



POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica – Classe LM-21

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**CARATTERIZZAZIONE MECCANICA E MODELLAZIONE COSTITUTIVA
VISCO-IPERELASTICA DEL TESSUTO BRONCHIALE EQUINO**

Un approccio sperimentale e computazionale

Relatrice

Prof.ssa Cecilia Surace

Candidata

Vittoria Cuneo

Correlatori

Prof.ssa Michela Bullone

Ing. Vito Burgio

Anno Accademico 2024/2025

Abstract

Negli ultimi decenni lo studio dei tessuti biologici ha conosciuto un rinnovato interesse, volto a chiarire in che modo la loro complessa e gerarchica organizzazione ne determini le proprietà meccaniche, le quali possono essere significativamente eterogenee all'interno dello stesso organo.

L'impiego di test sperimentali di trazione uniassiali bi-assiali integrati da prove di stress-rilassamento, lo sviluppo di nuove leggi costitutive e la crescente potenza di calcolo ha permesso di definire e simulare in maniera più precisa il comportamento meccanico di molteplici tessuti biologici, quali cuore, arterie, muscoli, tendini e cervello.

In letteratura le proprietà meccaniche dei bronchi o in generale dei tessuti molli che costituiscono l'apparato respiratorio, sia umano sia animale, sono state valutate da un numero limitato di studi. Un loro approfondimento, associato all'impiego di modelli numerici, rappresenta una via promettente per indagare patologie la cui insorgenza e sviluppo rimangono ad oggi ancora poco chiare. In questo contesto, risulta di particolare interesse l'analisi dell'albero polmonare, in quanto luogo in cui si verificano le principali disfunzioni respiratorie, quali per esempio l'asma e la bronchite.

Il presente lavoro si focalizza sulla caratterizzazione meccanica dell'albero polmonare equino, considerando specificatamente tessuti quali i bronchi primari e secondari e le ramificazioni bronchiali di maggiore diametro, provenienti sia da soggetti sani sia patologici. Per determinare le proprietà meccaniche dei bronchi si sono effettuati test di stress-rilassamento e test di trazione uniassiale, impiegando sia campioni di forma rettangolare sia cilindrica, preservando in quest'ultimo caso la struttura bronchiale fisiologica. A tal fine è stato sviluppato un sistema di afferraggio ad hoc, realizzato tramite stampante 3D a filamento.

Lo scopo ultimo è quello di definire un modello costitutivo in grado di simulare la risposta meccanica fisiologica delle vie aeree dell'equino. A partire dai dati sperimentali sono stati identificati i parametri costitutivi della formulazione visco-iperelastica fibrorinforzata considerando due famiglie di fibre, la quale successivamente è stata implementata in un modello a elementi finiti sviluppato nella piattaforma open-source FEniCS, specializzata nella risoluzione di equazioni differenziali alle derivate parziali.

Il confronto tra il comportamento meccanico osservato sperimentalmente e la risposta numerica del modello ha permesso di validare una metodologia numerica robusta in grado di simulare il comportamento meccanico dei bronchi equini.

Parole chiave: biomeccanica polmonare, albero polmonare, test uniassiale, test stress-rilassamento, modello visco-iperelastico, FEniCS.

Indice

Capitolo 1

1. Introduzione	1
1.1 Motivazione	2
1.1.2 Correlazione tra caratteristiche meccaniche e condizioni patologiche	2
1.1.3 Simulazioni computazionali	3
1.2 Obiettivi	3
1.3 Outline	4

Capitolo 2

2. Contesto anatomico e fisiologico	5
2.1 Il sistema respiratorio: componenti principali dei tessuti e le loro funzioni	5
2.2 Narice e cavità nasali	9
2.3 Faringe	11
2.4 Laringe	11
2.5 Trachea	12
2.6 Bronchi	14
2.7 Parenchima polmonare	15
2.8 Perfusionazione sanguigna	18
2.9 Cavità toracica e muscoli coinvolti nella respirazione	18
2.10 Respirazione equina: fisiologia e principali patologie delle vie aeree	19

Capitolo 3

3. Analisi biomeccanica	23
3.1 Concetti e definizioni principali	23
3.2 Test meccanici dei tessuti biologici	24
3.3 Condizioni sperimentali ed ambientali	26
3.4 Modelli costitutivi	27
3.4.1 Iperelasticità	27
3.4.2 Definizione delle caratteristiche del modello	28
3.4.3 Implementazione del modello	31
3.4.4 Validità del modello	32

Capitolo 4

4. Set-up sperimentale	34
4.1 Raccolta dei campioni	34
4.2 Preparazione dei campioni	35
4.3 Strumentazione per i test a trazione	37
4.4 Sistema di afferraggio cilindrico modulabile	39
4.5 Protocollo di testing e post processing	41

Capitolo 5

5. Risultati e discussione	45
5.1 Analisi primaria	45
5.2 Analisi dei test stress-rilassamento	46
5.2.1 Analisi delle curve stress-rilassamento normalizzate	51
5.2.2 Fitting del modello costitutivo ai dati sperimentali	54
5.3 Analisi dei test a trazione	56
5.4 Analisi agli elementi finiti	59
5.4.1 FEniCS	59
5.4.2 Risultati delle simulazioni numeriche	61

Capitolo 6

6. Conclusioni	64
----------------	----

Capitolo 7

7. Direzioni future	67
---------------------	----

Lista di figure	69
------------------------	----

Lista di tabelle	71
-------------------------	----

Bibliografia	72
---------------------	----

Capitolo 1

1 Introduzione

Con il termine biomeccanica si fa riferimento in generale all'applicazione dei principi meccanici per lo studio del comportamento fisiologico degli organismi viventi quando sottoposti a sollecitazioni statiche o dinamiche. La determinazione e l'analisi delle proprietà meccaniche di una struttura anatomica è fondamentale per comprenderne la fisiologia, predirne i cambiamenti a seguito di patologie e/o alterazioni funzionali ed infine creare dei modelli predittivi per migliorare terapie, tecniche chirurgiche e dispositivi medici.

La metodologia solitamente seguita per trattare e risolvere un problema di biomeccanica prevede in primis di esaminare la morfologia, la citologia e la struttura del tessuto, organo o sistema che si vuole studiare, prestando particolare attenzione alla tipologia di componenti strutturali presenti e loro organizzazione. Una volta ottenuta la geometria, è necessario effettuare una serie di test per determinare le proprietà meccaniche del tessuto. Questo step rappresenta spesso un'ardua sfida per i ricercatori a causa di numerosi fattori quali per esempio la difficoltà nell'isolare e studiare separatamente i singoli componenti che costituiscono il tessuto, la complessità nel mantenere un ambiente di test più simile possibile a quello fisiologico del tessuto o tutte le problematiche correlate al reperire campioni di tessuti adatti e della dimensione corretta per il testing.

Una volta superati questi ostacoli ed ottenuti i dati è possibile creare un modello matematico che rappresenti il comportamento del materiale tramite la formulazione di un'equazione costitutiva, generalmente descritta da una serie di parametri determinati sperimentalmente. Infine l'ultimo step consiste nella validazione del modello creato, ovvero nel verificare che i valori teorici ottenuti siano effettivamente confrontabili con quelli sperimentali e che quindi il modello sia in grado di rappresentare correttamente il comportamento fisiologico del materiale. Successivamente inoltre è possibile anche valutare al variare delle condizioni al contorno o delle proprietà intrinseche del materiale come cambia la sua risposta meccanica e di conseguenza studiare condizioni patologie del tessuto.

In letteratura si possono trovare un numero considerevole di studi che descrivono le proprietà meccaniche dei tessuti biologici umani e riguardano principalmente le arterie, i tessuti delle valvole aortiche, le vene, alcuni tessuti vaginali, legamenti, muscoli, cornea e pelle [1], tuttavia la reperibilità dei campioni, la ripetibilità dei test e le questioni etiche associate all'uso di tessuti umani nei test, comportano spesso l'impiego di modelli animali. Anche se ovviamente è necessario considerare la diversa morfologia e fisiologia dei modelli animali, spesso quadrupedi (topi, conigli, pecore, cani) rispetto all'essere umano, essi possono essere utili per definire le proprietà meccaniche generali di un tessuto o un organo di una specie e per confrontare il comportamento durante test mono e biassiali di specie diverse, evidenziandone similitudini e differenze.

Il presente lavoro ricade nell'ambito di numerosi precedenti studi sulla caratterizzazione meccanica dei tessuti biologici, mediante l'impiego di test a trazione [2], [3], [4], [5]. Grazie al lavoro multidisciplinare tra ingegneri e veterinari, è stato possibile stabilire una collaborazione tra il laboratorio 'Bio-Inspired Nanomechanics' del Dipartimento di Ingegneria Civile del Politecnico di Torino e il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino. Questo approccio integrato ha permesso di analizzare campioni di albero bronchiale di origine equina, prelevati durante esami necroscopici condotti dal team di veterinari, e di studiarne le proprietà meccaniche.

1.1 Motivazioni

L'apparato respiratorio in generale può essere definito come un sistema multistrato e composito, caratterizzato da una marcata eterogeneità tissutale e da una gerarchia strutturale complessa. A livello macroscopico può essere suddiviso in parenchima e albero polmonare. E' noto la sua funzione principale è quella di garantire l'ossigenazione del sangue e l'eliminazione dell'anidride carbonica, prodotto di scarto del metabolismo cellulare. L'alterazione di questo processo a causa di patologie, di malformazioni o traumi, può determinare lo sviluppo di gravi condizioni cliniche acute o croniche.

Sebbene le funzioni fisiologiche fondamentali dell'apparato respiratorio siano conservate tra le diverse specie, si possono osservare significative variazioni anatomiche e strutturali. In particolare, mentre cani e gatti condividono un'organizzazione anatomica simile, il sistema respiratorio equino presenta caratteristiche distintive rispetto a quello umano, tra cui la diversa conformazione delle vie aeree superiori e la meccanica ventilatoria. Queste differenze morfofunzionali giustificano, almeno in parte, la peculiare suscettibilità di questa specie a specifiche patologie respiratorie. I disturbi polmonari e delle vie aeree possono originare da infezioni dirette da parte di virus, batteri, funghi o parassiti, nonché da reazioni immuno-mediate o dall'inalazione di sostanze irritanti o tossiche presenti nell'ambiente circostante. Eventi traumatici, come per esempio l'impatto violento contro un ostacolo, possono determinare il collasso polmonare o delle vie respiratorie.

Le malattie respiratorie rappresentano un'importante causa di morbidità e calo prestazionale nel cavallo, interessando soggetti di tutte le età, razze e discipline, e comprendono sia patologie non infettive (asma equina, emiplegia laringea) sia infettive (adenite equina, infezioni virali/batteriche), interessando tutto l'apparato respiratorio. Una migliore comprensione della meccanica fisiologica delle vie aeree e una maggiore determinazione dei fattori che influenzano l'insorgenza di malattie respiratorie croniche nei cavalli sono fondamentali per formulare corrette misure preventive e predisporre adeguati protocolli di terapia.

1.1.2 Correlazione tra caratteristiche meccaniche e condizioni patologiche

L'importanza dello studio dei tessuti biologici come materiali gerarchici e multistrato risiede nella loro intrinseca complessità strutturale, che richiede necessariamente un approccio multiscale per una comprensione completa delle loro proprietà. Ciò implica che il comportamento meccanico a livello macroscopico, come per esempio la risposta elastica di un organo o la sua capacità a resistere alle sollecitazioni esterne, è il risultato diretto di fenomeni che operano a scale inferiori. La disposizione delle fibre collagene ed elastiche, l'orientamento preferenziale delle cellule muscolari, la presenza di microstrutture circolari o reticolari, e l'interazione tra componenti extracellulari determinano collettivamente le proprietà globali del tessuto a livello macroscopico. Pertanto, l'analisi isolata di una singola scala (macro, micro o nano) può risultare insufficiente: solo un approccio integrato, che consideri l'organizzazione tra i diversi livelli strutturali e la loro interazione, può rivelare i meccanismi alla base del comportamento meccanico e della risposta a stimoli fisiologici o patologici.

Le strutture biologiche possono subire modifiche morfologiche in risposta alla crescita e/o alle alterazioni delle proprietà microstrutturali dovute a processi di rimodellamento. La fisiopatologia delle malattie polmonari croniche presenta tipicamente crescita mucosale e contrazione della muscolatura liscia bronchiale, che determinano un ripiegamento interno

dello strato mucosale e un'ostruzione progressiva delle vie aeree, con conseguente restringimento bronchiale, iperreattività delle vie aeree e tendenza al collasso respiratorio [6]. Dal punto di vista biologico, l'infiammazione della parete bronchiale e l'elastosi delle vie aeree rappresentano classici indicatori dei processi di crescita e rimodellamento durante le malattie polmonari croniche [7], e determinano una variazione delle proprietà meccaniche macroscopiche dell'apparato respiratorio, come per esempio un aumento della rigidità e dello stress locale causato dall'ispessimento della parete bronchiale e dalla contrazione anomala della parete bronchiale, o una minore capacità di ritorno elastico e di adattabilità alla disfunzione dell'accoppiamento elastina-collagene e alle sollecitazioni cliniche dovute ad un deposito anomalo di fibre elastiche nell'elastosi. La caratterizzazione meccanica dei componenti strutturali alla microscala quali fibre di collagene, di elastina e della matrice extracellulare è fondamentale per comprendere i processi di crescita e di rimodellamento cellulare e per costruire dei modelli costitutivi in grado di rappresentare non solo la dinamica polmonare fisiologica ma anche i vari stadi di progressioni di una patologia polmonare [8].

1.1.3 Simulazioni computazionali

L'uso di simulazioni numeriche ha rivoluzionato lo studio della fisiologia e della patologia polmonare, offrendo nuovi strumenti per analizzare il comportamento biomeccanico di questo organo complesso. In particolare, i modelli agli elementi finiti (FEM) permettono di integrare i dati sperimentali con modelli teorici, creando rappresentazioni virtuali che possono riprodurre in maniera fedele le proprietà meccaniche del tessuto polmonare. Questi approcci sono fondamentali per comprendere fenomeni come la distribuzione delle pressioni durante la ventilazione, l'impatto di patologie ostruttive sulla meccanica respiratoria, o gli effetti di interventi chirurgici sul parenchima polmonare. Per sviluppare modelli accurati, è importante considerare, oltre l'anatomia specifica e le condizioni al contorno dinamiche del caso studio in esame, che i tessuti biologici hanno un comportamento complesso che dipende principalmente dal tempo e dalla massima deformazione precedentemente subita. Il loro comportamento meccanico asintotico è di tipo elastico e tende a dominare la meccanica globale quando gli effetti dissipativi diventano trascurabili. Date queste considerazioni la maggior parte dei tessuti molli sono descritti nel contesto dell'iperelasticità [1].

Grazie a queste simulazioni, è possibile prevedere come l'albero polmonare reagisce a sollecitazioni meccaniche, permettendo di ottimizzare le terapie ventilatorie e di pianificare interventi chirurgici con maggiore precisione.

Dunque questi strumenti non solo migliorano la comprensione della fisiologia polmonare, ma aprono anche la strada a applicazioni cliniche avanzate, dalla personalizzazione delle terapie alla progettazione di dispositivi biomedicali specifici per la medicina veterinaria.

1.2 Obiettivi

I test biomeccanici sui tessuti biologici permettono di ottenere dati quantitativi sul loro comportamento meccanico in risposta a sollecitazioni fisiologiche. Tali misurazioni permettono di correlare le proprietà meccaniche con la composizione biochimica e l'organizzazione strutturale del tessuto, offrendo inoltre informazioni utili per valutare stati patologici e l'efficacia di trattamenti. Attraverso l'analisi dei risultati è possibile ricavare direttamente alcune proprietà meccaniche dei materiali esaminati, applicando relazioni matematiche fondamentali.

Il presente lavoro si propone di condurre test uniassiali in direzione longitudinale di bronchi

primari e secondari. Tramite l'analisi delle curve stress-deformazione e l'applicazione di semplici e fondamentali relazioni matematiche, è stato possibile ricavare direttamente alcune proprietà dei campioni in esame e svolgere un'analisi comparativa delle proprietà meccaniche tra campioni provenienti da distretti diversi dell'albero polmonare e tra campioni provenienti da individui diversi.

In seguito verrà descritto il modello visco-iperelastico adottato per la caratterizzazione del comportamento dell'albero polmonare, focalizzando l'attenzione sul fitting di tale modello con i dati sperimentali sfruttando il software MATLAB® e sull'impiego di un'analisi degli elementi finiti per validare l'approccio computazionale impiegato.

1.3 Outline

Capitolo 2 - Contesto anatomico e fisiologico - In questa sezione viene descritto nel dettaglio l'apparato respiratorio equino dal punto di vista anatomico e funzionale, fornendo le informazioni necessarie per valutare correttamente le proprietà biomeccaniche sui campioni oggetto di analisi.

Capitolo 3 - Studi biomeccanici - In questa sezione vengono illustrati i concetti biomeccanici fondamentali, le definizioni operative e le problematiche specifiche relative alla caratterizzazione meccanica dei tessuti biologici molli. Si offre anche un quadro generale sulla teoria costitutiva iperelastica per lo studio dei tessuti molli, focalizzandosi sulla formulazione impiegata per descrivere materiali compositi a fibre rinforzati con comportamento viscoelastico.

Capitolo 4 - Setup sperimentale - Vengono descritti i protocolli di raccolta e preparazione dei campioni, con particolare attenzione alle apparecchiature utilizzate e al metodo di acquisizione e di analisi dei risultati. Viene inoltre descritto l'innovativo sistema di afferraggio che permette di effettuare i test uniassiali preservando la struttura cilindrica dei campioni bronchiali.

Capitolo 5 - Risultati e discussione - Presenta un'analisi delle caratteristiche meccaniche e dei risultati ottenuti attraverso la rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento. Viene anche inoltre mostrato il risultato dell'analisi usando il metodo degli elementi finiti implementato mediante il programma FEniCS.

Capitolo 6 - Conclusioni - Sintesi delle principali evidenze emerse dalla ricerca.

Capitolo 7 - Sviluppi futuri - Proposta di spunti per il perfezionamento della metodologia e delle possibili direzioni per ricerche future.

Capitolo 2

2 Contesto anatomico e fisiologico

Il sistema respiratorio presenta un'architettura complessa, ottimizzata per garantire un'efficiente acquisizione di ossigeno ed eliminazione di anidride carbonica, nonché per rimuovere le sostanze di scarto metabolico dal sangue e le particelle aerodisperse introdotte con la ventilazione.

L'analisi anatomica di un organo o di un sistema richiede un approccio integrato, che consideri sia gli aspetti strutturali sia quelli funzionali, al fine di stabilire le basi necessarie per una corretta valutazione clinica. È essenziale che il clinico comprenda in modo approfondito come le alterazioni dell'anatomia e della fisiologia del sistema respiratorio possano compromettere l'efficienza degli scambi gassosi, guidando così la scelta del trattamento più appropriato [9].

E' noto infatti che un'alterazione della funzionalità polmonare di grado subclinico o moderato può compromettere significativamente il metabolismo aerobico nei cavalli non solo durante l'esercizio fisico, ma anche nelle normali attività quotidiane. Inoltre è comprovato come le anomalie respiratorie rappresentino una causa frequente della sindrome da 'scarso rendimento' nel cavallo [10].

Questo capitolo si propone di delineare in modo sistematico l'architettura anatomica dell'apparato respiratorio equino, analizzando in successione: il distretto superiore (narice, faringe, laringe, trachea), l'albero tracheobronchiale e il parenchima polmonare.

L'approccio multiscala consentirà di evidenziare le caratteristiche morfologiche e citologiche fondamentali per le considerazioni meccaniche che seguiranno.

2.1 Il sistema respiratorio: componenti principali del tessuto e le loro funzioni

A fini descrittivi generalmente il sistema respiratorio viene suddiviso in vie aeree superiori e vie aeree inferiori. Questa discriminazione è dovuta principalmente a differenze citologiche e strutturali dei tessuti che costituiscono le vie aeree e di solito si considera come punto di distinzione l'ingresso della trachea.

Un'ulteriore classificazione, che si incentra sulla funzione dei vari organi del sistema respiratorio, è quella tra la porzione di conduzione, che si estende dalla trachea ai bronchioli terminali, e la porzione di scambio gassoso costituito dai bronchioli respiratori e dagli alveoli [11].

Si può immaginare il sistema respiratorio come un lungo 'tubo' che si estende longitudinalmente dalle narici fino alle diramazioni bronchiali, terminando negli alveoli polmonari. Considerando la sezione trasversale, si può distinguere una porzione dorsale, ventrale e laterale (Figura 2.1).

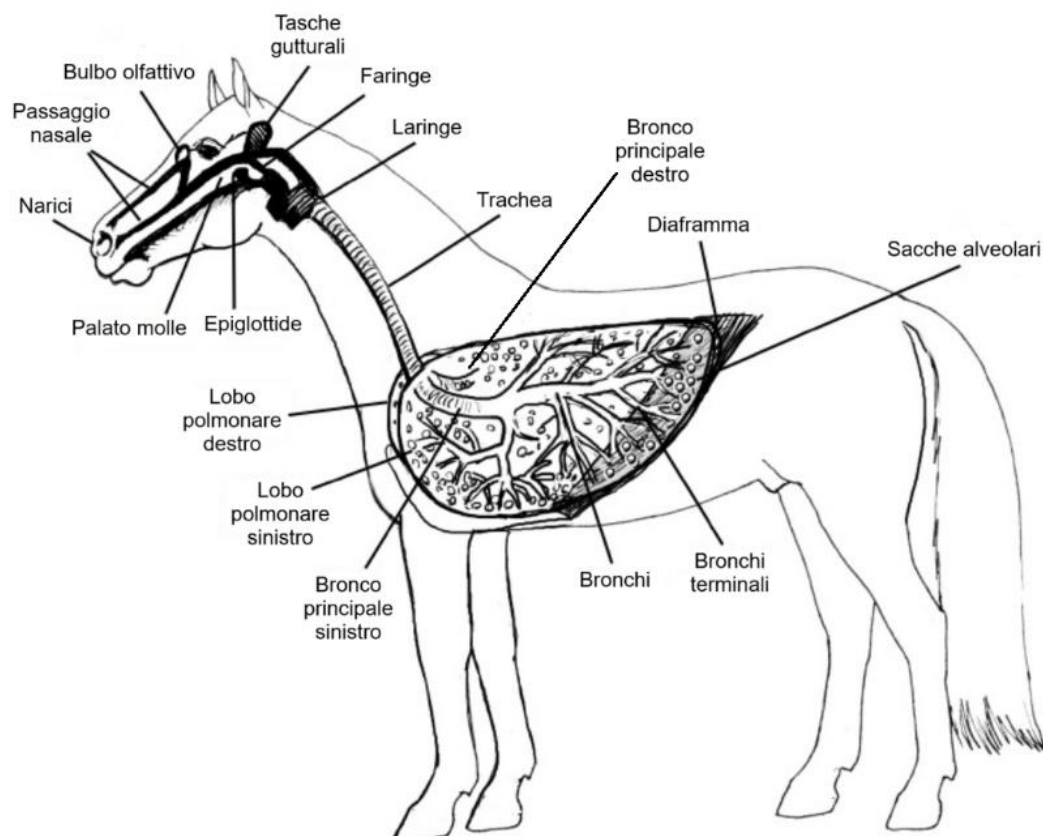


Figura 2.1: Diagramma del sistema respiratorio equino (adattata da “*Illustrated Atlas of Clinical Equine Anatomy and Common Disorders of the Horse*”).

La parete di questo ‘tubo’ può essere descritta come una struttura stratificata a sezione cilindrica contenente diverse tipologie di tessuti differenti. Per valutare la distribuzione e l’organizzazione spaziale dei diversi componenti tissutali, si è soliti eseguire degli esami di tipo istologico, ovvero si analizzano dei campioni cellulari e tissutali, i quali vengono opportunamente sezionati e fissati per non alterare la struttura fisiologica e per evitare la digestione da parte di enzimi e batteri. La fissazione viene solitamente effettuata tramite l’uso di metodologia chimiche, immergendo il campione in un agente stabilizzante o reticolante e successivamente includendolo in un mezzo solido, come per esempio paraffina o resine plastiche. Dal momento che la maggior parte dei tessuti è incolore, si utilizzano dei coloranti che possono essere più o meno selettivi in accordo al grado di pH del campione stesso. Queste tecniche permettono di ottenere informazioni sull’organizzazione delle cellule e delle componenti strutturali che costituiscono il campione [12]. Inoltre tramite studi di tipo immunochimico e istologico è possibile identificare pattern specifici oppure correlare la presenza di collagene o elastina con le proprietà biomeccaniche del tessuto. Difatti le proprietà meccaniche di un materiale sono il risultato della sua costituzione interna, che comprende la distribuzione, l’orientazione e l’interconnessione dei suoi componenti. Esaminando la microstruttura del tessuto, è possibile quindi interpretare meglio i fattori che determinano una risposta meccanica piuttosto che un’altra, quando esso è soggetto all’applicazione di una forza.

La citologia della parete dell’albero polmonare è oggetto di studio da molti anni [13] sia in modelli umani sia animali, per via del fatto che la sua alterazione è strettamente correlata con l’insorgenza di numerose patologie respiratorie croniche [6] [14] [15] [16]. Partendo dalla regione che identifica il lume, gli strati che definiscono la parete delle vie aeree sono l’epitelio, la membrana basale, la lamina propria, la submucosa, la cartilagine e l’avventizia.

I primi tre strati, ovvero l'epitelio, la membrana basale, la lamina propria, sono spesso raggruppati e definiti con il termine mucosa e rappresentano il rivestimento più interno delle vie aeree. La submucosa si presenta, invece, come uno strato più morbido, spesso e debolmente connesso, ricco di elastina e collagene, e caratterizzato dalla presenza della muscolatura liscia nella parte più esterna [17]. Il confine tra la mucosa e la sottomucosa è compreso quindi tra la lamina propria e le cellule della muscolatura liscia, indicato dalla linea nera continua in figura 2.2.

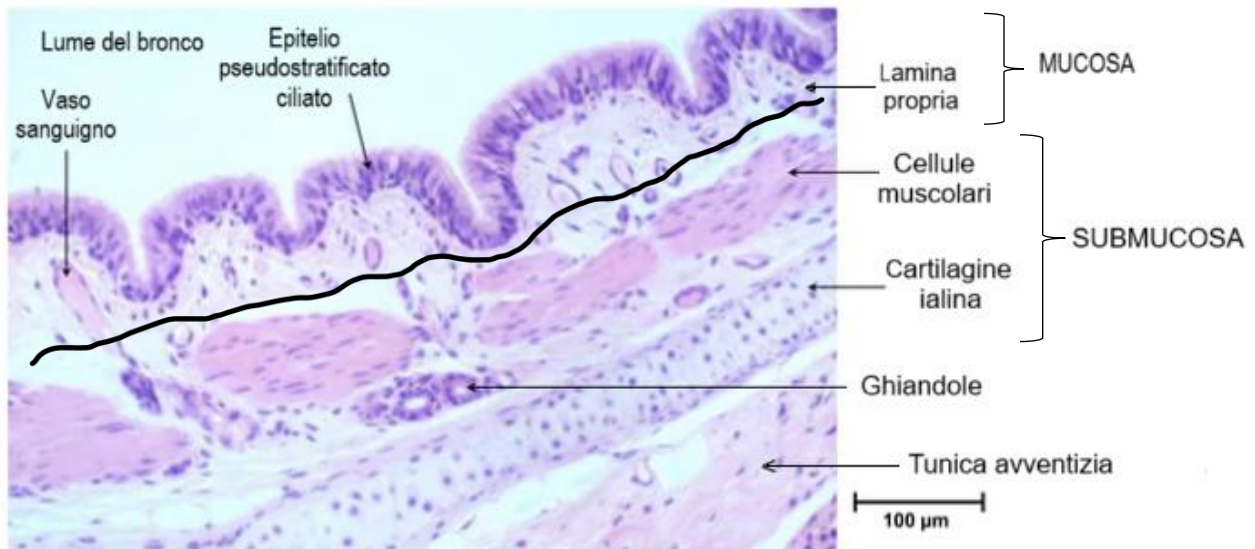


Figura 2.2: Parete del bronco intraparenchimale.

L'epitelio è lo strato che si trova in diretto contatto con il lume del tratto respiratorio e viene definito come un epitelio colonnare pluristratificato ciliato di rivestimento. Nonostante le cellule siano tutte a contatto con la membrana basale e formano, quindi, un singolo strato di cellule, i loro nuclei non sono allineati sullo stesso piano. Pertanto, sembra che siano presenti diversi strati di cellule, da qui l'aggettivo pseudostratificato, ovvero falsamente stratificato (Figura 2.3). All'interno dell'epitelio si trovano le cellule caliciformi, le quali presentano una forma a calice e sono responsabili della produzione e secrezione di muco che funge da lubrificante protettivo della superficie epiteliale.

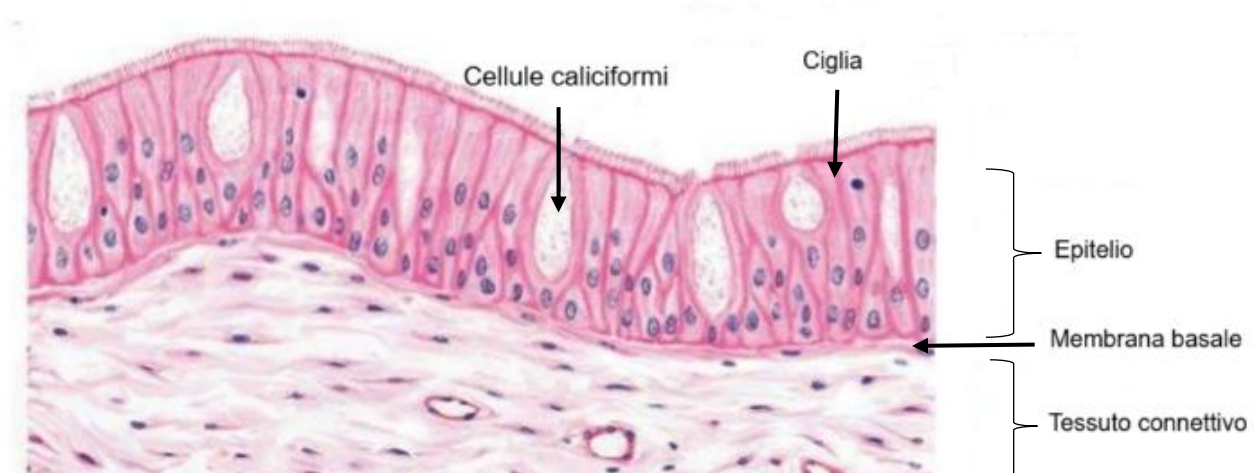


Figura 2.3: Epitelio pseudostratificato, in evidenza sia le cellule caliciformi e sia le ciglia.

La membrana basale è una struttura specializzata della matrice extracellulare e si interpone tra il tessuto epiteliale e il tessuto connettivo e può essere a sua volta decomposto in tre strati (Figura 2.4):

- I. Lamina lucida è occupata principalmente da glicoproteine extracellulari di adesione come la laminina, la quale lega da un lato recettori integrinici transmembrana e distroglicani, entrambi sporgenti sul versante basale delle cellule epiteliali, e dall'altro i proteoglicani, i glicosamminoglicani (GAGs) e il collagene di tipo IV della lamina densa;
- II. Lamina densa è formata da proteoglicani, GAGs liberi e soprattutto da collagene di tipo IV che non forma fibre ma una sottile e resistente rete, grazie al fatto che non vengono rimossi i peptidi terminali in sede extracellulare, come accade agli altri tipi di collagene;
- III. Lamina fibroreticolare è costituita da fibre reticolari di collagene di tipo III e non contiene proteoglicani. Le fibrille di collagene di tipo VII connettono invece il collagene di tipo IV della lamina densa alla lamina fibroreticolare ancorandola ad essa. A questo legame concorrono anche i gruppi basici delle fibre collagene, che formano legami con i gruppi acidi dei GAGs della lamina densa.

La lamina fibroreticolare è sintetizzata dai fibroblasti, a differenza delle lamine lucida e densa, sintetizzate dalle cellule epiteliali. Per via del suo limitato spessore, compreso tra 70 e 300 nm, e per via della sua organizzazione, esso può essere considerato come un network randomico di fibre di collagene e GAGs.

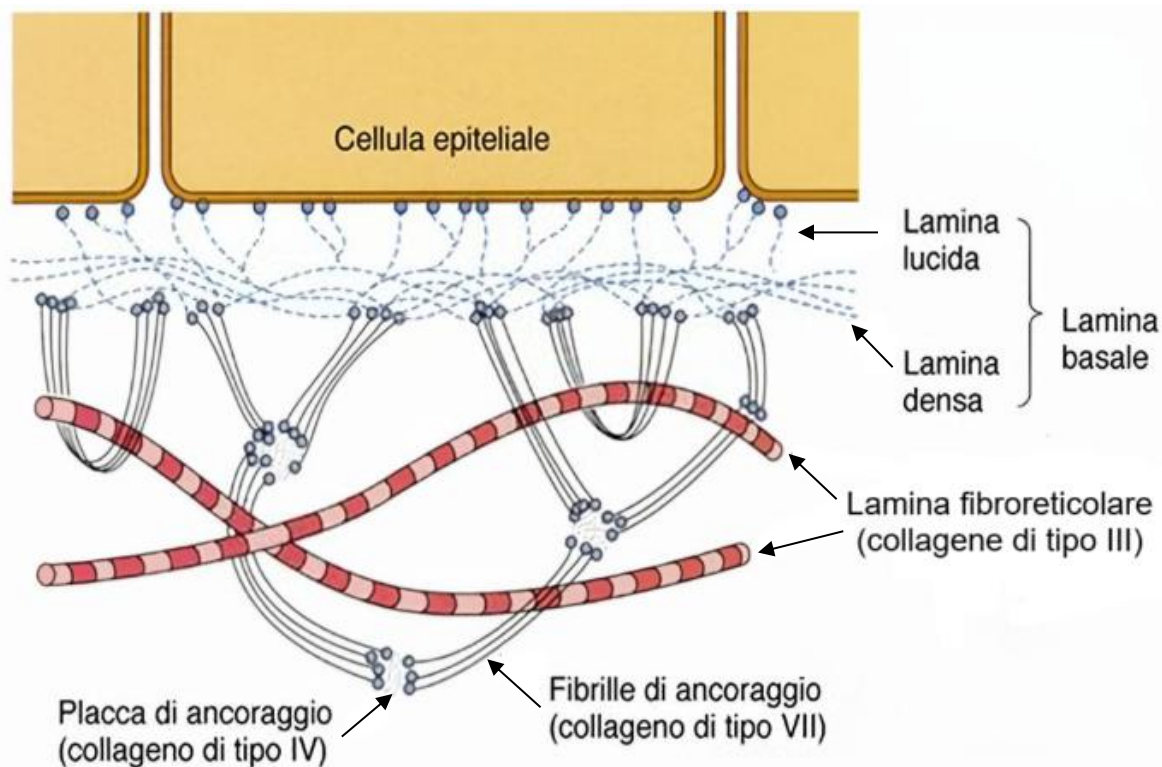


Figure 2.4: Rappresentazione grafica della struttura della membrana basale.

La lamina propria è uno strato di tessuto connettivo lasso, altamente vascolarizzato e le cui due funzioni principali sono di fornire nutrienti all'epitelio e di contribuire ad ancorare l'epitelio ai tessuti sottostanti.

La submucosa è uno strato di tessuto connettivo ricco di fibre di collagene ed elastina che funge da scaffold per le strutture vascolari, nervose e ghiandolari [11]. Le fibre di collagene sono organizzate in fasci di fibrille di tropocollagene disposti a tripla elica; per via della sua conformazione macromolecolare, simile ad una fune, conferisce al tessuto flessibilità, quando è arrotondato, ed elevata resistenza, quando è sottoposto a trazione. Le fibre di elastina, invece, derivano dalla polimerizzazione di monomeri di tropoelastina con successiva formazione di un core amorfo di elastina polimerizzata insolubile. In assenza di sollecitazioni meccaniche il network di fibre di elastina presenta una configurazione randomica, mentre a seguito dell'applicazione di una forza le fibre tendono ad allinearsi secondo un'orientazione preferenziale. In sintesi queste due famiglie di fibre connettive tra loro complementari regolano il comportamento meccanico delle vie aeree: le fibre di elastina conferiscono elasticità ai tessuti polmonari permettendo il ritorno elastico delle vie respiratorie, mentre le fibre di collagene, con il loro modulo elastico più elevato, prevengono l'iperestensione preservando l'integrità strutturale dei tessuti [8].

La muscolatura liscia si presenta sotto forma di fasci continui di fibrille muscolari, la cui disposizione ed orientazione cambia in modo significativo a seconda del tratto dell'albero polmonare considerato. Il ruolo fondamentale della muscolatura liscia è quello di contrarsi ed in questo modo deformare la membrana mucosa, permettendo al flusso d'aria di percorrere le vie aeree superiori e giungere agli alveoli polmonari [11].

La tunica avventizia è tipicamente un tessuto connettivo irregolare che forma connessioni tra l'apparato respiratorio e le strutture circostanti. Nei polmoni, l'avventizia è sostituita dalla sierosa [11].

E' opportuno osservare che tale suddivisione non è costante e netta in quanto l'organizzazione, la composizione e lo spessore di questi strati può variare in relazione a diversi fattori come la localizzazione del tessuto, la funzione che l'organo in questione deve svolgere oppure semplicemente la specie animale considerata [17]. In seguito verranno evidenziate le principali differenze morfologiche e strutturali della parete del sistema respiratorio che si possono osservare a partire dalla vie aeree superiori fino a quelle inferiori.

2.2 Narice e cavità nasali

La funzione principale delle vie aeree è quella di trasportare l'aria dalle narici alle regioni polmonari deputate allo scambio gassoso durante l'inspirazione e viceversa durante l'espirazione. Le narici equine differiscono considerevolmente rispetto a quelle di altri grandi animali domestici per via della sua conformazione notevolmente allungata in confronto al resto della testa. Le narici sono ampie, mobili e flessibili. La loro particolare struttura permette l'espansione durante l'inspirazione, con l'attivazione dei muscoli che determinano la loro dilatazione e il collasso del diverticolo nasale. A riposo, la narice ha una forma a virgola, ma può facilmente allargarsi in diametro fino a diventare una struttura circolare, come per esempio durante l'esercizio fisico [10].

La cavità nasale è divisa in due parti (sinistra e destra) dal setto nasale, il quale è in gran parte cartilagineo, ma diventa più osseo caudalmente. Il lume nasale è sostanzialmente ristretto da strutture secondarie dette lamine che aumentano significativamente l'area di contatto con la mucosa, formando le conche nasali. In particolar modo si hanno la grande conca dorsale e ventrale, e la conca media molto più piccola, che sono estensioni dell'osso mascellare, e la conca etmoidale, estensione dell'osso etmoidale. La loro funzione non è ancora completamente compresa, ma è probabile che svolgano un ruolo nel ridurre il peso della testa, nella risonanza e nella protezione termica e meccanica delle strutture sottostanti.

L'unione delle conche nasali porta alla formazione di tre passaggi separati per il flusso d'aria, denominati meato dorsale, medio e ventrale, i quali si fondono medialmente lungo il setto nasale nel meato comune. Il meato ventrale e quello comune sono le principali vie di passaggio dell'aria, mentre il meato dorsale conduce una frazione dell'aria oltre il sistema olfattivo, e il meato medio contiene l'apertura per il sistema dei seni paranasali. I seni sono rivestiti di mucosa e l'aumentata superficie mucosale può anche contribuire a umidificare e filtrare l'aria in ingresso; tuttavia, gli stretti passaggi nel sistema sinusale limitano il flusso d'aria effettivo [11]. Ulteriori strutture esterne di rilevanza clinica includono l'apparato del seno paranasale, i molari superiori, i muscoli masticatori e facciali, i nervi, i vasi e il tessuto connettivo (Figura 2.5).

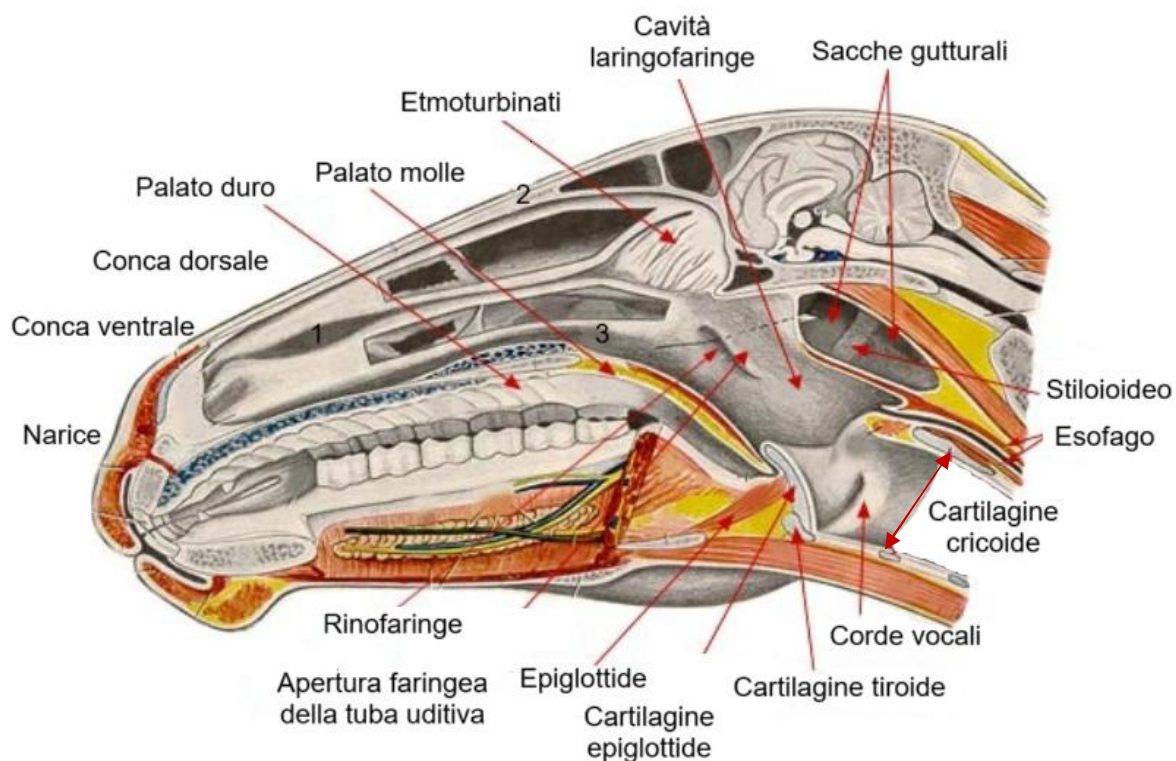


Figure 2.5: L'immagine illustra l'anatomia assiale del distretto cranio-cervicale equino, con particolare riferimento alle strutture delle vie aeree nasali. Sono inoltre indicati con 1: meato mediale; 2: meato dorsale; 3: meato ventrale.

In sintesi si può affermare che l'apparato sinusale è un sistema complesso di cavità interconnesse nelle ossa craniche e nelle conche. E' riccamente vascolarizzate da arteriole e venule che irrorano i letti capillari situati sotto la superficie della mucosa nasale, consentendo sia il condizionamento dell'aria che entra nel sistema respiratorio, sia la termoregolazione in situazioni come l'esercizio intenso, quando la temperatura corporea si alza. I seni vascolari delle vie nasali sono riccamente innervati dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico e possono influenzare la resistenza nasale dilatando o restringendo i passaggi. La regolazione del volume sanguigno nasale permette sia un rapido aumento del flusso d'aria necessario durante l'esercizio, sia il controllo della temperatura o dell'umidità dell'aria inspirata o espirata dall'animale. I cornetti nasali fungono anche da filtro per le particelle, aumentando la turbolenza dell'aria che attraversa le vie nasali [9] [10]. Le caratteristiche superficiali e gli aspetti istologici dell'epitelio del sistema respiratorio superiore equino sono stati esaminati mediante degli studi al microscopio elettronico a

scansione [18] rivelando che l'epitelio che riveste le vie nasali è principalmente di tipo respiratorio, pseudostratificato e cilindrico, con molte cellule mucipare e ghiandole sottomucose, ad eccezione fatta della porzione rostrale del naso in cui l'epitelio risulta squamoso stratificato e cheratinizzato, con follicoli piliferi, ghiandole sudoripare e sebacee.

2.3 Faringe

Procedendo caudalmente, al termine della cavità nasale, la successiva sezione respiratoria è la faringe. La faringe è divisa in tre parti: la rinofaringe dorsale, l'orofaringe ventrale e la laringofaringe ventro-caudale. Tra queste, il rinofaringe e la laringofaringe sono considerate parte dell'apparato respiratorio. Esiste una netta demarcazione, quasi orizzontale, tra la parte superiore e quella inferiore dello spazio faringeo, formata dal palato molle frontalmente e dagli archi palatofaringei lungo le pareti laterali, che culminano caudalmente all'ingresso dell'esofago (Figura 2.6).

Nella faringe, il tessuto linfatico associato alla mucosa è distribuito sulla superficie mucosa e si aggrega nelle tonsille faringee e nei follicoli tonsillari situati sulla parete caudo-dorsale e nelle tonsille palatine in prossimità delle inserzioni laterali del palato molle [11].

Le strutture laringee, ovvero le cartilagini cornicolate e l'epiglottide, si articolano con l'ostio come un bottone in un'asola, formando una chiusura ermetica quando il cavallo respira. Questa peculiare disposizione spiega perché il cavallo, a differenza di esseri umani e cani, respiri esclusivamente per via nasale, impedendogli di passare dalla respirazione nasale a quella oronasale quando la resistenza nasale al flusso d'aria diventa troppo elevata, come accade durante l'iperpnea indotta dall'esercizio fisico [9].

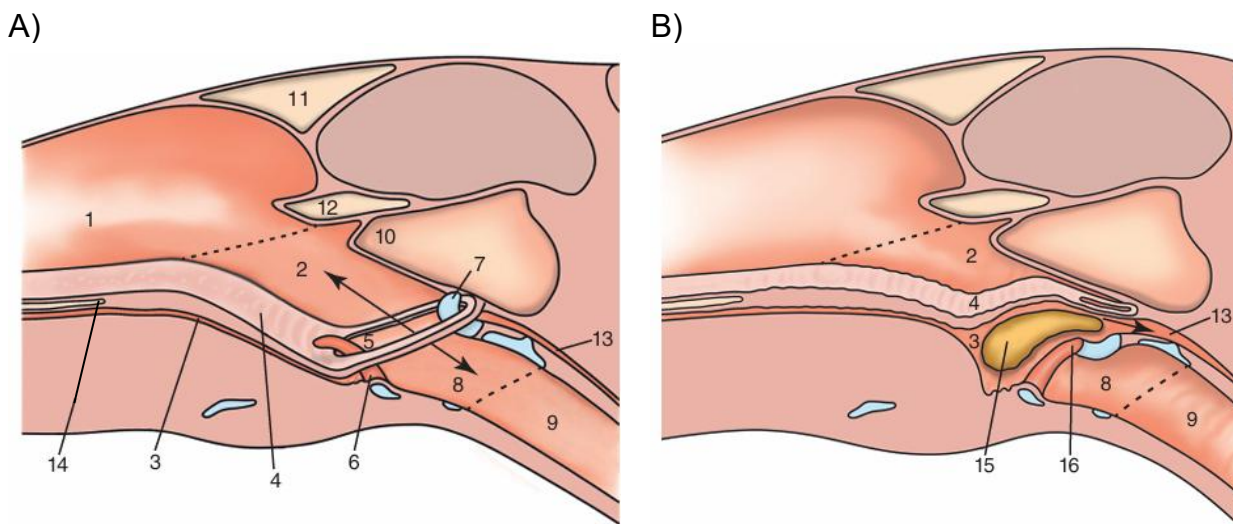


Figura 2.6: Vista laterale dell'area faringolaringea durante (A) respirazione normale, (B) deglutizione. Sono indicati rispettivamente: 1: cavità nasale; 2: rinofaringe; 3: orofaringe; 4: palato molle; 5: ostio intrafaringeo ("asola"); 6: epiglottide; 7: cartilagine corniculata; 8: laringe; 9: trachea; 10: tasca gutturale; 11: seno frontale; 12: seno sfenopalatino; 13: esofago; 14: lingua; 15: bolo alimentare; 16: laringe chiusa (adattata da [10]).

2.4 Laringe

La laringe collega la faringe alla trachea, è attaccata alla lingua e all'apparato ioideo, che lo mantiene sospesa sotto la base cranica dunque qualsiasi movimento della lingua o dell'apparato ioideo modifica anche la posizione della laringe. La laringe è costituita da diverse cartilagini laringee quali la cartilagine epiglottica, la cartilagine cricoidea e la cartilagine tiroidea, le cartilagini aritenoidi pari che circondano il lume laringeo (Figura 2.5).

La cartilagine epiglottica è molto distinguibile data la sua forma a 'foglia' e sporge nella faringe da una posizione ventrale. Dietro l'epiglottide, la cartilagine tiroidea forma la parte ventrale e laterale della laringe insieme alle cartilagini aritenoidee inserite in posizione più dorsale. Infine la cartilagine cricoidea forma un anello caudale quando la laringe si inserisce sulla trachea (Figura 2.7).

Le inserzioni all'interno e intorno alla laringe includono un gran numero di muscoli, legamenti, membrane, nonché tre articolazioni sinoviali quali l'articolazione tiroioidea, l'articolazione cricotiroidea e l'articolazione cricoaritenoidea. Tra le articolazioni, l'articolazione cricoaritenoidea è la più importante nella regolazione delle dimensioni dell'apertura di ingresso nella laringe. I legamenti elastici collegano le cartilagini tra loro e alla trachea, oltre a formare le corde vocali e le pliche vestibolari visibili quando si esamina il lume laringeo. I muscoli laringei si dividono in muscoli intrinseci ed estrinseci. I muscoli intrinseci controllano la posizione relativa delle cartilagini tra loro, contribuendo così a controllare la forma e le dimensioni dello spazio laringeo, mentre i muscoli estrinseci, quali sternotiroideo, tiroioideo e ioepiglottico, collegano la laringe alle strutture circostanti (sterno, faringe, osso ioide) e ne regolano la posizione durante la deglutizione, la fonazione e la respirazione. Le funzioni principali delle strutture laringee sono dunque la produzione di suoni e la protezione delle vie aeree inferiori quando l'animale deglutisce, dal momento che l'anatomia dell'epiglottide e delle strutture faringee circostanti assicura che i materiali alimentari solidi e i liquidi vadano nell'esofago. [11].

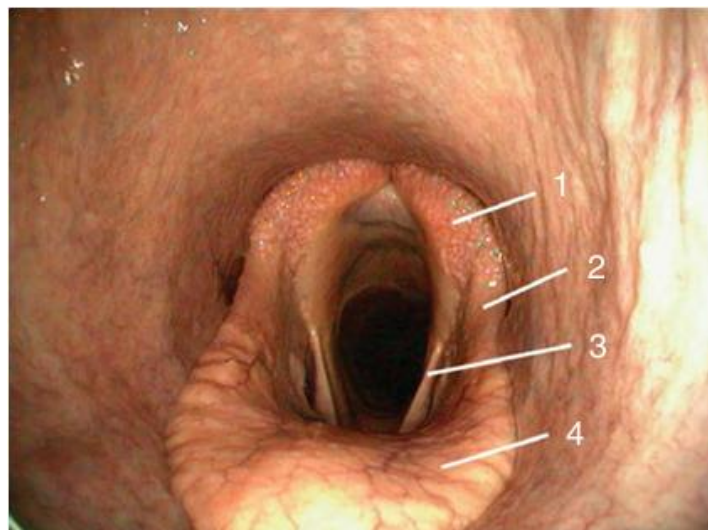


Figura 2.7: Immagine endoscopica di una laringe sana equina. Sono indicati rispettivamente 1: cartilagini aritenoidee; 2: piega ariepiglottica; 3: corda vocale; 4: epiglottide (adattata da [11]).

2.5 Trachea

La trachea equina è un lungo tubo flessibile lungo 70-80 cm, la cui sezione trasversale è pressoché circolare prossimalmente e distalmente (diametro trasversale 5,5 cm; diametro sagittale 5 cm), ma è più appiattita dorsoventralmente (diametro trasversale 7 cm, diametro sagittale 5 cm) tra i due estremi. La parete della trachea è costituita dallo strato mucosale, il quale contiene un gran numero di ghiandole responsabili della produzione e secrezione del muco che, insieme alle cellule ciliate, cattura e trasporta le particelle verso l'alto e all'esterno delle vie aeree [10]. La mucosa è a sua volta circondata da anelli cartilaginei di ialina a forma di C. Le estremità libere di questi anelli, il cui numero può variare da 48-60, si sovrappongono nella parte cervicale della trachea, ma non in quella toracica in cui sono presenti delle placche di cartilagine disposte longitudinalmente per garantire maggiore

stabilità alla trachea. Nella parte dorsale della struttura si trova il muscolo trachealis responsabile della contrazione della mucosa e i cui fasci muscolari sono orientati trasversalmente rispetto all'asse longitudinale della trachea [19]. Esso è rivestito da uno strato di tessuto connettivo, funge da collegamento con le parte terminali e dorsale degli anelli di cartilagine. Infine nella parte cervicale l'ultimo strato che avvolge l'intera trachea è rappresentato dalla tunica adventitia, uno strato connettivo fibroso, mentre nella parte toracica si ha la tunica serosa, costituita da due strati mesoteliali al cui interno si può osservare uno strato di tessuto connettivo (Figura 2.8) (Figura 2.9) [11].

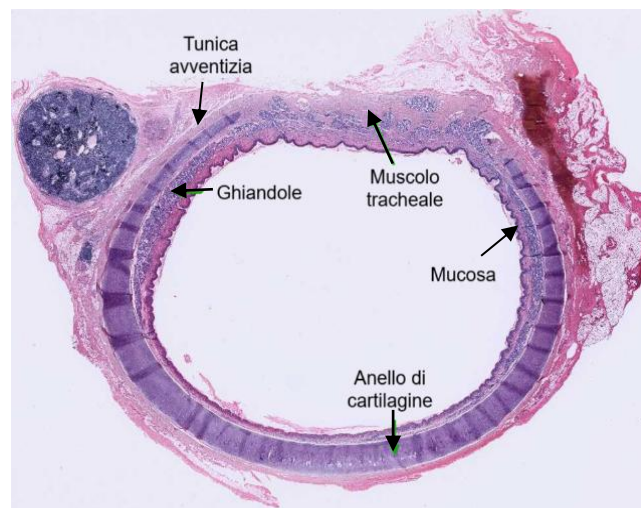
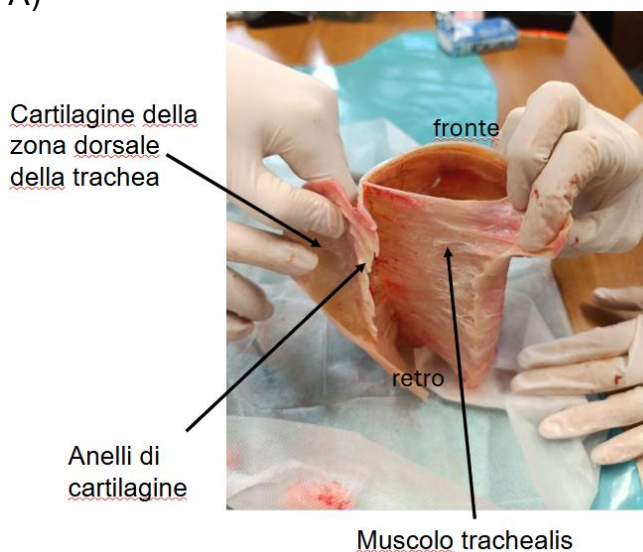


Figura 2.8: Trachea (sezione trasversale).

La disposizione e la presenza del muscolo tracheale riveste un ruolo fondamentale nel definire le proprietà biomeccaniche della trachea, distintive rispetto ai bronchi o bronchioli, e a ridurre la sua cedevolezza, e quindi la sua collassabilità, dovuta all'elevata pressione transmurale compressiva che si verifica durante l'inspirazione forzata e allo stiramento di testa e collo indotto dall'esercizio.

A)



B)



Figura 2.9: Campione di trachea equina della zona toracica aperto dorsalmente per mostrare il muscolo trachealis (A); Campione di muscolo trachealis estratto (B).

2.6 Bronchi

Dopo la biforcazione della trachea nei bronchi principali destro e sinistro, l'albero bronchiale si ramifica più volte verso la periferia polmonare attraverso i bronchi primari, i bronchi segmentali, i bronchioli e i bronchioli terminali. A differenza della trachea, a partire dai bronchi principali si ha una progressiva riduzione della componente cartilaginea a favore di quella muscolare. Infatti gli anelli tracheali di cartilagine vengono sostituiti da placche irregolari disposte secondo un pattern elicoidale e di dimensioni sempre più ridotte man mano che la sezione del bronco diminuisce (Figura 2.10). In particolare la perdita totale della cartilagine nella parete bronchiale segna la transizione da bronchi a bronchiolo. Per quanto concerne la muscolatura liscia, essa forma uno strato che avvolge l'intera circonferenza del bronco, con una disposizione dei fasci muscolari a doppia elica con angoli compresi tra $\pm 20^\circ$ rispetto all'asse longitudinale della porzione di via aerea considerata.

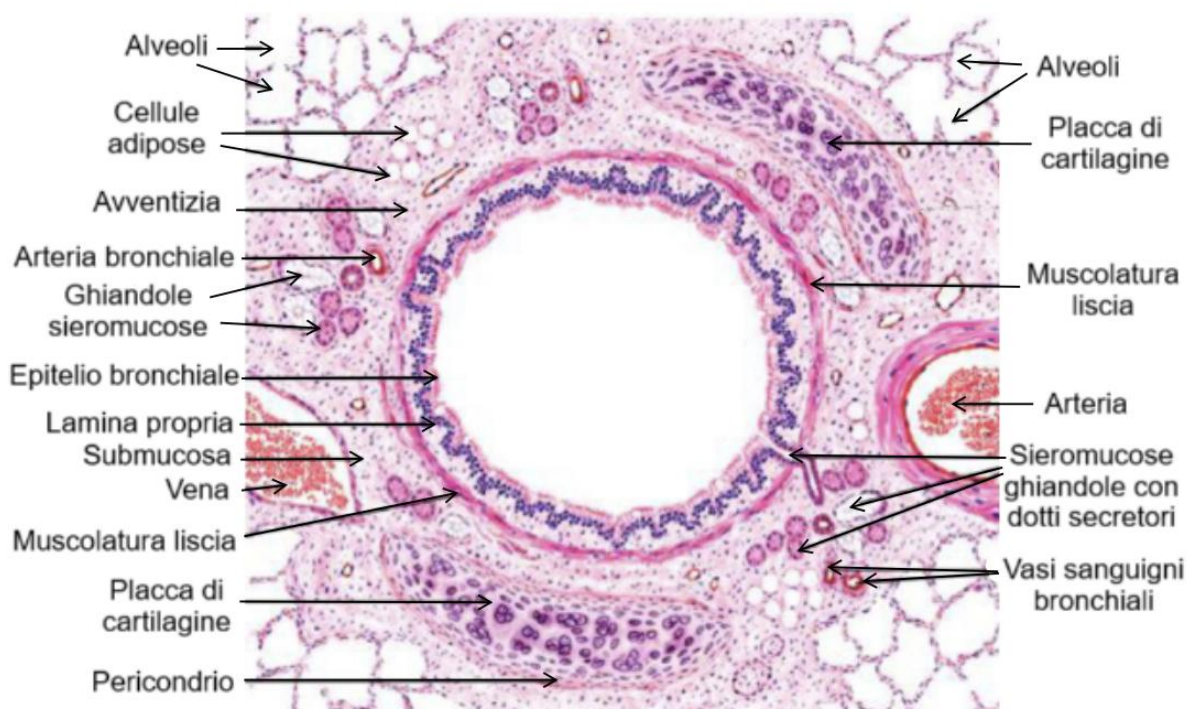


Figura 2.10: Bronco intraparenchimale (sezione trasversale).

Anche le vie aeree intratoraciche sono suscettibili al collasso quando la pressione trasmurale esercitata sulle loro pareti è compressiva, motivo per cui la presenza delle placche cartilaginee conferisce una maggiore rigidità e stabilità all'intera struttura. Ciò risulta vero anche a livello delle piccole vie aeree, che non hanno supporto cartilagineo. Tuttavia, a differenza delle vie aeree extratoraciche, dove il collasso dinamico parziale si verifica solo durante l'inspirazione, il collasso delle piccole vie aeree si verifica solo durante l'espirazione forzata, ovvero quando la pressione extraluminale è più positiva di quella intraluminale [9].

La ramificazione intralobulare nel cavallo è pseudodicotomica, con biforcazioni prevalentemente asimmetriche. I polmoni umani e di primati mostrano ramificazioni più simmetriche, mentre cani, ratti e conigli hanno ramificazioni monopodali, con notevoli differenze di dimensioni e angoli rispetto alla via aerea genitrice. Il numero di ramificazioni distali alla trachea varia significativamente tra specie, tra lobi polmonari e in base allo sviluppo delle scissure pleuriche. I primati hanno circa 12-14 generazioni bronchiali, mentre cavalli e cani possono averne 38-43. Le vie aeree più distali, invece, presentano angoli più

acuti [9]. Con il progredire delle generazioni delle vie aeree, il diametro e la lunghezza individuali delle vie aeree diminuiscono, ma l'area trasversale totale aumenta, di conseguenza, la velocità e la turbolenza del flusso d'aria diminuiscono nelle vie aeree distali o avvicinandosi alla regione degli scambi gassosi. La geometria complessiva dell'albero bronchiale garantisce un trasporto efficiente dei gas, utilizzando il minimo volume tissutale possibile nel torace, massimizzando così lo scambio gassoso negli alveoli.

2.7 Parenchima polmonare

Le vie aeree distali vanno incontro a numerose ramificazioni, tali per cui il lume dell'albero respiratorio si restringe sempre di più attraverso i bronchioli terminali, i bronchioli respiratori e terminando nei dotti alveolari, nelle sacche alveolari e nell'interstizio cellulare e non cellulare. I bronchioli respiratori, i dotti e le sacche alveolari costituiscono il luogo dell'apparato respiratorio deputato allo scambio gassoso e viene anche definito parenchima polmonare (Figura 2.11).

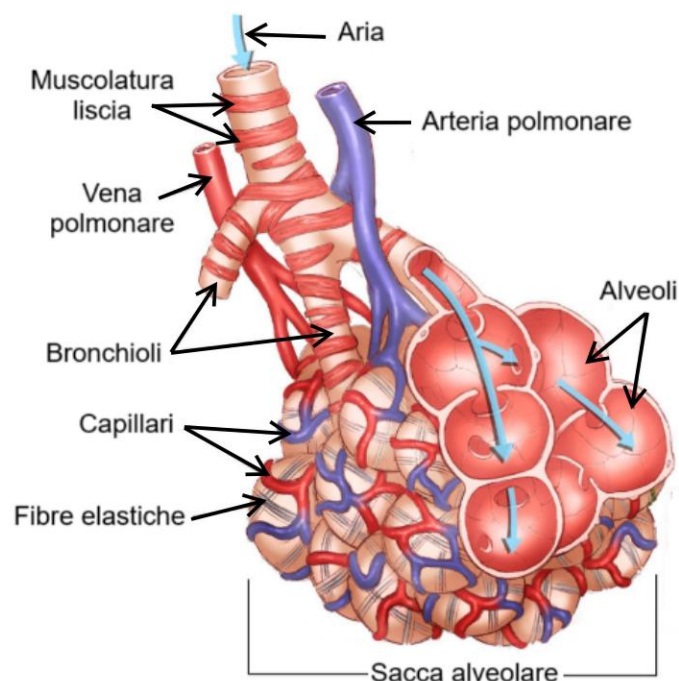


Figura 2.11: Bronchi respiratori, sacca alveolare (sezione trasversale) con alveoli.

Dal punto di vista della struttura della parete, a partire dai bronchioli terminali e avanzando verso i dotti alveolari la componente muscolare viene persa, facendo in modo che la parete sia costituita solo da mucosa, il cui strato epiteliale cambia da cilindrico cigliato a cuboide non cigliato (Figura 2.12).

Dal momento che i bronchioli respiratori equini non sono molto sviluppati in quanto costituiti da tessuto epiteliale interrotto da tessuto alveolare, la gran maggioranza degli scambi gassosi avviene a livello dell'unità alveolo-capillare, poiché ben strutturata e avente una densità superficiale alveolare elevata e proporzionale a quella capillare.

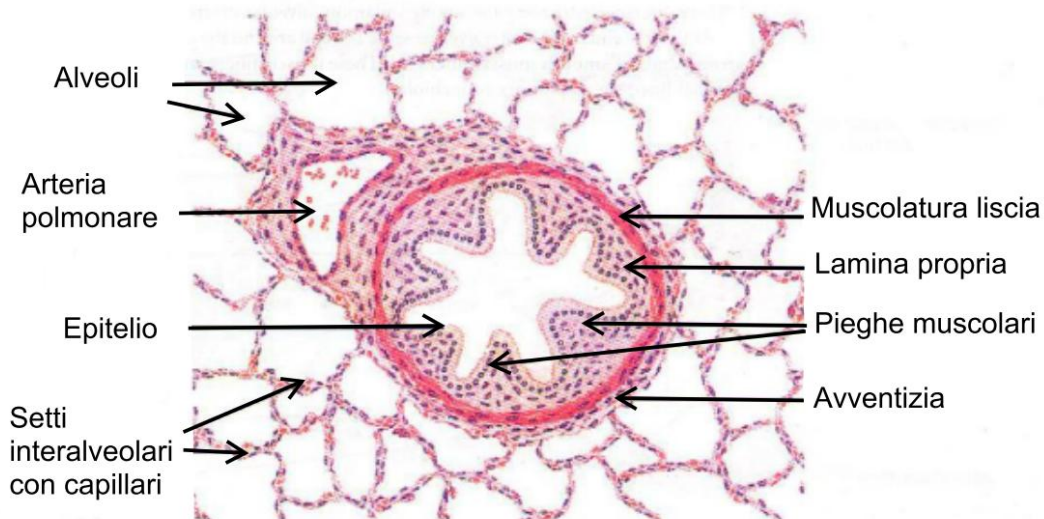


Figura 2.12: Bronchiolo terminale (sezione trasversale).

Il polmone equino è altamente efficiente e rappresenta circa l'1% del peso corporeo, presenta almeno 107 alveoli e probabilmente 1000 volte di più segmenti capillari. Sebbene esso non sia realmente diviso in lobi da scissure, viene di solito suddiviso in un lobo apicale, un lobo diaframmatico e un lobo accessorio nel polmone destro e un lobo apicale e un lobo diaframmatico nel polmone sinistro (Figura 2.13). Sono ricoperti da una spessa pleura e i setti di tessuto connettivo tra i lobuli non sono completi. Ciò consente una certa ventilazione collaterale, ovvero il trasferimento di aria tra lobuli adiacenti attraverso vie accessorie come i pori interalveolari di Kohn, i canali di Lambert e i bronchioli respiratori comunicanti e i dotti alveolari, che può risultare vantaggioso nel caso di patologie ostruttive delle piccole vie aeree, condizione a cui gli equini soprattutto in tarda età sono solitamente soggetti [10].

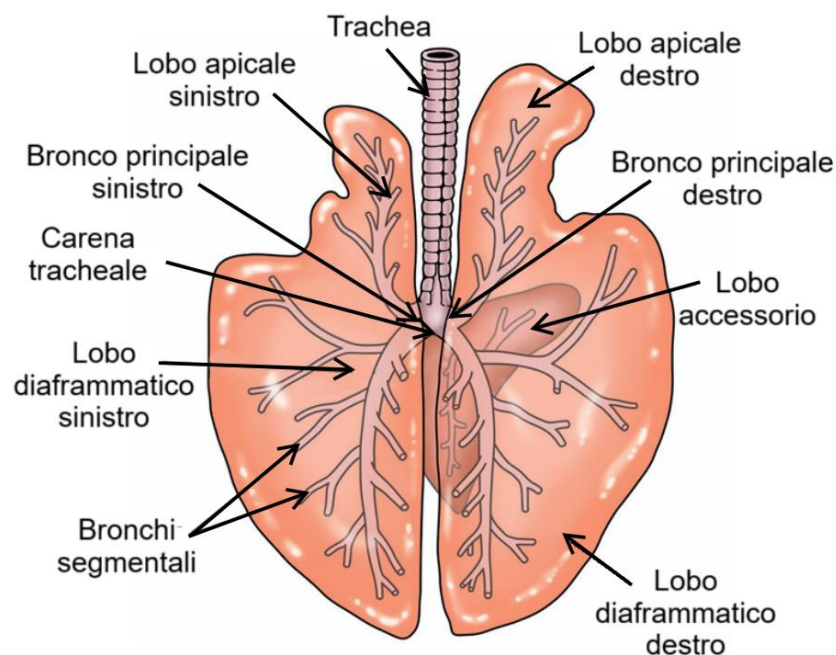


Figura 2.13: Illustrazione anatomica di un polmone equino (adattata da [10]).

La barriera alveolo-capillare in cui avviene lo scambio è composta dalle cellule epiteliali alveolari di tipo I e II rivolte verso il lume alveolare, appoggiate su una membrana basale non cellulare fusa, formata dalle membrane basali dell'epitelio alveolare e dell'endotelio capillare, il quale è interposto tra gli strati epiteliali. Le cellule alveolari di tipo I costituiscono la maggior parte della superficie alveolare e rappresentano la barriera primaria per gli scambi gassosi, le cellule di tipo II secernono uno strato surfattante che modifica la tensione superficiale degli alveoli e svolgono un ruolo immunomodulatorio ed infine le cellule endoteliali capillari facilitano gli scambi gassosi e metabolizzano sostanze bioattive. Altre cellule rilevanti, associate all'endotelio capillare, sono i macrofagi intravascolari polmonari, che fungono da filtro per i composti dannosi come i batteri (Figura 2.14).

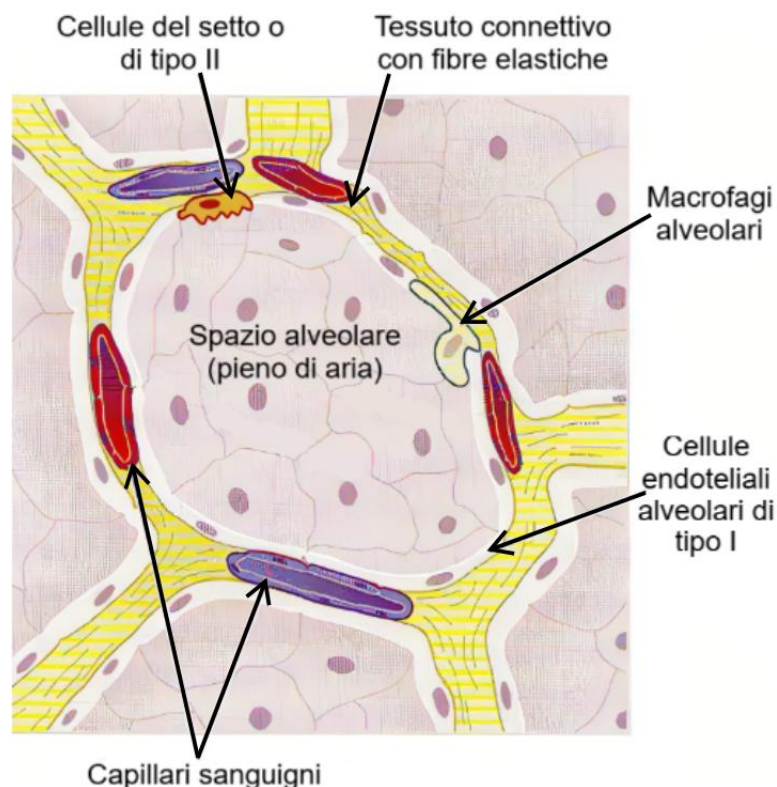


Figura 2.14: Struttura interna di un alveolo polmonare.

La distribuzione del flusso di aria attraverso l'albero bronchiale fino alveoli non è uniforme, anche nei cavalli sani. Questo è dovuto principalmente a due motivi. Il primo è che le variazioni di pressione intrapleurica non sono uniformi in tutto il torace e a causa degli effetti gravitazionali, la pressione è più negativa nella parte dorsale rispetto a quella ventrale del polmone. Questo comporta che gli alveoli dorsali siano più distesi, conseguentemente meno complianti, e ricevono quindi meno aria durante l'inspirazione a qualsiasi tasso ventilatorio. Il secondo è correlato all'insorgere di alcune disuguaglianze nella resistenza delle piccole vie aeree regionali, nella compliance delle alveoli o in entrambi: tendenzialmente l'aria inalata preferenzialmente entra nelle aree dei polmoni con vie aeree a bassa resistenza e alveoli altamente complianti. Questa asincronia ventilatoria risulta moderata nei cavalli sani e non ha effetti significativi sullo scambio gassoso a basse frequenze respiratorie. Tuttavia, nei cavalli con asincronia significativa, come nel caso di patologie legate alle piccole vie aeree, e con una alta frequenza respiratoria, questa condizione può compromettere in maniera notevole lo scambio gassoso [10].

2.8 Perfusione sanguigna

Per quanto concerne la vascolarizzazione dei tessuti polmonari, si possono distinguere due tipologie di circoli, ovvero quello polmonare e quello bronchiale.

La circolazione polmonare è responsabile di trasportare il sangue deossigenato proveniente dalla circolazione sistemica mediante le arterie polmonari. In seguito alla respirazione e gli scambi gassosi a livello alveolo-capillare il sangue ossigenato viene riportato all'atrio sinistro del cuore tramite le vene polmonari.

Le arterie polmonari equine adiacenti ai bronchioli e ai dotti alveolari sono muscolari e presentano uno strato di muscolatura liscia mediale piuttosto spesso, più sottile di quello di bovini e suini, ma più spesso di quello di cani e pecore. Questa quantità di muscolatura liscia determina la reattività dei vasi all'ipossia spiegando così la predisposizione del cavallo a sviluppare ipertensione polmonare secondaria a vasocostrizione ipossica.

La circolazione bronchiale, invece, costituisce un ramo della circolazione sistemica e garantisce sangue ossigenato per il nutrimento delle vie aeree e del parenchima polmonare. Essa origina da due arterie principali che sono rispettivamente l'arteria broncoesofagea, la quale irrori le vie aeree e i setti interlobulari della maggior parte del polmone, e l'arteria bronchiale apicale destra, che irrori invece le vie aeree del lobo apicale destro. In generale le arterie bronchiali formano un complesso vascolare sottoepiteliale che permette una certa dissipazione di calore durante la respirazione.

A livello dei bronchioli terminali, la circolazione polmonare e quella bronchiale si anastomizzano. La maggior parte di queste anastomosi si verifica a livello dei capillari e delle vene piuttosto che delle arterie [10].

2.9 Cavità toracica e muscoli coinvolti nella respirazione

La cavità toracica equina presenta una forma approssimativamente triangolare ed è chiusa caudalmente dal diaframma, che la divide in due parti, ciascuna contenente un polmone.

La parete superiore è costituita dalle vertebre toraciche, dai legamenti e dai muscoli ipassiali ad esse collegati, le pareti laterali sono formate dalle 18 costole e dai muscoli intercostali, ed infine la parete inferiore è composta dallo sterno, dalle cartilagini delle coste sternali e dai relativi muscoli associati. La superficie interna delle pareti toracica è rivestita di pleura parietale.

Rispetto al torace umano, appiattito in senso dorso-ventrale, quello del cavallo è più arrotondato. Inoltre, cranialmente, il torace è compresso lateralmente per facilitare la funzione locomotoria. Le differenze nelle dimensioni, nella forma e nella posizione dell'addome rispetto ai polmoni, insieme all'elevata rigidità del torace equino, sono probabilmente vantaggiose per la locomozione e per la stabilizzazione del volume di rilassamento del sistema respiratorio durante i cambiamenti posturali.

I principali muscoli inspiratori sono il diaframma, una struttura muscolotendinea a cupola che separa l'addome dal torace, i muscoli intercostali esterni, lo sternomandibolare, lo scaleno, i quali quando si contraggono contribuiscono all'ampliamento del torace.

I principali muscoli espiratori sono i muscoli addominali (obliqui esterno e interno, trasverso e retto dell'addome, trasverso del torace) e i muscoli intercostali interni sono espiratori. La loro contrazione aumenta la pressione addominale, spingendo in avanti il diaframma rilassato e riducendo il volume toracico. Durante l'atto espiratorio rivestono importanza anche i muscoli che dilatano le narici, la faringe e la laringe, in quanto possono modificare il diametro delle vie aeree e di conseguenza il flusso di aria [10].

2.10 Respirazione equina: fisiologia e principali patologie delle vie aeree

Le vie aeree permettono lo scambio gassoso di ossigeno e anidride carbonica attraverso un processo che si articola principalmente in tre fasi: ventilazione e trasporto dell'aria dall'esterno fino alla regione bronchiale terminale, diffusione per gradiente di concentrazione parziale di O₂ e CO₂ a livello degli alveoli, ed infine, perfusione ematica ossigenazione del flusso sanguigno. Oltre la respirazione molte altre funzioni vengono svolte nelle vie aeree, tra cui l'umidificazione dell'aria, la termoregolazione e la rimozione di particelle estranee e inquinanti. Inoltre strutture anatomiche quali il rinofaringe e la laringe sono coinvolti nella deglutizione, nell'espettorazione e nella fonazione.

In condizioni fisiologiche, a riposo, la frequenza respiratoria equina è circa 14 respiri/min, il volume corrente è di circa 5,5 L, il cambiamento di pressione totale a cui i polmoni sono soggetti è di circa 0,44 kPa, e la pressione associata all'accelerazione del volume è di circa 0,22 kPa. Durante l'attività fisica, in particolare il galoppo veloce, la frequenza respiratoria aumenta fino a 120-148 respiri/min, il volume corrente aumenta fino a 15 L, il cambiamento massimo di pressione raggiunge valori di circa 8,5 kPa, e l'accelerazione totale del volume supera i 4.3 kPa [10].

Come precedentemente accennato, il cavallo è un respiratore nasale-obbligato, il che comporta che l'atto respiratorio si realizza attraverso la chiusura ermetica rispettivamente delle labbra e del palato molle che crea un'occlusione tra rinofaringe e orofaringe, e delle aritenoidi e dell'epiglottide. Questa condizione è fondamentale per garantire una respirazione efficiente ed evitare l'instaurarsi di turbolenze del flusso d'aria, che possono interferire con le quotidiane attività del cavallo, ed eventualmente limitarne le prestazioni in caso di esercizio. E' stato evidenziato che la presenza di frizione e di turbolenza del flusso è strettamente correlata all'aumento della resistenza polmonare totale, misura che quantifica la permeabilità delle vie aeree al flusso d'aria. Durante la respirazione a riposo, il 50% della resistenza polmonare totale deriva dai passaggi nasali, il 30% dalle vie aeree superiori rimanenti e il 20% dalle vie aeree intratoraciche. In condizioni di esercizio fisico si ha un aumento sostanziale della resistenza polmonare, sebbene il contributo relativo di ciascuna parte dell'apparato respiratorio alla resistenza polmonare totale non vari in modo significativo. In genere, infatti, si verificano una serie di aggiustamenti fisiologici, come la dilatazione delle narici esterne, l'abduzione completa della laringe, la distensione del collo con conseguente ipertensione e irrigidimento della trachea e la broncodilatazione, che tendono a facilitare l'aumento della quantità di flusso, e a diminuire la resistenza ingrandendo l'area della sezione trasversale delle vie aeree e, quindi, il loro raggio. Nonostante questi adattamenti, l'esercizio intenso può provocare un aumento della resistenza polmonare totale di oltre due volte, per via di una più marcata distribuzione non omogenea della resistenza lungo le vie aeree e gli alveoli e di variazioni dell'area della sezione trasversale delle vie aeree indotte dalla compressione delle pressioni transmurali. Uno dei fattori principali che influisce sul diametro dell'albero tracheobronchiale, e che si ripercuote sulla sua resistenza al flusso d'aria, è la contrazione e il rilassamento della muscolatura liscia. Infatti quando materiali irritanti, come la polvere, vengono inalati, i recettori irritanti tracheobronchiali vengono stimolati, risultando in una broncocostrizione, operata dai afferenti del sistema nervoso parasimpatico, con conseguente diminuzione del flusso d'aria.

Oltre la resistenza polmonare, per valutare la capacità volumetrica polmonare si usa una misura denominata compliance dinamica, che fornisce una stima delle proprietà elastiche del polmone. Tali proprietà derivano dalle caratteristiche intrinseche del tessuto e dalla presenza delle forze di tensione superficiale. Quest'ultime sono regolate dal surfattante polmonare, un complesso tensioattivo fosfolipoproteico prodotto dalle cellule alveolari e

costituito dall'80% di lipidi e dal 20% di proteine, che ha il compito di mantenere la stabilità alveolare e prevenire l'atelettasia polmonare. Le proprietà elastiche del polmone vengono analizzate tramite l'uso di curve sperimentali che mettono in relazione pressione e volume, ottenute misurando il volume raggiunto al variare della pressione necessaria per gonfiare il polmone fino ad un determinato livello rispetto all'infrazione del polmone. La compliance dinamica aumenta con l'infrazione polmonare e può diminuire con l'aumento della frequenza respiratoria, in particolare nei polmoni che presentano un certo grado di ostruzione delle vie aeree inferiori [10]. In oltre il verificarsi di condizioni patologiche che inducono maggiore rigidità polmonare, come per esempio l'edema, la fibrosi e l'ipertensione polmonare, possono indurre una significativa diminuzione della compliance dinamica, aumentando conseguentemente il lavoro di respirazione in modo esponenziale.

Le straordinarie capacità atletiche dei cavalli si basano in gran parte sull'enorme capacità polmonare, che tuttavia spesso può essere alterata per via della presenza di processi infiammatori delle vie aeree, i quali sono relativamente comuni in questa specie. L'infiammazione può manifestarsi in forma lieve, con poco o nessun sintomo evidente, in forma moderata o grave, che può determinare considerevoli difficoltà respiratorie, non solo in esercizio, ma anche a riposo.

Le malattie respiratorie equine possono essere classificate a seconda della regione dell'albero tracheobronchiale che colpiscono ed in particolare si suddividono in patologie respiratorie delle vie aeree superiori e delle vie aeree inferiori. In aggiunta è possibile anche distinguere le patologie respiratorie in infettive o non infettive a seconda dell'origine scatenante la malattia stessa (Figura 2.15).

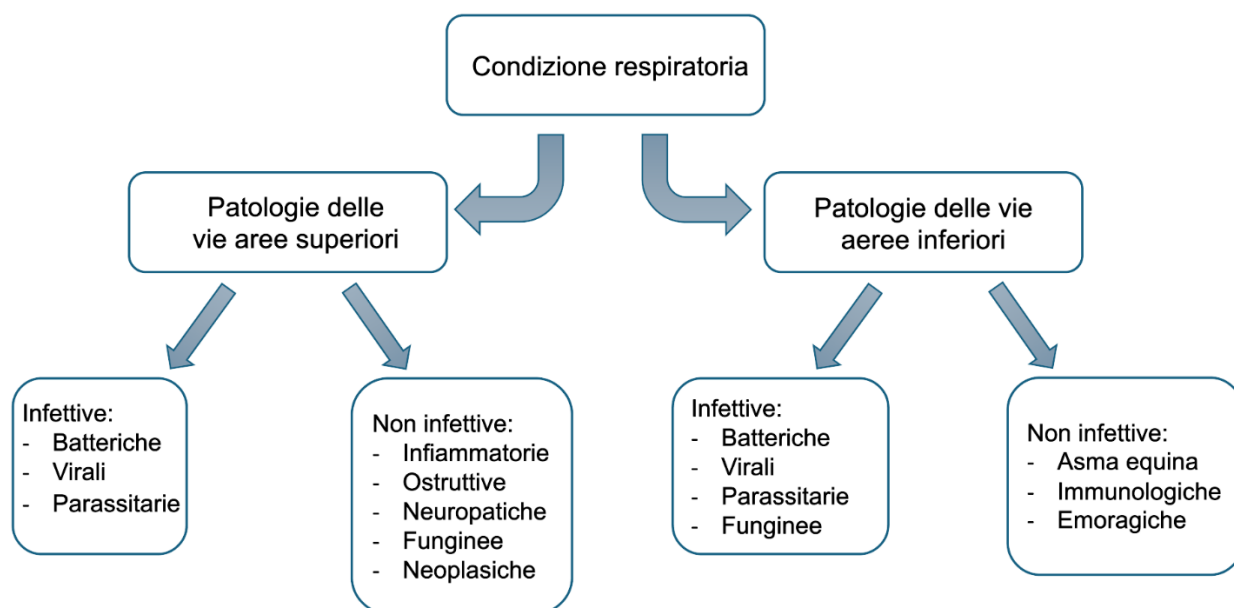


Figura 2.15: Rappresentazione schematica delle più frequenti malattie respiratorie nella specie equina.

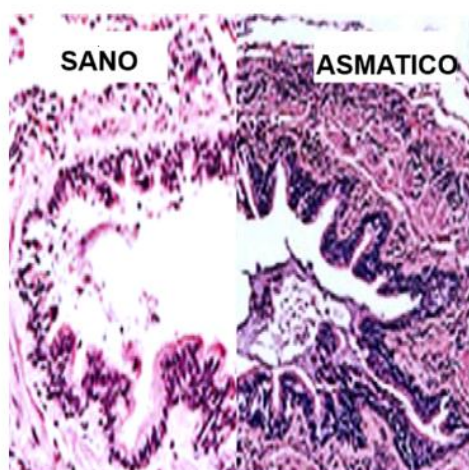
Le malattie infettive delle vie aeree superiori possono essere di natura batterica o virale, mentre quelle non infettive possono variare da ostruttive, neuropatiche, infiammatorie, fungine fino a neoplasie.

Le malattie infettive delle vie aeree inferiori possono essere batteriche, virali, parassitarie o fungine, mentre quelle non infettive sono prevalentemente legate a diverse tipologie di asma equina (EA), particolarmente rilevanti in quanto in grado di alterare sostanzialmente la struttura e la biomeccanica delle vie aeree, con implicazioni funzionali rilevanti.

L'infiammazione delle vie aeree derivante da cause non infettive è più frequente rispetto a quelle infettive e spesso più difficile da trattare, ed è generalmente attribuibile o all'inalazione di polveri organiche aerodisperse o a specifici aero-allergeni.

Il termine asma equina è attualmente adottato per descrivere tutte le forme di malattia infiammatoria delle vie aeree ambientali non infettive indotte da agenti pro-infiammatori e/o allergenici inalati e può essere. L'EA presenta un'eterogeneità fenotipica e per questa ragione può essere classificata in base alla gravità dei sintomi. Le forme più lievi, definite con il termine MMEA (Mild to Moderate Equine Asthma) sono caratterizzate da un'infiammazione diffusa delle basse vie aeree con ispessimento della mucosa e reclutamento di cellule infiammatorie quali neutrofili ed eosinofili, da produzione eccessiva di muco, visibile all'endoscopia tracheobronchiale, da iperreattività bronchiale e tosse cronica. Nelle forme severe, SEA (Severe Equine Asthma), si osserva un generale peggioramento della meccanica respiratoria, con un maggiore sforzo respiratorio a riposo dovuto ad un'espiazione più prolungata e all'uso marcato della muscolatura addominale. Inoltre si ha un notevole restringimento del lume delle vie aeree causate da broncospasmi, ostruzioni da tappi di muco e infiammazioni peribronchiali. La cronicizzazione della SEA può portare ad un drastico rimodellamento delle vie aeree con un ispessimento della muscolatura liscia nella parete esterna e una crescita anomala della mucosa nella parete interna dei bronchi. Questi cambiamenti si manifestano in un aumento della pressione nella parete esterna e in un aumento del volume nella parete interna, risultando in una maggiore costrizione del lume e in un'ostruzione progressiva del flusso d'aria (Figura 2.16, A) [15]. Come si evince dalla figura 2.16, B, la via aerea sana mostra strati sottili e molte pieghe regolari con lunghezze d'onda corte, mentre quella asmatica ha uno spessore ingorgato e meno pieghe, più profonde, con lunghezze d'onda lunghe. Il numero di pieghe ha un'alta significanza clinica: poche pieghe con lunghezze d'onda grandi si muovono verso l'interno e ostruiscono completamente il lume, mentre numerose pieghe con lunghezze d'onda corte, come si osserva nei soggetti sani, lasciano la via aerea non ostruita [7].

A)



B)

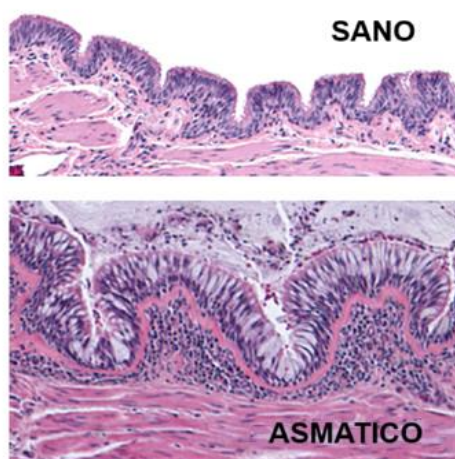


Figura 2.16: Rimodellamento della parete delle vie aeree nel caso di asma cronico (A). Immagini istologiche di una parete bronchiale sana e asmatica a confronto (B) (adattata da [7] [15]).

Il cambiamento della struttura e dell'organizzazione dei tessuti bronchiali possono determinare in maniera significativa la risposta meccanica della parete dell'albero tracheobronchiale durante la respirazione e le proprietà biomeccaniche dei campioni analizzati possono di conseguenza essere variabili.

Capitolo 3

3 Analisi biomeccanica

“ I tessuti molli presentano un comportamento complesso con molti fenomeni non lineari come spiegato da diversi autori, come la dipendenza dal tempo o il fenomeno della riduzione dello stress, cioè, il loro comportamento meccanico dipende principalmente dal tempo e dalla massima deformazione precedentemente sopportata. La maggior parte dei tessuti molli disperde energia durante il carico, tuttavia, il comportamento elastico generalmente domina il loro comportamento e rappresenta il comportamento asintotico quando la dissipazione diminuisce a zero. In questo modo, in un primo approccio, la maggior parte dei tessuti molli è descritta nel contesto dell'iperelasticità [1] ”.

Al fine di determinare le proprietà meccaniche di un materiale è necessario svolgere diversi test sperimentali in accordo con il fenomeno biologico che si vuole studiare, come per esempio la resistenza alla trazione oppure il rilassamento a seguito dell'applicazione di un carico. Inoltre per via della disomogeneità intrinseca dei tessuti biologici e del loro carattere tendenzialmente anisotropo, sono necessari dei data set considerevoli e consistenti al fine di comprendere al meglio il comportamento meccanico del tessuto in esame e successivamente essere in grado di modellarlo nella maniera più corretta possibile.

In questo capitolo verranno illustrati i concetti fondamentali della meccanica dei solidi non lineare che sono alla base degli studi sperimentali qui presentati, con particolare attenzione alle formulazioni matematiche del modello costitutivo implementato.

3.1 Concetti e definizioni principali

Il test di trazione meccanico maggiormente impiegato per determinare le proprietà strutturali in generale di un materiale è il test a trazione di tipo uniassiale fino a cedimento per rottura del campione. Durante tale analisi, il campione viene solitamente inserito all'interno di un sistema di afferraggio dotato di morsetti e viene deformato a seguito dell'applicazione di un carico a trazione ad una delle estremità. Tale carico aumenta gradualmente e di una quantità stabilita durante il settaggio della macchina a trazione, producendo in questo modo una deformazione del campione che è approssimativamente conservativa nel volume, in particolar modo nel caso di tessuti biologici molli altamente idratati [1].

Per via della composizione non omogenea dei tessuti biologici e del loro comportamento anisotropo dovuto alla direzionalità preferenziale delle fibre, la risposta meccanica ad un test a trazione uniassiale non riflette completamente la condizione reale che si verifica nell'organismo. Per questo motivo spesso vengono anche effettuati test a trazione biassiali oppure test a trazione multiassiali, in modo da riprodurre al meglio lo stress e le deformazioni tridimensionali causate dal complesso intreccio delle componenti della matrice extracellulare, le quali sono disposte secondo le esigenze fisiologiche specifiche e le condizioni di carico e deformazione di quel determinato tessuto.

La rigidità è una proprietà meccanica intrinseca del materiale, la cui misurazione può essere influenzata dal fatto che il tessuto venga sollecitato solo in una direzione piuttosto che in due o tre direzioni contemporaneamente. Ciò implica che i valori di rigidità ottenuti da test di trazione uniassiali risultino sovrastimati rispetto a quelli ottenuti da test di tensione biassiali e multiassiali [20].

A prescindere dalla tipologia di test a trazione svolto, tutti i test a trazione forniscono informazioni riguardanti il carico F applicato e a cui il campione viene sottoposto e all'allungamento Δl che il materiale subisce come conseguenza. A partire da queste due grandezze ed essendo a conoscenza della geometria iniziale dei campioni, è possibile ottenere i valori di stress e deformazione.

Lo stress ingegneristico è infatti calcolabile come il rapporto tra il carico e l'area della sezione trasversale del campione su cui esso è applicato, ovvero $\sigma = \frac{F}{A}$, mentre la deformazione è misurabile come il rapporto tra la variazione della lunghezza del campione Δl e la lunghezza iniziale l_i , ovvero $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_i} = \frac{l_f - l_i}{l_i}$.

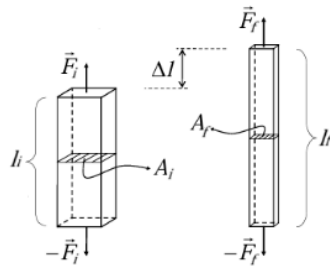


Figura 3.1: Durante il test a trazione uniaassiale la deformazione avviene preservando il volume della regione centrale omogenea del campione.

Come precedentemente accennato, i materiali che manifestano un comportamento non lineare, come nel caso dei tessuti biologici, vengono studiati nell'ambito della teoria dell'elasticità non lineare, in cui è solito impiegare per descrivere il calcolo dello stress la notazione di allungamento λ , invece che quella di deformazione ε .

In questo modo si può riscrivere lo stress in funzione dell'allungamento, ovvero $\sigma = f(\lambda)$, in cui λ viene calcolato come $\lambda = \frac{l_i + \Delta l}{l_i} = \varepsilon + 1$.

Lo stress ingegneristico viene quindi calcolato considerando il materiale incomprimibile, ovvero in assenza di perdita significativa di volume, $V = A_f l_f = A_i l_i$, con la seguente relazione: $\sigma(\lambda) = \frac{F}{A_f} = \lambda \frac{F}{A_i}$.

Questa approssimazione è più accurata nei casi in cui la deformazione del campione venga misurata all'interno di una regione omogenea (Figura 3.1), dove la sezione trasversale può considerarsi uniforme lungo tutta l'estensione del provino.

3.2 Test meccanici dei tessuti biologici

I tessuti molli hanno un comportamento anisotropo a causa della direzione preferenziale delle fibre che li costituiscono e della loro complessa e non omogenea composizione. Per queste ragioni la risposta a trazione dei tessuti molli è di tipo non lineare e la loro resistenza a trazione è strettamente dipendente dalla velocità di deformazione. Al contrario dei tessuti duri, come per esempio il tessuto osseo, i tessuti molli possono subire grandi deformazioni per via della presenza di elastina e di collagene, e possono dimostrare un comportamento viscoelastico associato proprio all'interazione di taglio tra il collagene e la matrice dei proteoglicani [21].

Quando si studia il comportamento meccanico di un materiale in genere ci si focalizza su due regioni di deformazione principali, definite rispettivamente zona elastica e zona plastica. La regione elastica del materiale rappresenta la deformazione recuperabile che il materiale può subire e a livello matematico è rappresentata dalla relazione lineare tra lo stress σ e la

deformazione ε , calcolabile mediante la legge di Hooke: $\sigma = E\varepsilon$. La costante di proporzionalità E viene definita modulo di elasticità, o modulo di Young, ed esprime la pendenza della curva stress-deformazione nel tratto lineare e costituisce uno dei parametri fondamentali per caratterizzare la risposta meccanica di un materiale, in quanto ne definisce la rigidità (Figura 3.2).

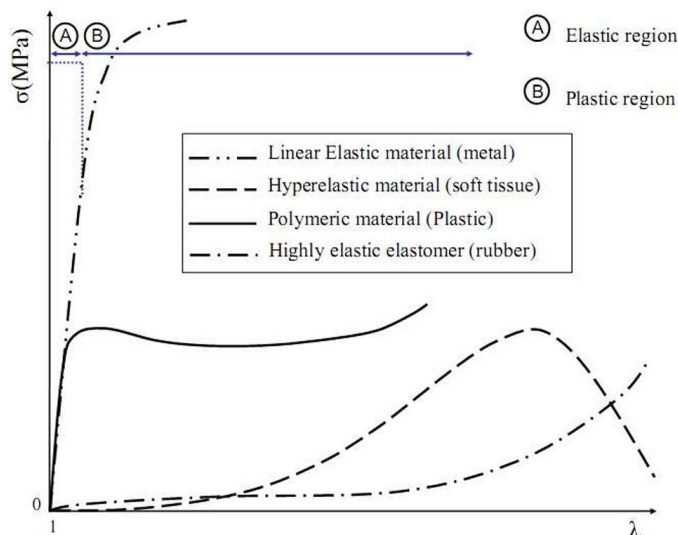


Figure 3.2: Esempio di curve stress-allungamento di alcuni materiali.

I materiali iperelastici, come i tessuti biologici, non hanno un comportamento lineare e per questa ragione, invece di impiegare la legge di elasticità di Hooke, si utilizzano dei modelli meccanici non lineari, in grado di meglio rappresentare la deformazione permanente e non recuperabile che si verifica quando la deformazione o l'allungamento supera il valore elastico limite del materiale. Tale fenomeno prende nome di deformazione plastica. La zona di deformazione plastica origina dal punto identificato σ_y , noto come sforzo di snervamento, in cui la curva stress-allungamento diventa non lineare.

Come precedentemente accennato, dunque il comportamento non lineare dei tessuti biologici viene quindi descritto da un funzione matematica del tipo $\sigma = f(\lambda)$. Nella figura 3.3 viene mostrato un classico esempio del comportamento non lineare di un tessuto biologico.

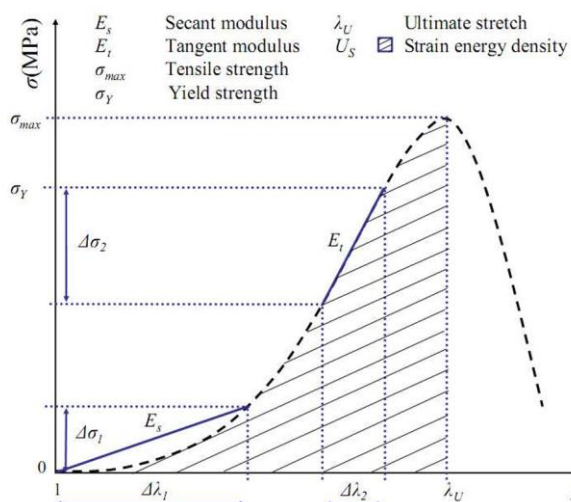


Figure 3.3: Esempio di una classica curva stress-allungamento di un tessuto biologico.

A partire da tale curva è possibile determinare diversi parametri che possono essere utili per descrivere le proprietà meccaniche del materiale, per esempio:

- la resistenza a trazione σ_{max} , ovvero lo stress massimo a cui è soggetto il materiale;
- l'allungamento ultimo λ_U , ovvero l'allungamento massimo in corrispondenza della resistenza alla trazione;
- il modulo tangente E_t , ovvero la pendenza della curva stress-deformazione nella regione lineare;
- la resistenza di snervamento σ_y , ovvero il limite superiore del modulo tangente, e che rappresenta il punto in cui inizia la regione di plasticità, quindi il comportamento non lineare del materiale;
- il modulo secante E_s , ovvero la pendenza della curva stress-deformazione dall'origine al punto in cui lo stress inizia ad avere un comportamento approssimativamente lineare;

Questi parametri possono essere calcolati direttamente dalla rappresentazione grafica della curva stress-deformazione ottenuta al termine della prova a trazione. Dopodiché, mediante l'ausilio di strumenti matematici, è possibile determinare la densità di energia di deformazione, ovvero l'area racchiusa dalla curva stress-deformazione, definita come l'energia assorbita dal materiale mentre viene deformato.

Le proprietà meccaniche di un tessuto sono anche influenzate anche dal tempo, dalla storia di deformazione e dal valore di carico applicato. Spesso infatti le curve stress-deformazione durante la fase di applicazione del carico e la fase di scarico non seguono lo stesso percorso, con conseguenza che i cicli di carico-scarico sono sempre diversi l'uno dall'altro, mostrando quello che si definisce effetto di isteresi. Tale fenomeno può essere correlato alle complesse interazioni tra le fibre di collagene, l'elastina, i proteoglicani e l'acqua all'interno del tessuto. E' noto infatti che la variazione dell'intensità del carico applicato determini una variazione dell'arrangiamento delle fibre tissutali, in particolar modo delle fibrille di collagene, le quali per carichi sufficientemente elevati passino da una configurazione prettamente randomica ad una allineata in modo tale da aumentare la rigidità del tessuto e limitarne la deformazione [7] [21].

Al fine di ridurre il fenomeno di isteresi e diminuire gli errori sperimentali, in genere il protocollo sperimentale dei tessuti biologici prevede di includere, prima del test a trazione, una fase di preconditionamento, ovvero una ripetizione consecutiva di cicli di carico e scarico, con un periodo di recupero tra i cicli, durante il quale il materiale viene completamente scaricato.

3.3 Condizioni sperimentali ed ambientali

Le proprietà meccaniche dei tessuti biologici dipendono da molteplici fattori, sia intrinseci che estrinseci. Tra i fattori intrinseci rientrano, per esempio, la struttura microscopica del tessuto, la topografia del tessuto, l'età e l'ambiente di provenienza del donatore, la specie animale considerata. Dal punto di vista estrinseco, le variabili che entrano maggiormente in gioco sono correlate alle condizioni sperimentali adottate, come per esempio la temperatura, il pH, la pressione osmotica e la velocità di deformazione [21].

Quando si studiano le proprietà di un tessuto biologico, il contesto sperimentale ideale richiede di mantenere il tessuto in condizioni più simili possibili a quelle fisiologiche. Pertanto per garantire un protocollo sperimentale ripetibile e affidabile è necessario prestare attenzione alla conservazione del tessuto una volta prelevato, mantenendo una corretta idratazione e temperatura fino al momento prima del testing.

Nella comunità scientifica si è concluso che gli effetti di degradazione o danneggiamento

risultano minimi quando la temperatura viene mantenuta entro livelli compresi tra 18 e 37 °C e la conservazione viene effettuata preservando i campioni in contenitori ermetici idratati da soluzione salina fino a 24 ore [20].

3.4 Modelli costitutivi

Le teorie costitutive sono un strumento molto utile per quantificare il carico e la deformazione di un materiale. L'obiettivo principale delle teorie costitutive è quello di individuare e descrivere dei modelli matematici in grado di rappresentare il più accuratamente possibile il comportamento meccanico dei materiali, con il fine futuro di poter prevedere il comportamento meccanico di un materiale simile.

La diversità delle proprietà meccaniche dei vari tessuti molli ha determinato lo sviluppo di un gran numero di formulazioni costitutive, che potessero tenere in considerazione non solo le caratteristiche peculiari di ciascun tessuto ma anche il/i specifico/i comportamento/i meccanici da analizzare, come quello elastico, plastico, viscoelastico o viscoplastico.

La ricerca nell'ambito delle strutture rinforzate con fibre, come il tessuto cardiovascolare o l'anello fibroso dei dischi intervertebrali, ha ben descritto la meccanica del tessuto in massa attraverso leggi costitutive strutturali.

Questi modelli sono anche in grado di descrivere il contributo allo stress relativo a ciascun componente tissutale, comprese le fibre, la matrice extracellulare e le loro interazioni, valutando eventualmente anche il grado di anisotropia del tessuto, ovvero il suo comportamento meccanico al variare della direzione e con conseguente differente deformazione massima ammissibile.

A seguito di queste considerazioni la formulazione costitutiva alla base della teoria dell'iperelasticità risulta particolarmente conveniente e costituisce, grazie alla sua semplicità, la base fondamentale per lo sviluppo di modelli più complessi, come quelli visco-iperelastici. Tuttavia, spesso, identificare leggi costitutive appropriate senza sovra-vincolare o sovra-parametrizzare il modello non è banale e richiede spesso di scendere a compromessi riducendo o la complessità del sistema o il numero di fenomeni fisici da analizzare.

Nel caso specifico di questo elaborato, verranno evidenziati le nozioni principali della teoria dell'iperelasticità e verrà presentato lo sviluppo di una legge costitutiva visco-iperelestica per lo studio del tessuto dell'albero polmonare, la cui formulazione è stata ricavata a partire da modelli presentati in precedenti lavori [1] [21] [22] [23] [24].

3.4.1 Iperelasticità

La teoria non lineare dell'elasticità si basa sulla definizione della funzione di energia libera di Helmholtz (Ψ), nota anche come funzione di energia di deformazione, per descrivere in termini energetici il comportamento meccanico del materiale.

Un materiale viene definito iperelastico quando il suo stato meccanico può essere completamente descritto dalla sua funzione di energia di deformazione, cioè: $\Psi = \Psi(\underline{F})$, in cui $\underline{F}$ rappresenta il gradiente di deformazione del materiale, che viene assunto continuo. Per quanto concerne i materiali omogenei, nei quali la distribuzione dei componenti interno viene assunta uniforme, la funzione di energia di deformazione Ψ dipende solo dal gradiente di deformazione $\underline{F}$, mentre per i materiali eterogenei Ψ dipende anche dalla posizione del punto considerato nel mezzo [22].

In qualsiasi posizione di riferimento $\underline{X}$ del tessuto si postula l'esistenza di una funzione di energia libera di Helmholtz, che è funzione del gradiente di deformazione $\underline{F}$ nello stato non deformato. Il gradiente di deformazione $\underline{F}$ è definito come una matrice diagonale per i test a trazione uniassiale:

$$\underline{F} = \begin{bmatrix} \lambda_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_{zz} \end{bmatrix} \quad (1)$$

in cui λ_{xx} , λ_{yy} e λ_{zz} sono gli allungamenti principali rispetto ai tre assi. Negli stati di trazione uniassiali si considera un allungamento allineato con l'asse di trazione del campione e i restanti due allungamenti nelle altre due direzioni equivalenti e trascurabili.

Dal momento che si considera una descrizione lagrangiana, ovvero si considera una disposizione geometrica rispetto ad una configurazione di riferimento, è appropriato introdurre una misura della deformazione in termini di coordinate del materiale. Si è scelto di usare il tensore simmetrico destro di Cauchy-Green, ovvero:

$$\underline{C} = \underline{F}^T \underline{F} \quad (2)$$

In questo modo è possibile esprimere la funzione di energia libera come $\Psi = \Psi(\underline{C})$ ed è possibile calcolare il primo tensore degli sforzi di Piola-Kirchhoff come:

$$\underline{P} = 2\underline{F} \frac{\delta \Psi}{\delta \underline{C}} \quad (3)$$

Sapendo inoltre che il primo tensore degli sforzi di Piola-Kirchhoff è legato allo stress ingegneristico dalla relazione $\underline{P} = J \sigma \underline{F}^{-T}$ si può calcolare lo stress in funzione dell'energia libera Ψ tramite la seguente formula:

$$\sigma = 2J^{-1} \underline{F} \frac{\delta \Psi}{\delta \underline{C}} \underline{F}^T \quad (4)$$

in cui J rappresenta il determinante Jacobiano del gradiente di deformazione $\underline{F}$.

Le ultime due relazioni sono note come equazioni costitutive o equazioni di stato e consentono di stabilire un modello assiomatico o empirico come base per approssimare il comportamento di un materiale reale [22].

3.4.2 Definizione delle caratteristiche del modello

Per definire le espressioni matematiche del modello costitutivo che descrivono la risposta viscoelastica della parete bronchiale dell'albero polmonare, in primis, è necessario definire la geometria della configurazione non deformata del campione, evidenziando le componenti che lo costituiscono e quali proprietà meccaniche determinano ciascuno di essi.

Ad oggi la maggior parte degli studi inerenti alla meccanica polmonare riguardano o l'analisi del polmone inteso come intero organo funzionante o la caratterizzazione tissutale della trachea e dei bronchi primari. Dunque poiché le vie aeree inferiori rappresentano i siti dove si verificano i principali fenomeni di rimodellamento e poiché la maggior parte delle malattie respiratorie sono di tipo intraparenchimale [2], si è scelto di testare e modellizzare la parete bronchiale delle vie aeree inferiori per poter estrapolare nuove informazioni sulle loro

proprietà meccaniche.

La parete bronchiale delle vie aeree è molto simile a quella dei vasi sanguigni ed è approssimabile ad un cilindro a sezione circolare costituita da uno strato interno composto da una matrice ricca in collagene ed elastina e da uno strato esterno composto da fasci muscolari e placche di cartilagine [2] [5] [7]. Queste considerazioni permettono di approssimare il tessuto bronchiale ad un materiale composito quasi-incomprimibile nel quale la matrice è rinforzata da due famiglie di fibre e le proprietà meccaniche dipendono dall'orientazione preferenziale delle fibre stesse (Figura 3.4) [24].

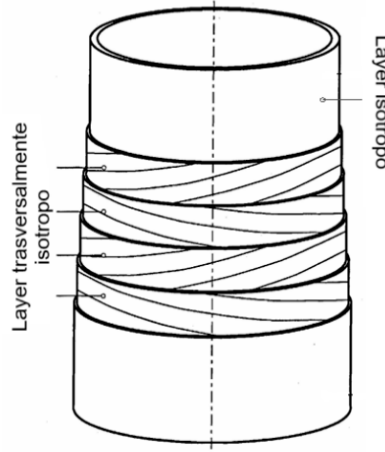


Figura 3.4: Esempio di struttura tubulare composita rinforzata da due famiglie di fibre, ognuna con direzione preferenziale (adattata da [24]).

Determinata la geometria, è dunque necessario stabilire un sistema di riferimento rispetto al quale scrivere le leggi che rappresentano il modello. Si considera quindi il sistema di riferimento come quello mostrato in Figura 3.5, in cui l'asse z è l'asse parallelo all'asse di trazione del provino. E' possibile quindi definire le direzioni delle fibre nella configurazione di riferimento non deformata, ovvero i vettori a_0 e b_0 , sapendo che i fasci di fibrille muscolari della parete bronchiali sono inclinate rispetto all'asse longitudinale del lume di un angolo pari a circa 30° [19] [21]:

$$a_0 = \begin{pmatrix} 0 \\ -\cos(60^\circ) \\ \sin(60^\circ) \end{pmatrix} \text{ e } b_0 = \begin{pmatrix} 0 \\ \cos(60^\circ) \\ \sin(60^\circ) \end{pmatrix} \quad (5)$$

A partire dai vettori direzionali delle fibre è possibile definire i tensori strutturali A_0 e B_0 :

$$A_0 = a_0 \otimes a_0 \text{ e } B_0 = b_0 \otimes b_0 \quad (6)$$

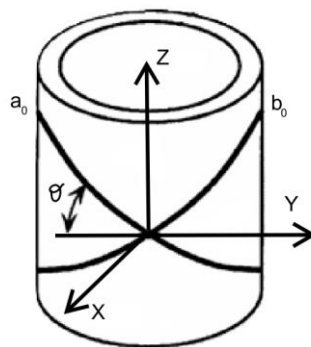


Figura 3.5: Sistema di riferimento scelto.

In una data posizione di riferimento X del tessuto è possibile quindi postulare l'esistenza di una funzione di energia libera di Helmholtz.

E' noto da osservazione sperimentali su materiali elastomerici e tessuti biologici molli è la risposta alla deformazione è pressoché isocora, ovvero il modulo di massa k supera considerevolmente il modulo di taglio E_t . Per questa ragione spesso si sceglie una formulazione disaccoppiata della funzione di energia libera Ψ che descriva separatamente i contributi volumetrico (o dilatativo) e isocoro [24], ovvero:

$$\Psi(C, A_0, B_0) = \Psi_{vol(M)}(J) + \Psi_{iso}(\bar{C}, A_0, B_0) \quad (7)$$

dove $\bar{C}$ è il tensore di deformazione isocorico pari a $J^{-2/3}C$.

Inoltre spesso invece di esprimere la funzione di energia libera Ψ in funzione del tensore destro di Cauchy- Green C si preferisce scriverla in termini di invarianti principali in quanto il loro valore è indipendente dal sistema di riferimento adottato.

Conoscendo il gradiente di deformazione $\underline{F}$ e il tensore destro di Cauchy-Green C è possibile definire i seguenti invarianti [24]:

$$\begin{aligned} I_1(C) &= tr(C),; & I_2(C) &= \frac{1}{2}[(tr(C))^2 - tr(C^2)]; & I_3(C) &= det(J) \\ I_4(C, a_0) &= C:A_0; & I_5(C, a_0) &= C^2:A_0; \\ I_6(C, b_0) &= C:B_0; & I_7(C, b_0) &= C^2:B_0; \\ I_8(C, a_0, b_0) &= (a_0 \cdot b_0)a_0 \cdot Cb_0; \end{aligned} \quad (8)$$

Gli invarianti I_1 e I_2 sono gli invarianti principali di C e sono responsabili della deformazione isotropa del tessuto, mentre gli invarianti I_4 e I_6 rappresentano l'allungamento delle due famiglie di fibre e quindi sono responsabili della deformazione anisotropa del tessuto. Gli invarianti I_5, I_7 e I_8 vengono usati per rappresentare interazioni più complesse tra le fibre e la struttura del materiale come per esempio l'effetto di taglio oppure l'interazione reciproca tra famiglie di fibre [24]. In questa trattazione si è deciso di trascurare gli effetti dovuti allo sforzo di taglio e di considerare il comportamento delle famiglie di fibre tra loro indipendente. Infine è possibile esprimere gli invarianti principali in invarianti distorsionali sfruttando la relazione seguente:

$$\begin{aligned} \bar{I}_a &= J^{-2/3}I_a, \text{ per } a = 1,4,6,8 \\ \bar{I}_a &= J^{-4/3}I_a, \text{ per } a = 2,5,7 \end{aligned} \quad (9)$$

Poiché la deformazione del materiale è sia isotropica sia anisotropa è possibile riscrivere il termine isocorico della funzione di energia di deformazione dell'equazione (7) suddividendo i contributi della matrice e delle fibre, ottenendo:

$$\Psi = \Psi_{vol(M)}(J) + \bar{\Psi}_{iso(M)}(\bar{I}_1) + \bar{\Psi}_{aniso}(\bar{I}_4, \bar{I}_6) \quad (10)$$

Ottenuta l'espressione della funzione di energia di deformazione è possibile scrivere il primo tensore degli sforzi di Pirola-Kirchhoff come la somma dei contributi della matrice (volumetrica e isocora) e dei contributi anisotropi delle due famiglie di fibre:

$$\underline{P} = \underline{P}_{vol(M)} + \underline{P}_{iso(M)} + \underline{P}_{fibreA} + \underline{P}_{fibreB} \quad (11)$$

Usando l'equazione (3) ciascun termine può essere poi esplicitato risolvendo rispettivamente le equazioni:

$$\underline{P}_{vol(M)} = Jp\underline{F}^{-T} \quad (12.a)$$

$$\underline{P}_{iso(M)} = J^{-\frac{2}{3}} * 2 \frac{\delta \bar{\Psi}_{iso(M)}}{\delta \bar{I}_1} \left(\underline{F} - \frac{1}{3} I_1 + \underline{F}^{-T} \right) \quad (12.b)$$

$$\underline{P}_{fibra(A)} = J^{-\frac{2}{3}} * 2 \frac{\delta \bar{\Psi}_4}{\delta \bar{I}_4} \left(\underline{A} - \frac{1}{3} I_4 + \underline{F}^{-T} \right) \quad (12.c)$$

$$\underline{P}_{fibra(B)} = J^{-\frac{2}{3}} * 2 \frac{\delta \bar{\Psi}_6}{\delta \bar{I}_6} \left(\underline{B} - \frac{1}{3} I_6 + \underline{F}^{-T} \right) \quad (12.d)$$

in cui $\underline{A} = \underline{F} * A_0$, $\underline{B} = \underline{F} * B_0$ e p è la pressione idrostatica pari a $p = \frac{\delta \Psi_{vol(M)}}{\delta J} = \frac{\delta (\frac{k}{2}[J-1]^2)}{\delta J}$.

Le espressioni di funzioni di energia libera sono state assunte pari a:

$$\bar{\Psi}_{iso(M)} = C_1 \{ \exp[\alpha_1 (\bar{I}_1 - 3)] \} \quad (13.a)$$

$$\bar{\Psi}_4 = C_2 * (\bar{I}_4 - 1) \{ \exp[\alpha_2 (\bar{I}_4 - 1)^2] - 1 \} \quad (13.b)$$

$$\bar{\Psi}_6 = C_2 * (\bar{I}_6 - 1) \{ \exp[\alpha_2 (\bar{I}_6 - 1)^2] - 1 \} \quad (13.c)$$

in cui k, C_1, C_2 sono rispettivamente il modulo di massa della matrice, il modulo elastico della matrice e delle fibre, e α_1, α_2 sono dei fattori adimensionali che esprimono il comportamento non lineare della matrice e delle fibre.

Infine, unendo le equazioni (3) e (4) è possibile calcolare lo stress ingegneristico applicando la seguente relazione:

$$\sigma = J^{-1} \underline{P} \underline{F}^{-T} \quad (14)$$

3.4.3 Implementazione del modello

Le equazioni costitutive enunciate nel paragrafo 3.4.2 si basano sul modello visco-iperelastico proposto da Holzapfel per l'analisi della biomeccanica delle arterie [21] e sono state impiegate per fittare le curve sperimentali dei test stress-rilassamento enunciati e commentati nel capitolo 5.

A livello computazionale si è dunque scelto di calcolare separatamente la risposta iperelastica, che descrive il comportamento a lungo termine del tessuto, e la risposta viscoelastica, che cattura i fenomeni transitori quali rilassamento e isteresi, ottenendo la risposta globale come somma dei due contributi, ovvero:

$$P_{tot} = P_{iper} + P_{visc} \quad (15)$$

in cui il contributo iperelastico P_{iper} può essere calcolato secondo l'equazione (5), mentre il

contributo viscoelastico P_{visc} si ottiene introducendo il concetto di variabili interne. Invero i materiali che presentano fenomeni dissipativi possono essere descritti attraverso un numero finito di variabili termodinamiche interne, dette anche variabili nascoste, indicate collettivamente con il simbolo ξ . Queste variabili catturano i fenomeni di riorganizzazione strutturale irreversibili all'interno dei tessuti biologici soggetti ad un carico. Infatti tali fenomeni infatti non sarebbero direttamente osservabili o controllabili durante una qualsiasi tipologia di test meccanico, a differenza di grandezze misurabili come deformazione o temperatura, e quindi l'analisi dell'evoluzione nel tempo di tali variabili permette di valutare indirettamente la storia deformativa del materiale, fungendo da "memoria" dei processi dissipativi [22].

Il contributo viscoso può essere determinato con la seguente equazione:

$$P_{visc}(t) = \sum_{k=1}^i \gamma_k \int_0^t e^{-(t-s)/\tau_k} \dot{P}_{iper}(s) ds \quad (16)$$

dove γ_k e τ_k sono parametri che regolano l'intensità e il tempo di rilassamento dei processi viscosi e P_{iper} è lo stress "a regime" calcolato nella porzione della formulazione iperelastica.

Per quanto concerne l'implementazione del modello si è usato il software MATLAB®, optando per l'uso di un algoritmo genetico (GA) in grado di determinare i valori dei parametri del contributo iperelastico, cioè $k, C_1, C_2, \alpha_1, \alpha_2$, e del contributo viscoelastico, ovvero le coppie γ_k e τ_k , minimizzando l'errore quadratico medio tra i dati sperimentali e la risposta numerica del modello. Infine poiché il tessuto bronchiale è stato modellizzato come un materiale composito quasi-incomprimibile, è stato necessario introdurre un vincolo meccanico fondamentale nell'ottimizzazione dei parametri. In particolare, durante l'esecuzione dell'algoritmo genetico, si è imposta la condizione $P_{yy} = P_{xx} \approx 0$ per garantire coerenza con il comportamento fisico del materiale. Questo vincolo riflette l'ipotesi che le deformazioni nelle direzioni trasversali x e y siano trascurabili rispetto alla direzione di carico principale, ovvero z, approssimando così la risposta meccanica a uno stato di deformazione uniassiale.

3.4.4 Validità del modello

Una formulazione costitutiva risulta efficiente quando è in grado di approssimare i vari componenti del tessuto biologico in questione con ragionevole accuratezza su ampio intervallo di deformazione, senza richiedere un elevato costo computazionale.

La formulazione qui proposta permette di descrivere la risposta del tessuto in termini di struttura usando un numero non eccessivo di parametri. Inoltre consente una rappresentazione coerente con i requisiti sia meccanici che matematici, risultando applicabile a geometrie arbitrarie e adatto ad essere impiegato nei metodi agli elementi finiti.

Il modello proposto usa la meccanica del continuo non lineare come base fondamentale per descrivere un materiale tridimensionale, la cui struttura si basa su dati istologici e il cui comportamento è altamente non lineare e anisotropo, come tipico dei materiali compositi rinforzati da due famiglie di fibre [25]. L'assunzione di approssimare la struttura del bronco a quella di un materiale composito rinforzato permette di indagare molteplici fenomeni, quali resistenza a rottura o il comportamento viscoelastico del tessuto, e di prevedere la risposta meccanica di bronchi sani e patologici in condizioni di carico fisiologico.

E' necessario sottolineare che il modello non tiene in considerazione della risposta attiva delle fibre muscolari della parete bronchiale, dovuta all'accoppiamento actina-miosina, che può essere indagata per esempio tramite il modello di Hill [26]. Inoltre il modello non è in grado di prevedere cambiamenti acuti e a lungo termine nella geometria e/o nella risposta meccanica del tessuto dovuti per esempio alle deformazioni plastiche irreversibili che si verificano quando il tessuto è sottoposto a carichi al di fuori dei range fisiologici, portando le fibre a scivolare l'una rispetto all'altra oppure a rottura.

Infine il modello costitutivo, la cui descrizione è fornita rispetto ad una configurazione di riferimento non deformata, si limita allo studio della meccanica, quindi allo studio delle componenti di sforzo e deformazione in un regime viscoelastico non lineare isotermico, per cui variabili come temperatura ed entropia non vengono considerate [21] [24].

Capitolo 4

4 Set up sperimentale

Per studiare le proprietà meccaniche dei bronchi polmonari, i primi step consistono nell'estrarre l'organo di interesse dal cadavere, raccogliere e conservare correttamente il tessuto ed infine preparare i campioni in maniera appropriata per il testing.

In questo capitolo verrà fornita una spiegazione esaustiva dei passaggi effettuati, fornendo una panoramica generale delle procedure effettuate sopraelencate, nonché una descrizione dell'attrezzatura impiegata per le prove di trazione uniassiale, con particolare attenzione alla tipologia di sistema di afferraggio usata. Infine verrà descritto il protocollo di testing applicato e la metodologia di analisi ed elaborazione dei risultati.

Preliminarmente sono state effettuate diverse strategie di preparazione del campione e sono stati esplorati differenti protocolli di test meccanici prima di selezionare una procedura definitiva per una raccolta dati coerente e affidabile e una metodologia che consentisse un'adequata analisi comparativa tra campioni di tessuto di soggetti differenti [2] [4] [27] [28].

4.1 Raccolta dei campioni

I test di trazione uniassiale sono stati eseguiti utilizzando campioni provenienti da tre livelli delle vie aeree, ovvero dal bronco lobare superiore, dalle ramificazioni del bronco intermedio e dalle ramificazioni del bronco lobare inferiore. I dati hanno rilevato significative anisotropie e differenze regionali nel comportamento delle vie aeree bronchiali prossimali e distali.

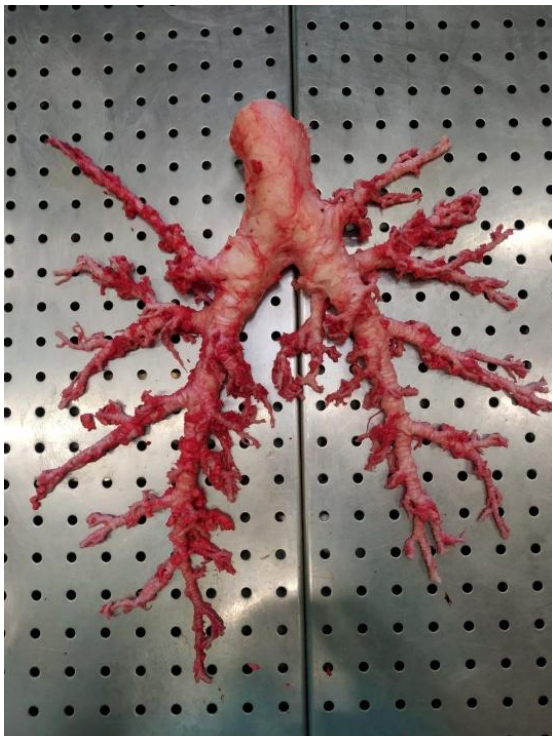
Il prelievo dei campioni è stato condotto presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino sotto la supervisione della Prof.ssa Michela Bullone. A partire da polmoni equini freschi, è stata eseguita una dissezione accurata con strumentazione chirurgica dedicata per isolare l'intero albero bronchiale dal parenchima circostante, cercando di preservare il più possibile l'integrità strutturale delle vie aeree e soprattutto delle ramificazioni di maggiore diametro (Figura 4.1).

Una volta estratto, l'albero bronchiale è stato immediatamente avvolto in garze sterili imbevute di soluzione fisiologica isotonica (NaCl 0,9%) per prevenire fenomeni di disidratazione. I campioni così preparati sono stati trasferiti in contenitori sterili ermetici, appositamente progettati per il trasporto di tessuti biologici.

Questo protocollo di conservazione ha garantito la stabilità delle proprietà biomeccaniche del tessuto durante il trasferimento al Laboratorio di Biomast del Dipartimento di Ingegneria Civile del Politecnico di Torino, dove sono stati successivamente condotti i test sperimentali entro un arco temporale di 24 ore dal momento della dissezione.

Durante questo studio si sono presi in esame campioni di albero polmonare equino prelevati da cinque soggetti distinti. La popolazione campione comprendeva quattro esemplari adulti sani, provenienti da macello e utilizzati come gruppo di controllo, e un soggetto anziano di circa 33 anni. Questa scelta campionaria ha permesso di valutare sia le caratteristiche biomeccaniche del tessuto bronchiale sano che le possibili modifiche legate all'invecchiamento e all'insorgenza di patologie respiratorie croniche, come l'asma, di cui la maggior parte dei cavalli in vecchiaia tende a soffrire. La presenza nello studio del soggetto anziano, deceduto naturalmente, ha rappresentato un'opportunità unica per indagare gli effetti dell'età avanzata sulle proprietà meccaniche del tessuto bronchiale equino, dato che esemplari di tale età raramente sono disponibili per studi scientifici. Tutti i campioni sono stati sottoposti alle stesse procedure analitiche per garantire la comparabilità dei risultati.

A)



B)

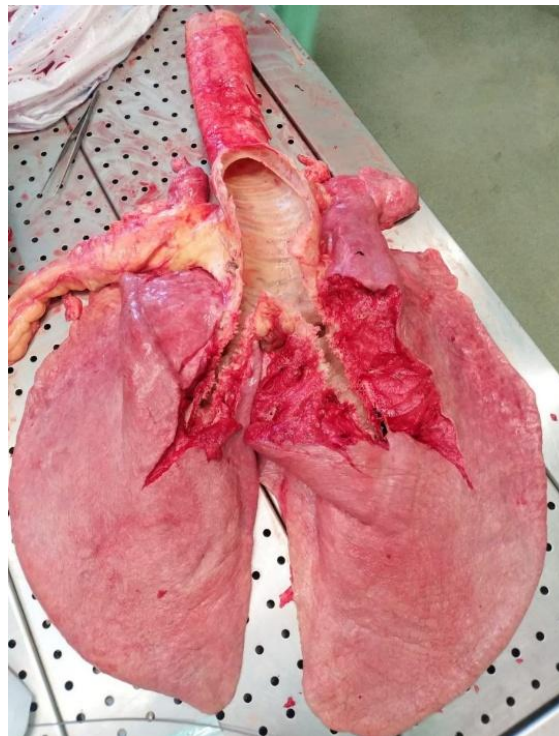


Figura 4.1: *Albero polmonare estratto dal soggetto 1, costituito dalla parte distale della trachea e dai bronchi e ramificazioni principali (A). Polmone del soggetto 1, dopo la rimozione delle strutture bronchiali (B).*

4.2 Preparazione dei campioni

Per la caratterizzazione meccanica del tessuto bronchiale è stato necessario sezionare la struttura dell'albero polmonare in campioni più piccoli. Tale procedura è risultata essenziale per garantire la fattibilità dei test di trazione e la riproducibilità dei risultati sperimentali. La scelta della dimensione del campione è stata guidata considerando criteri multipli quali la preservazione dell'organizzazione istologica del tessuto, il mantenimento dell'integrità strutturale e la presenza di potenziali irregolarità strutturali intrinseche al materiale biologico, che avrebbero potuto influenzarne la risposta meccanica.

Come descritto precedentemente nel capitolo 1, le strutture bronchiali sono composte da uno strato interno di tessuto morbido avvolto da uno strato cartilagineo esterno, che al diminuire della sezione del bronco diventa sempre più eterogeneo fino a presentarsi a forma di squame cartilaginee a forma di semiluna molto deformabili.

La preparazione dei campioni è stata eseguita mediante dissezione con bisturi chirurgico al fine di limitare il più possibile danni microstrutturali. Inoltre durante la preparazione, con molta cura sono stati rimossi gli eventuali residui di tessuto molle del parenchima polmonare e ove presenti bronchioli terminali troppo piccoli per essere testati, la cui asportazione ha lasciato inevitabilmente dei fori di piccole dimensioni.

Inoltre si è cercato di mantenere il più possibile lo strato cartilagineo adeso allo strato di mucosa della parete bronchiale. La presenza della cartilagine è risultata vantaggiosa perché mostrando maggior rigidità rispetto al tessuto molle ha garantito una maggiore tenuta durante il test a trazione, evitando il verificarsi di numerosi artefatti dovuti ad una pinzatura eccessiva o ad uno scivolamento del campione.

La scelta e il numero di campioni prelevati da ogni singolo soggetto è dipeso quindi sia dalle caratteristiche anatomiche proprie dell'albero polmonare di ciascuno sia dalla capacità di mantenere il più possibile integro il tessuto bronchiale dopo il taglio.

In generale sono stati dunque prelevati dall'albero polmonare di ciascun soggetto campioni corrispondenti a specifiche generazioni bronchiali per consentire un'analisi comparativa topospecifica tra soggetti, privilegiando tratti bronchiali meno ramificati per minimizzare le inevitabili microperforazioni risultanti. Come si può infatti osservare dalla figura 4.2 sono stati rimossi eventuali bronchioli di dimensioni ridotte e sono state mantenute le semilune di cartilagine che avvolgono lo strato di mucosa. Inoltre i campioni presentano sia lunghezza sia spessore differente in quanto si è cercato di minimizzare la presenza di microperforazioni, dovute alla rimozione di piccole ramificazioni, per non alterare i risultati dei test a trazione.

Per queste ragioni la lunghezza dei campioni prelevati non è standard, mentre lo spessore del campione dipende dalla dimensione della parete delle vie aeree, la quale diminuisce man mano che si procede verso le vie aeree distali.

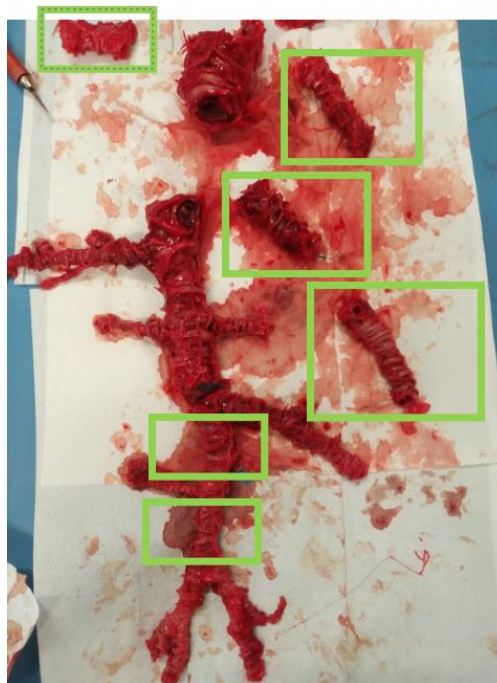


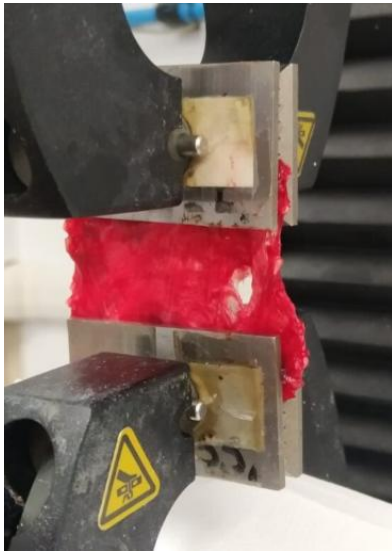
Figura 4.2: Vengono qui mostrati i campioni ottenuti dissezionando il bronco principale destro dell'albero polmonare del soggetto 2.

Per ragioni di tempistiche e di strumentazione sono stati prelevati una media di 13 campioni da ciascun soggetto nonostante l'opportunità di dissezionarne un numero maggiore.

I campioni dei primi tre soggetti sono stati ulteriormente tagliati in direzione longitudinale per ottenere una dimensione rettangolare, mentre i campioni degli altri due soggetti sono stati mantenuti nella conformazione cilindrica originale per effettuare il test a trazione con il nuovo sistema di afferraggio sviluppato (Figura 4.3).

Durante la preparazione dei campioni sono state adottate le convenzionali precauzioni sanitarie di laboratorio, come l'uso di guanti e disinfettanti. Infine dopo i test, i tessuti rimanenti sono stati riposti nei contenitori originali e smaltiti correttamente.

A)



B)



Figura 4.3: Test a trazione condotto su campioni di forma rettangolare ottenuti incidendo longitudinalmente il bronco (A). Test a trazione condotto con il sistema di afferraggio sviluppato per testare i campioni in configurazione cilindrica (B).

4.3 Strumentazione per i test a trazione

Il sistema sperimentale impiegato per effettuare le prove di trazione è mostrata in figura 4.4. Essa comprende una macchina per test di trazione uniassiale, un sistema di controllo pneumatico della pressione e una postazione informatica dotata di software compatibile, che consente di avere una completa gestione dei parametri di prova e l'acquisizione dei dati. La macchina a trazione era già stata impiegata in precedenti studi per l'analisi di tessuti biologici, in particolare tendini equini, fornendo dati affidabili quindi non è stato necessario effettuare ulteriori test di calibrazione su materiali di riferimento come elastomeri.

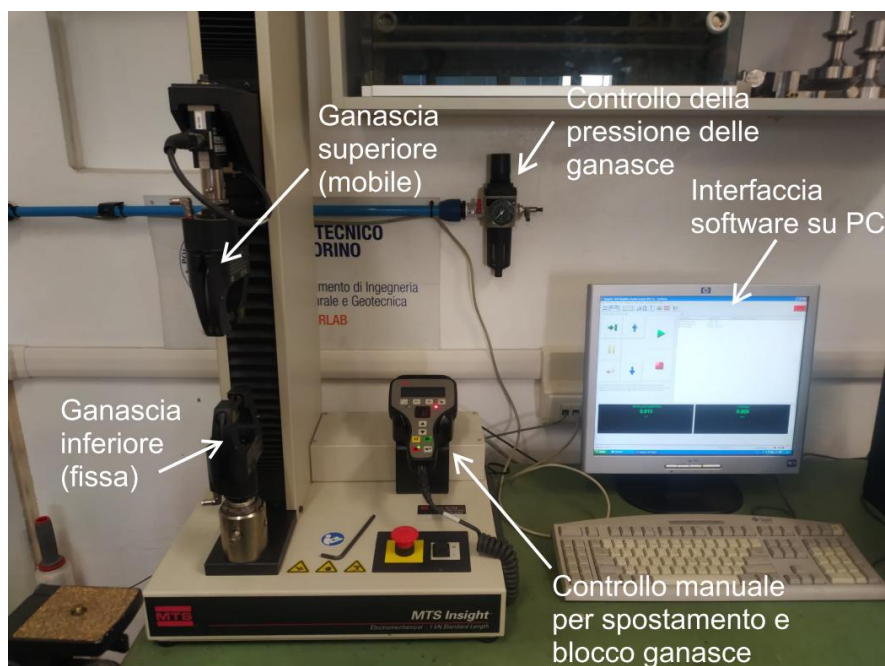


Figura 4.4: Strumentazione usata per effettuare i test meccanici.

Il dispositivo della macchina a trazione è dotato di due ganasce intercambiabili, selezionabili in base all'entità del carico applicato: una versione più piccola, adatta a forze fino a 10 N, e una più grande, in grado di sostenere carichi fino a 100 N (Figura 4.5, A). Le estremità superiori e inferiori del campione di tessuto vengono posizionate tra due piastre rettangolari con le superfici smussate, che ne garantiscono una presa uniforme e salda. Il fissaggio avviene mediante un sistema a pressione controllato da un pedale: una volta posizionato il campione, schiacciando il pedale si attiva la chiusura delle ganasce (Figura 4.5, B).

A)



B)



Figura 4.5: A sinistra vengono evidenziate le specifiche della macchina a trazione e come vengono posizionate le piastre rettangolari sulle ganasce. A destra, invece, si può osservare la strumentazione con un campione di bronco posizionato: Il meccanismo di chiusura delle piastre rettangolari è controllato da un sistema a pressione che serra le ganasce. Nei cerchi sono evidenziati i due fili che garantiscono l'accoppiamento tra il sistema di pressione e le ganasce.

L'altezza tra le ganasce è regolabile tramite una console posizionata lateralmente, che consente anche di bloccare la macchina prima dell'inizio del test. Durante l'esecuzione, il campione viene sottoposto a trazione solo dall'estremità superiore, mentre quella inferiore rimane fissa. Tutti i parametri del test, come velocità di deformazione, carico applicato e durata, sono impostabili tramite un'interfaccia software gestita da un PC collegato alla macchina.

4.4 Sistema di afferraggio cilindrico modulare

Come precedentemente accennato i test a trazione sono stati effettuati sia su campioni di forma rettangolare ottenuti incidendo longitudinalmente il bronco sia su campioni in configurazione cilindrica.

La scelta di realizzare un sistema di afferraggio cilindrico nasce dall'esigenza di volere preservare il più possibile l'integrità strutturale del campione bronchiale durante le prove meccaniche. Il sistema di fissaggio sviluppato consente di testare il tessuto nella sua configurazione cilindrica fisiologica, garantendo una deformazione minima delle estremità. Questa scelta metodologica deriva dall'osservazione che l'incisione longitudinale dei campioni – seguita da prove con geometria rettangolare – introduca alterazioni istologiche significative. In particolare, il taglio altera la continuità strutturale della parete bronchiale, rompendo sia i collegamenti tra gli anelli cartilaginei, sia i fasci della muscolatura liscia che il network di fibre di collagene, con possibile variazione della viscoelasticità e della resistenza meccanica del tessuto.

Il sistema di fissaggio bronchiale, sviluppato mediante progettazione CAD, è costituito da una struttura principale formata da due piatti circolari paralleli collegati da sei strutture cilindriche che fungono da sistema di guide. Le guide sono sei ed equidistanti tra di loro, permettono scorrimento di sei tasselli a forma conica con punta svasata. L'interfaccia tra i tasselli e le guide è stata ottimizzata mediante un sistema di tolleranze dimensionali che permette l'inserimento a battuta dei tasselli sulla parete bronchiale e la libera traslazione durante la fase di preparazione (Figura 4.6).

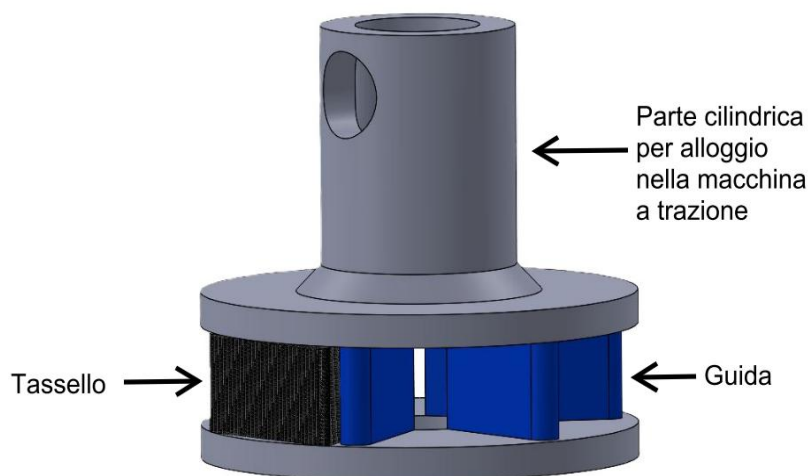
Il meccanismo di bloccaggio si basa sull'interazione di tre elementi fondamentali: un cilindro interno che aderisce alla parete interna del bronco, i sei tasselli dalla posizione regolabile che esercitano una pressione radiale uniforme sulla parete esterna del campione e una fascetta esterna che mantiene in posizione i tasselli garantendo un serraggio omogeneo (Figura 4.6).

Per garantire l'adattabilità del sistema alle diverse dimensioni bronchiali, sono stati progettati cilindri interni intercambiabili con diametri variabili. Una volta inserito il cilindro di diametro appropriato a contatto con la parete interna del bronco, il meccanismo di chiusura viene regolato mediante la fascetta esterna, che applica una tensione controllata sui tasselli. Inoltre le superfici del cilindro interno e quella dei tasselli a contatto rispettivamente con la parete bronchiale interna ed esterna sono state realizzate in modo da avere una rugosità a forma di nido d'ape per garantire un maggiore grip sul tessuto, senza però danneggiarlo.

Infine la parte superiore del dispositivo presenta una conformazione cilindrica appositamente studiata per l'integrazione con la macchina di trazione, assicurando un perfetto allineamento durante l'applicazione del carico (Figura 4.6, A).

La geometria del sistema, unitamente alla possibilità di regolare la posizione dei tasselli, consente il testing a campioni di diverse dimensioni, garantendo al contempo ripetibilità e affidabilità dei dati sperimentali. E' stato realizzato creando tramite il CAD Solidworks le diverse parti costituenti, le quali successivamente sono state stampate tramite stampa 3D a filamento di PLA (Figura 4.7).

A)



B)



Figura 4.6: Rappresentazione CAD del sistema di afferraggio con un tassello inserito (A). Cilindro interno realizzato con la rugosità superficiale a forma di nido d'ape. Per ottimizzare le tempistiche del processo di stampo, ciascun cilindro presenta due misure differenti a seconda del diametro del bronco da testare (B).

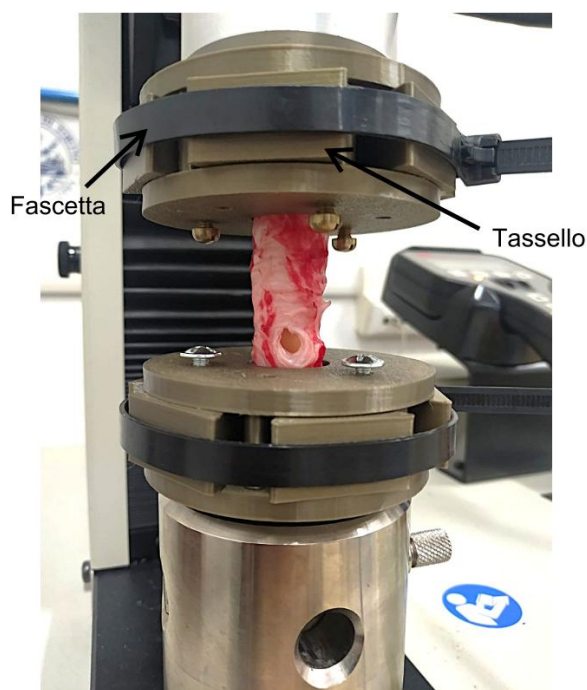


Figura 4.7: Sistema di afferraggio inserito sulla macchina a trazione con campione di bronco montato.

4.5 Protocollo di testing e post processing

Prima dell'inizio di ciascuna prova a trazione, è stata misurata la dimensione di ciascun provino non soggetto a carico mediante l'impiego di un calibro digitale. In particolare per i campioni di forma rettangolare sono state misurate la larghezza e lo spessore nella regione distale, mediale e prossimale del provino calcolando l'area finale come media delle tre aree. Per quanto riguarda i campioni di forma cilindrica cavi, invece, si sono misurati i diametri interni ed esterni della regione prossimale e distale e la lunghezza del provino calcolando l'area come media delle due aree.

Successivamente ciascun provino è stato posizionato nella macchina a trazione ed è stata misurata la lunghezza iniziale del tessuto L_0 (Figura 4.8) impostando un pre-carico pari a 1-2 N a seconda del campione.

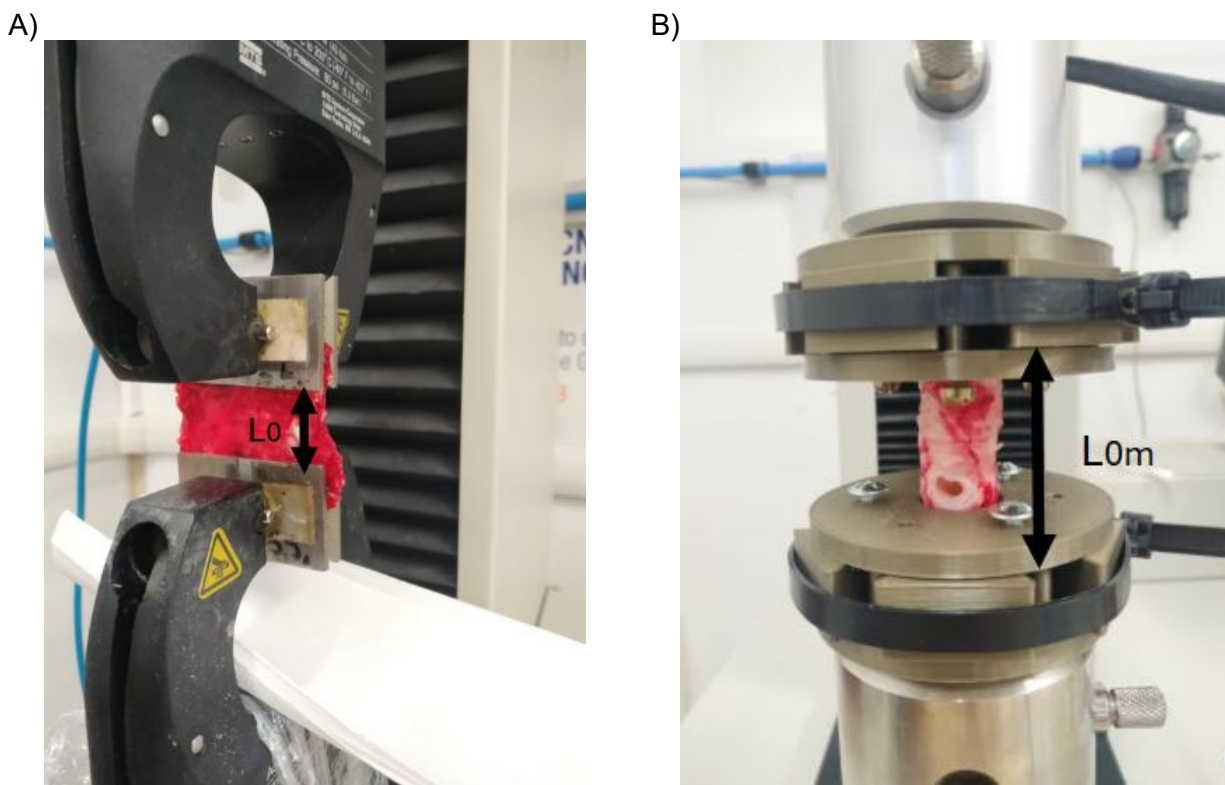


Figura 4.8: Indicazione di riferimento per la misura di L_0 nel caso di campione rettangolare (A) e cilindrico (B).

Per ciascun campione è stato applicato il medesimo protocollo, che ha previsto i seguenti test:

1. Test di preconditionamento;
2. Test stress-rilassamento;
3. Test a trazione fino a rottura.

I test di preconditionamento vengono eseguiti per stabilizzare il comportamento meccanico del campione, eliminando gli effetti viscoelastici transitori dovuti alla storia carico-deformazione precedente. Consistono nell'applicare cicli di carico-scarico, permettendo al materiale di raggiungere una risposta ripetibile e rappresentativa delle sue proprietà

intrinseche. Sono stati quindi effettuati per ogni provino due test di preconditionamento di 5 cicli di carico-scarico ciascuno con una tasso di deformazione del 5% (Figura 4.9).

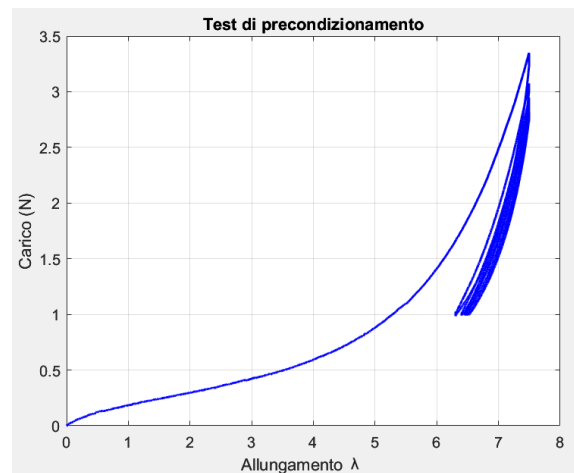


Figura 4.9: Curva caratteristica del test di preconditionamento.

A seguire è stato effettuato il test stress-rilassamento mediante il quale è possibile catturare la risposta temporale del materiale a deformazione costante e quantificare la riduzione dello stress nel tempo per effetto dei fenomeni viscoelastici. Dunque è stato implementato un test di stress-rilassamento a livelli di carico incrementali.

A differenza di tessuti biologici come i tendini, che hanno range di deformazione molto bassi compresi tra il 3-10% [29], il tessuto polmonare, in maniera specifica i bronchi di diametro ridotto, riescono a sopportare range di deformazione superiori compresi tra il 50-70%. Per questo il campione è stato inizialmente deformato fino al 50% della sua lunghezza iniziale, dopodiché si è mantenuta tale deformazione costante per un periodo di 120 secondi. Al termine di questa fase, il tessuto è stato ulteriormente deformato fino al 60% della lunghezza iniziale, seguendo lo stesso protocollo di mantenimento e acquisizione dati. Questo approccio è stato ripetuto in modo sequenziale per cinque livelli di deformazione cioè 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (Figura 4.10).

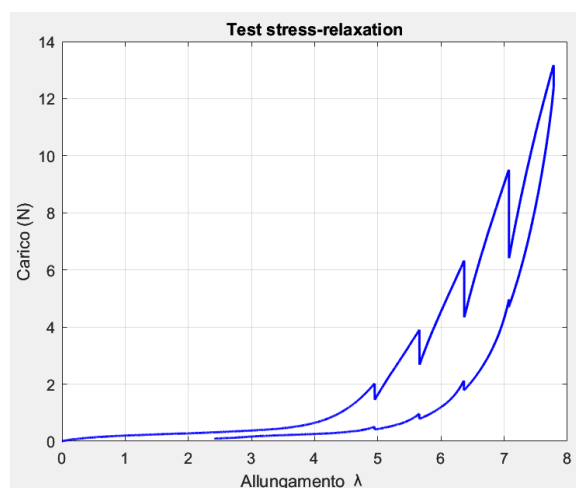


Figura 4.10: Curva caratteristica acquisita durante il test stress-rilassamento tramite il software dedicato della macchina di trazione.

Si può osservare che quando il campione viene deformato si ha una risposta elastica del

materiale dovuta allo stiramento delle fibre collagene e della matrice extracellulare, che termina con un picco di forza massima in corrispondenza del livello di deformazione stabilito. A deformazione costante, invece, le componenti viscosi del tessuto si riorganizzano, comportando una riduzione progressiva dello stress nel tempo fino a raggiungere un plateau, in corrispondenza del quale il tessuto si trova in una situazione di equilibrio meccanico (Figura 4.11).

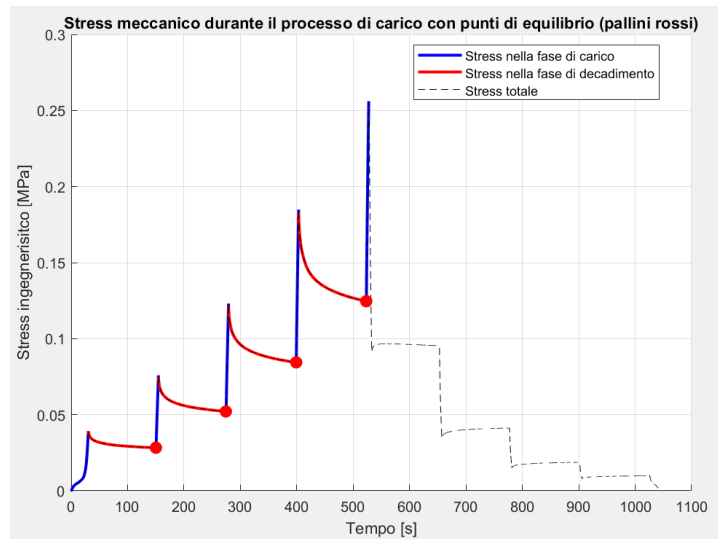


Figura 4.11: Curva test stress-rilassamento a seguito dell'elaborazione dei dati acquisiti tramite il software MATLAB®.

Infine è stato effettuato il test a trazione sottoponendo il campione a deformazione progressiva fino a rottura (Figura 4.12).

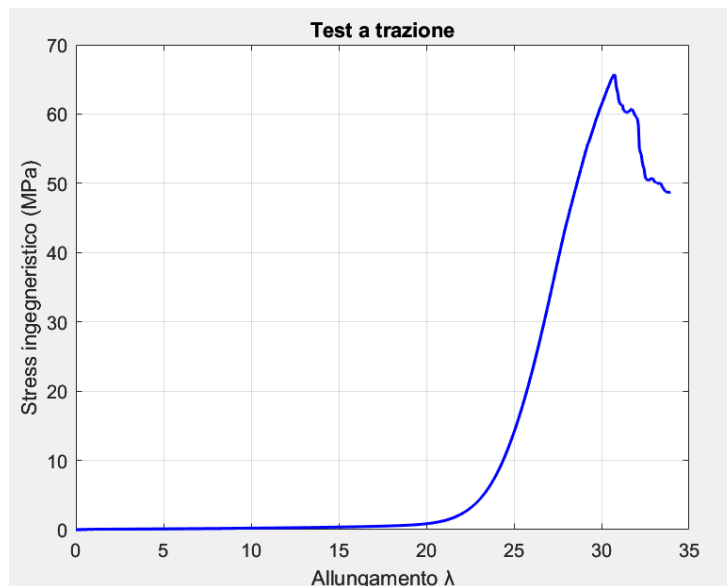


Figura 4.12: Curva caratteristica del test a trazione a seguito dell'elaborazione dei dati acquisiti tramite il software MATLAB®.

Per elaborare tutti i dati e analizzare il carico e lo spostamento ottenuti in ciascun test, è stato utilizzato MATLAB®, sviluppando degli script ad hoc per l'estrazione dei dati, il calcolo dello stress ingegneristico e la rappresentazione grafica. In questo modo è stato possibile

ottenere curve stress-allungamento e curve di stress normalizzato per confrontare i differenti comportamenti meccanici tra campioni diversi e soggetti diversi.

Dopo la visualizzazione e l'analisi dei dati, sono state effettuate delle simulazioni numeriche per la ricerca dei parametri costitutivi, con lo scopo di definire le caratteristiche fisiche del modello costitutivo iperelastico che descrivono il comportamento meccanico dei bronchi. Per fare ciò è stata implementato, sempre tramite MATLAB®, un algoritmo genetico in grado di identificare i valori dei parametri che garantiscono il miglior fitting tra la curva teorica del modello e i dati sperimentali del test stress-rilassamento.

Infine i parametri costitutivi identificati sono stati implementati in un modello a elementi finiti sviluppato nella piattaforma open-source FEniCS, specializzata nella risoluzione di equazioni differenziali alle derivate parziali con il metodo degli elementi finiti. Nella risoluzione si è rappresentato il bronco come una struttura cilindrica cava, con dimensioni simili ai campioni biologici testati sperimentalmente. Attraverso questa simulazione è stato possibile validare la coerenza globale tra il comportamento meccanico osservato nei test di trazione e la risposta numerica del modello, confermando l'affidabilità dei parametri iperelastici ottenuti.

Capitolo 5

5 Risultati e discussione

L'obiettivo principale del presente lavoro è quello di indagare il comportamento meccanico dell'albero polmonare equino, in particolare delle strutture bronchiali di medio calibro. A partire dai dati acquisiti tramite la strumentazione per le prove di trazione è stato possibile determinare la capacità di rilassamento del tessuto per un determinato range di deformazione e la resistenza a rottura del tessuto. Analizzando le risposte dei diversi campioni è stato possibile confrontare il comportamento tra generazioni polmonari e soggetti differenti.

5.1 Analisi primaria

Il numero totale di campioni analizzati è sessanta (60) e sono stati prelevati da un totale di cinque (5) soggetti, denominati rispettivamente da S1 a S5. L'età dei soggetti non è nota, ad eccezione del soggetto anziano di età 33 anni, ma possono essere collocati all'interno di una fascia di età giovane. Non è stato possibile reperire dati relativi a peso, altezza o altri parametri biometrici che potessero essere utili al fine di contestualizzare i risultati; tuttavia è noto che al momento del decesso gli individui non erano affetti da alcuna patologia conclamata che potesse interferire in qualche modo durante l'analisi sperimentale. La data di morte degli individui coincide con la data di prelievo del tessuto dell'albero polmonare e tutti i test meccanici sono stati eseguiti entro le 24 ore successive alla raccolta dei tessuti, dopo aver effettuato le procedure di preparazione precedentemente discusse.

Come accennato, la scelta, la localizzazione e il numero di campioni prelevati da ciascun soggetto è dipeso da numerosi fattori, quali la conformazione anatomica propria dell'albero polmonare, l'integrità dei tessuti dopo il prelievo dell'organo e il bisogno di sviluppare un protocollo di testing efficiente per confrontare i dati sperimentali.

Per queste ragioni del primo individuo sono stati testati campioni appartenenti sia alla trachea, sia al bronco primario destro e sinistro, mentre del secondo e terzo individuo sono stati analizzati campioni appartenenti solo al bronco primario destro e alle sue generazioni principali.

Per il quarto e quinto soggetto è stato impiegato il sistema di afferraggio cilindrico, il quale ha permesso di ottimizzare i tempi di preparazione dei provini, consentendo di testare campioni appartenenti al bronco primario destro, al bronco primario sinistro e alle loro ramificazioni secondarie.

Sono state quindi individuate delle coppie di campioni di soggetti diversi provenienti dalla medesima regione topografica dell'albero polmonare al fine di effettuare un confronto più significativo. Le regioni topografiche di interesse sono in particolare il bronco lobare superiore, le ramificazioni del bronco intermedio e le ramificazioni del bronco lobare inferiore, le quali per semplicità nella rappresentazione grafica seguente verranno indicate rispettivamente come ramificazione primaria, ramificazione secondaria e ramificazione terminale.

I dati presentati in questo capitolo sono stati ottenuti secondo le procedure descritte nel capitolo 4 permettendo di ricavare le rispettive curve di stress-rilassamento e stress-allungamento.

5.2 Analisi dei test stress-rilassamento

Le prove di stress-rilassamento permettono di caratterizzare la componente viscoelastica dei tessuti ed in particolare studiarne sia il comportamento viscoso, ovvero quanto rapidamente il tessuto dissipa l'energia, sia il comportamento a lungo termine, cioè la capacità del tessuto di rilassarsi completamente oppure di trattenere dello stress residuo una volta rimosso il carico. L'analisi comparativa delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento, ottenute dai primi tre soggetti equini nei diversi distretti bronchiali fornisce diverse informazioni riguardo alle proprietà meccaniche del tessuto dell'albero polmonare (Figura 5.1).

Si può osservare che il comportamento meccanico complessivo delle vie aeree è caratterizzato da una marcata elasticità non lineare, tipico dei tessuti biologici ricchi di elastina e collagene, e da una regione iniziale di bassa rigidità seguita da un tratto a pendenza maggiore. Questo andamento è presente in tutte e tre le zone considerate, sebbene con differenze significative tra i vari distretti. Si nota, infatti, che la rigidità del tessuto diminuisce dalla ramificazione primaria a quella terminale, dove le prime mostrano valori di stress assoluti più elevati a parità di allungamento λ . Questa progressione riflette l'adattamento fisiologico della struttura dell'albero polmonare, in cui le vie aeree di calibro maggiore, caratterizzate da una parete più spessa e da un maggiore contenuto di matrice connettiva e di cartilagine, sono biomeccanicamente più rigide, mentre le vie aeree di calibro minore sono intrinsecamente più complianti, e quindi a parità di sollecitazione sono in grado di deformarsi maggiormente (Figura 5.1, A, Figura 5.1, E).

L'influenza dell'età sul comportamento meccanico emerge con chiarezza dal confronto tra il soggetto anziano (S2) e quelli giovani (S1, S3). Analizzando la ramificazione primaria e secondaria (Figura 5.1, A, Figura 5.1, C), il tessuto del soggetto anziano si deforma meno a parità di condizione di carico, suggerendo un plausibile rimodellamento tissutale legato al progredire dell'età. Quest'ultimo è attribuibile ai naturali processi di invecchiamento tissutale, quali un aumento della deposizione di collagene, una maggiore degradazione delle fibre elastiche e un avanzato cross-linking delle proteine della matrice extracellulare, che collettivamente possono alterare la compliance del tessuto. Questi fattori sembrano limitare la capacità del tessuto di deformarsi, impedendo così il raggiungimento degli alti livelli di stress osservati nei campioni sani più deformabili.

Per quanto concerne il comportamento viscoelastico, valutabile mediante le curve stress-rilassamento, è evidente in tutti i campioni il caratteristico decadimento esponenziale dello stress al variare del tempo a deformazione costante. Il fenomeno di rilassamento, generato dallo scorrimento delle fibre e dalla riorganizzazione del fluido interstiziale nel tessuto, risulta tuttavia differente tra i tre soggetti. In generale si può osservare che i campioni giovani tendono ad avere un rilassamento più rapido, indicativo di una maggiore capacità di dissipare energia e di adattarsi alla variazione della sollecitazione, mentre la risposta del soggetto anziano suggerisce una ridotta capacità di riorganizzazione microstrutturale (Figura 5.1 B, Figura 5.1 C).

Si può anche osservare che il grado di rilassamento tende ad aumentare progressivamente dalle ramificazioni prossimali a quelle distali. Nelle ramificazioni terminali (Figura 5.1, D), si ha una risposta viscoelastica più pronunciata, con un decadimento dello stress più marcato, indice di una maggiore capacità delle strutture più periferiche di dissipare le sollecitazioni meccaniche attraverso il riarrangiamento delle loro componenti strutturali.

I dati quindi suggeriscono che le proprietà meccaniche dell'albero bronchiale siano strettamente dipendenti dalla localizzazione anatomica e siano influenzabili dai processi di

rimodellamento tissutale dovuti non solo dai normali processi di invecchiamento, ma plausibilmente anche da numerose patologie con conseguenti ripercussioni sulla efficienza respiratoria.

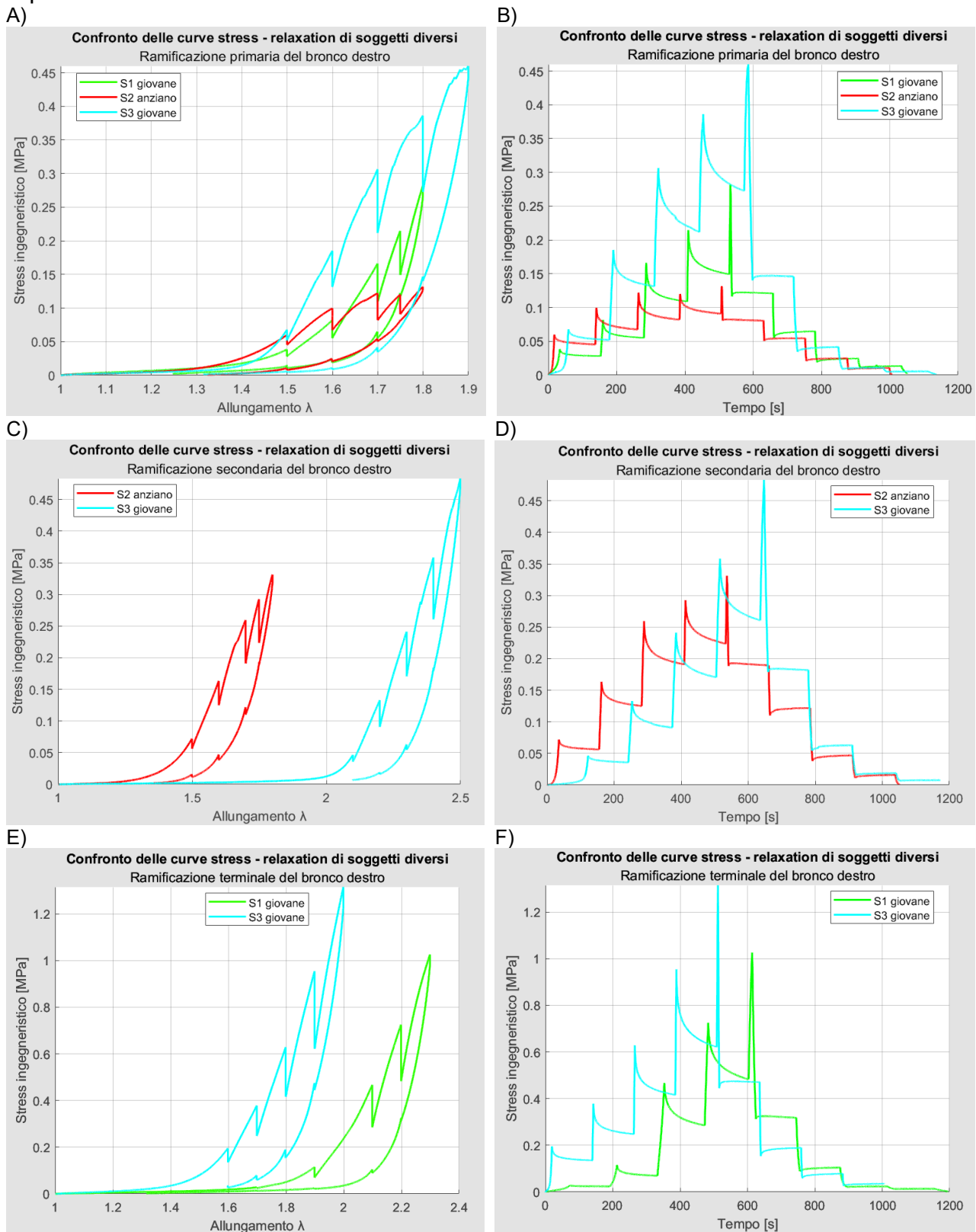


Figura 5.1: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei primi tre soggetti. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e F) alla ramificazione terminale.

L'analisi delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento per i soggetti giovani S4 e S5, usando il nuovo sistema di afferraggio che preserva la conformazione cilindrica originale del campione, fornisce informazioni meccaniche utili e complementari a quelle ricavate dai test precedenti (Figura 5.2, Figura 5.3).

La prima considerazione generale riguarda la riproducibilità dei risultati tra i due soggetti giovani. Si può notare che le curve stress-allungamento dei soggetti S4 e S5 non mostrano un andamento sovrapponibile a differenza dei soggetti sani S1 e S3 precedentemente trattati. In particolare si osserva che il soggetto S5 a parità di deformazione sopporta valori di stress inferiori rispetto al soggetto S4 in tutti e tre i distretti bronchiali analizzati (primario, secondario, terminale) e in entrambi i polmoni (destro e sinistro). Tale discrepanza non è necessariamente legata ad un danneggiamento dei campioni o ad un errore nella metodologia di testing, ma può essere probabilmente ricondotto alla variabilità fisiologica inter-soggetto causata da numerosi fattori, quali età, sesso, condizioni ambientali, che purtroppo non sono stati potuti essere indagati in questo studio (Figura 5.2, A, C ed E, Figura 5.3, A, C ed E).

Si può anche osservare che rispetto ai test condotti su S1, S2 e S3 con campioni in conformazione rettangolare, i valori di stress ingegneristico registrati per S4 e S5 sono relativamente più bassi a parità di allungamento (λ). Questa differenza è particolarmente evidente nelle ramificazioni primarie. Ciò non indica un vero e proprio cambiamento intrinseco delle proprietà del materiale, ma evidenzia un artefatto metodologico dell'approccio di testing. Infatti la prova su campioni cilindri, preservando l'integrità strutturale della fascia muscolare e delle placche di cartilagine e la naturale disposizione delle fibre di collagene ed elastina lungo l'asse circonferenziale, permette un maggior reclutamento della muscolatura liscia ed evita il precoce coinvolgimento e il conseguente irrigidimento del tessuto connettivo che si verifica quando un campione rettangolare viene stirato, portando così a una risposta meccanica più fisiologica e meno rigida.

Nonostante queste discrepanze, può essere rimarcato il gradiente decrescente di rigidità dall'albero bronchiale prossimale a quello distale. Le ramificazioni primarie, sia del bronco di destra sia di sinistra, sopportano i carichi più elevati. Le ramificazioni secondarie mostrano valori di stress intermedi, mentre quelle terminali sono le più complianti, con valori di stress significativamente più bassi a parità di deformazione.

Inoltre le curve per le ramificazioni primarie, secondarie e terminali sono sostanzialmente sovrapponibili tra i due lati, indicando una simmetria biomeccanica nell'albero bronchiale dei soggetti sani analizzati.

Per quanto concerne la cinetica di rilassamento si può notare che le curve stress-rilassamento di S4 e S5 mostrano un'elevata eterogeneità (Figura 5.2, B, D e F, Figura 5.3, B, D e F), soprattutto per quanto concerne i campioni del bronco sinistro, i quali si discostano anche dal comportamento dei soggetti S1, S2 e S3. Per questo in seguito verranno analizzate le curve stress-rilassamento normalizzate in modo da mettere in luce la sola risposta viscoelastica del tessuto rispetto alla risposta meccanica assoluta.

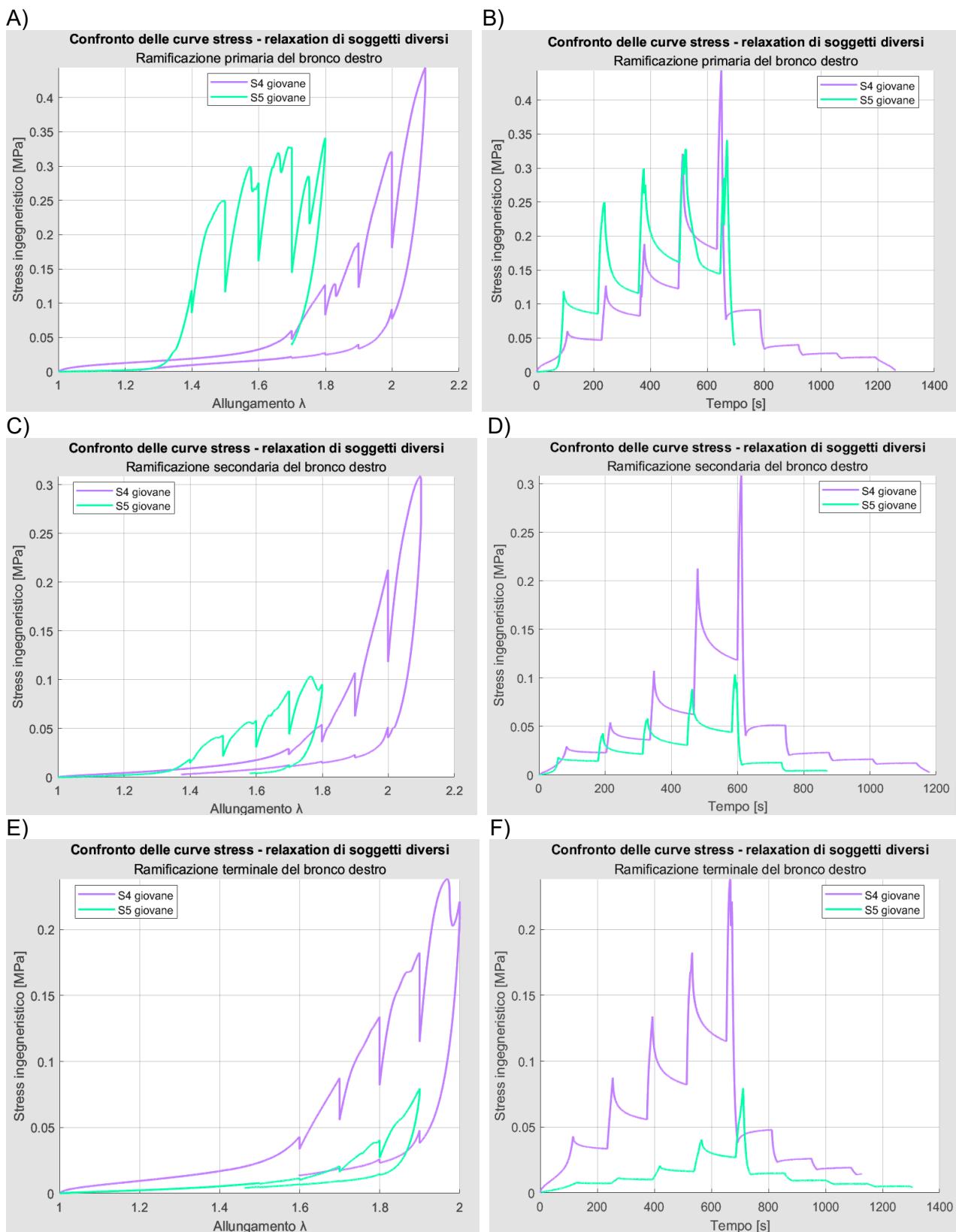


Figura 5.2: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei soggetti 4 e 5 riferiti al bronco destro. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e F) alla ramificazione terminale.

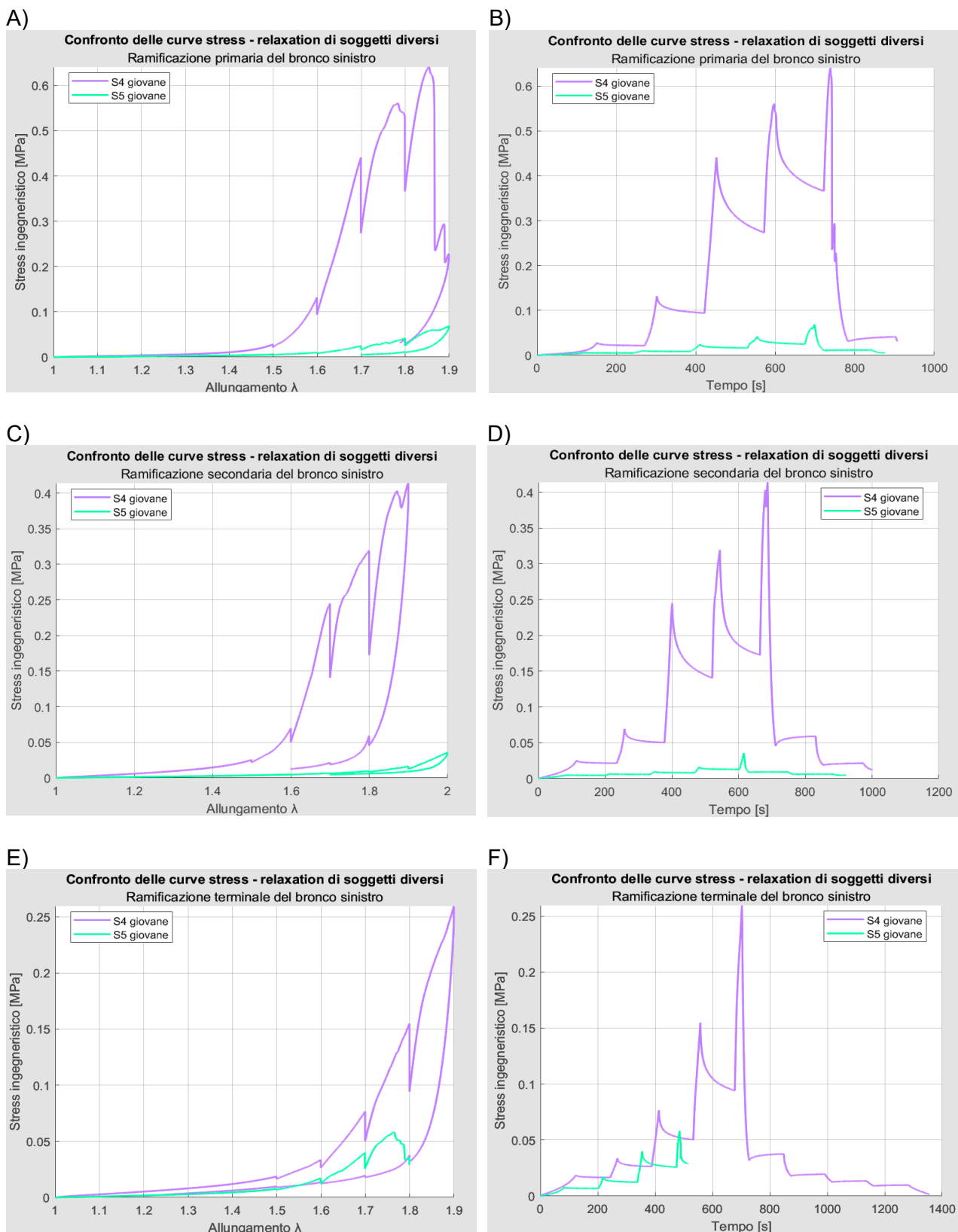


Figura 5.3: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei soggetti 4 e 5 riferiti al bronco sinistro. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e F) alla ramificazione terminale.

5.2.1 Analisi delle curve stress-rilassamento normalizzate

Il comportamento viscoelastico del tessuto al variare del livello di deformazione può essere indagato in maniera più precisa analizzando le curve stress-rilassamento normalizzate della fase di decadimento. Infatti il processo di normalizzazione consente di isolare la risposta viscoelastica da quella meccanica assoluta, evidenziando maggiormente il rilassamento del tessuto al variare delle diverse condizioni di deformazioni imposte. In figura 5.3 è mostrato un esempio di curva di rilassamento normalizzata per diversi livelli di deformazione. Si possono distinguere quattro fasi caratteristiche del rilassamento dello stress: la regione di rilassamento rapido, la regione di transizione, la regione di rilassamento lento e la regione di equilibrio.

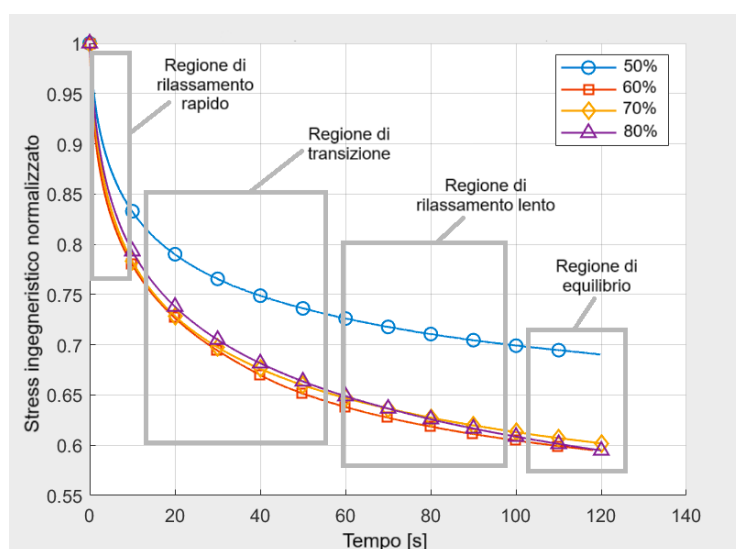


Figura 5.4: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate. In evidenza nei riquadri grigi sono indicate le quattro fasi caratteristiche.

Le curve stress-rilassamento di ciascun campione di ogni paziente sono state normalizzate rispetto al picco massimo dell'antecedente fase di carico, e sono state confrontate le 4 curve risultati, corrispondenti ciascuna ad un livello di deformazione.

Inoltre è stato calcolato per ogni campione la perdita di stress percentuale (PSL) come [29]:

$$PSL = \frac{\sigma_{0.1s} - \sigma_{120s}}{\sigma_{120s}}$$

dove $\sigma_{0.1s}$ e σ_{120s} sono rispettivamente i valori di stress a 0.1 s e 120 s.

In generale, per i soggetti S1, S2 e S3, è stato osservato che all'incremento della percentuale di deformazione si ottiene inizialmente un miglioramento delle capacità di rilassamento del tessuto, in particolare per il 50%, 60% e 70% di deformazione. Tuttavia, a un livello di deformazione pari all'80%, si è riscontrato una riduzione di tale capacità, suggerendo un possibile peggioramento della performance meccanica (Figura 5.5).

Questo comportamento potrebbe essere ricondotto ad un irrigidimento progressivo del tessuto all'aumentare della deformazione, dovuto allo stiramento delle fibre di collagene e a una minore efficacia nel reclutamento delle fibre muscolari. Invero la conformazione rettangolare non fisiologica dei campioni analizzati potrebbe infatti ostacolare il

riarrangiamento microscopico del tessuto, limitando di conseguenza una distribuzione ottimale dei carichi. Inoltre tale andamento si riscontra in tutte e tre le regioni topografiche esaminate, suggerendo quindi non essere dipendente né dal soggetto analizzato né dalla localizzazione dei campioni.

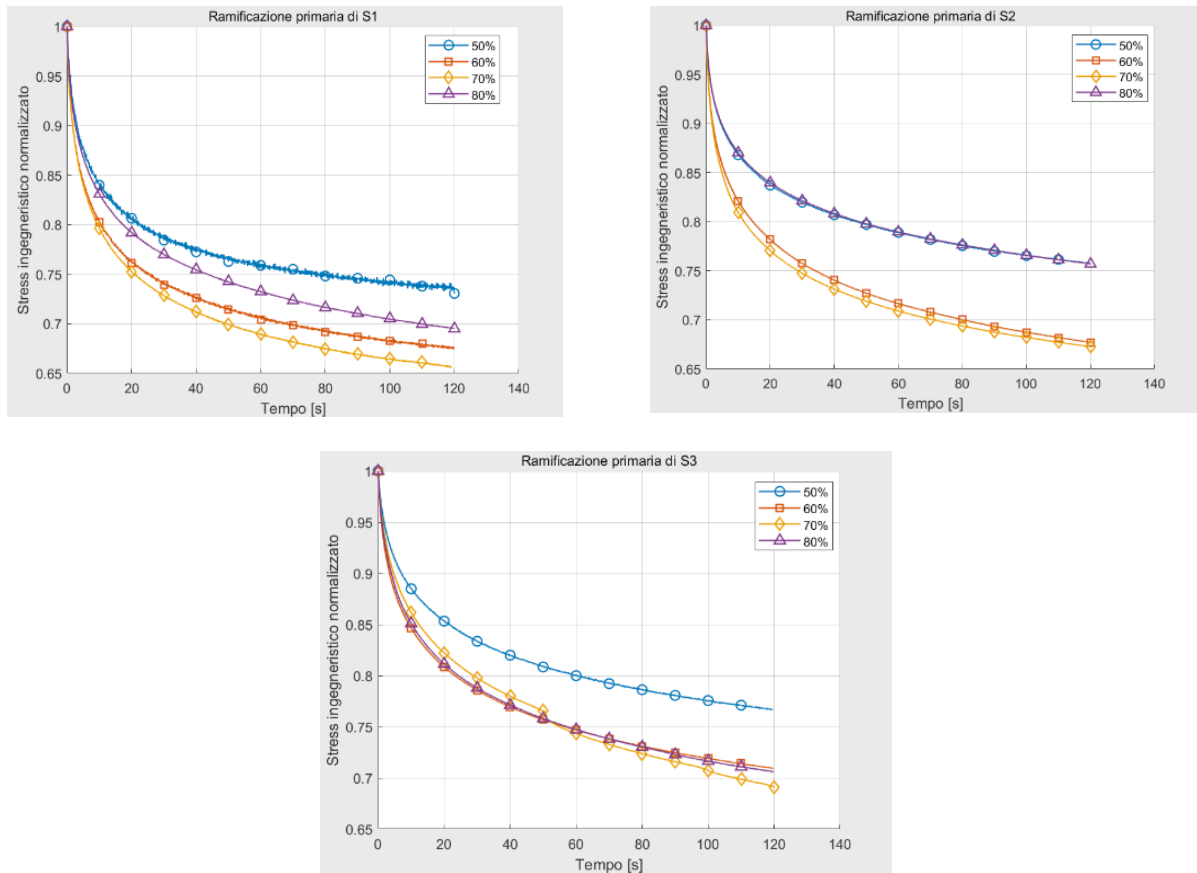


Figura 5.5: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S1, S2 e S3.

Analizzando più nel dettaglio la regione di rapido rilassamento della figura 5.5, confrontando tutte le curve dei tre soggetti, si osserva in generale che S1 e S3 presentano un decadimento dello stress più rapido, rispetto al soggetto S2.

La percentuale di perdita di stress risulta massima per il livello di deformazione del 70%, e considerando i campioni provenienti da tutte e tre le zone in analisi, il valore di PSL è pari in media circa al 35% nei soggetti S1 e S3, mentre al 30% per il soggetto S2.

Le curve stress-rilassamento normalizzate presentano il raggiungimento di un plateau di equilibrio per $t \cong 120$ s. Sebbene infatti si possa verificare un'ulteriore diminuzione dello stress dopo la durata del protocollo di testing, il valore di stress misurato a 120 s è da considerarsi una stima robusta dello stress residuo a lungo termine del tessuto. Questo stress residuo rappresenta la componente puramente elastica della risposta, associata all'allungamento irreversibile delle fibre di collagene e all'energia immagazzinata elasticamente nella matrice extracellulare. L'analisi dei dati in scala semi-logaritmica conferma l'assenza di componenti viscoelastiche di ampia magnitudine oltre i 120 s, supportando la scelta della durata del test per caratterizzare lo stato di equilibrio.

Il fenomeno di irrigidimento del tessuto all'aumentare della grado di deformazione non è stato riscontrato nei due soggetti S4 e S5 testati con il sistema di afferraggio cilindrico. Dalle curve di decadimento si nota un'ottima capacità del tessuto di rilassarsi all'aumentare della percentuale di deformazione (Figura 5.6). Tale andamento si riscontra in tutte e tre le regioni topografiche esaminate e sia per il bronco sinistro sia per quello destro, permettendo di concludere che probabilmente la conservazione delle forma fisiologica del campione migliora le abilità adattive della parete bronchiale.

Analizzando la regione di rapido rilassamento della figura 5.6, confrontando tutte le curve dei due soggetti, si osserva in generale che S4 e S5 presentano un decadimento dello stress più rapido, rispetto ai tre soggetti precedenti, soprattutto all'aumentare della percentuale dei deformazione.

La percentuale di perdita di stress risulta massima per il livello di deformazione del 80%, e considerando i campioni provenienti dalla tutte e tre le zone in analisi, il valore di PSL è pari in media circa al 45% nei soggetti S4, mentre al 40% per il soggetto S5.

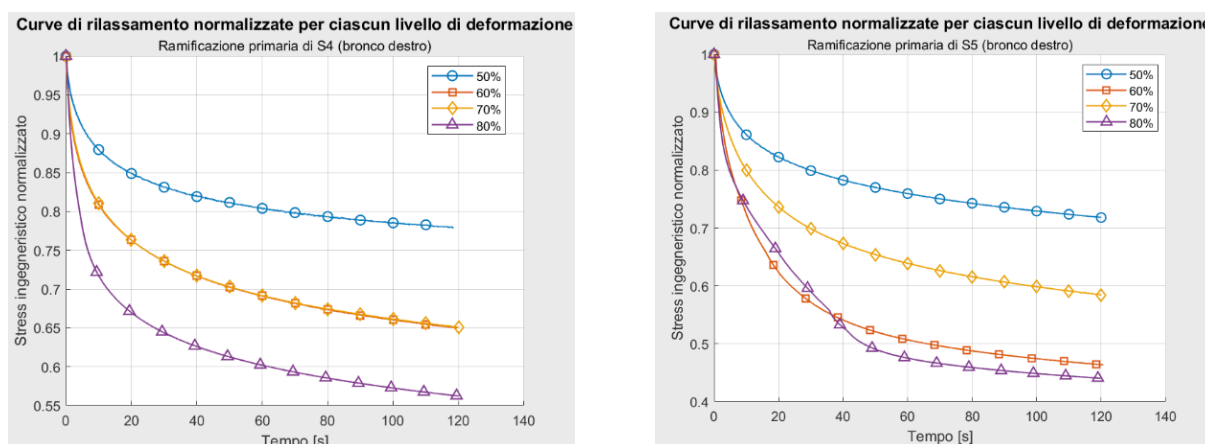


Figura 5.6: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S4 (sinistra) e S5 (destra).

In conclusione, l'analisi comparativa delle curve di stress-rilassamento ha evidenziato comportamenti meccanici differenti riconducibili all'intrinseca variabilità tra i soggetti e al sistema di aggraffaggio scelto.

I campioni preparati con metodo classico (rettangolare) mostrano un'alterazione della capacità di rilassamento a deformazioni più elevate, dovuta ad una variazione microstrutturale indotta dalla geometria non fisiologica. Al contrario, i campioni cilindrici mantengono le loro proprietà viscoelastiche progressive all'aumentare del grado di deformazione.

Questa divergenza comportamentale sottolinea l'importanza cruciale della conservazione della microstruttura tissutale durante la preparazione del campione per una caratterizzazione meccanica fedele delle proprietà fisiologiche del tessuto bronchiale. I risultati suggeriscono che la conformazione geometrica fisiologica è un prerequisito fondamentale per consentire il riarrangiamento microscopico e la distribuzione ottimale dei carichi che caratterizzano la migliore capacità adattiva osservata nei soggetti S4 e S5.

Infine, per quanto concerne il soggetto anziano S2, i dati raccolti non permettono di concludere che le sue capacità di rilassamento siano globalmente inferiori rispetto a quelle dei soggetti sani. È invece più corretto affermare che la dinamica di risposta e di adattamento meccanico risulti più lenta, come evidenziato dalla una regione di rilassamento rapido meno ripida (minore pendenza iniziale) rispetto agli altri soggetti.

5.2.2 Fitting del modello costitutivo ai dati sperimentali

A seguito dell'analisi dei test stress-rilassamento, come descritto nel capitolo 4, sono state effettuate delle simulazioni numeriche per la ricerca dei parametri fisici del modello costitutivo visco-iperelastico.

Vengono quindi presentate per ogni soggetto le curve dei campioni che hanno mostrato il miglior grado di fitting tra la curva teorica del modello e i dati sperimentali del test stress-rilassamento (Figura 5.7).

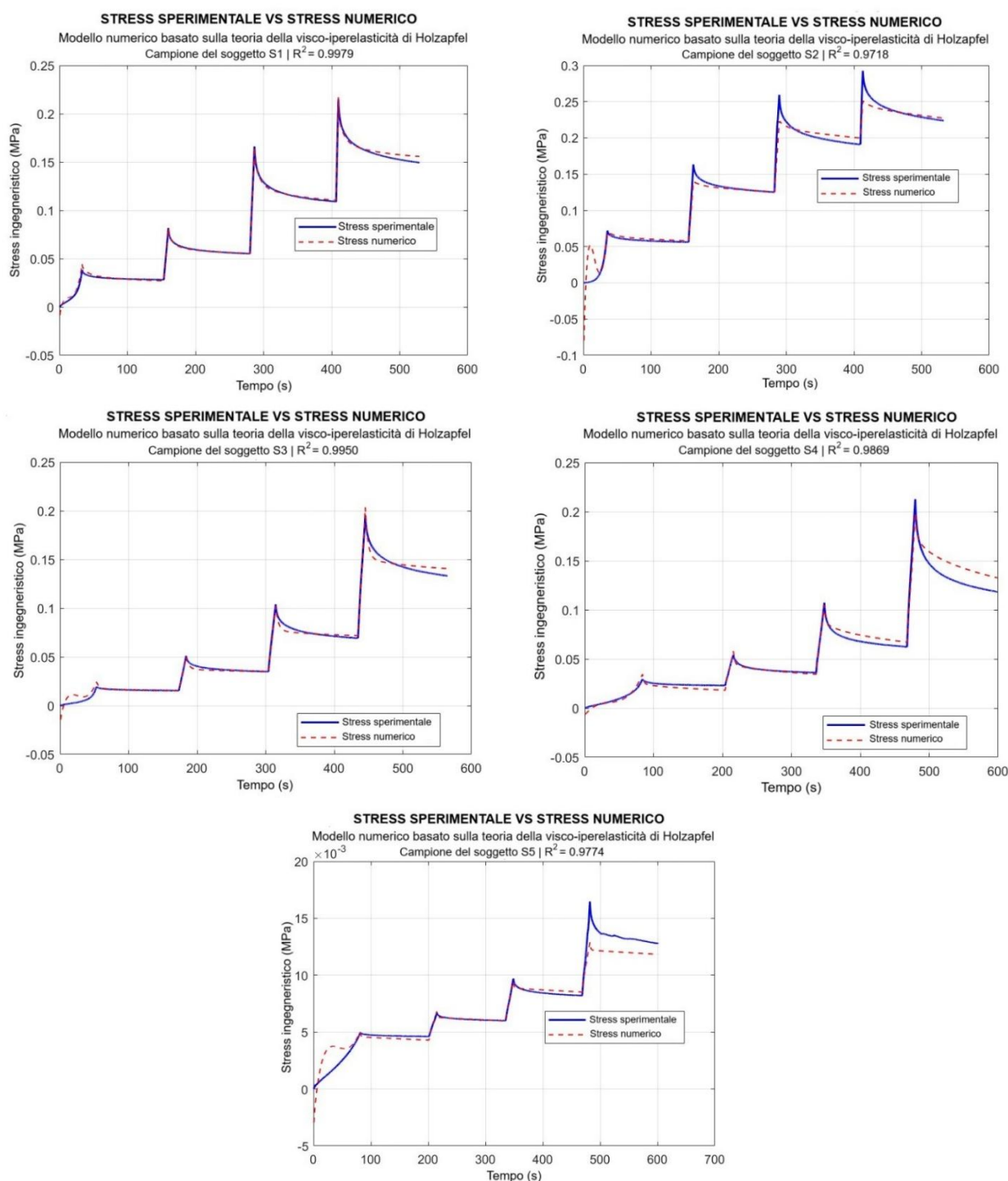


Figura 5.7: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento sperimentali (linea continua in blu) e numeriche (linea tratteggiata in rosso) dei 5 soggetti. Per ogni grafico   mostrato il valore di R^2 per fornire un'indicazione della bont  del fitting.

Al fine di caratterizzare quantitativamente il materiale, viene inoltre presentata una tabella riassuntiva (Tabella I) dei parametri costitutivi k , C_1 , C_2 , α_1 , α_2 presenti nelle funzioni di energia libera secondo l'equazione (10) illustrata nel capitolo 3.

In generale, una buona sovrapposizione tra le curve numeriche ottenute dal modello e i dati sperimentali indica che i parametri identificati sono efficaci nel descrivere il comportamento meccanico del tessuto. Inoltre questo evidenzia che la formulazione matematica del modello incorpora in maniera sufficientemente accurata le relazioni meccaniche correlate alle caratteristiche microstrutturali del tessuto in esame.

Per tutti i soggetti analizzati è stato possibile ottenere un buon fitting globale, con valori del coefficiente di determinazione R^2 pari o superiori a 0.97, confermando la robustezza del modello impiegato. La sovrapposizione tra la curva sperimentale e la curva numerica è risultata particolarmente evidente per i livelli di deformazione intermedi, pari al 60% e 70%, per i quali il modello riesce a catturare con precisione la transizione tra le fasi di rilassamento rapido e lento. Si può osservare, tuttavia, una leggera discrepanza nella fase iniziale di deformazione del 50% per i soggetti S2, S3 e S5, dove il modello tende a sovrastimare lievemente la risposta sperimentale, a differenza dei soggetti S1 e S4 che mostrano un fitting più uniforme su tutti i livelli di deformazione.

È importante sottolineare come, in alcuni campioni, l'insorgenza di fenomeni di slittamento durante il test abbia alterato la risposta sperimentale, introducendo picchi anomali nella curva di stress-rilassamento. Questi artefatti sperimentali hanno inevitabilmente influito sulla bontà del fitting, comportando valori del coefficiente di determinazione R^2 inferiori, compresi tra 0.6 e 0.85. La riduzione dell'accuratezza del fitting non deve essere interpretata come un limite intrinseco del modello, quanto piuttosto come la conseguenza di artefatti sperimentali che influenzano la risposta meccanica. Tali osservazioni evidenziano la necessità di adattare dinamicamente gli intervalli di ottimizzazione dei parametri durante l'utilizzo di algoritmi genetici (GA), al fine di tenere conto non solo del comportamento ideale del materiale, ma anche di possibili imperfezioni sperimentali o microstrutturali non direttamente osservabili, garantendo così una maggiore robustezza e affidabilità del processo di identificazione parametrica.

I parametri presentati in Tabella III forniscono una caratterizzazione quantitativa del comportamento iperelastico del tessuto bronchiale per ciascun soggetto. Come illustrato nel capitolo 3, il modello implementato si basa sulla definizione della funzione di energia libera che scompone il contributo meccanico in una parte isotropa, associata alla matrice extracellulare, e una parte anisotropa, associata alle fibre muscolari lisce presenti nella parete bronchiale.

I parametri C_1 e α_1 governano il contributo iperelastico isotropo della matrice, mentre C_2 e α_2 caratterizzano invece specificamente il contributo passivo delle fibre muscolari lisce, in cui C_2 ne esprime la rigidità e α_2 ne modula il progressivo coinvolgimento e la tensione generata in risposta all'allungamento.

Analizzando nel dettaglio i valori riportati nella tabella II è possibile affermare che i soggetti S1, S2 e S3 mostrano valori relativamente elevati di C_2 (rispettivamente 0.065 MPa e 0.941 MPa), indicando una significativa rigidità associata alla componente muscolare, probabilmente indotta dalla preparazione non fisiologica del campione. Al contrario, i soggetti S4 e S5 presentano valori di C_2 estremamente bassi (0.001 MPa), rivelando che la componente muscolare contribuisce in modo più compliant alla deformazione globale del tessuto. Il parametro k , legato alla resistenza della matrice ad una variazione di volume, è

generalmente più basso in S4 e S5, suggerendo una comprimibilità più pronunciata rispetto ai soggetti S1, S2 e S3.

Infine il soggetto S2 si distingue per un comportamento intermedio, caratterizzato da un valore di C_2 simile a quello dei soggetti S4 e S5, un valore di α_1 significativamente più elevato rispetto a tutti gli altri soggetti, e un valore k di entità intermedia.

<i>Soggetto</i>	k	C_1 (MPa)	α_1	C_2 (MPa)	α_2
S1	0,005	2,30	1,00E-05	0,065	0,72
S2	0,002	1,47	5,41E-05	0,017	0,97
S3	0,0007	2,05	1,00E-05	0,941	0,99
S4	0.00005	2,52	1,40E-05	0,001	0,99
S5	0,0014	0,26	1,00E-05	0,001	0,78

Tabella I: Parametri ottenuti dal fitting delle curve stress-rilassamento per un dato campione di ciascun soggetto. I parametri k , C_1 , C_2 sono rispettivamente il modulo di massa della matrice, il modulo elastico della matrice e delle fibre, e α_1 , α_2 sono dei fattori adimensionali che esprimono il comportamento non lineare della matrice delle fibre.

Al fine di catturare la dipendenza dal tempo e la dissipazione viscosa tipica dei tessuti biologici, il modello incorpora quattro processi di rilassamento, ciascuno regolato da una coppia di parametri viscosi: γ_k e τ_k . I range di ottimizzazione definiti per questi parametri viscosi, che spaziano da $\gamma_k = 0.00001$ a $\gamma_k = 75$ per i fattori di rilassamento e da $\tau_{min} = 0.0001_k = 0.000$ a γ_k e $\tau_{max} = 10000$ s per la costante di tempo di rilassamento, sono stati scelti per permettere al modello di coprire un ampio spettro di comportamenti viscoelastici, dai fenomeni di dissipazione molto rapidi a quelli estremamente lenti e persistenti. La calibrazione dei range di queste coppie di parametri è risultata fondamentale per replicare con accuratezza la transizione tra la fase di rilassamento rapido e la fase di rilassamento lento osservata sperimentalmente.

L'analisi congiunta di tutti i parametri, iperelastici e viscosi, ha consentito quindi di ottenere un eccellente fitting dei dati.

5.3 Analisi dei test a trazione

Al fine di ottenere un quadro il più possibile completo sulle proprietà meccaniche delle vie aeree equine sono stati svolti infine test a trazione uniassiale fino a rottura dei campioni, permettendo in questo modo di analizzare il comportamento iperelastico e anisotropo del tessuto bronchiale.

Anche in questo caso sono stati confrontati campioni provenienti dalla medesima regione topografica come mostrato in figura 5.8 e figura 5.9. In aggiunta è stato possibile determinare diversi parametri meccanici a partire dalle diverse curve stress-allungamento come enunciato nel capitolo 3 (Figura 3.3), i cui valori sono mostrati in tabella I e tabella II.

Le curve stress-allungamento confermano innanzitutto il marcato comportamento elastico non lineare tipico dei tessuti biologici, evidenziando che il tessuto bronchiale si deforma facilmente a basse tensioni per poi irrigidirsi progressivamente a deformazioni più elevate per resistere all'ulteriore stiramento. Tale caratteristica è riscontrabile per tutti i campioni testati e in tutte e tre le regioni considerate. Tuttavia, le curve evidenziano alcune differenze meccaniche correlate sia al soggetto sia alla zona topografia del campione considerata.

I soggetti S1 e S3 mostrano una risposta a trazione simile (Figura 5.8, A e C), anche se raggiungono il punto di rottura a livelli di stress differente (Tabella I), indicando una naturale eterogeneità inter-soggetto delle proprietà meccaniche.

Per quanto concerne il soggetto S2 si evince di nuovo una minore capacità di deformazione a parità di carico (Figura 5.8, A, B), mostrando in generale una minore resistenza a rottura e raggiungendo valori di stress molto inferiori rispetto ai soggetti S1 e S3 (Tabella I).

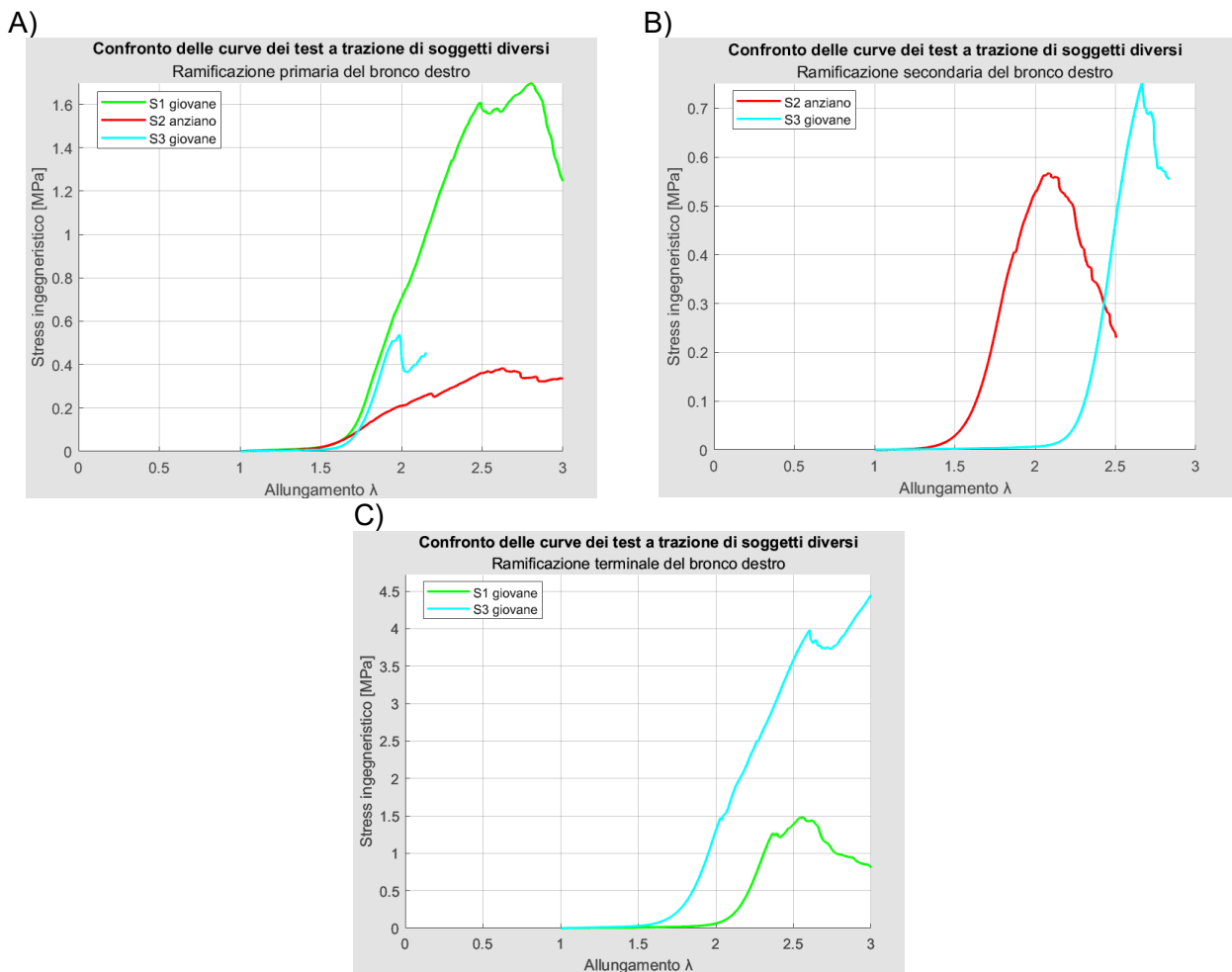


Figura 5.8: Rappresentazione grafica delle curve ottenute dai test a trazione di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S1, S2 e S3. In particolare il grafico A) si riferisce alla ramificazione primaria, il grafico B) alla ramificazione secondaria ed infine il grafico C) alla ramificazione terminale.

Soggetto	Regione	$\sigma_{\max}$ (MPa)	λ_U	E_t (MPa)	σ_y (MPa)	E_s (MPa)
S1	R. primaria	1.6091	2.4881	1.9758	1.5111	0.8025
	R. terminale	1.2680	2.3690	4.8671	1.1804	0.6230
S2	R. primaria	0.2665	2.1820	2.1062	0.2019	0.5317
	R. secondaria	0.5639	2.1857	1.1670	0.5367	0.3192
S3	R. primaria	0.5387	1.9871	2.1452	0.4582	0.3479
	R. secondaria	0.7525	2.6667	2.0512	0.7152	0.3160
	R. terminale	3.9932	2.6014	4.5924	3.7695	1.2764

Tabella II: Parametri ottenuti dalle curve stress-allungamento dei campioni di bronco dei soggetti S1, S2 e S3.

I soggetti S4 e S5 mostrano un comportamento a trazione simile ai soggetti S1 e S3 (Figura 5.9), tuttavia a parità di deformazione i valori di stress ultimo raggiunti sono notevolmente inferiori suggerendo un comportamento meccanico globalmente più compliant (Tabella II).

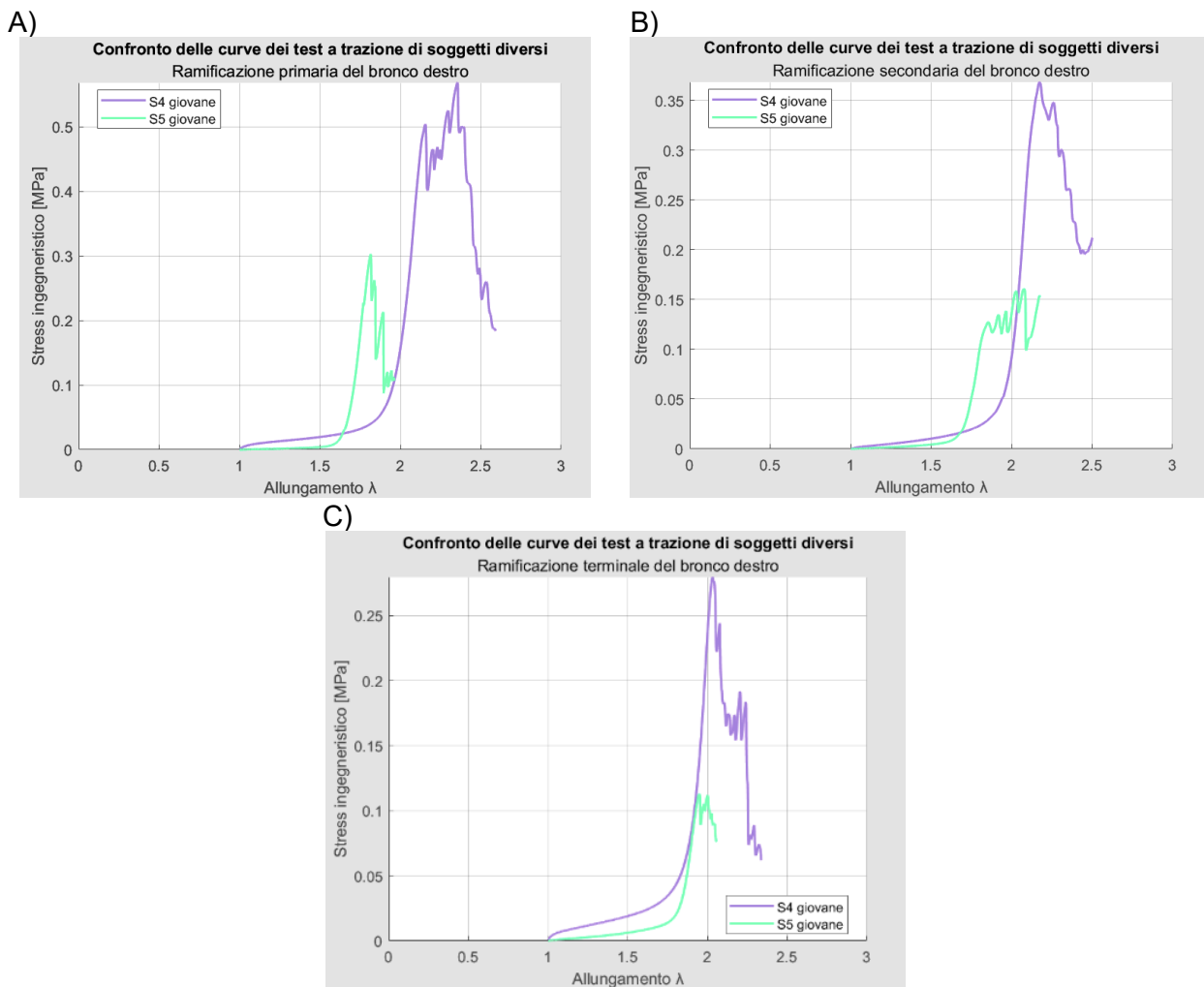


Figura 5.9: Rappresentazione grafica delle curve ottenute dai test a trazione di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S4 e S5.

Inoltre confrontando i valori in tabella I e tabella II si può osservare una minore variabilità inter-individuale per i soggetti S4 e S5 deducendo che il sistema di afferraggio cilindrico utilizzato, preservando l'integrità microstrutturale del tessuto, ha molto probabilmente consentito di misurare una risposta meccanica intrinseca più fedele e ripetibile, caratterizzata da valori di rigidità e resistenza globalmente inferiori e privi di picchi aberranti. Pertanto, questi risultati sottolineano come la scelta del protocollo sperimentale non sia un mero dettaglio tecnico, ma un fattore critico in grado di influenzare in modo decisivo l'esito della caratterizzazione meccanica e la successiva interpretazione biologica dei dati.

Soggetto	Regione	$\sigma_{\max}$ (MPa)	λ_U	E_t (MPa)	σ_y (MPa)	E_s (MPa)
S4	R. primaria	0.5014	2.1515	2.4196	0.4804	0.1856
	R. secondaria	0.3685	2.1736	1.8365	0.3514	0.1892
	R. terminale	0.2799	2.0355	1.6395	0.2699	0.3685

S5	R. primaria	0.3027	1.8180	2.0576	0.2938	0.2703
	R. secondaria	0.1273	1.8507	0.8221	0.1214	0.0973
	R. terminale	0.1124	1.9447	0.8048	0.1098	0.0722

Tabella III: Parametri ottenuti dalle curve stress-allungamento dei campioni di bronco dei soggetti S4 e S5.

5.4 Analisi agli elementi finiti

L'analisi agli elementi finiti (Finite Element Method, FEM) rappresenta una tecnica numerica consolidata per la risoluzione di problemi di meccanica dei solidi e dei continui, definiti tramite equazioni differenziali alle derivate parziali difficilmente risolvibili in forma analitica. Tale metodologia si basa sulla discretizzazione della geometria di un solido in un insieme di sotto-domini, denotati elementi finiti, i quali sono connessi tramite dei punti detti nodi. All'interno di ciascun elemento le variabili incognite, come per esempio spostamenti o pressioni, vengono approssimate da funzioni di forma note, permettendo così di ottenere una soluzione numerica che si avvicina alla risposta reale del problema complesso.

Per quanto concerne lo studio dei tessuti biologici, il metodo FEM rappresenta uno strumento eccellente che consente di modellare materiali strutturalmente complessi caratterizzati da comportamento non lineare e asintotico.

L'analisi FEM implementata in questo studio ha permesso di validare i parametri costitutivi ottenuti tramite GA, riproducendo in un ambiente virtuale la risposta meccanica dei campioni bronchiali equini.

5.4.1 FEniCS

L'implementazione del modello costitutivo è stata sviluppata utilizzando FEniCS, una piattaforma open-source che consente la risoluzione numerica di equazioni differenziali parziali attraverso FEM in ambiente Python. La caratteristica principale di FEniCS è la possibilità di formulare direttamente il problema meccanico in analisi in termini variazionali, usando una sintassi prossima a quella matematica. Ciò rende relativamente semplice implementare modelli elastici non lineari e viscoelastici, come quello di Holzapfel, che sono al centro di questo lavoro.

La struttura del codice implementato segue lo schema proposto nella documentazione ufficiale e in particolare nei tutorial disponibili online, come per esempio [FEniCS tutorial](https://jsdokken.com/dolfinx-tutorial/index.html) (<https://jsdokken.com/dolfinx-tutorial/index.html>). Tale codice è stato adattato al caso specifico del tessuto bronchiale equino, scegliendo la geometria appropriata per modellizzare il bronco polmonare, modificando le condizioni al contorno e le leggi costitutive in modo da rispecchiare il modello visco-iperelastico descritto nel capitolo 3.

Il primo passo è stato quello di definire la geometria adatta per rappresentare il bronco polmonare e in questo caso si è scelto un cilindro cavo, di spessore e dimensioni simili a quelle dei campioni testati sperimentalmente. Tale approssimazione, seppur trascurando la distinzione tra mucosa e sottomucosa e le caratteristiche morfologiche specifiche della parete bronchiale, è risultata adeguata a descrivere la risposta globale del tessuto.

Tale geometria è stata successivamente discretizzata tramite l'uso di una mesh tridimensionale di elementi tetraedrici (Figura 5.10), in quanto particolarmente versatili per descrivere geometrie curve e deformazioni complesse. La dimensione degli elementi è stata scelta in modo da garantire una buona accuratezza numerica e un moderato costo computazionale. Infatti in generale una mesh più fitta consente di migliorare la risoluzione del campo di tensioni e deformazioni, a discapito dei tempi di calcolo, che possono

aumentare notevolmente; viceversa, l'uso di una mesh più grossolana permette di ridurre i costi computazionali ma può introdurre errori numerici significativi, che possono determinare la non convergenza della simulazione. La bontà della mesh e dei suoi elementi è stata verificata tramite un'analisi preliminare di sensibilità, raffinando progressivamente la discretizzazione fino ad ottenere una qualità dei elementi della mesh superiore al 60%.

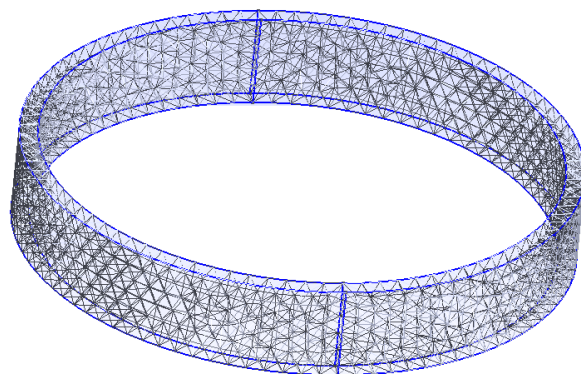


Figura 5.10: *Rappresentazione grafica della mesh tridimensionale di elementi tetraedrici impiegata per discretizzare la geometria cilindrica del bronco.*

Il passo successivo ha previsto di definire le condizioni al contorno. In questo caso sono state imposte le condizioni al contorno di Dirichlet, vincolando direttamente i nodi appartenenti a una delle estremità del cilindro, ovvero imponendovi uno spostamento nullo. In questo modo è stato possibile riprodurre le condizioni sperimentali applicate durante i test meccanici svolti, garantendo che un'estremità del cilindro rimanesse fissa e l'altra mobile. (Figura 5.11).

Condizioni al contorno di Dirichlet



Figura 5.11: *Rappresentazione grafica delle condizioni al contorno imposte alla geometria discretizzata.*

Una volta definite geometria, tipologia di mesh e condizioni al contorno, è stato possibile procedere alla definizione del problema variazionale, il quale rappresenta il fulcro dell'implementazione. Il problema variazionale può essere espresso tramite le equazioni di equilibrio della meccanica dei solidi, derivate dal principio dei lavori virtuali, formulate in

termini di energia potenziale totale del sistema, includendo la parte iperelastica e quella viscosa secondo il modello costitutivo discusso nel capitolo 3. In quest'ottica, la soluzione del problema consiste nel trovare il campo di spostamenti che minimizza l'energia potenziale e che quindi soddisfa le equazioni di equilibrio in forma debole.

Poiché il modello costitutivo visco-iperelastico introduce una forte non-linearità, il problema non può essere risolto con metodi diretti ma la ricerca della soluzione richiede un approccio iterativo. A questo scopo è stato impiegato il metodo di Newton-Raphson, integrato in FEniCS attraverso la classe NewtonSolver. In sintesi l'algoritmo comincia da una configurazione iniziale di spostamenti e, attraverso una sequenza di iterazioni, aggiorna progressivamente la soluzione, calcolando a ogni passo l'errore residuo e correggendo il campo degli spostamenti. Il processo continua finché l'errore residuo scende sotto una soglia prefissata, garantendo così la convergenza della soluzione.

A partire dalla conoscenza del campo degli spostamenti è sufficiente applicare le leggi costitutive spiegate nel capitolo 3 per poter facilmente calcolare lo stress ingegneristico.

5.4.2 Risultati simulazioni numeriche

L'implementazione del modello costitutivo visco-iperelastico fibrorinforzato nella piattaforma FEniCS ha permesso di svolgere una simulazione agli elementi finiti del primo ciclo di carico-scarico dei test di stress-rilassamento. Il confronto quantitativo tra la curva forza-tempo numerica e sperimentale, come illustrato nel grafico in figura 5.12, rivela un accordo generale in termini di ordine di grandezza della forza, attestando la correttezza dell'impostazione del problema meccanico e della procedura di identificazione dei parametri.

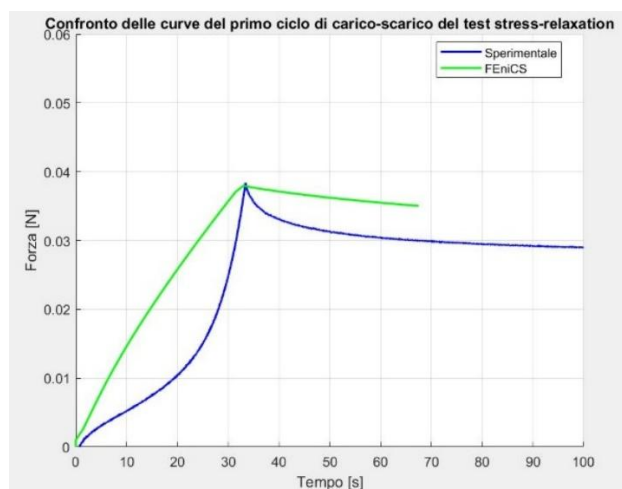


Figura 5.12: Rappresentazione grafica la curva forza-tempo numerica e i dati sperimentali del soggetto S1.

Tuttavia, l'analisi qualitativa evidenzia una discrepanza nell'andamento della fase di carico, dove la risposta numerica non riesce a cogliere appieno la non linearità presente nel comportamento meccanico sperimentale del tessuto bronchiale. Questa divergenza potrebbe essere attribuita, come riportato in letteratura [2], all'inclusione nel modello dell'effetto del primo gradino di carico, una regione transitoria non lineare che andrebbe esclusa dall'analisi per una più accurata identificazione dei parametri materiale. Sebbene questa considerazione sia emersa a posteriori, i risultati ottenuti costituiscono una solida base di partenza. La simulazione ha infatti permesso di visualizzare l'evoluzione del campo degli spostamenti, come mostrato nella sequenza di immagini riportare nella figura 5.13, che riproducono qualitativamente la risposta meccanica del campione al variare del tempo.

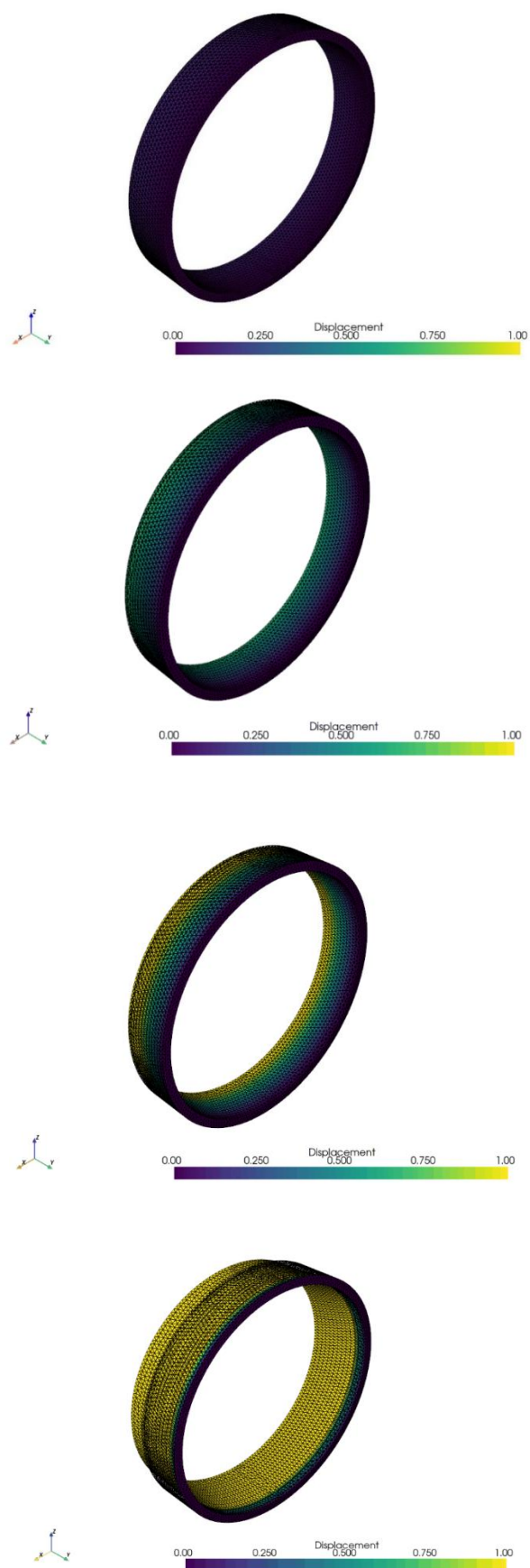


Figura 5.13: Rappresentazione grafica dell'evoluzione del campo degli spostamenti.

Per migliorare l'accuratezza predittiva del modello, sviluppi futuri potrebbero concentrarsi su due aspetti principali: in primo luogo, affinare la procedura di calibrazione escludendo la risposta transitoria iniziale durante il test; in secondo luogo, esplorare l'implementazione di un legame costitutivo che preveda una risposta non lineare più marcata per le fibre nel regime di piccole deformazioni, per meglio rappresentare la ripida salita iniziale della curva sperimentale. Inoltre, la notevole richiesta computazionale, che ha limitato la simulazione solo a 103 secondi, suggerisce la necessità di esplorare strategie di calcolo parallelo più efficienti o tecniche di model order reduction per rendere fattibile la simulazione dell'intero test. Nonostante le criticità emerse, questo lavoro ha validato una metodologia numerica robusta per la simulazione del comportamento meccanico dei bronchi equini, gettando le basi per futuri studi più approfonditi sulla meccanica del sistema respiratorio in condizioni fisiologiche e patologiche

Capitolo 6

6 Conclusioni

La complessa relazione tra l'organizzazione e composizione del tessuto polmonare e la sua funzione meccanica rimane ad oggi in gran parte inesplorata. La carenza di dati sperimentali riguardo le proprietà meccaniche delle diverse strutture polmonari limita significativamente i progressi nella comprensione, diagnosi e trattamento delle patologie respiratorie croniche, che rappresentano una causa primaria di morbidità e calo prestazionale nel cavallo, interessando soggetti di tutte le età e razze.

Attraverso l'analisi biomeccanica è possibile migliorare il grado di comprensione dei fenomeni biofisici che si verificano a livello tissutale, determinando anche eventuali fattori che influenzano l'insorgenza di malattie respiratorie croniche. Dal punto di vista biologico, infatti il rimodellamento della parete bronchiale a causa di processi infiammatori e di elastosi che si verificano durante alcune patologie respiratorie, per esempio asma o bronchite, determinano una variazione delle proprietà meccaniche macroscopiche dell'apparato respiratorio, come un aumento della rigidità e dello stress locale, causato dall'ispessimento della parete bronchiale con conseguente contrazione anomala, e una minore capacità di ritorno elastico e di adattabilità.

Il presente lavoro di tesi ha affrontato questa sfida attraverso un approccio integrato sperimentale e computazionale, finalizzato alla caratterizzazione meccanica e alla modellazione costitutiva del tessuto bronchiale dell'albero polmonare equino.

Come molti tessuti biologici, anche quelli delle strutture dell'albero polmonare, presentano un'organizzazione gerarchica e multistrato che determina complessivamente proprietà meccaniche eterogenee e non lineari. Questa peculiarità, unita alla difficoltà di reperire campioni e di mantenere condizioni sperimentali vicine a quelle fisiologiche, rende la loro caratterizzazione meccanica abbastanza complessa.

Nella prima parte di quest'elaborato sono stati richiamati le principali nozioni anatomiche e fisiologiche del sistema respiratorio equino necessarie per interpretare correttamente i risultati successivamente discussi. L'albero bronchiale si presenta come un sistema dinamico e complesso, costituito da diversi tessuti e molteplici componenti strutturali che interagiscono tra loro. Le fibre di collagene ed elastina, insieme alla muscolatura liscia, determinano la capacità del bronco di deformarsi notevolmente sotto sforzo, mentre la progressiva riduzione della componente cartilaginea lungo le ramificazioni bronchiali conferisce alla struttura complessiva un'importante variabilità regionale. Questa analisi preliminare ha dunque fornito le basi necessarie per interpretare correttamente il comportamento meccanico del tessuto, evidenziando come la sua organizzazione multistrato e composita sia direttamente responsabile delle sue proprietà meccaniche eterogenee e anisotrope e permettendo di orientare la scelta delle metodologie di testing e di modellazione più adatta.

Dal punto di vista sperimentale, si sono svolte prove di trazione uniassiale fino a rottura e di stress-rilassamento a livelli di deformazione incrementale (50% - 90%) su campioni bronchiali provenienti da diversi distretti dell'albero polmonare e da cinque distinti soggetti, di cui quattro giovani e sani e uno anziano, testando un totale di 60 campioni.

In quest'ottica particolare importanza ha rivestito la progettazione di un sistema di afferraggio modulare realizzato tramite stampa 3D a filamento, il quale a differenza dei protocolli tradizionali che prevedono di tagliare longitudinalmente i campioni per ottenere provini rettangolari, ha permesso di testare i campioni preservando la loro integrità

strutturale e la configurazione cilindrica fisiologica. Questo accorgimento metodologico ha rappresentato un contributo innovativo, consentendo di riprodurre in maniera più fedele le condizioni fisiologiche e riducendo gli artefatti che spesso derivano dall'uso di campioni appiattiti o eccessivamente manipolati.

Le prove di stress-rilassamento hanno messo in evidenza il comportamento fortemente viscoelastico del tessuto bronchiale, caratterizzato da una riduzione progressiva dello stress a deformazione costante. L'analisi delle curve normalizzate ha confermato la natura eterogenea della risposta meccanica, mostrando differenze significative tra campioni provenienti da distretti anatomici differenti.

Le prove di trazione uniassiale hanno a loro volta permesso di ottenere le curve sforzo-deformazione, che hanno rivelato l'andamento non lineare tipico dei tessuti molli: una fase iniziale a bassa rigidità, seguita da un incremento graduale del modulo elastico associato al reclutamento delle fibre collagene.

L'analisi comparativa tra le diverse porzioni dell'albero bronchiale ha inoltre messo in luce un chiaro gradiente regionale: le ramificazioni prossimali hanno manifestato valori di stress assoluti più elevati a parità di allungamento, probabilmente per via del maggiore spessore della parete e della più alta concentrazione di cartilagine e matrice connettiva, mentre le diramazioni distali sono risultate più deformabili e complessivamente più complianti.

Anche l'età degli animali si è rivelata un fattore determinante. Il soggetto anziano ha mostrato una ridotta capacità di deformazione a parità di carico e una cinetica di rilassamento complessivamente più lenta rispetto ai soggetti più giovani, suggerendo la presenza di processi di rimodellamento tissutale in atto legati all'invecchiamento. Questo fenomeno, infatti, è plausibilmente riconducibile a un aumento della deposizione di collagene, alla degradazione progressiva delle fibre elastiche e a un cross-linking avanzato delle proteine della matrice extracellulare, condizioni che sono riscontrabili anche in alcune patologie respiratorie croniche come l'asma equina.

Infine, è stata rilevata una variabilità inter-soggetto anche tra cavalli giovani e sani, che può essere attribuita a fattori fisiologici intrinseci quali età, sesso o storia clinica individuale. Sebbene non sia stato possibile indagare in dettaglio tali differenze, esse sottolineano la necessità di includere un numero di campioni più ampio negli studi biomeccanici, al fine di rendere più robusta l'analisi statistica e trarre conclusioni maggiormente generalizzabili.

Infine un aspetto particolarmente rilevante emerso dall'analisi dei dati dei test sperimentali riguarda la metodologia dei test impiegata. I test condotti su campioni cilindrici hanno mostrato una risposta più compliant e una maggiore capacità di rilassamento rispetto a quelli di forma rettangolare, evidenziando come la geometria del campione e la preservazione della sua architettura fisiologica possano influenzare in modo sostanziale le proprietà meccaniche misurate. Questo risultato sottolinea l'importanza della scelta metodologica effettuata per garantire una caratterizzazione più fedele e rappresentativa del comportamento in vivo.

In seguito i dati sperimentali sono stati utilizzati per identificare i parametri di una legge costitutiva visco-iperelastica fibrorinforzata con due famiglie di fibre, basata sul modello di Holzapfel per materiali compositi viscoelastici. Il modello, implementato e calibrato in MATLAB® tramite un algoritmo genetico, ha dimostrato un'eccellente capacità di catturare la risposta meccanica non lineare, anisotropa e viscoelastica del tessuto bronchiale osservata durante i test stress-rilassamento, con coefficienti di determinazione R^2 pari o superiori a 0.97 per la maggior parte dei campioni. La formulazione adottata ha permesso di tenere conto sia della componente elastica non lineare, legata all'orientamento e al progressivo stiramento delle fibre, sia della componente viscosa tempo-dipendente, fondamentale per descrivere i fenomeni di rilassamento. L'analisi parametrica ha rivelato

come i campioni testati in configurazione rettangolare presentassero valori di rigidità della componente muscolare significativamente più elevati rispetto a quelli testati in configurazione cilindrica. Questa discrepanza conferma ulteriormente come la metodologia di testing influenzi direttamente l'identificazione dei parametri materiale, e come il nuovo sistema di afferraggio abbia permesso di stimare proprietà intrinseche più fedeli e fisiologiche.

Il modello ha quindi in generale fornito una rappresentazione coerente e robusta del comportamento del tessuto, costituendo un passo avanti rispetto a descrizioni puramente elastiche o isotrope.

Infine il modello costitutivo così definito è stato implementato in ambiente agli elementi finiti mediante la piattaforma FEniCS, con l'obiettivo di valutare la possibilità di riprodurre numericamente la risposta bronchiale e di aprire la strada a simulazioni più complesse.

Dall'analisi comparativa delle curve forza-tempo emerge che la risposta numerica riproduce fedelmente l'ordine di grandezza della forza sperimentale, attestando la correttezza dell'impostazione del problema meccanico e della procedura di identificazione dei parametri. Tuttavia la discrepanza tra gli andamenti complessivi delle curve, in particolar modo durante la fase non lineare di carico, evidenziano la necessità di ulteriori affinamenti, volti sia a migliorare la riproducibilità della risposta non lineare sia a ridurre i costi computazionali dovuti all'implementazione di un modello così complesso.

Una volta completata questa fase, sarà possibile estendere l'analisi a scenari patologici nonché sviluppare strumenti di supporto per la progettazione di dispositivi terapeutici e per la pianificazione di interventi clinici in medicina veterinaria.

Nel complesso, questo studio offre numerosi spunti per future riflessioni e una comprensione più approfondita delle proprietà biomeccaniche del tessuto bronchiale equino. Lo sviluppo di una metodologia sperimentale innovativa e meno invasiva, unita all'identificazione di parametri costitutivi sufficientemente affidabili, rappresenta un passo importante verso la creazione di modelli computazionali predicibili dell'apparato respiratorio equino, che possano condurre a risultati di interesse sia per la ricerca di base sia per le applicazioni cliniche.

La stretta collaborazione interdisciplinare tra ingegneria e medicina veterinaria si è rivelata essenziale per il successo di questa ricerca, dimostrando come un approccio integrato sia la chiave per affrontare le complesse sfide della biomeccanica dei tessuti molli.

Capitolo 7

7 Direzioni future

Il presente lavoro ha fornito un quadro preliminare ma significativo sulle proprietà meccaniche del tessuto bronchiale equino, gettando le basi per una caratterizzazione biomeccanica più approfondita. Tuttavia, come in qualsiasi progetto di ricerca sperimentale, è possibile identificare diverse limitazioni metodologiche e altrettante promettenti direzioni per studi futuri, che potrebbero non solo confermare e raffinare i risultati ottenuti ma anche estendere notevolmente la portata e l'applicabilità della ricerca.

Un primo aspetto critico riguarda la gestione dei campioni e le condizioni di testing. Sebbene le prove meccaniche siano stati condotte entro 24 ore dal prelievo e i campioni siano stati conservati in condizioni controllate, all'interno di contenitori sterili e a contatto con soluzione fisiologica, il lasso di tempo tra la dissezione e il testing potrebbe aver influito, seppur in misura limitata, sulle proprietà meccaniche del tessuto a causa di processi degradativi post-mortem. L'ideale sarebbe eseguire le prove meccaniche immediatamente dopo l'autopsia, minimizzando così qualsiasi alterazione o acidificazione dei tessuti e preservando il più possibile le caratteristiche del tessuto nel suo stato fisiologico.

Inoltre, l'ambiente di testing non riproduce pienamente il microambiente fisiologico dei bronchi in vivo. Parametri quali la temperatura, l'umidità relativa, il pH e la presenza di fluidi biologici svolgono un ruolo cruciale nel comportamento meccanico dei tessuti molli. Prove condotte a temperatura corporea all'interno di un bagno fisiologico con controllo del pH e dell'osmolarità potrebbero fornire una caratterizzazione meccanica più fedele e significativa. Sul piano metodologico, l'acquisizione delle dimensioni iniziali dei campioni è stata effettuata con metodi tradizionali a contatto, che potrebbero introdurre errori di misura legati alla manipolazione del tessuto. L'impiego di tecniche di acquisizione non invasive, come la microscopia ottica o sistemi di imaging tridimensionale, permetterebbero una determinazione più precisa della geometria del campione senza rischiare di comprimere o deformare il tessuto molle e ridurrebbero la variabilità dei dati. Inoltre una maggiore standardizzazione delle procedure di taglio e preparazione dei campioni potrebbe garantire forme più omogenee e riproducibili, facilitando il confronto tra prove differenti.

Un secondo aspetto è rappresentato dalla natura stessa delle prove sperimentali effettuate. Nel presente lavoro sono stati eseguiti test di trazione uniassiale e di stress-rilassamento, che forniscono informazioni importanti ma parziali. Le vie aeree, infatti, in vivo sono sottoposte a stati di deformazione più complessi, in cui agiscono sollecitazioni multiassiali e pressioni interne. La mancanza di test biassiali o triassiali limita la possibilità di descrivere in maniera completa l'anisotropia del tessuto e di catturare fenomeni non osservabili in condizioni uniassiali. In futuro sarà quindi necessario integrare le prove uniassiali con test meccanici più avanzati, in grado di riprodurre meglio le condizioni fisiologiche.

In aggiunta per comprendere appieno i meccanismi alla base del comportamento meccanico osservato, potrebbe risultare utile affiancare ai test meccanici una caratterizzazione microstrutturale dei campioni. L'uso di analisi istologiche e immunoistochimiche condotte sui provini prima e dopo i test meccanici permetterebbero di correlare direttamente la risposta macroscopica con i fenomeni microscopici, come il riallineamento delle fibre di collagene, il danneggiamento della microstruttura o la delaminazione degli strati tissutali.

Dal punto di vista computazionale, il modello costitutivo visco-iperelastico implementato costituisce un solido punto di partenza, anche se tuttavia la sua calibrazione è stata limitata ai soli dati uniassiali. L'inclusione di dati sperimentali provenienti da test multiassiali sarebbe

fondamentale per raffinare la stima dei parametri, validare le assunzioni alla base del modello, come per esempio l'indipendenza delle due famiglie di fibre, e ridurre significativamente le incertezze del modello. I prossimi sviluppi dovranno quindi concentrarsi sulla validazione numerica, sulla simulazione di scenari patologici e sull'integrazione con modelli fluidodinamici, così da arrivare a una descrizione più completa dell'interazione fluido-struttura nelle vie aeree equine.

Infine, un limite intrinseco a questo tipo di studi riguarda la disponibilità e l'eterogeneità dei campioni biologici. L'età, il sesso e le condizioni cliniche dei soggetti possono influenzare significativamente i risultati. Per questo motivo, in futuro sarà fondamentale ampliare il numero di soggetti testati e cercare di raccogliere informazioni cliniche dettagliate sugli animali, così da poter effettuare analisi statistiche più robuste e valutare l'effetto delle variabili biologiche sulle proprietà meccaniche osservate.

In conclusione, le prospettive future si articolano su più livelli: migliorare le condizioni sperimentali per avvicinarsi quanto più possibile alla fisiologia reale, ampliare il numero e la tipologia di test meccanici per catturare la complessità del tessuto, affinare le tecniche di preparazione e acquisizione dei campioni, considerando in maniera più sistematica l'eterogeneità biologica dei soggetti analizzati, e infine validare e arricchire i modelli numerici attraverso l'integrazione di nuovi dati, includendo simulazioni fluidodinamiche accoppiate per studiare l'interazione tra flusso d'aria e struttura bronchiale. Attraverso questo percorso sarà possibile raggiungere una comprensione più completa della biomeccanica bronchiale e tradurre i risultati in strumenti utili non solo per la medicina veterinaria, ma anche per la medicina comparata e per lo sviluppo di tecniche diagnostiche e terapeutiche avanzate.

Lista delle figure

Figura 2.1: Diagramma del sistema respiratorio equino (adattata da “Illustrated Atlas of Clinical Equine Anatomy and Common Disorders of the Horse”).	6
Figura 2.2: Parete del bronco intraparenchimale.	7
Figura 2.3: Epitelio pseudostratificato, in evidenza sia le cellule caliciformi e sia le ciglia...	7
Figure 2.4: Rappresentazione grafica della struttura della membrana basale.	8
Figure 2.5: L'immagine illustra l'anatomia assiale del distretto cranio-cervicale equino, con particolare riferimento alle strutture delle vie aeree nasali. Sono inoltre indicati con 1: meato mediale; 2: meato dorsale; 3: meato ventrale.	10
Figura 2.6: Vista laterale dell'area faringolaringea durante (A) respirazione normale, (B) deglutizione. Sono indicati rispettivamente: 1: cavità nasale; 2: rinofaringe; 3: orofaringe; 4: palato molle; 5: ostio intrafaringeo ("asola"); 6: epiglottide; 7: cartilagine cornicolata; 8: laringe; 9: trachea; 10: tasca gutturale; 11: seno frontale; 12: seno sfenopalatino; 13: esofago; 14: lingua; 15: bolo alimentare; 16: laringe chiusa (adattata da [10]).	11
Figura 2.7: Immagine endoscopica di una laringe sana equina. Sono indicati rispettivamente 1: cartilagini aritenoidee; 2: piega ariepiglottica; 3: corda vocale; 4: epiglottide (adattata da [11]).	12
Figura 2.8: Trachea (sezione trasversale).	13
Figura 2.9: Campione di trachea equina della zona toracica aperto dorsalmente per mostrare il muscolo trachealis (A); Campione di muscolo trachealis estratto (B).	13
Figura 2.10: Bronco intraparenchimale (sezione trasversale). Figura 2.11: Bronchi respiratori, sacca alveolare (sezione trasversale) con alveoli.	14
Figura 2.11: Bronchi respiratori, sacca alveolare (sezione trasversale) con alveoli.	15
Figura 2.12: Bronchiolo terminale (sezione trasversale).	16
Figura 2.13: Illustrazione anatomica di un polmone equino (adattata da [10]).	16
Figura 2.14: Struttura interna di un alveolo polmonare.	17
Figura 2.15: Rappresentazione schematica delle più frequenti malattie respiratorie nella specie equina.	20
Figura 2.16: Rimodellamento della parete delle vie aeree nel caso di asma cronico (A). Immagini istologiche di una parete bronchiale sana e asmatica a confronto (B) (adattata da [7] [15]).	21
Figura 3.1: Durante il test a trazione uniassiale la deformazione avviene preservando il volume della regione centrale omogenea del campione.	24
Figure 3.2: Esempio di curve stress-allungamento di alcuni materiali.	25
Figura 3.3: Esempio di una classica curva stress-allungamento di un tessuto biologico.	25
Figura 3.4: Esempio di struttura tubulare composita rinforzata da due famiglie di fibre, ognuna con direzione preferenziale (adattata da [24]).	29
Figura 3.5: Sistema di riferimento scelto.	29
Figura 4.1: Albero polmonare estratto dal soggetto 1, costituito dalla parte distale della trachea e dai bronchi e ramificazioni principali (A). Polmone del soggetto 1, dopo la rimozione delle strutture bronchiali (B).	35

Figura 4.2: Vengono qui mostrati i campioni ottenuti dissezionando il bronco principale destro dell'albero polmonare del soggetto 2.	36
Figura 4.3: Test a trazione condotto su campioni di forma rettangolare ottenuti indicendo longitudinalmente il bronco (A). Test a trazione condotto con il sistema di afferraggio sviluppato per testare i campioni in configurazione cilindrica (B).	37
Figura 4.4: Strumentazione usata per effettuare i test meccanici.	37
Figura 4.5: A sinistra vengono evidenziate le specifiche della macchina a trazione e come vengono posizionate le piastre rettangolari sulle ganasce. A destra, invece, si può osservare la strumentazione con un campione di bronco posizionato: Il meccanismo di chiusura delle piastre rettangolari è controllato da un sistema a pressione che serra le ganasce. Nei cerchi sono evidenziati i due fili che garantiscono l'accoppiamento tra il sistema di pressione e le ganasce.	38
Figura 4.6: Rappresentazione CAD del sistema di afferraggio con un tassello inserito (A). Cilindro interno realizzato con la rugosità superficiale a forma di nido d'ape. Per ottimizzare le tempistiche del processo di stampo, ciascun cilindro presenta due misure differenti a seconda del diametro del bronco da testare (B).	40
Figura 4.7: Sistema di afferraggio inserito sulla macchina a trazione con campione di bronco montato.	40
Figura 4.8: Indicazione di riferimento per la misura di L_0 nel caso di campione rettangolare (A) e cilindrico (B).	41
Figura 4.8: Indicazione di riferimento per la misura di L_0 nel caso di campione rettangolare (A) e cilindrico (B).	42
Figura 4.10: Curva caratteristica acquisita durante il test stress-rilassamento tramite il software dedicato della macchina di trazione.	42
Figura 4.11: Curva test stress- rilassamento a seguito dell'elaborazione dei dati acquisiti tramite il software MATLAB®.	43
Figura 4.12: Curva caratteristica del test a trazione a seguito dell'elaborazione dei dati acquisiti tramite il software MATLAB®.	43
Figura 5.1: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei primi tre soggetti. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e D) alla ramificazione terminale.	47
Figura 5.2: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei soggetti 4 e 5 riferiti al bronco destro. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e D) alla ramificazione terminale.	48
Figura 5.3: Rappresentazione grafica delle curve stress-allungamento e stress-rilassamento dei soggetti 4 e 5 riferiti al bronco sinistro. In particolare i grafici A) e B) si riferiscono alla ramificazione primaria, i grafici C) e D) alla ramificazione secondaria, ed infine i grafici E) e D) alla ramificazione terminale.	49
Figura 5.4: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate. In evidenza nei riquadri grigi sono indicate le quattro fasi caratteristiche.	51
Figura 5.5: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S1, S2 e S3.	52
Figura 5.6: Rappresentazione grafica delle curve stress-rilassamento normalizzate di un	

campione della ramificazione primaria per i soggetti S4 (sinistra) e S5 (destra).	53
Figura 5.7: Rappresentazione grafica delle curve stress- rilassamento sperimentali (linea continua in blu) e numeriche (linea tratteggiata in rosso) dei 5 soggetti. Per ogni grafico è mostrato il valore di R^2 per fornire un'indicazione della bontà del fitting.	54
Figura 5.8: Rappresentazione grafica delle curve ottenute dai test a trazione di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S1, S2 e S3. In particolare il grafico A) si riferisce alla ramificazione primaria, il grafico B) alla ramificazione secondaria ed infine il grafico C) alla ramificazione terminale.	57
Figura 5.9: Rappresentazione grafica delle curve ottenute dai test a trazione di un campione appartenente alla ramificazione primaria per i soggetti S4 e S5.	58
Figura 5.10: Rappresentazione grafica della mesh tridimensionale di elementi tetraedrici impiegata per discretizzare la geometria cilindrica del bronco.	60
Figura 5.11: Rappresentazione grafica delle condizioni al contorno imposte alla geometria discretizzata.	60
Figura 5.12: Rappresentazione grafica la curva forza-tempo numerica e i dati sperimentali del soggetto S1.	61
Figura 5.13: Rappresentazione grafica dell'evoluzione del campo degli spostamenti.	62

Lista delle tabelle

Tabella I: Parametri ottenuti dal fitting delle curve stress- rilassamento per un dato campione di ciascun soggetto. I parametri k, C_1, C_2 sono rispettivamente il modulo di massa della matrice, il modulo elastico della matrice e delle fibre, e α_1, α_2 sono dei fattori adimensionali che esprimono il comportamento non lineare della matrice delle fibre.	56
Tabella II: Parametri ottenuti dalle curve stress-allungamento dei campioni di bronco dei soggetti S1, S2 e S3.	57
Tabella III: Parametri ottenuti dalle curve stress-allungamento dei campioni di bronco dei soggetti S4 e S5.	58

Bibliografia

- [1] G. Chagnon, M. Rebouah, and Denis Favier, 'Hyperelastic Energy Densities for Soft Biological Tissues: A Review.'
- [2] Mona Eskandari, Alberto L. Arvayo, and Marc E. Levenston, 'Mechanical properties of the airway tree: heterogeneous and anisotropic pseudoelastic and viscoelastic tissue responses'.
- [3] MonaEskandari, TaraM.Nordgren, and GraceD.O'Connell, 'Mechanics of pulmonary airways: Linking structure to function through constitutive modeling, biochemistry, and histology'.
- [4] Samaneh Sattari and Mona Eskandari, 'Characterizing the viscoelasticity of extra- and intra-parenchymal lung bronchi'.
- [5] Samaneh Sattari, Crystal A Mariano, and Mona Eskandari, 'Biaxial mechanical properties of the bronchial tree: Characterization of elasticity, extensibility, and energetics, including the effect of strain rate and preconditioning'.
- [6] Mona Eskandari, Ware G. Kuschner, and Ellen Kuhl, 'Patient-Specific airway wall remodeling in chronic lung disease'.
- [7] Mona Eskandari, Ali Javili, and Ellen Kuhl, 'Elastosis during airway wall remodeling explains multiple co-existing instability patterns'.
- [8] Crystal A. Mariano, Samaneh Sattari, Gustavo O. Ramirez, and Mona Eskandari, 'Effects of tissue degradation by collagenase and elastase on the biaxial mechanics of porcine airways'.
- [9] Jeffrey Lakritz, Erik R. Wisner, and Charles G. Plopper, 'The respiratory system of the horse: selected aspects of the functional anatomy and cell biology of normal equine respiratory'.
- [10] Pierre Lekeux, tatiana Art, and David R. Hodgson, 'The Respiratory System: Anatomy, Physiology, and Adaptations to Exercise and Training'.
- [11] Lise C. Berg et al., 'Equine respiratory endoscopy'.
- [12] Junqueira, L.C. and J. Carneiro, 'Basic Histology, 11th ed'. 2007.
- [13] Joseph F. Tomashefski, Jr. and Carol F. Farver, 'Anatomy and histology of the lung'.
- [14] Adam J. Booth et al., 'Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation'.
- [15] Mona Eskandari, Martin R. Pfaller, and Ellen Kuhl, 'On the role of mechanics in chronic lung disease'.
- [16] James C. Hogg et al., 'The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease'.
- [17] Anthony Bai et al., 'Propose nomenclature for quantifying subdivisions of bronchial wall'.
- [18] Myrtle Pirie, H. M. Pirie, and N. G. Wright, 'A scanning electron microscopic study of the equine upper respiratory tract'.
- [19] M. Lei, H. Ghezzi, M.F. Chen, and D. H. Eidelman, 'Airway smooth muscle orientation in intraparenchymal airways'.
- [20] Maria Helena Sequeira Cardoso, 'Experimental study of the human anterolateral abdominal wall biomechanical properties of fascia and muscles'. 2012.
- [21] G.A. Holzapfel, 'Biomechanics of Soft Tissue'.
- [22] Gerhard Holzapfel, 'Nonlinear solid mechanics: A continuum approach for engineering'.
- [23] Gerhard Holzapfel and Thomas C. Gasser, 'A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models'.
- [24] Gerhard Holzapfel and Thomas C. Gasser, 'A viscoelastic model for fiber-reinforced composites at finite strains: Continuum basis, computational aspects and applications'.
- [25] A. J. M. Spencer, 'Continuum theory of the mechanics of fibre-reinforced composites'.

- [26] Michael R. Hill *et al.*, 'A theoretical model of inflammation-andmechanotransduction driven asthmatic airway remodelling'.
- [27] John S. Kang, Kishev Navindaran, J. Phillips, K. Kenny, and Kee S. Moon, 'Characterization of mechanical properties of soft tissues using sub-microscale tensile testing and 3D-Printed sample holder'.
- [28] Samuel R.Polio, Aritra Nath Kundu, Carey E. Dougan, and Nathan P.Birch, 'Cross-platform mechanical characterization of lung tissue'.
- [29] Sylwia D. Lagan and Aneta Liber-Knec, 'Stress relaxation of porcine tendon under simulated biological environment: experiment and modeling'.