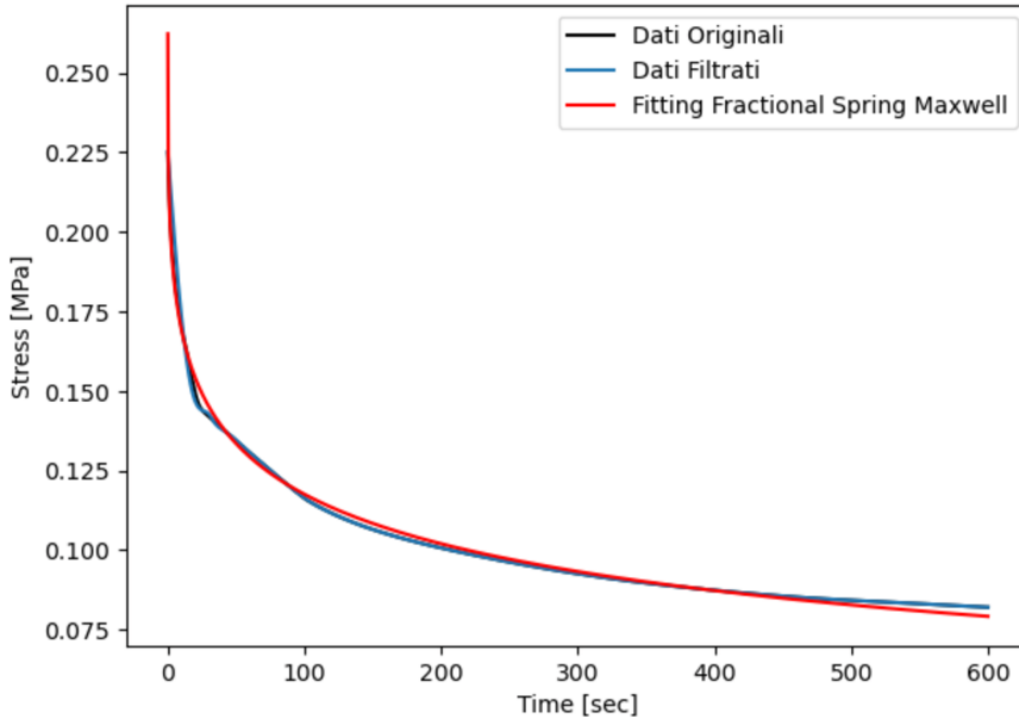


Figura 6.11: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello di Maxwell frazionale.

Da un'analisi qualitativa delle curve emerge come nessuno dei tre modelli riesca a descrivere in maniera perfetta i dati sperimentali; tale discrepanza è stata successivamente confermata dall'analisi quantitativa degli errori associati a ciascun fitting.

La bontà dei modelli è stata valutata attraverso l'analisi dell'errore relativo percentuale (MAPE) che, essendo normalizzato rispetto al dato originale, consente un confronto diretto e coerente tra modelli diversi.

Rispetto ad un modello specifico, per ciascun rilassamento, gli errori MAPE sono stati mediati in modo da ricavare un unico valore rappresentativo della bontà del fitting relativo al modello in questione, rispetto al rilassamento analizzato. Nella Tabella 6.12 seguente sono riportate le medie degli errori MAPE calcolate per i tre modelli in corrispondenza di ciascun rilassamento.

Tabella 6.12: Medie degli errori MAPE calcolati per i tre modelli in corrispondenza di ciascun rilassamento.

ε	Maxwell	SLS Zener	Maxwell Frazionale
2%	4.30	1.40	1.13
4%	5.17	1.98	1.32
6%	4.74	2.20	1.10

Dal confronto degli errori risulta evidente che il modello di tipo frazionale fornisce la rappresentazione più accurata dei dati sperimentali. Di conseguenza sono stati riportati solo i parametri costitutivi del modello di Maxwell frazionale (Tabella 6.13); questi, sono stati ottenuti, separando i tre rilassamenti, mediando i valori ricavati dalle diverse prove. Tale procedura è stata adottata poiché il modello non rileva una differenza statisticamente significativa nei parametri, se vengono modellati campioni “superiori” o “nasali”; cioè non rileva differenze tra le direzioni.

Tabella 6.13: Parametri costitutivi del modello di Maxwell frazionale.

ε	C_a	a	k
2%	2.00 ± 2.03	0.27 ± 0.10	0.58 ± 0.68
4%	2.22 ± 1.80	0.27 ± 0.08	0.67 ± 0.82
6%	2.60 ± 2.44	0.26 ± 0.09	0.73 ± 0.96

Successivamente, è stato confrontato il modulo di rilassamento, estratto per i tre livelli di deformazione, con quello calcolato dalle curve sperimentali. I risultati sono elencati nella Tabella 6.14 di seguito per facilitare il confronto:

Tabella 6.14: Modulo di rilassamento sperimentale e predetto dal modello frazionale a confronto.

ε	Curva sperimentale	Maxwell Frazionale
2%	1.79	0.35
4%	1.58	0.34
6%	2.32	0.37

I valori del modulo di rilassamento estratti dal modello risultano molto inferiori rispetto a quelli ottenuti dalle prove sperimentali. Nonostante l’errore del modello di Maxwell frazionale sia relativamente contenuto (circa l’1%), esso non rappresenta in modo affidabile il comportamento reale, di rilassamento, del campione di sclera. Un modulo di rilassamento basso indica, infatti, un materiale più cedevole, che oppone minore resistenza alla deformazione imposta.

Osservando le curve corrispondenti ai tre rilassamenti (Figura 6.12, Figura 6.13, Figura 6.14), si nota come la curva predetta dal modello (rossa) presenti una pendenza maggiore verso la fine del rilassamento, suggerendo che il modello tende a rilassare più rapidamente del tessuto reale.

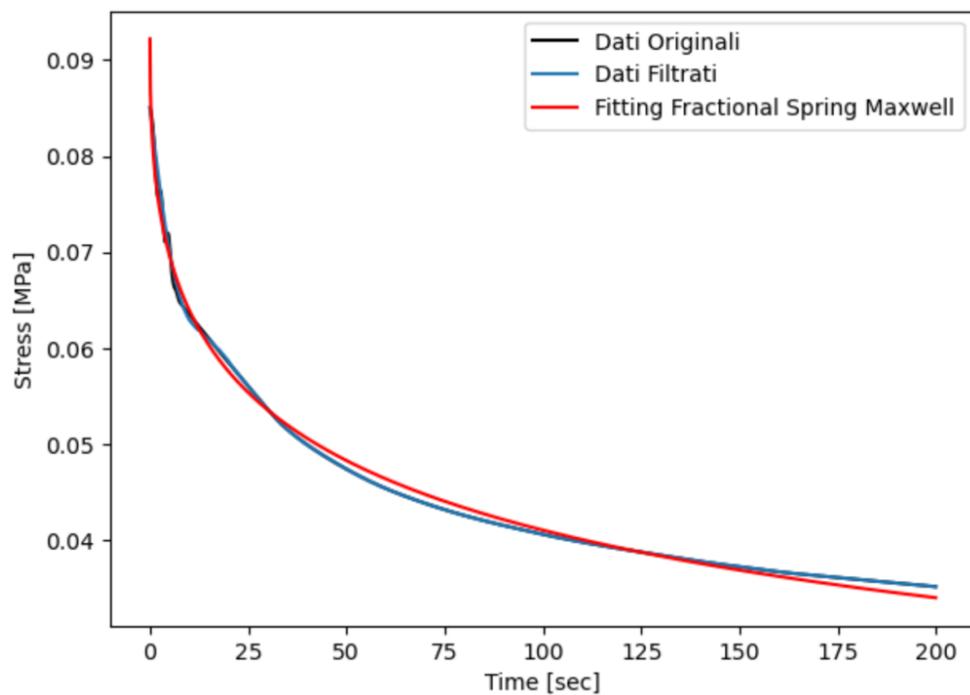


Figura 6.12: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 2%.

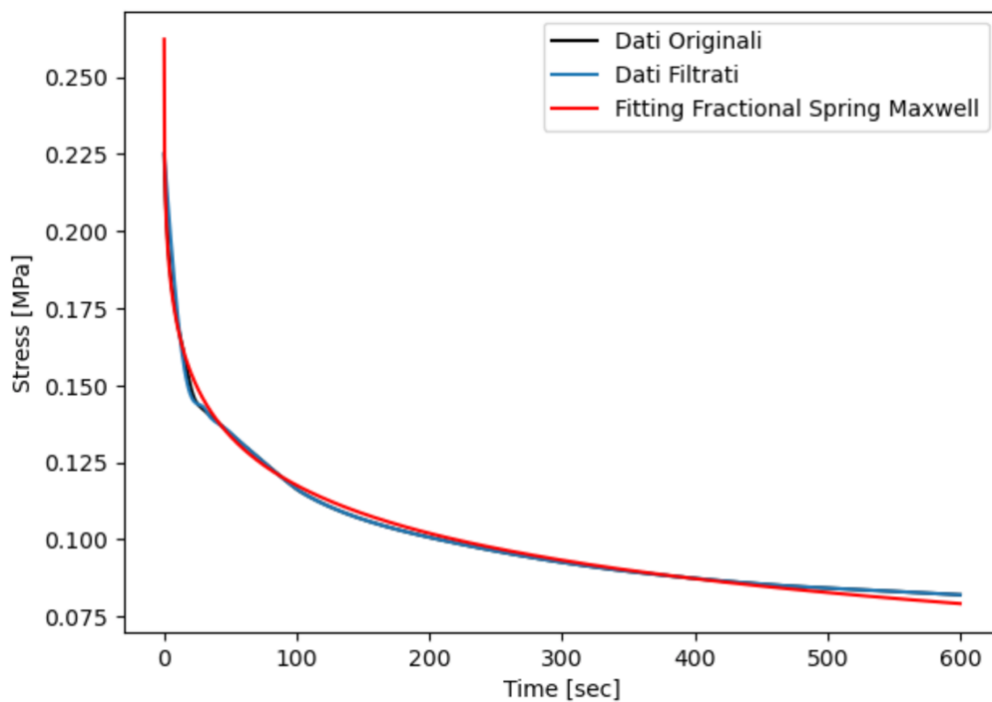


Figura 6.13: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 4%.

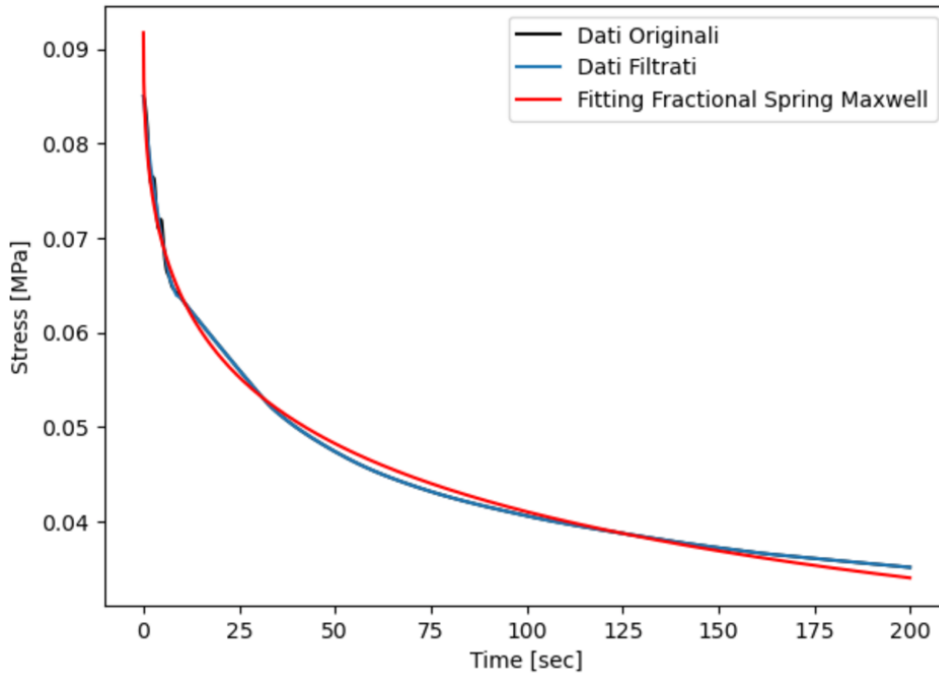


Figura 6.14: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 6%.

È opportuno considerare inoltre che, durante i test sperimentali, la sclera probabilmente non ha raggiunto un completo rilassamento, fenomeno particolarmente evidente nel primo rilassamento. Di conseguenza, il modulo di rilassamento reale di un campione completamente rilassato potrebbe essere inferiore rispetto ai valori riportati.

A supporto di questa osservazione, il modulo di rilassamento del primo rilassamento può essere confrontato con la media dei moduli elastici al 2% estratti dalla curva lenta, pari a $E_{2\%} = 0.73$. La curva lenta, condotta a una velocità molto ridotta ($0.01\% \cdot L_0$), rappresenta una prova quasi statica. Pertanto, se il campione fosse stato completamente rilassato, il modulo di rilassamento sarebbe stato verosimilmente più vicino a $E_{2\%}$, o addirittura inferiore, considerando che quest'ultimo valore è stato ricavato da una prova condotta con un movimento seppur minimo, mentre il rilassamento completo delle tensioni si verifica in condizioni di totale staticità.

In conclusione, il modello di Maxwell frazionale risulta il più rappresentativo tra quelli testati, sebbene non fornisca una descrizione ottimale dei dati sperimentali.

Esistono vari studi in letteratura che hanno utilizzato modelli viscoelastici classici e frazionali per modellare il comportamento dei tessuti biologici viscoelastici (106; 107). In contrasto rispetto a quanto affermato da Che – Yu Lin (108) il modello SLS non coglie con accuratezza il comportamento del tessuto sclerale.

6.4 Prove in Parallelo

I campioni di cornea ricavati per queste analisi sono stati estratti dalla medesima porzione, in tutti i bulbi.

Per via della sostanziale uguaglianza delle proprietà meccaniche lungo il meridiano orizzontale, i campioni di sclera sono stati estratti senza verificare che provenissero dal lato nasale o temporale.

Sottoponendo i campioni di cornea a test di trazione è stato osservato il caratteristico comportamento dei tessuti soffici, ovvero uno strain – stiffening del campione. Il modulo elastico aumenta in modo più che lineare all'aumentare della deformazione, come per la sclera (Figura 6.15). Inoltre, è stata osservata, analogamente a quanto rilevato per la sclera, una dipendenza del modulo elastico dallo strain rate. All'aumentare della velocità di carico, la media dei moduli elastici ricavati all'8% di deformazione aumenta, come riportato in Tabella 6.15.

Tabella 6.15: Media dei moduli elastici della cornea all'8% di deformazione.

ε	$v_1 = 0.0001 * L_0$	$v_2 = 0.001 * L_0$	$v_3 = 0.01 * L_0$
8%	$1.27 \pm 1.53 \text{ MPa}$	$1.59 \pm 0.82 \text{ MPa}$	$1.85 \pm 1 \text{ MPa}$

Confrontando i moduli elastici ricavati per le tre diverse velocità mediante il test di Kruskal Wallis, non è stata individuata alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi ($p - value = 0.72$). I campioni di cornea, sebbene possiedano valori di modulo di Young crescenti all'aumentare dello strain rate, non mostrano un comportamento significativamente diverso fra i gruppi.

È importante tenere in considerazione il ridotto numero di campioni su cui è stata effettuata l'analisi, che potrebbe aver influito sulla statistica. Inoltre, aver utilizzato una macchina di prova ed un set up sperimentale diversi potrebbe aver introdotto degli artefatti sperimentali non trascurabili. Oltretutto, bisogna considerare che lo sforzo sviluppatosi nei campioni di cornea è risultato molto ridotto e questo potrebbe indicare una maggiore sensibilità della cella di carico ad oscillazioni casuali.

A tal proposito, si può osservare la Figura 6.15, contenente delle curve di sforzo – deformazione della cornea, per velocità di carico crescenti. La curva lenta mostra un andamento molto più oscillante rispetto alle altre due che appaiono comunque molto irregolari; un andamento di questo tipo potrebbe indicare una maggiore sensibilità della cella di carico ma potrebbe essere frutto di movimenti casuali del campione all'inizio della rampa.

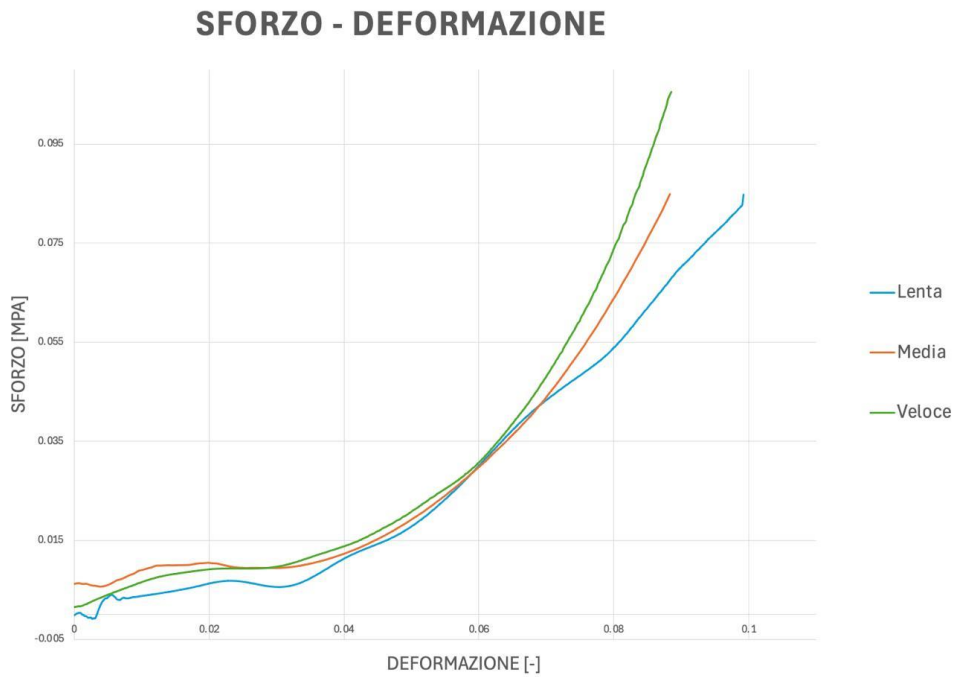


Figura 6.15: Curve di sforzo – deformazione a strain rate crescenti, per la cornea.

I test di rilassamento effettuati sulla cornea hanno evidenziato un evidente comportamento viscoelastico con una grande capacità di rilassamento.

In Figura 6.16 è mostrato come esempio una curva di sforzo – deformazione ricavata per i tre gradini di deformazione imposti e le relative rampe di rilassamento.

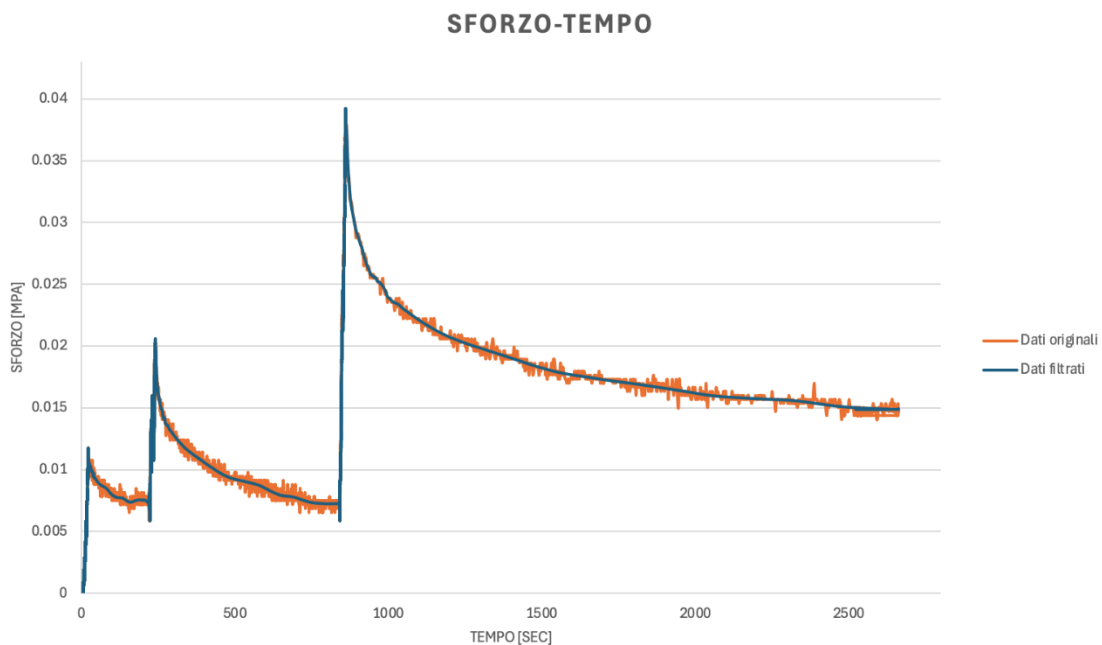


Figura 6.16: Curva di sforzo – deformazione per rampe di rilassamento eseguite su cornea.

Nella Tabella 6.16 di seguito, sono riportate le medie dei moduli di rilassamento estratti al termine delle tre rampe.

Tabella 6.16: Media dei moduli di rilassamento della cornea.

ε	G
2%	$0.49 \pm 0.27 MPa$
4%	$0.52 \pm 0.64 MPa$
6%	$0.9 \pm 1 MPa$

Analogamente a quanto osservato per la sclera, anche la cornea possiede moduli di rilassamento crescenti all'aumentare della deformazione.

Il comportamento della sclera è risultato compatibile con quanto osservato nelle analisi precedentemente effettuate; tuttavia, i valori di modulo elastico e modulo di rilassamento sono risultati maggiori di quelli ricavati dalle analisi pregresse. Questa discrepanza, potrebbe essere dovuta alla dimensione maggiore del campione sclerale utilizzato per queste analisi; infatti, come già accennato, le proprietà meccaniche dei tessuti biologici soffici sono particolarmente sensibili alla dimensione e alla geometria del provino testato.

Di seguito, in Il modulo elastico ha mostrato un aumento rispetto alla velocità di carico a parità di deformazione, ed il modulo di rilassamento ha mostrato un aumento all'aumentare della deformazione.

Tabella 6.17 e Tabella 6.18 sono elencati i valori di modulo elastico e modulo di rilassamento estratti.

Il modulo elastico ha mostrato un aumento rispetto alla velocità di carico a parità di deformazione, ed il modulo di rilassamento ha mostrato un aumento all'aumentare della deformazione.

Tabella 6.17: Media dei moduli di rilassamento della sclera.

ε	G
2%	$4.01 \pm 0.97 MPa$
4%	$5.63 \pm 1.91 MPa$
6%	$8.77 \pm 3.41 MPa$

Tabella 6.18: Media dei moduli elastici della sclera.

ε	$v_1 = 0.0001 * L_0$	$v_2 = 0.001 * L_0$	$v_3 = 0.01 * L_0$
8%	$29.43 \pm 9.5 MPa$	$43.3 \pm 12.7 MPa$	$54.5 \pm 15.7 MPa$

Sebbene i valori di modulo elastico e modulo di rilassamento siano risultati molto diversi fra cornea e sclera, le percentuali di rilassamento dei due tessuti hanno mostrato tendenze e ordini di grandezza comuni. In Tabella 6.19 sono riportati i valori delle medie dei moduli di rilassamento di cornea e sclera.

Tabella 6.19: Medie dei rilassamenti percentuali di cornea e sclera.

ϵ	<i>R% Cornea</i>	<i>R% Sclera</i>
2%	30.3 ± 9.88 MPa	36.57 ± 16 MPa
4%	40.7 ± 7.56 MPa	41.53 ± 18 MPa
6%	41.9 ± 8.7 MPa	43.95 ± 18.96 MPa

Si osserva, per entrambi i tessuti un aumento del rilassamento percentuale rispetto alla deformazione coerentemente a quanto ci si sarebbe aspettati; tale andamento è maggiormente apprezzabile osservando la Figura 6.17 contenente l'istogramma dei valori sopra riportati.

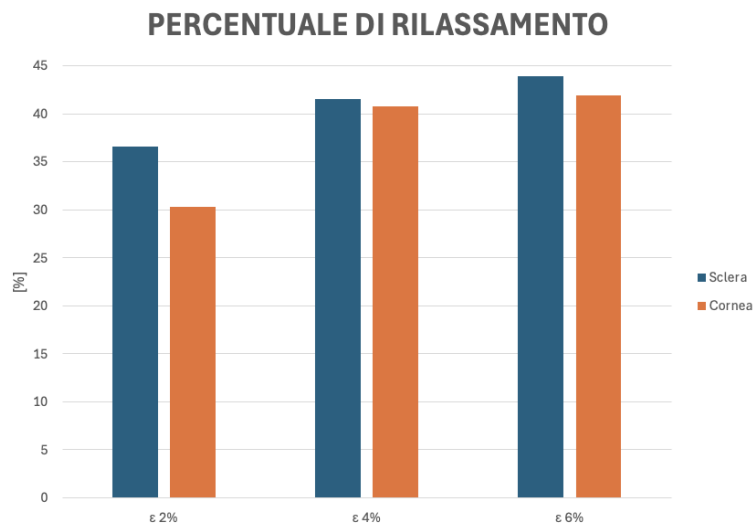


Figura 6.17: Iistogramma con le percentuali di rilassamento di cornea e sclera.

Sebbene anche per la sclera siano stati ottenuti risultati molto variabili, la cornea ha mostrato curve molto più irregolari e oscillanti complicando l'estrazione dei parametri di interesse per la correlazione.

Successivamente, i valori di modulo elastico di cornea e sclera, estratti dalle prove di trazione all'8%, sono stati confrontati mediante il test di Kendall ottenendo risultati contrastanti.

In tutte le prove, i valori della sclera corrispondono alla variabile X indipendente, mentre i valori relativi alla cornea, alla Y. Perciò, parlando di correlazione positiva si intende che all'aumentare del parametro corrispondente alla sclera, aumenta anche quello relativo alla cornea. Per correlazione negativa, invece, si intende che all'aumentare dei parametri relativi alla sclera, quelli relativi alla cornea diminuiscono.

Infatti, per la velocità lenta non è stata individuata alcuna correlazione ($\tau = 0$), per la velocità media è stata rilevata una correlazione positiva ($\tau = 0.33$), mentre per la velocità di carico maggiore è stata ottenuta una correlazione negativa ($\tau = -0.39$).

Anche confrontando i moduli di rilassamento ai diversi valori di deformazione non è stato rilevato un andamento di τ coerente fra le prove. Per il primo rilassamento, al 2% di deformazione, il coefficiente di correlazione è risultato pari $\tau = -0.15$ indicando una correlazione negativa debole fra i moduli di rilassamento di cornea e sclera. Ciò significa che all'aumentare del modulo di rilassamento della sclera, quello della cornea diminuisce. Al secondo rilassamento è stata osservata una correlazione positiva evidente, con $\tau = 0.44$, mentre al terzo rilassamento la correlazione è risultata positiva debole ($\tau = 0.055$).

Una variabilità così elevata nei dati è stata molto probabilmente causata dalle condizioni sperimentali con cui è stata testata la cornea; questa, infatti, è stata testata tramite un set up con dimensioni molto maggiori rispetto a quelle del campione; sia in termini di afferraggio che rispetto alla camera di idratazione.

I campioni di sclera sono stati prelevati senza specificare che fossero di provenienza nasale o temporale dato il fatto che, nelle analisi relative ai campioni freschi, queste due direzioni non hanno mostrato differenze significative nel comportamento meccanico.

7 Capitolo 7: Conclusioni e Sviluppi Futuri

Nel presente lavoro di tesi è stata effettuata una caratterizzazione sperimentale della sclera porcina volta a dare un quadro generale del comportamento meccanico e viscoelastico della stessa. A tal proposito sono stati eseguiti test meccanici di trazione e test di rilassamento seguiti da modellazioni viscoelastiche; queste ultime sono state effettuate con l'obiettivo di identificare un modello reologico in grado di rappresentare il comportamento sclerale, al fine di migliorarne la comprensione e fornire un possibile strumento per analisi numeriche. Inoltre, è stata effettuata un'analisi per confrontare se il metodo di conservazione dei campioni mediante congelamento determinasse una modifica sostanziale delle proprietà del tessuto. In ultimo, sono state eseguite delle analisi in parallelo per indagare se fosse presente una correlazione tra tessuto sclerale e corneale estratti dallo stesso animale.

L'analisi dei campioni freschi ha confermato il comportamento viscoelastico della sclera, che risulta particolarmente evidente. Le proprietà meccaniche di questo tessuto dipendono in modo marcato sia dalla velocità di deformazione sia dall'entità della deformazione applicata. Inoltre, esso mostra un chiaro fenomeno di rilassamento dello stress in seguito all'applicazione di una deformazione costante, comportamento tipico dei materiali viscoelastici.

Dallo studio di campioni freschi emerge una differenza delle proprietà meccaniche lungo le direzioni superiore – inferiore e nasale – temporale, probabilmente dovuta a una diversa architettura delle strutture interne. È plausibile che la maggiore rigidità e la resistenza al rilassamento osservate lungo il meridiano verticale derivino da una maggiore densità e/o da un maggiore allineamento delle lamelle di collagene. Pur ammettendo la possibilità di artefatti sperimentali, la sistematicità dei risultati ottenuti in tutte le 40 prove rende improbabile che tali differenze siano casuali.

Sebbene la motivazione per cui tali direzioni risultino più rigide sia da chiarire, è ragionevole ipotizzare che tali direzioni siano più sollecitate meccanicamente in vivo. Un ruolo potrebbe essere giocato dalle inserzioni muscolari, che sono doppie per ciascuna zona rispetto ai quadranti laterali, in cui si inseriscono solamente un muscolo per lato.

Risulterebbe pertanto interessante indagare ulteriormente la dipendenza delle proprietà meccaniche della sclera rispetto alla posizione considerata.

Il congelamento si è dimostrato una tecnica efficace per preservare le proprietà del tessuto, sebbene alcune caratteristiche risultino attenuate. Infatti, non sono emerse evidenze sufficienti per individuare, con sistematicità, le stesse differenze rilevate nei campioni freschi; nonostante questo, il macrogruppo dei campioni congelati ha mostrato caratteristiche meccaniche paragonabili a quelle dei campioni freschi.

La modellazione dei tessuti viscoelastici tramite RHEOS, nonostante la qualità dei dati sperimentali non ottimale, si conferma uno strumento valido per la modellizzazione della sclera. Sono tuttavia necessari ulteriori approfondimenti per individuare il modello che meglio rappresenta le caratteristiche del tessuto reale, dal momento che esistono modelli più complessi rispetto a quelli applicati e che probabilmente risultano più appropriati per descrivere il comportamento complesso della sclera.

Poter descrivere accuratamente il comportamento di un tessuto mediante una simulazione consentirebbe un approccio più comodo e affidabile per lo studio di nuove terapie o tecniche chirurgiche, eliminando la variabilità inevitabilmente introdotta dai test sperimentali.

Il lavoro presentato in questa tesi rappresenta una prima analisi esplorativa, nella quale sono state introdotte semplificazioni metodologiche e di calcolo per agevolare lo studio. Nei test di trazione, ad esempio, sarebbe opportuno misurare la deformazione con sistemi ottici, così da quantificare anche la contrazione trasversale del campione e ottenere una stima più accurata degli sforzi. Inoltre, gli afferraggi rappresentano punti di concentrazione dello sforzo, che possono modificare la distribuzione delle tensioni e influire su resistenza e deformazione, introducendo un bias nel risultato ottenuto. Gli strumenti impiegati si sono rivelati comunque adeguati alla tipologia di tessuto analizzata, poiché fenomeni di scivolamento si sono verificati raramente.

I provini sono stati ricavati con forma rettangolare, senza restringimento nella zona centrale, come spesso si fa per ottenere una distribuzione più regolare degli sforzi. Questa scelta è stata dettata da ragioni di praticità, legate alle ridotte dimensioni dei campioni e agli strumenti disponibili. Nella maggior parte dei casi, la rottura è avvenuta nella zona centrale, con un andamento "a strappo" piuttosto che netto, tipico della rottura progressiva delle fibre.

Gli aspetti sopra citati costituiscono uno spunto per eseguire successive analisi in modo più accurato e presentare risultati più affidabili.

L'analisi effettuata riguardo il confronto tra campioni di sclera e cornea costituisce uno studio preliminare volto a indagare eventuali correlazioni tra le proprietà dei due tessuti, con l'obiettivo di spostare alcune tipologie di esame clinico, come la tonometria, dalla cornea alla sclera. Il lavoro presentato in questa tesi ha messo in evidenza alcuni aspetti critici, che potranno essere ottimizzati in ricerche future.

L'integrazione dei dati ottenuti dalle prove parallele e dalle analisi sulla sclera potrebbe favorire lo sviluppo di dispositivi diagnostici capaci di rilevare patologie

oculari, riducendo al contempo il discomfort del paziente durante l'esame. Si tratta di un'indagine di tipo preliminare ma effettuata con la prospettiva di ampliare, nel futuro, le conoscenze legate all'interdipendenza delle proprietà meccaniche di cornea e sclera.

8 Bibliografia

1. *A Global Assessment of Eye Health and Quality of Life A Systematic Review of Systematic Reviews.* **Lama Assi, Fatimah Chamseddine, Perla Ibrahim, Hadi Sabbagh, Lori Rosman, Nathan Congdon, Jennifer Evans, Jacqueline Ramke, Hannah Kuper, Matthew J. Burton, Joshua R. Ehrlich, Bonnielin K. S Swenor.** 5, s.l. : JAMA Ophthalmology, 2021 , Vol. 139.
2. *Impact of vision on generic health-related quality of life – A systematic review.* **Petri Purola, Seppo Koskinenn, Hannu Uusitalo.** 7, s.l. : Acta Ophthalmologica, 2023, Vol. 101.
3. *Morphological and Functional Changes of Corneal Nerves and Their Contribution to Peripheral and Central Sensory Abnormalities.* **Adrian Guerrero-Moreno, Christophe Baudouin, Stphane Melik Parsadaniantz, Annabelle Réaux-Le Goazigo.** s.l. : Frontiers in Cellular Neuroscience, 2020, Vol. 14.
4. *Anatomic Studies of the Miniature Swine Cornea.* **Sarag Abhari, Michael Eisenback, Henry J. Kaplan, Eric Walters, Randall S. Prather, Patrick A. Scott.** 11, s.l. : The Anatomical Record, 2018, Vol. 201.
5. *Göttingen Minipigs in Ocular Research.* **Greentree, Stephanie M. Shrader and William F.** 4, s.l. : Toxicologic Pathology, 2018, Vol. 46.
6. *Pig Models in Retinal Research and Retinal Disease.* **MA, McCall.** 4, s.l. : Cold Spring Harb Perspect Med, 2024, Vol. 14.
7. **Richard S. Snell, Michael A. Lemp.** *Clinical Anatomy of the Eye - Second Edition.* s.l. : Blackwell Science, 1998.
8. **Al Lens, Sheila Coyne Nemeth, Janice K. Ledford.** *Ocular Anatomy and Physiology - Second Edition.* s.l. : SLACK Incorporated, 2008.
9. *Human ocular anatomy.* **Barry D. Kels, MD, JD, Andrzej Grzybowski, MD, PhD, MBA, Jane M. Grant-Kels, MD.** 2, Farmington : Elsevier Inc, 2015, Vol. 33.
10. **Louis-Philippe Guérin, Gaëtan Le-Bel, Pascale Desjardins, Camille Couture, Elodie Gillard, Élodie Boisselier, Richard Bazin, Lucie Germain, and Sylvain L. Guérin.** *The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress.* *International Journal of Molecular Sciences.* 2021.

11. **Anna Manco, Alex Grippi.** Anatomia e caratteristiche meccaniche di cornea e sclera. *CARATTERIZZAZIONE BIOMECCANICA DELLA CORNEA E DELLA SCLERA, ED INFLUENZA DELLE LORO PROPRIETA' MECCANICHE NELLA TONOMETRIA.* Milano : s.n., 2010-2011.
12. **Brecken J. Blackburn, Michael W. Jenkins, Andrew M. Rollins and William J. Dupps.** *A Review of Structural and Biomechanical Changes in the Cornea in Aging, Disease, and Photochemical Crosslinking.* s.l. : Brittany Coats, The University of Utah, United States, 2019.
13. **Keith M. Meek, Craig Boote.** *The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma .* s.l. : Elsevier Ltd, 2009.
14. **Naoyuki Morishige, Yuki Takagi, Tai-ichiro Chikama, Atsushi Takahara and Teruo Nishida.** Three-Dimensional Analysis of Collagen Lamellae in the Anterior Stroma of the Human Cornea Visualized by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Febbraio 2011, Vol. 52, 2.
15. **James V. Jester, Moritz Winkler, Bryan E. Jester, Chyong Nien, Dongyul Chai, and Donald J. Brown.** *Evaluating Corneal Collagen Organization Using High Resolution Non Linear Optical (NLO) Macroscopy*.* settembre : Eye Contact Lens, 2010.
16. **Morishige, Naoyuki, et al.** Quantitative Analysis of Collagen Lamellae in the Normal and Keratoconic Human Cornea by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Dicembre 2014, Vol. 55.
17. **Muller LJ, Pels E, Vrensen GF.** *The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. .* s.l. : Br J Ophthalmol, Aprile 2001.
18. *Comparative Study of Fibrillar Collagen Arrangement in the Corneas of Primates and Other Mammals.* **SALLY HAYES, CRAIG BOOTE, JENNIFER LEWIS, JACK SHEPPARD, MOHAMMAD ABAHUSSIN, ANDREW J. QUANTOCK, CHRISTINE PURSLOW, MARCELA VOTRUBA, AND KEITH M. MEEK.** s.l. : s.l. : THE ANATOMICAL RECORD, 2007.
19. **Craig Bootea, Ian A. Sigald, Rafael Grytze, Yi Huad, Thao D. Nguyen, Michael J.A. Girard.** *Scleral structure and biomechanics.* s.l. : Elsevier Ltd, 2019.
20. **Fung, y.c.** *Biomechanics - Mechanical Properties of Living Tissues.* s.l. : Springer Science+Business Media New York, 1993.
21. **Nello Formisano, Cas van der Putten, Rhiannon Grant, Gozde Sahin, Roman K. Truckenmüller, Carlijn V. C. Bouten, Nicholas A. Kurniawan, and Stefan Giselbrecht.** *Mechanical Properties of Bioengineered Corneal Stroma.* s.l. : Wiley-VCH GmbH, 2021.
22. **Daniel G. Dawson, John L. Ubels & Henry F. Edelhauser.** *Cornea and Sclera. PHYSIOLOGY OF THE E Y E.* s.l. : Elsevier Mosby.

23. *Young's modulus in normal corneas and the effect on applanation tonometry.* **Hamilton KE, Pye DC.** 6, s.l. : Optom Vis Sci., 2008, Vol. 85.
24. *Measuring Human Corneal Stromal Biomechanical Properties Using Tensile Testing Combined With Optical Coherence Tomography.* **Yi Song, Di Wu, Min Shen, Like Wang, Congzheng Wang, Yong Cai, Chao Xue, George P.M. Cheng, Yongping Zheng and Yan Wang.** 882392, United States : Salavat Aglyamov, University of Houston, Maggio, 2022, Vol. 10.
25. *Preliminary Investigation of the Mechanical Anisotropy of the Normal Human Corneal Stroma.* **Xue C, Xiang Y, Shen M, Wu D, Wang Y.** s.l. : Journal of Ophthalmology, 2018.
26. *Depth-dependent mechanical properties of the human cornea by uniaxial extension.* **Malavika H. Nambiar, Theo G. Seiler, Sebastian Senti, Layko Liechti, Fabian Müller, Harald Studer, Abhijit S. Roy, Philippe Büchler.** s.l. : Elsevier Ltd, 2023.
27. —. **Malavika H. Nambiar, Theo G. Seiler, Sebastian Senti, Layko Liechti, Fabian Müller, Harald Studer, Abhijit S. Roy, Philippe Büchler.** s.l. : Elsevier Ltd, 2023.
28. **Sloan, S.R., Khalifa, Y.M., Buckley, M.R.** The location- and depth-dependent mechanical response of the human cornea under shear loading. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2014, Vol. 55.
29. *Depth-Dependent Transverse Shear Properties of the Human Corneal Stroma.* **Petsche, Steven J., et al.** s.l. : Investigative Ophthalmology & Visual Science February, 2012, Vol. 53.
30. *Multiscale Investigation of the Depth-Dependent Mechanical Anisotropy of the Human Corneal Stroma.* **Labate, Cristina, et al.** s.l. : Investigative Ophthalmology & Visual Science , 2015, Vol. 56.
31. *Depth-dependent Cohesive Tensile Strength in Human Donor Corneas: Implications for Refractive Surgery.* **Randleman JB, Dawson DG, Grossniklaus HE, McCarey BE, Edelhauser HF.** s.l. : Journal of Refractive Surgery., 2008.
32. *Anterior and posterior corneal stroma elasticity assessed using nanoindentation.* **Ziebarth, Janice Dias and Noël M.** s.l. : Elsevier Ltd, 2013.
33. **Mohammad Abahussin 1, Sally Hayes, Nathaniel E Knox Cartwright, Christina S Kamma-Lorger, Yasir Khan, John Marshall, Keith M Meek.** *3D collagen orientation study of the human cornea using X-ray diffraction and femtosecond laser technology.* s.l. : Invest Ophthalmol Vis Sci., Novembre 2009.
34. *Corneal Tissue Replacement. Principles of Tissue Engineering.* **Ruberti, J., Zieske, J., Trinkaus-Randall, V.** s.l. : R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, Elsevier/Academic Press, 2007.

35. *Experimental Assessment of Corneal Anisotropy*. **Ahmed Elsheikh, Michael Brown, Daad Alhasso, Paolo Rama, Marino Campanelli, and David Garway-Heath**. 2, s.l. : Journal of Refractive Surgery,, 2008, Vol. 24.
36. **Geraghty, B., Whitford, C., Boote, C., Akhtar, R., and Elsheikh, A.** Age- related variation in the biomechanical and structural properties of the corneo- scleral tunic,. [aut. libro] B. Derby and R. Akhtar. *Mechanical Properties of Aging Soft Tissues*. 2015.
37. *A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea*. **Yanjun Zenga, Jian Yang, Kun Huang, Zhihui Leeb, Xiuyun Leec**. Pechino : Elsevier - Journal of Biomechanics , 2001.
38. *Biomechanical properties of human and porcine corneas*. **Ahmed Elsheikh, Daad Alhasso, Paolo Rama**. s.l. : Elsevier - Experimental Eye Research , 2008, Vol. 86.
39. *Material properties and effect of preconditioning of human sclera, optic nerve, and optic nerve sheath*. **Joseph Park, Andrew Shin, Somaye Jafari, Joseph L. Demer**. s.l. : Biomechanics and Modeling in Mechanobiology , 2021, Vol. 20.
40. **Kinon Chen, Adrian P. Rowley, James D. Weiland, Mark S. Humayun**. Elastic properties of human posterior eye. *J Biomed Mater Res Part*. 2014, 102A, p. 2001-2007.
41. *Nonlinear material properties of intact cornea and sclera*. **Woo SL, Kobayashi AS, Schlegel WA, Lawrence C**. 1, s.l. : Exp Eye Res, 1972, Vol. 14, p. 29-39.
42. *Age-related variations in the biomechanical properties of human sclera*. **Brendan Geraghty, Stephen W. Jones, Paolo Rama Riaz Akhtar, Ahmed Elsheikh**. 16, s.l. : journal of the mechanical behavior of biomedical materials , 2012.
43. *Linear viscoelasticity of human sclera and posterior ocular tissues during tensile creep*. **Dooseop Song, Seongjin Lima, Joseph Park, Joseph L. Demer**. s.l. : Journal of Biomechanics - Elsevier, 2023.
44. *Biomechanics of the Human Posterior Sclera: Age- and Glaucoma-Related Changes Measured Using Inflation Testing*. **Baptiste Coudrillier, Jing Tian, Stephen Alexander, Kristin M. Myers, Harry A. Quigley, and Thao D. Nguyen**. 4, s.l. : Investigative Ophthalmology & Visual Science,, 2012, Vol. 53.
45. *Dynamic material properties of the human sclera*. **Jill A. Bisplinghoff, Craig McNally, Sarah J. Manoogian, Stefan M. Duma**. s.l. : Journal of Biomechanics - Elsevier, 2009.
46. *The Porcine Eye as a Surrogate Model for the Human Eye: Anatomical and Mechanical Relationships*. **S. M. Duma, E D. Power, J D. Stitzel, M. V Jernigan .I. P. Herring, R. B. Duncan, J P. Pickett, C. R. Bass**. s.l. : s.l. : INJURY SCIENCE RESEARCH - Proceedings of the Teenty-Eighth International Workshop.
47. *The parameters of the porcine eyeball*. **ernandez-Bueno, Irene Sanchez & Raul Martin & Fernando Ussa & Ivan**. s.l. : Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2011.

48. *Porcine Sclera: Thickness and Surface Area*. **Timothy W. Olsen, Scott Sanderson, Xiao Feng, and William C. Hubbard**. s.l. : Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012, Vol. 43.
49. *Middleton Sheldon. Ophthalmology, Porcine*. Acorn House Veterinary Surgery, Linnet Way, Brickhill, Bedford, MK41 7HN, UK : Vet Clin Food Anim - Elsevier Inc, 2010.
50. *Mechanical anisotropy of porcine cornea and correlation with stromal microstructure*. **Ahmed Elsheikh, Daad Alhasso**. s.l. : Experimental Eye Research, 2009, Vol. 88.
51. *Biomechanical properties of porcine cornea; planar biaxial tests versus uniaxial tensile tests*. **Hamed Hatami-Marbini, Md Esharuzzaman Emu**. s.l. : Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2025.
52. *Effect of Hydration on Viscoelastic Tensile Properties of Sclera*. **Hatami-Marbini, Hamed**. s.l. : Vision, 2025, Vol. 9.
53. *Anatomy and Physiology of the Eye - Third Edition*. **AK Khurana, Indu Khurana**. s.l. : CBS Publishers & Distributors Pvt Ltd.
54. *Tensile viscoelastic properties of the sclera after glycosaminoglycan depletion*. **Hamed Hatami-Marbini, Mohammad Pachenari**. 9, s.l. : Curr Eye Res., 2021, Vol. 46.
55. *Regional Differences in the Glycosaminoglycan Role in Porcine Scleral Hydration and Mechanical Behavior*. **Hatami-Marbini, Mohammad Pachenari and Hamed**. 3, s.l. : Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, Vol. 62.
56. *Biaxial Estimation of Biomechanical Constitutive Parameters of Passive Porcine Sclera Soft Tissue*. **Zwelihle Ndlovu, Dawood Desai, Thanyani Pandelani, Harry Ngwangwa and Fulufhelo Nemavhola**. s.l. : Applied Bionics and Biomechanics, 2022.
57. *Measurement of equatorial sclera mechanical anisotropy of using acoustic radiation force optical coherence elastography*. **Fengyi Zhang, Yan Li, Yirui Zhu, Runze Li, Susannah Waxman, Qifa Zhou, Ian A. Sinal, and Zhongping Chen**. s.l. : Proc. SPIE 11655, Label-free Biomedical Imaging and Sensing (LBIS), 2021.
58. *Biaxial mechanical testing of posterior sclera using high-resolution ultrasound speckle tracking for strain measurements*. **Benjamin Cruz Perez, Junhua Tang, Hugh J. Morris, Joel R. Palko, Xueliang Pan, Richard T. Hart, Jun Liu**. s.l. : Journal of Biomechanics, 2014.
59. *Drained secant modulus for human and porcine peripapillary sclera using unconfined compression testing*. **Ariane M. Mortazavia, Bruce R. Simona, W. Daniel Stamer, Jonathan P. Vande Geest**. s.l. : Experimental Eye Research, 2009, Vol. 89.
60. *A biphasic approach for characterizing tensile, compressive and hydraulic properties of the sclera*. **Brown DM, Pardue MT, Ethier CR**. s.l. : J. R. Soc. Interface, 2021, Vol. 18.

61. *Glaucoma: now and beyond*. **Hari Jayaram, Miriam Kolko, David S Friedman, Gus Gazzard**. s.l. : Seminar, 2023, Vol. 402.
62. *The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma*. **Robert N. Weinreb, Tin Aung, and Felipe A. Medeiros**. s.l. : JAMA, 2014.
63. **Jun Liu, Keyton .L Clayson, Elias R. Pavlatos**. The dynamic response of the corneoscleral shell. *Biomechanics of the Eye*. s.l. : C.J. Roberts. W.J. Dupos a n d J.C_ Downs , 2018, p. 377-382.
64. *Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an in dependent risk ractor in patients with glaucoma*. **Asrani S, Zeimer R, Wilensky ,J Gieser D, Vitale S, Lindenmuth K**. s.l. : J Glaucoma, 2000.
65. *How to Measure Intraocular Pressure: An Updated Review of Various Tonometers*. **Brusini, P., Salvetat, M.L. e Zeppieri, M**. s.l. : J. Clin. Med., 2021, Vol. 10.
66. *Myopia's global impact, by the numbers*. **Gregory Ostrow, Laura Kirkeby**. 3, s.l. : Ophthalmology Times Europe, 2025, Vol. 21.
67. *Scleral remodeling in myopia*. **Grytz, Rafael**. s.l. : Biomechanics of the Eye,, 2018.
68. *Shape of the myopic eye as seen with high-resolution magnetic resonance imaging*. **Cheng, H.M., Singh, O.S., Kwong, K.K., Xiong, J., Woods, B.T., Brady, T.J**. s.l. : Optom. Vis. Sci., 1992, Vol. 69.
69. *Bulk changes in posterior scleral col- lagen microstructure in human high myopia*. **Markov, P.P., Eliasy, A., Pijanka, J.K., Htoon, H.M., Paterson, N.G., Sorensen, T., Elsheikh, A., Girard, M.J.A., Boote, C**. s.l. : Mol. Vis., 2018, Vol. 24.
70. *Techniques for characterizing mechanical properties of soft tissues*. **Kishev Navindaran, John S. Kang, Kee Moon**. s.l. : Journal of the mechanical behavior of biomedical materials , 2023.
71. *CONTINUUM MECHANICS Elasticity, Plasticity, Viscoelasticity*. **Dill, Ellis H**. s.l. : CRC Press Taylor & Francis Group.
72. *On Mechanical Behavior and Characterization of Soft Tissues*. **Radhika Chavan, Nitin Kamble, Chetan Kuthe and Sandeep Sarnobat**. s.l. : Biomedical Engineering and Computational Biology, 2024.
73. *Biomechanics of Soft Tissue*. **Holzapfel, Gerhard A**. s.l. : Jean Lemaitre, LMT-Cachan, France, Novembre, 2000.
74. *Shape or size matters? Towards standard reporting of tensile testing parameters for human soft tissues: systematic review and finite element analysis*. **Lin AC, Pirrung F, Niestrawska JA, Ondruschka B, Pinter G, Henys P and Hammer N**. 2024, Front. Bioeng. Biotechnol.
75. *Dependence of tendon multiscale mechanics on sample gauge length is consistent with discontinuous collagen fibrils. .* **Peterson BE, Szczesny SE**. 2020, Acta Biomater.

76. **Kelly, PA.** Mechanics Lecture Notes: An introduction to Solid Mechanics. [Online] <http://homepages.engineering.auckland.ac.nz/~pkel015/SolidMechanicsBooks/index.html>.
77. *Clamping soft biologic tissues for uniaxial tensile testing: A brief survey of current methods and development of a novel clamping mechanism.* **Mingliang Jiang, Zachary T. Lawson, Veysel Erel, Sophie Pervere, Tianyi Nan, Andrew B. Robbinsa, Alan D. Feeda, Michael R. Moreno.** s.l. : Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2020.
78. *Damage Mechanics of Biological Tissues in Relation to Viscoelasticity.* **Ateshian GA, Kroupa KR, Petersen CA, Zimmerman BK, Maas SA, Weiss JA.** s.l. : J Biomech Eng, 2023, Vol. 145.
79. *A porohyperelastic finite element model of the eye: the influence of stiffness and permeability on intraocular pressure and optic nerve head biomechanics.* **Ayyalasomayajula A, Park RI, Simon BR, Vande Geest JP.** 6, s.l. : omput Methods Biomech Biomed Engin, 2016, Vol. 19.
80. *Porohyperelastic Experimental Models for Ocular Tissues in Unconfined and Confined Compression.* **B.R. Simon, II, P.H. Rigby, R.I. Park, S. Basavanhappa, J.P. Vande Geest.** 13, s.l. : Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2006, Vol. 47.
81. **ZANELLA, ALESSANDRO.** CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DI TESSUTI BIOLOGICI PER IMPIANTI CHIRURGICI. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA, DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE , s.l. : 2012-2013.
82. **Mainardi, Francesco.** *Fractional Calculus and Waves in Linear Viscoelasticity, an introduction to mathematical models.* s.l. : Imperial College Press, 2010.
83. *Application of fractional calculus to viscoelastic behaviour modelling and to the physical ageing phenomenon in glassy amorphous polymers.* **Martinez-Vega, M. Alcoutlabi and J. J.** 25, s.l. : POLYMER , 1998, Vol. 39.
84. *Characterizing the stress relaxation behavior of unidirectional prepreg through a parallel fractional-order viscoelastic model .* **Jun Liu, Zhefu Li, Guangquan Yue, Weiping Liu and Zitong Cheng.** s.l. : Materials Research Express, 2024, Vol. 11.
85. *Dynamic viscoelastic models of human skin using optical elastography.* **Steven P. Kearney, Altaf Khan¹, Zoujun Dai, and Thomas J. Royston.** 17, s.l. : Phys Med Biol, 2015, Vol. 60.
86. *A quantitative comparison of soft tissue compressive viscoelastic model accuracy.* **Wang, Xin & Schoen, Jonathan & Rentschler, Mark.** s.l. : Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2013, Vol. 20C, p. 126-136.
87. *Exploiting Viscoelastic Experimental Observations and Numerical Simulations to Infer Biomimetic Artificial Tendon Fiber Designs.* **Karathanasopoulos N, Ganghoffer JF.** 85, s.l. : Front Bioeng Biotechnol, Maggio, 2019, Vol. 7.

88. *Analyzing and modeling rheological behavior of liver fibrosis in rats using shear viscoelastic moduli.* **Zhu Y, Zheng Y, Shen YY, Chen X, Zhang XY, Lin HM, Guo YR, Wang TF, Chen SP.** 4, s.l. : J Zhejiang Univ Sci B, 2014, Vol. 15.
89. **A. Bonfanti, J. L. Kaplan, G. Charras, A. J. Kabla.** Fractional viscoelastic models for power-law materials. *RHEOS*. [Online] 2020. <https://doi.org/10.1039/D0SM00354A>.
90. *Julia: A fresh approach to numerical computing.* **Bezanson, J., Edelman, A., Karpinski, S., & Shah, V. B.** s.l. : SIAM Review, 2017.
91. JupyterLab: An extensible environment for interactive and reproducible computing. *Project Jupyter*. [Online] 2018. <https://jupyter.org>.
92. **Kaplan, J. L., Bonfanti, A., & Kabla, A.** RHEOS.jl – A Julia package for rheology data analysis. *Journal of Open Source Software*. [Online] 2020. <https://doi.org/10.21105/joss.01700>.
93. Kruskal Wallis Test Calculator. *Statistics Kingdom*. [Online] <https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>.
94. Mann Whitney U test calculator (Wilcoxon rank-sum). *Statistics Kingdom*. [Online] https://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html.
95. Shapiro-Wilk Test Calculator. *Statistics Kingdom*. [Online] <https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>.
96. Correlation Coefficient Calculator. *GIGACalculator*. [Online] https://www.gigacalculator.com/calculators/correlation-coefficient-calculator.php?utm_source=chatgpt.com.
97. *Nano-scale mechanisms explain the stiffening and strengthening of ligament tissue with increasing strain rate.* **Angelo Karunaratne, Simin Li & Anthony M. J. Bull.** s.l. : Sci Rep, 2018, Vol. 8.
98. *A mechanistic study for strain rate sensitivity of rabbit patellar tendon.* **John Clemmera, Jun Liaoa, Debbie Davi, Mark F. Horstemeyera, and Lakiesha N. Williams.** s.l. : J Biomech., 2010. 10.1016/j.jbiomech.2010.06.009.
99. *Scleral Mechanics: Comparing Whole Globe Inflation and Uniaxial Testing.* **Lari DR, Schultz DS, Wang AS, Lee OT and Stewart JM.** s.l. : Exp. Eye Res., 2012, Vol. 94.
100. *Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen networks.* **Stefan Münsterer, Louise M. Jawerthd, Beverly A. Lesliee, Jeffrey I. Weitze, Ben Fabry, and David A. Weitz,** s.l. : PNAS, 2013, Vol. 110.
101. *Nonlinear Viscoelastic Behavior of Human Knee Ligaments Subjected to Complex Loading Histories.* **J.A.W. VAN DOMMELEN, M. MINARY JOLANDAN, B.J. IVARSSON, S.A. MILLINGTON, M. RAUT, J.R. KERRIGAN, J.R. CRANDALL, and D.R. DIDUCH.** s.l. : Annals of Biomedical Engineering, 2006, Vol. 34.

102. *Assessment of the Viscoelastic Mechanical Properties of the Porcine Optic Nerve Head using Micromechanical Testing and Finite Element Modeling.* **Babak N. Safa, A. Thomas Read, and C. Ross Ethier.** s.l. : bioRxiv, 2021.
103. *Regional differences in electroactive response of the sclera.* **Hatami-Marbini H, Mehr JA.** **2**, s.l. : Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2024, Vol. 238.
104. *Effect of freezing and thawing on the biomechanical characteristics of porcine ocular tissues.* **Abass A, Eliasy A, Geraghty B, Elabd M, Hassan A, Elsheikh A.** s.l. : J Biomech, 2019. doi: 10.1016/j.jbiomech.2019.02.024.
105. *Structural Factors That Mediate Scleral Stiffness.* **Schultz DS, Lotz JC, Lee SM, Trinidad ML and Stewart JM.** **10**, s.l. : Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008, Vol. 49.
106. *Dynamic viscoelastic models of human skin using optical elastography.* **Steven P. Kearney, Altaf Khan, Zoujun Dai, and Thomas J. Royston.** **17**, s.l. : Phys Med Biol, 2015, Vol. 60.
107. *Human cornea thermo-viscoelastic behavior modelling using standard linear solid model.* **Hassan M. Ahmed, Nancy M. Salem and Walid Al-Atabany.** **250**, s.l. : BMC Ophthalmology, 2023, Vol. 23.
108. *Alternative Form of Standard Linear Solid Model for Characterizing Stress Relaxation and Creep: Including a Novel Parameter for Quantifying the Ratio of Fluids to Solids of a Viscoelastic Solid.* **Lin, Che-Yu.** **11**, s.l. : Frontiers in Materials, 2020, Vol. 7.
109. dalmar. Tabelle dimensionali. *dalmar.it.* [Online] <https://www.dalmar.it/public/pdf/guarnizioni-o-ring-scheda-tecnica.pdf>.
110. Dimensionamento di una sede O-ring. *FluidPower.it.* [Online] <https://www.fluidpower.it/it/dimensionamento-di-una-sede-o-ring/>.
111. R. Garotti e Figlio s.r.l. Dimensionamento sedi per anelli O-ring. *garotti.com.* [Online] https://www.garotti.com/wp-content/uploads/09_01_garotti_guarnizioni_dimensione_cave_sedi_anelli_o-ring.pdf.
112. C. Otto Gehrckens GmbH & Co. KG. O-RING CALCULATOR. *cog.de.* [Online] <https://www.cog.de/it/prodotti/informazioni-sugli-o-ring/o-ring-calculator>.
113. *A mechanistic study for strain rate sensitivity of rabbit patellar tendon.* **John Clemmera, Jun Liaoa, Debbie Davisa, Mark F. Horstemeyera, and Lakiesha N. Williams.** s.l. : J Biomech, 2010.

A Appendice A: Sistema di Riferimento Occhio Umano

Quando si tratta l'occhio si possono individuare direzioni principali e assi di riferimento (Figura A.1). In generale, si possono applicare i piani classici dell'anatomia (sagittale, frontale (coronale) e trasversale (orizzontale)) anche all'anatomia oculare.

Osservando il bulbo si individuano due poli: uno anteriore, in corrispondenza del vertice della cornea, e uno posteriore. Entrambi si trovano in corrispondenza dei punti di massima convessità del globo (53). I due poli si trovano lungo l'asse geometrico, o asse anatomico, che prende il nome di asse ottico nella sua porzione interna all'occhio (dalla cornea alla retina). L'asse ottico non coincide con l'asse visivo, che congiunge un oggetto fissato con lo sguardo alla fovea passando per il punto nodale (al centro del cristallino) (7).

Si identifica anche l'equatore, cioè una circonferenza sul piano frontale, equidistante dai due poli, che divide il bulbo in due emisferi.

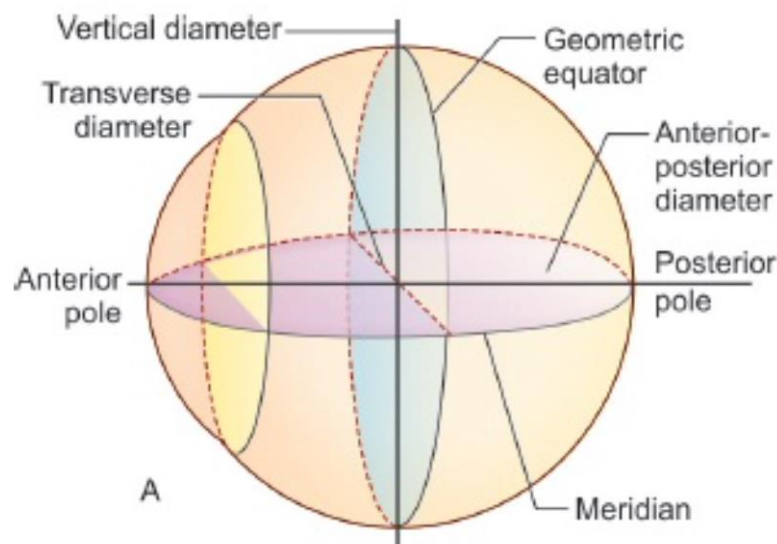


Figura A.1: Sistema di riferimento occhio umano.

Inoltre, il bulbo oculare sul piano frontale può essere idealmente suddiviso in quadrati dai meridiani, rappresentati da circonferenze passanti per l'asse ottico.

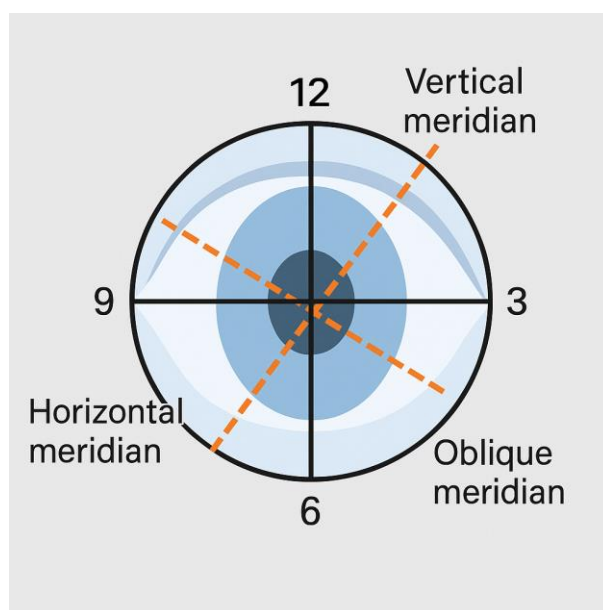


Figura A.2: Meridiani dell'occhio umano

Le dimensioni oculari, indicate tramite i diametri anteroposteriore, trasversale e verticale, sono contenute all'interno dei piani precedentemente indicati come si può facilmente notare dalla Figura A.2.

B Appendice B: Dimensioni Supporto e Sede O'ring

Tabella B.1: Parametri dimensionali dell'elemento 1 facente parte del supporto.

Elemento 1	Dimensioni
Diametro esterno	$D_{ext} = 62 \text{ mm}$
Filettatura metrica ISO	$M56 \times 2, \text{classe } 6g$
Altezza madrevite	$H_{fil} = 6 \text{ mm}$
Diametro fori passanti	$D_{fori} = 3.80 \text{ mm}$
Altezza base	$H = 9 \text{ mm}$

Tabella B.2: Parametri dimensionali dell'elemento 2 facente parte del supporto.

Elemento 2	Dimensioni
Diametro esterno	D_{ext}
Diametro interno	$D_{int} = 50.50 \text{ mm}$
Filettatura metrica ISO	$M56 \times 2, \text{classe } 6g$
Altezza parte non filettata	$H_1 = 10 \text{ mm}$
Altezza filettatura	$H_2 = 5.87 \text{ mm}$
Altezza sede o'ring	$H_3 = 4.5 \text{ mm}$
Profondità sede oring	$d = 2.80 \text{ mm}$

La forzante per la scelta della guarnizione e per il calcolo delle dimensioni del supporto in PLA è stata la dimensione del cilindro in PMMA e degli afferraggi della macchina.

La dimensione della sede è stata ricavata tramite i seguenti calcoli (109; 110; 111; 112). Per un'applicazione statica, risulta adeguata una compressione della guarnizione compresa tra il 12 ed il 30%; in questo caso è stata imposta una compressione del 17%.

La compressione della guarnizione è legata al toro ϕ e alla larghezza, o profondità, della sede tramite l'Equazione (B.2):

$$\text{Compressione} = \frac{\phi - W}{W} \times 100 \quad (\text{B.2})$$

Con $\phi = 3.5 \text{ mm}$, si ottiene $W = 3 \text{ mm}$.

Dove W è data dalla somma della profondità della scanalatura e del gioco fra pistone e cilindro; per calcolarlo si è fatto riferimento all'Equazione (B.3).

Il gioco vale 2 mm . Riferendoci alla (B.3), H è il diametro della sede ricavata sul cilindro ed E è il diametro del pistone

$$W = \frac{H - E}{2} \quad (B.3)$$

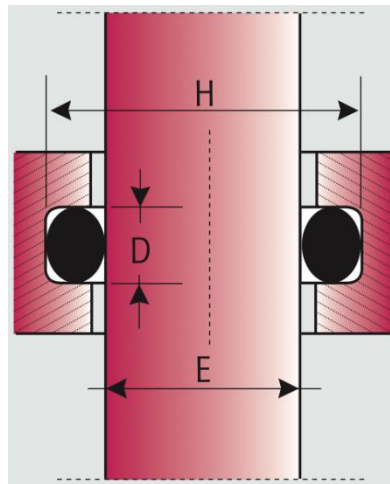


Figura B.1: Schema da tabelle dimensionali per o'ring

C Appendice C: Codice di MATLAB

```

clear all
close all

% === File di input ===
input_filename = ['250415-Campione1.xlsx'];
[~, base_filename, ~] = fileparts(input_filename);
output_filename = [base_filename '_filtered_load.xlsx'];

% === Leggi colonne 2 (Time), 4 (Disp), 5 (Load) ===
raw_data = readmatrix(input_filename);
time = raw_data(:,2);
disp = raw_data(:,4);
load = raw_data(:,5);

% === Parametri filtraggio ===
sgolay_window = 15; % deve essere dispari
sgolay_order = 3;
loess_alpha = 0.3;
golay_len = 40; % quanti punti iniziali usare per Golay
blend_len = 40; % transizione morbida

% === Inizializza vettore filtrato ===
load_sm = load; % di default, manteniamo tutto invariato

% === Trova rampe (segmenti continui validi) ===
is_valid = ~isnan(load);
diffs = diff([0; is_valid; 0]);
start_idx = find(diffs == 1);
end_idx = find(diffs == -1) - 1;

% === Indici delle rampe da filtrare ===
ramps_to_filter = [2, 4, 6, 9]; % base
if length(start_idx) >= 11
    ramps_to_filter = [ramps_to_filter, 11];
end
if length(start_idx) >= 13
    ramps_to_filter = [ramps_to_filter, 13];
end

for k = 1:length(start_idx)
    idx = start_idx(k):end_idx(k);
    t_seg = time(idx);
    f_seg = load(idx);
    N = length(f_seg);

    if ismember(k, ramps_to_filter)

        % --- Per rampa 9 e 13: filtra solo parte crescente ---

```

```

if (k == 9 || k == 13)
    % Trova punto massimo di carico
    [~, peak_idx] = max(f_seg);
    idx_to_filter = 1:peak_idx;
else
    idx_to_filter = 1:N;
end

t_filt = t_seg(idx_to_filter);
f_filt = f_seg(idx_to_filter);

if length(f_filt) < (sgolay_window + blend_len + 2)
    if length(f_filt) < 3
        f_sm = f_filt; % troppo corto → nessun filtraggio
    else
        span = max(3, round(loess_alpha * length(f_filt)));
        f_sm = smooth(f_filt, span, 'loess'); % uso lo span in punti
    end
else
    n_golay = min(golay_len, length(f_filt) - blend_len - 1);
    n_loess = length(f_filt) - n_golay;

    f_golay = sgolayfilt(f_filt(1:n_golay + blend_len), sgolay_order,
sgolay_window);
    t_loess = t_filt(n_golay + 1:end);
    f_loess = f_filt(n_golay + 1:end);

    if length(f_loess) < 3
        f_loess_sm = f_loess; % troppo corto → nessun filtraggio
    else
        span = max(3, round(loess_alpha * length(f_loess)));
        f_loess_sm = smooth(f_loess, span, 'loess');
    end

    f_sm = NaN(size(f_filt));
    f_sm(1:n_golay) = f_golay(1:n_golay);

    for i = 1:blend_len
        w = (cos(pi * (i-1)/(blend_len - 1)) + 1) / 2;
        f_sm(n_golay + i) = ...
            w * f_golay(n_golay + i) + ...
            (1 - w) * f_loess_sm(i);
    end

    f_sm(n_golay + blend_len + 1:end) = ...
        f_loess_sm(blend_len + 1:end);
end
% Salva segmento filtrato nella posizione corretta
if (k == 9 || k == 13)
    load_sm(idx(1:length(f_sm))) = f_sm; % solo parte crescente
else
    load_sm(idx) = f_sm;
end
end
end

% === Plot ===
figure

```

```
plot(time, load, '-r', 'DisplayName', 'Original Load')
hold on
plot(time, load_sm, '-b', 'DisplayName', 'Smoothed Load (Selective)')
xlabel('Time')
ylabel('Load')
legend
title('Filtraggio selettivo rampe')

% === Scrivi file Excel ===
output_matrix = NaN(size(raw_data,1), 3);
output_matrix(:,1) = time;
output_matrix(:,2) = disp;
output_matrix(:,3) = load_sm;

T = array2table(output_matrix, ...
    'VariableNames', {'Time', 'Displacement', 'Load_Filtered'});
writetable(T, output_filename);
```


D Appendice C: Codici Julia

Di seguito verranno elencati i tre codici usati per le i fitting in Julia.

D.1. Fitting Maxwell Classico

```
using RHEOS
using PyPlot
using CSV
using SavitzkyGolay
using NaNStatistics
using Statistics

# Cartella input e output
input_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/CSV_input_julia"
output_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/Output 2 Julia/"

# File di output
output_files = Dict(
    "rilassamento_1" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell 2%.csv"),
    "rilassamento_2" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell 4%.csv"),
    "rilassamento_3" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell 6%.csv")

# Scrivere i parametri su CSV
function append_params_to_csv(output_file, filename, eta, k, t_R,
relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
    file_exists = isfile(output_file)
    open(output_file, "a") do io
        if !file_exists
            write(io, "file, eta, k, t_R, relaxation_modulus, error_MAPE,
error_MAPE\n")
        end
        write(io,
"$filename,$eta,$k,$t_R,$relaxation_modulus,$error_RMSE,$error_MAPE\n")
    end
end

# Legge tutti i file CSV dalla cartella di input
input_files = filter(f -> endswith(f, ".csv"), readdir(input_folder, join=true))

for input_path in input_files
    println("Sto processando: $input_path")
    filename_base = splitext(basename(input_path))[1]

    # Determina la finestra di filtraggio in base al tipo di rilassamento
    if occursin("rilassamento_1", input_path)
```

```

        window_size = 301
        t = 200
    elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
        window_size = 201
        t = 600
    elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
        t = 1800
        window_size = 101
    end

# Import file
data = importcsv(input_path, delimiter = ';', t_col = 1, ε_col = 2, σ_col = 3)

# Check data type
rheotimedatatype(data)
data_original = data
stress = data.σ
filtered_stress_golay = savitzky_golay(stress, window_size, 4).y

# Ricreo una struttura RheoTimeData:
strain = data.ε
time = data.t
data_filtered = RheoTimeData(filtered_stress_golay, strain, time, nothing)

# takes only strains
strain = onlystrain(data_filtered)

# Fitting Maxwell
maxwell_model = modelstepfit(data_filtered, Maxwell, strain_imposed,
verbose=false, rel_tol_x = 1e-4, optmethod=:LN_SBPLX)
maxwell_predict = modelsteppredict(strain, maxwell_model)

# Estrai parametri
Params_Max = getparams(maxwell_model)
eta = Params_Max[1]
k = Params_Max[2]
t_R = eta / k
relaxation_modulus = relaxmod(maxwell_model, t)

# Calcola l'errore del fitting come RMSE
error = sqrt(mean((data_filtered.σ .- maxwell_predict.σ).^2))

# Calcola l'errore percentuale del fitting come MAPE
error_MAPE = 100 * mean(abs.((data_filtered.σ .- maxwell_predict.σ)
./data_filtered.σ))

# Capire a quale rilassamento appartiene e scrivere nel file giusto
if occursin("rilassamento_1", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_1"], filename_base, eta,
k, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_2"], filename_base, eta,
k, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_3"], filename_base, eta,
k, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
end
end

```

D.2. Fitting SLS Zener

```

using RHEOS
using PyPlot
using CSV
using SavitzkyGolay
using NaNStatistics
using Statistics

# Cartella input e output
input_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/CSV_input_julia"
output_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/Output 2 Julia/"

# Definisco i file di output
output_files = Dict(
    "rilassamento_1" => joinpath(output_folder, "Rilassamento SLS Zener 2%.csv"),
    "rilassamento_2" => joinpath(output_folder, "Rilassamento SLS Zener 4%.csv"),
    "rilassamento_3" => joinpath(output_folder, "Rilassamento SLS Zener 6%.csv"))

# Funzione per scrivere i parametri su CSV (aggiunge intestazione se file non
esiste)
function append_params_to_csv(output_file, filename, eta, kb, ka, t_R,
relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
    file_exists = isfile(output_file)
    open(output_file, "a") do io
        if !file_exists # ! operatore NOT. Se il file non esiste scrive una riga
con intestazioni
            write(io, "file, eta, kb, ka, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE,
error_MAPE\n")
        end
        write(io,
"$filename,$eta,$kb,$ka,$t_R,$relaxation_modulus,$error_RMSE,$error_MAPE\n")
    end
end

# Legge tutti i file CSV dalla cartella di input
input_files = filter(f -> endswith(f, ".csv"), readdir(input_folder, join=true))

for input_path in input_files
    println("Sto processando: $input_path")
    filename_base = splitext(basename(input_path))[1]

    # Determina la finestra di filtraggio in base al tipo di rilassamento
    if occursin("rilassamento_1", input_path)
        window_size = 301
        t = 200
    elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
        window_size = 201
        t = 600
    elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
        window_size = 101
        t = 1800
    end

    # Import file

```

```

data = importcsv(input_path, delimiter = ';', t_col = 1, ε_col = 2, σ_col = 3)

# Check data type
rheotimedatatype(data)
data_original = data
stress = data.σ
filtered_stress_golay = savitzky_golay(stress, window_size, 4).y

# Ricreo una struttura RheoTimeData:
strain = data.ε
time = data.t
data_filtered = RheoTimeData(filtered_stress_golay, strain, time, nothing)

# takes only strains
strain = onlystrain(data_filtered)

# Fitting SLS Zener
SLS_Zener_model = modelstepfit(data_filtered, SLS_Zener, strain_imposed,
verbose=false, rel_tol_x = 1e-4, optmethod=:LN_SBPLX)
SLS_Zener_predict = modelsteppredict(strain, SLS_Zener_model)

# Estrai parametri
Params_SLS_Z = getparams(SLS_Zener_model)
eta = Params_SLS_Z[1]
kb = Params_SLS_Z[2]
ka = Params_SLS_Z[3]
t_R = eta / kb
relaxation_modulus = relaxmod(SLS_Zener_model, t)

# Calcola l'errore del fitting come RMSE
error = sqrt(mean((data_filtered.σ .- SLS_Zener_predict.σ).^2))

# Calcola l'errore del fitting come MAPE
error_MAPE = 100 * mean(abs.((data_filtered.σ .- SLS_Zener_predict.σ) ./
data_filtered.σ))

# Capire a quale rilassamento appartiene e scrivere nel file giusto
if occursin("rilassamento_1", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_1"], filename_base, eta,
kb, ka, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_2"], filename_base, eta,
kb, ka, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_3"], filename_base, eta,
kb, ka, t_R, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
end
end
end

```

D.3. Fitting Maxwell Frazionale con Molla

```

using RHEOS
using PyPlot
using CSV
using SavitzkyGolay
using NaNStatistics
using Statistics

# Cartella input e output
input_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/CSV_input_julia"
output_folder = "/Users/ilaria/Desktop/Poli/Tesi/Prove uniassiali/Output 2 Julia/"

# Definisco i file di output
output_files = Dict(
    "rilassamento_1" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell Fractional
Spring 2%.csv"),
    "rilassamento_2" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell Fractional
Spring 4%.csv"),
    "rilassamento_3" => joinpath(output_folder, "Rilassamento Maxwell Fractional
Spring 6%.csv"))

# Funzione per scrivere i parametri su CSV (aggiunge intestazione se file non
esiste)
function append_params_to_csv(output_file, filename, Ca, a, k, t_Rm,
relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
    file_exists = isfile(output_file)
    open(output_file, "a") do io
        if !file_exists
            write(io, "file,Ca, a, k, t_Rm, relaxation_modulus, error_RMSE,
error_MAPE\n")
        end
        write(io,
"$filename,$Ca,$a,$k,$t_Rm,$relaxation_modulus,$error_RMSE,$error_MAPE\n")
    end
end

# Legge tutti i file CSV dalla cartella di input
input_files = filter(f -> endswith(f, ".csv"), readdir(input_folder, join=true))

for input_path in input_files
    println("Sto processando: $input_path")
    filename_base = splitext(basename(input_path))[1]

    # Determina la finestra di filtraggio in base al tipo di rilassamento
    if occursin("rilassamento_1", input_path)
        window_size = 301
        t = 200
    elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
        window_size = 201
        t = 600
    elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
        t = 1800
        window_size = 101
    end

    # Import file
    data = importcsv(input_path, delimiter = ';', t_col = 1,  $\epsilon$ _col = 2,  $\sigma$ _col = 3)

```

```

# Check data type
rheotimedatatype(data)
data_original=data

# Selezioniamo solo gli stress e li filtriemo una volta
stress = data.σ
filtered_stress_golay = savitzky_golay(stress, window_size, 4).y

# Ricreo una struttura RheoTimeData:
strain = data.ε
time = data.t
data_filtered = RheoTimeData(filtered_stress_golay, strain, time, nothing)

# takes only strains
strain = onlystrain(data_filtered)

# Fitting Maxwell Fractional:
# Lower bounds
Lo = (ca = 0.01, a = 0.01, k = 0.01)
# Upper bounds
Hi = (ca = 100, a = 0.99, k = 15)
# Initial parameters
P0 = (ca = 0.1, a = 0.2, k = 5.0)

Fract_spring_maxwell_model = modelstepfit(data_filtered, FractS_Maxwell,
strain_imposed, lo = Lo, hi = Hi, p0 = P0, verbose = false, rel_tol_x = 1e-3,
optmethod=:LN_SBPLX)
Fract_spring_maxwell_predict = modelsteppredict(strain,
Fract_spring_maxwell_model)

# Estrai parametri
Params_MaxFrac = getparams(Fract_spring_maxwell_model)
Ca = Params_MaxFrac[1]
a = Params_MaxFrac[2]
k = Params_MaxFrac[3]
t_Rm = (Ca / k)^(1 / a)
relaxation_modulus = relaxmod(Fract_spring_maxwell_model, t)

# Calcola l'errore del fitting come RMSE
error = sqrt(mean((data_filtered.σ .- Fract_spring_maxwell_predict.σ).^2))

# Calcola l'errore del fitting come MAPE
error_MAPE = 100 * mean(abs.((data_filtered.σ .-
Fract_spring_maxwell_predict.σ) ./ data_filtered.σ))

# Capire a quale rilassamento appartiene e scrivere nel file giusto
if occursin("rilassamento_1", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_1"], filename_base, Ca, a,
k, t_Rm, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_2", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_2"], filename_base, Ca, a,
k, t_Rm, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
elseif occursin("rilassamento_3", input_path)
    append_params_to_csv(output_files["rilassamento_3"], filename_base, Ca, a,
k, t_Rm, relaxation_modulus, error_RMSE, error_MAPE)
end
end

```

List of Figures

Figura 1.1: Sezione sagittale del cranio, muscoli extraoculari e bulbo oculare.	6
Figura 1.2: Sezione trasversale del bulbo oculare.	6
Figura 1.3: Dettaglio dell'angolo della camera anteriore.	7
Figura 1.4: Sistema di drenaggio dell'umor acqueo.	7
Figura 1.5: Mappa dei vettori polari che indicano l'orientazione preferenziale delle lamelle in una cornea umana normotipo.	10
Figura 1.6: Stratificazione dei tessuti corneali.	11
Figura 1.7: Sezione sagittale del bulbo oculare.	12
Figura 1.8: Sezione della papilla del nervo ottico che mostra la struttura finestrata della lamina cribrosa (LC) e della sclera peripapillare circostante (PPS).	12
Figura 1.9: Dettaglio dell'angolo della camera anteriore.	13
Figura 1.10: Organizzazione delle molecole di collagene e delle fibrille all'interno delle fibre di collagene.	13
Figura 1.11: Mappa dei vettori polari indicanti l'orientazione delle lamelle di collagene.	14
Figura 1.12: Sezione sagittale del bulbo che mostra l'orientazione delle lamelle nella sclera.	15
Figura 1.13: Curva di sforzo – deformazione tipica di un materiale biologico.	16
Figura 1.14: Rigidezza normalizzata della cornea rispetto alla profondità della stessa.	18
Figura 1.15: Curve di sforzo – deformazione di cornea a profondità diverse.	18
Figura 1.16: Curve di sforzo – deformazione ottenute pressurizzando a valori diversi e per cornee di pazienti con età differenti.	19
Figura 1.17: Curva di creep della cornea ottenuta tramite insufflazione.	20
Figura 1.18: Curve di sforzo – deformazioni ottenute per porzioni diverse della sclera.	21
Figura 1.19: Grafico di sforzo – deformazione per la sclera estratta in porzione (a) anteriore, (b) equatoriale e (c) posteriore.	22

Figura 1.20: Grafico di forza – allungamento della sclera, rispetto all’uncrimping delle fibre.....	22
Figura 1.21: Grafico di forza – allungamento della sclera, rispetto all’uncrimping delle fibre.....	23
Figura 1.22: Andamento del modulo di rilassamento normalizzato porzioni della sclera diverse.....	23
Figura 1.23: Curve di creep della sclera ricavata per valori di pressione diversi.	24
Figura 1.24: Rappresentazione del bulbo oculare porcino con direzioni anatomiche.	25
Figura 1.25: Mappa dei vettori polari indicante la direzione preferenziale delle lamelle in una cornea porcina.	26
Figura 1.26: Andamento dello spessore sclerale rispetto alla distanza dal limbus.	26
Figura 1.27: Curva sforzo – deformazione della cornea umana porcina e porcina.	27
Figura 1.28: Curva che relaziona la pressione intraoculare allo spostamento apicale della cornea (a) umana e (b) porcina.	27
Figura 1.29: Curva di sforzo – deformazione per campioni corneali porcini prelevati in direzioni diverse.....	28
Figura 1.30: Curve di creep per la sclera porcina e umana.	29
Figura 1.31: Curva di sforzo – deformazione con area di isteresi per sclera umana e porcina.	30
Figura 1.32: Istogramma con i moduli di rilassamento a varie deformazioni per sclera umana e porcina.	31
Figura 2.1: Confronto papilla ottica di un occhio sano (A) con uno affetto da glaucoma (B).....	34
Figura 2.2: Proporzione di individui senza glaucoma all’aumentare del tempo rispetto alle variazioni di IOP a cui sono sottoposti.	35
Figura 2.3: Aumento della IOP in seguito all’intensità del trattamento corneale con gluteraldeide.	36
Figura 2.4: Confronto tra un occhio emmetrope ed uno miope.	37
Figura 2.5: Confronto nell’orientazione delle lamelle di collagene fra un occhio emmetrope ed uno miopico.	38
Figura 3.1: Curva sforzo – deformazione tipica di un materiale biologico.....	43
Figura 3.2: Schema in un provino soggetto a trazione.....	44
Figura 3.3: Grafico sforzo – deformazione che mostra (a) carico e scarico e (b) due curve a velocità di carico ottenute diverse.	47

Figura 3.4: Andamento della deformazione e dello sforzo in una prova di rilassamento.	47
Figura 3.5: Sforzo di picco e sforzo di rilassamento in una curva di rilassamento.....	48
Figura 3.6: Schema della molla.....	49
Figura 3.7: Schema dello smorzatore.....	50
Figura 3.8: Schema dello springpot: le due icone sono equivalenti.....	51
Figura 3.9: Schema del modello di Maxwell	51
Figura 3.10: Schema del modello Standard Linear Solid di Zener.....	52
Figura 3.11: Schema del modello di Maxwell Frazionale.....	53
Figura 4.1: Schema bulbo porcino e bulbo porcino.....	55
Figura 4.2: Procedure di incisione pulizia del bulbo oculare.....	56
Figura 4.3: Procedura di incisione della sclera in quattro porzioni.....	56
Figura 4.4: Estrazione dei campioni di sclera.....	57
Figura 4.5: Cornea con porzione di sclera oltre il limbus.....	58
Figura 4.6: Procedura per ritagliare campioni di sclera.....	59
Figura 5.1: Viste diverse del supporto.....	62
Figura 5.2: Set up sperimentale con campione di sclera.....	63
Figura 5.3: Grafico sforzo – tempo con curva originale e filtrate.....	65
Figura 5.4: Procedura per ricavare $\Delta\sigma_{eq}$	66
Figura 5.5: Esempio delle curve a trazione eseguite a velocità diversa.....	67
Figura 5.6: Curva di sforzo – deformazione fino a rottura.....	67
Figura 5.7: Esempio di rampa di rilassamento al 6% e curve predette dai modelli viscoelastici.....	69
Figura 5.8: Esempio di una curva sperimentale e della stessa in seguito al filtraggio.....	70
Figura 5.9: Dettaglio degli afferraggi e campione corneale montato all'interno del set up.....	71
Figura 6.1: Sequenza delle rampe di trazione, a velocità diverse, in funzione del tempo.	77
Figura 6.2: Esempio di rampe di trazione eseguite a velocità diversa.....	77
Figura 6.3: Dettaglio delle tre rampe al 2% di deformazione.....	78
Figura 6.4: Istogramma che contiene la media dei moduli elastici estratti dalle curva a velocità diverse per una deformazione dell'8%.....	80

Figura 6.5: Boxplot con i moduli elastici delle curve a velocità crescente, estratti al 2% di deformazione.....	82
Figura 6.6: Boxplot con i moduli elastici delle curve a velocità crescente, estratti all'8% di deformazione.....	82
Figura 6.7: Istogramma che contiene la mediana dei moduli di rilassamento per le varie direzioni anatomiche al 6% di deformazione.....	85
Figura 6.8: Esempio di una curva del terzo rilassamento filtrata con una finestra errata.	92
Figura 6.9: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello di Maxwell.....	93
Figura 6.10: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello SLS Zener.....	93
Figura 6.11: Curva sperimentale di un rilassamento al 4% e curva prodotta dal modello di Maxwell frazionale.	94
Figura 6.12: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 2%.	96
Figura 6.13: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 4%.	96
Figura 6.14: Esempio di una curva sperimentale e una predetta dal modello frazionale, per un rilassamento al 6%.	97
Figura 6.15: Curve di sforzo – deformazione a strain rate crescenti, per la cornea.	99
Figura 6.16: Curva di sforzo – deformazione per rampe di rilassamento eseguite su cornea.	99
Figura 6.17: Istogramma con le percentuali di rilassamento di cornea e sclera.	101
Figura A.1: Sistema di riferimento occhio umano.	119
Figura A.2: Meridiani dell'occhio umano	120
Figura B.1: Schema da tabelle dimensionali per o'ring	122

List of Tables

Tabella 5.1: Protocollo sperimentale	63
Tabella 6.1: Parametri statistici delle prove di trazione.....	79
Tabella 6.2: Mediane dei moduli elastici delle prove di trazione eseguite a tre velocità diverse.....	79
Tabella 6.3: Intervallo interquartile (IQR) calcolato sui moduli elastici delle curve a velocità crescente, al 2% e 8% di deformazione.....	83
Tabella 6.4: Parametri statistici ricavati confrontando i moduli di rilassamento nelle quattro direzioni anatomiche.	84
Tabella 6.5: Mediane dei moduli di rilassamento per le quattro direzioni anatomiche.	85
Tabella 6.6: Mediane delle percentuali di rilassamento ricavate per i tre valori di deformazione.	86
Tabella 6.7: Mediane delle percentuali di rilassamento ricavate per le quattro direzioni considerate.....	87
Tabella 6.8: Moduli elastici ricavati dalle curve di trazione a velocità crescente.....	89
Tabella 6.9: Parametri statistici ricavati confrontando le curve a velocità crescente..	90
Tabella 6.10: Mediane dei moduli di rilassamento ricavati per le quattro direzioni anatomiche.	91
Tabella 6.11: Mediane delle percentuali di rilassamento per i tre livelli di deformazione.	91
Tabella 6.12: Medie degli errori MAPE calcolati per i tre modelli in corrispondenza di ciascun rilassamento.	94
Tabella 6.13: Parametri costitutivi del modello di Maxwell frazionale.....	95
Tabella 6.14: Modulo di rilassamento sperimentale e predetto dal modello frazionale a confronto.....	95
Tabella 6.15: Media dei moduli elastici della cornea all'8% di deformazione.....	98
Tabella 6.16: Media dei moduli di rilassamento della cornea.....	100

Tabella 6.17: Media dei moduli di rilassamento della sclera.	100
Tabella 6.18: Media dei moduli elastici della sclera.	100
Tabella 6.19: Medie dei rilassamenti percentuali di cornea e sclera.	101
Tabella B.1: Parametri dimensionali dell'elemento 1 facente parte del supporto. ...	121
Tabella B.2: Parametri dimensionali dell'elemento 2 facente parte del supporto. ...	121

List of symbols

Variabile	Descrizione	Unità SI
F	Forza	N
A_0	Area sezione resistente del provino nella configurazione indeformata	mm^2
σ	Sforzo ingegneristico	MPa
ε	Deformazione ingegneristica	–
ΔL	Incremento di lunghezza del provino.	mm
L_0	Lunghezza iniziale del provino	mm
E	Modulo di Young	MPa
$\dot{\varepsilon}$	Velocità di deformazione	$1/s$
$d\varepsilon/dt$	Derivata di ordine 1 della deformazione rispetto al tempo	$1/s$
σ_{eq}	Sforzo di equilibrio	MPa
$R_{\%}$	Percentuale di rilassamento	–
σ_{picco}	Sforzo di picco	MPa
$G(t)$	Modulo di rilassamento	MPa
G_g	Modulo istantaneo o vetroso	MPa
G_{∞}	Modulo di equilibrio	MPa
$\Theta(t)$	Funzione gradino di Heaviside	–
η	Viscosità	$Pa \cdot s$
c_{β}	Parametro reologico frazionale	$Pa \cdot s^{\beta}$
$d^{\beta}\varepsilon/dt^{\beta}$	Derivata di ordine β della deformazione rispetto al tempo	$1/s^{\beta}$
k	Costante elastica della molla	MPa
τ	Tempo di rilassamento	s
$E_{\alpha}(\cdot)$	Funzione di Mittag - Leffler	–
v	Velocità	mm/s
s	Spessore campione	mm
w	Larghezza campione	mm
MAPE	Errore medio assoluto percentuale	–
y_i	Osservazioni sperimentali	MPa
\hat{y}_i	Osservazioni predette dal modello	MPa
N	Numero di osservazioni totali	–

Ringraziamenti

Oggi i caldi raggi solari che filtrano attraverso le tende del salotto mi sembrano provvidenziali dopo settimane di pioggia. Essi mi invitano ad uscire nella frizzante aria di fine Settembre e a respirare a pieni polmoni una nuova libertà. Si apre davanti a me la prospettiva di una vita nuova, seppur identica a prima, ma che porta con sé la promessa di una concreta realizzazione personale.

Si racchiudono qui i mie pensieri riguardo questo tortuoso, lungo e insidioso percorso che mi ha insegnato tanto e mi ha reso una persona diversa; spero migliore. Guardando indietro, se penso alla matricola che frequentava le prime lezioni universitarie fatico a riconoscermi; ma se potessi darle un consiglio, le direi di non sentirsi così fuori luogo, di puntare dritto alla meta lasciando indietro le preoccupazioni, perché pesano come un macigno senza arricchire. Le direi di prendere ciò che di buono ogni giornata sa dare, senza pensare troppo al domani, senza perdere di vista sé stessa... chi davvero è. Ho sentito dire che per ritrovare se stessi è necessario prima perdersi, non so se sia vero, ma per me è stato così. Ho iniziato questo percorso da ragazza e l'ho concluso da donna.

Sinceramente, penso di aver imparato tanto dal punto di vista accademico, quanto dal punto di vista personale e umano. Ho avuto la fortuna di incontrare persone splendide che oggi ho la fortuna di poter chiamare "amici". Fra di voi, riconosco con particolare valore ed affetto coloro che non mi hanno mai voltato le spalle nonostante i miei difetti, i pianti infiniti e le lamentele; davvero, grazie. Questo percorso è stato lo scoglio più grande che abbia mai affrontato; mi ha plasmato, mi ha reso più fiduciosa e resiliente. Mi ha insegnato a sopportare, a non scappare, a lottare contro un nemico che spesso non ha volto, ma molte forme. Perché nel mio caso, il nemico più grande è sempre stato nella mia testa ma non per questo meno potente o reale.

La lista di persone che hanno contribuito a rendere più leggeri questi anni è veramente lunga e contiene chi c'è da sempre, chi da qualche anno e chi si è aggiunto da poco. Penso che fare tutti i nomi sia quasi ridicolo, perché niente può racchiudere ciò che abbiamo condiviso; tuttavia, questa è l'occasione per ringraziarvi formalmente e non la perderò. Da brava ingegnere farò un elenco puntato suddiviso in gruppi, aree geografiche e temporali (n.b. non è una classifica dell'affetto che provo):

- Gruppo UniBg: sebbene la triennale sia ormai un lontano ricordo (per fortuna) chi di voi fa parte di questo gruppo è per me tanto caro e speciale. Nutro grande affetto per ognuno di voi; ci siamo conosciuti nel pieno del disagio ma non ci siamo persi e non potrei essere più grata per questo. Oltre ad essere intenerita

da tutti i ricordi che ho con voi (dai viaggi alle pause pranzo, dalle sessioni di studio alle feste) sono entusiasta alla prospettiva di condividere nuove esperienze. Vi voglio bene.

- Palazzolo: siamo tutte diverse quanto simili, ci conosciamo dal giorno 0 e nonostante tutto non siamo ancora qua, fra alti e bassi. Rappresentate l'eredità storica della mia crescita, ci siamo conosciute senza filtri, nell'età che non ha preoccupazioni e abbiamo cominciato a scoprire il mondo insieme, seppur ognuna con i propri occhi. Custodisco gelosamente i ricordi dell'asilo, le prime esperienze e i primi amori. So che posso contare su di voi e vi voglio bene. Siete la costante nella mia vita e ci immagino fra 40 anni, befane come a 4 anni, a bere il caffè tutte rugose e rinsecchite.
- Gruppo PoliMi: siete stati la cosa migliore del Politecnico a mani basse proprio. Ogni pausa caffè, pranzo o aperitivo è stato prezioso e sono stata estremamente felice di avervi conosciuto e che mi abbiate accolta nel vostro gruppo. Siete stati un faro in questi anni, vi voglio bene, sinceramente. Non so come avrei fatto senza di voi, persa come sono, a seguire tutto quello che c'era fare e da sapere... probabilmente starei ancora vagando fra gli edifici senza riconoscerli. Siete stati le risate ed il sorriso nella disperazione dei corsi e degli esami.
- Gruppo Valle: forse il più grande ed eterogeneo. Al "gruppo di Branzi" posso dire che siete stati una scoperta immensa e che mi sento a casa quando sto con voi. In questo anno mi avete distratto, alleggerito e reso felice in molti modi. Non mi avete mandato a quel paese in questi due mesi di scrittura quando ero veramente fuori di testa, e questo per me significa moltissimo; non scherzo. Posso ringraziare il cielo di aver finalmente incontrato qualcuno a cui piace guardare i cervi alla 4 di notte senza che mi senta matta solo io. Vi voglio bene.

Un grazie al Terre, perché ho incontrato delle persone fantastiche che sono state più che colleghi. Ho scoperto una vita favolosa grazie ad una famiglia estremamente accogliente; e sebbene sia stato complicato e stancante questo anno, andare a lavorare è sempre stata una gioia e mai un peso, e questo lo devo a voi. Grazie.

Agli affetti più storici devo molto, perché quando si condivide molto con una persona non si può più farne a meno, dopo. Vi devo ringraziare per la pazienza, siete due fra le persone più tolleranti e pazienti che io conosca. Non avete mai chiesto indietro niente a fronte di ciò che avete regalato a me, e io vi sarò eternamente grata per essermi stati vicino dei periodi più bui di questi anni.

- Famiglia: qui annoveriamo anche la Clara, perché sarà la zia dei miei bambini ed è stata una compagna fedelissima da 11 anni a questa parte, o forse di più. Sulla nostra amicizia, a 15 anni, non avrei scommesso un centesimo ed invece sei diventata la mia migliore amica da allora; insostituibile ed impareggiabile. Sei l'unica persona che riesce a farmi ridere, anche del niente, quando sono

triste; l'unica che non mi pesa mai avere intorno, con te posso essere me stessa al 100%. Ci conosciamo come le nostre tasche e non potrei desiderare amica migliore, compagna di viaggi, di feste e di cene a spettegolare. Anche se parli appena apri gli occhi la mattina, non ti cambierei mai. Ovviamente, grazie. Perché anche quando io sono stata troppo distratta e impegnata dallo studio, quando ti ho trascurato e balzato per l'ansia degli esami, non ti sei mai arrabbiata e mi hai sempre capito. Ti voglio bene!

Non saprei dove sarei oggi senza la mia famiglia. Siete la mia ancora più salda, una candela nella notte più buia, una bussola nella nebbia, un'oasi nel deserto, un rifugio nella tempesta più forte. Non posso nemmeno immaginare come sarebbe la mia vita senza di voi e nonostante io sia piuttosto sclerata, non lo dimostri e non ve lo dica, sono estremamente fiera delle persone che siete e di avervi al mio fianco. Come ho scritto all'inizio, un grazie non basta perché è stato difficile, ma senza di voi non penso che sarei arrivata dove sono oggi. Essere amati incondizionatamente, senza giudizi o pretese è una fortuna impagabile.

- Un grazie va di diritto anche all'Irene, per non aver mai dubitato di me in questi anni, avermi sempre ascoltata nei momenti di bisogno ed incoraggiata a dare il meglio di me.

Provo un affetto immenso per ognuno di voi, sinceramente.

Un sincero e sentitissimo grazie alla Prof. Boschetti e a Damiano per la pazienza, la simpatia, la gentilezza e la comprensione dimostratemi. Non avrei potuto sperare in meglio.

Ora, per tutti quelli che mi dicono che devo farmi vedere: *ve lo prometto qua davanti a tutti, io esco da qua e mi vado a fare un percorso psicologico importante; ve lo giuro.*

