

**POLITECNICO DI MILANO**

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**CARATTERIZZAZIONE POROELASTICA  
DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE IN PROVE DI  
CREEP DI NANOINDENTAZIONE**

Relatore: *Prof.* Pasquale VENA

Correlatore: *Ing.* Matteo TAFFETANI

Tesi di Laurea Specialistica di:

Giovanni GANDOLFI

Matr. n. 750113

**Anno Accademico 2010-2011**



# Indice

<b>SOMMARIO</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>STRUTTURA E PROPRIETÀ DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE</b> .....	3
2.1 Struttura e composizione della cartilagine articolare .....	4
2.1.1 Collagene .....	4
2.1.2 Condrociti .....	6
2.1.3 Proteoglicani .....	6
2.1.4 Fluido interstiziale .....	7
2.2 Proprietà meccaniche della cartilagine articolare .....	7
2.2.1 Comportamento viscoelastico .....	7
2.2.2 Comportamento a rigonfiamento (swelling) .....	9
2.2.3 Comportamento a compressione .....	9
2.2.4 Comportamento elastico .....	9
<b>MODELLIZZAZIONE POROELASTICA CARTILAGINE ARTICOLARE: DESCRIZIONE E TEORIA</b> .....	11
3.1 Modelli analitici cartilagine articolare.....	11

3.2 Modello poroelastico per cartilagine articolare .....	14
3.2.1 Problemi di compressione confinata e indentazione di uno strato di materiale poroelastico.....	18
<b>PROVE SPERIMENTALI E NUMERICHE .....</b>	<b>25</b>
4.1 Prove meccaniche su cartilagine articolare a livello micrometrico e nanometrico .....	25
4.1.1 Prove di indentazione .....	27
4.1.1.1 Preparazione del campione .....	27
4.1.1.2 Apparato sperimentale e prove di creep.....	30
4.1.1.3 Analisi dei dati e calcolo del modulo di indentazione .....	32
4.1.2 Prove di AFM .....	35
4.1.2.1 Preparazione campione .....	35
4.1.2.2 Apparato sperimentale e prove dinamiche.....	35
4.1.2.3 Analisi dei dati .....	36
4.2 Prove numeriche .....	37
4.2.1 Geometria .....	37
4.2.2 Discretizzazione ad elementi finiti .....	38
4.2.3 Proprietà del materiale.....	39
4.2.4 Condizioni al contorno .....	40
4.2.5 Definizione contatto .....	41
4.2.6 Modalità di carico .....	41
<b>RISULTATI .....</b>	<b>42</b>
5.1 Risultati prove sperimentali.....	42
5.1.1 Curve creep.....	43
5.1.1.1 Curve creep affondamento consolidato.....	44
5.1.1.2 Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata .....	47
5.1.2 Comportamento tempo dipendente: risultati interpolazione poroelastica curve di creep .....	49
5.1.3 Comportamento tempo indipendente: casi limite drenato, non drenato.....	56
5.2 Risultati prove numeriche e confronto con risultati prove sperimentali .....	60
5.2.1 Curve creep.....	60
5.2.1.1 Curve creep affondamento consolidato.....	60
5.2.1.2 Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata .....	61

5.2.2 Comportamento tempo dipendente: risultati fitting poroelastico curve di creep	62
5.3 Confronto risultati prove sperimentali dominio temporale-dominio delle frequenze ...	64
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b> .....	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>73</b>

# Sommario

## **1. Introduzione**

Negli ultimi anni sempre più interesse è stato riposto nella caratterizzazione meccanica di tessuti e materiali biologici, sia in ambito clinico sia nello studio dei biomateriali. Per uno studio completo le proprietà del materiale devono essere investigate in correlazione con le lunghezze e i tempi caratteristici delle procedure di prova. Nel presente lavoro la cartilagine articolare viene presentata come esempio di tessuto complesso le cui proprietà meccaniche sono dipendenti dal tempo e dalle lunghezze geometriche caratteristiche della prova.

Da un punto di vista strutturale la cartilagine articolare è costituita da una matrice solida, porosa e satura di fluido che scorre attraverso i pori. Da un punto di vista meccanico la cartilagine articolare è una struttura complessa, eterogenea, anisotropa con un comportamento meccanico dipendente dal tempo. Il comportamento tempo dipendente è dovuto a due principali meccanismi: i) la viscoelasticità intrinseca delle componenti solide della matrice, ii) la poroelasticità che è un meccanismo estrinseco dovuto al flusso di fluido attraverso i pori.

L'obiettivo del presente lavoro è stato lo studio del comportamento meccanico della cartilagine con particolare attenzione alla risposta temporale e agli effetti delle lunghezze caratteristiche delle condizioni di prova. A questo scopo sono state effettuate prove di creep di nanoindentazione con punta sferica e livelli di carico progressivamente crescenti (da ora in poi denominate come "prove multiloading"). Con questa tecnica sperimentale, l'effetto della lunghezza caratteristica dell'esperimento viene introdotto effettuando prove con diversi raggi di indentazione oppure prove con diversi valori di affondamento

massimo. Infatti, a parità di raggio di un indentatore sferico, un affondamento maggiore corrisponde ad un'area di contatto di diametro maggiore. Vengono inoltre condotte prove di creep su PDMS, in modo da confrontare il comportamento tempo dipendente di un materiale puramente viscoelastico quale il PDMS con il comportamento poroelastico della cartilagine.

Mentre la viscoelasticità è stata ampiamente studiata e sono disponibili in letteratura diversi modelli analitici per materiali puramente viscoelastici (Vandamme et al., 2006), invece l'interpretazione della risposta meccanica di materiali poroelastici in prove di indentazione rimane una questione ancora aperta. Nel presente lavoro i dati sperimentali sono interpretati con l'ausilio della soluzione analitica per prove di compressione confinata di un materiale poroelastico, la quale, pur facendo riferimento ad una configurazione di prova leggermente differente, viene adattata alle prove di creep di indentazione multiloading condotte sperimentalmente. Il modello poroelastico ha permesso di investigare gli effetti dei parametri costitutivi della cartilagine e delle lunghezze caratteristiche delle condizioni di prova.

Come termine di confronto per la caratterizzazione meccanica della cartilagine articolare vengono utilizzati risultati di prove sperimentali di indentazione dinamica al microscopio con forza atomica (AFM) condotte presso il Dipartimento di Biofisica e Elettronica, Università Genova. In questo modo è stato possibile confrontare la risposta nel dominio delle frequenze con la risposta temporale ottenuta nelle prove di indentazione statica condotte nel presente lavoro.

Parallelamente agli studi sperimentali viene condotta un'analisi ad elementi finiti per una validazione del modello poroelastico e della soluzione analitica formulata per un problema di indentazione.

## **2. Materiali e Metodi**

### **2.1. Prove sperimentali**

Le prove sperimentali di indentazione sono state condotte su campioni di cartilagine articolare bovina e porcina. I campioni di cartilagine bovina sono estratti da condili femorali mediale e laterale di maschio adulto bovino tramite una macchina per carotaggio e conservati in soluzione PBS 0,154M NaCl (pH 7,4). I campioni di cartilagine porcina sono estratti da condili femorali, specie minipig e crioconservati a temperature di -80°C.

Le procedure di prelievo e trattamento dei campioni di cartilagine porcina vengono eseguite presso l'IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi. Gli esperimenti sono condotti utilizzando una macchina di indentazione (Micromaterials Nanotest System, Wrexham, UK) con punte di indentazione sferiche di dimensioni pari a 25  $\mu\text{m}$  e 400  $\mu\text{m}$ . Il protocollo di prova applicato per lo studio del comportamento tempo dipendente della cartilagine consiste nell'applicazione di 10 step consecutivi di carico ciascuno di ampiezza pari a 0.1 mN con una velocità di applicazione del carico costante pari a 1 e 10  $\text{mNsec}^{-1}$ . Ogni livello di carico viene mantenuto per un tempo di hold pari a 120 sec in modo da permettere la deformazione di creep della cartilagine.

Vengono inoltre condotte prove di creep di indentazione su campioni cilindrici di polidimetilsilossano (PDMS) con punte di dimensioni pari a 25  $\mu\text{m}$  e 400  $\mu\text{m}$ . In questo modo è possibile confrontare il comportamento tempo dipendente di un materiale puramente viscoelastico quale il PDMS, con quello di un materiale poro-viscoelastico quale la cartilagine.

I moduli di indentazione drenato e non drenato sono ricavati tramite interpolazione delle curve  $F - u$ , in cui  $F$  è la forza applicata e  $u$  è lo spostamento misurato. A questo scopo viene impiegata la soluzione derivata dal modello di Hertz valido per una sfera rigida in contatto con un materiale elastico, lineare ed isotropo:

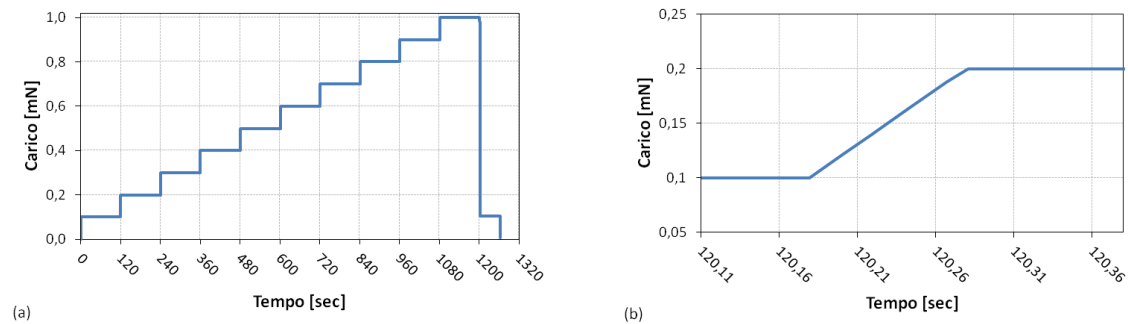
$$F = \frac{4}{3} E_{ind} \sqrt{Ru}^{3/2} \quad (1)$$

Il comportamento tempo dipendente della cartilagine viene analizzato tramite interpolazione delle curve di creep con la soluzione analitica per un problema di indentazione di un materiale poroelastico [3.2.1]. Il modello analitico viene implementato tramite il software di calcolo Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA) e l'affondamento della punta di indentazione viene espresso secondo la relazione:

$$u(\tau) = u_0 + P_1 \sum_{m=0}^N \frac{8}{(1+2m)^2 \pi^2} \left[ 1 - e^{-(1+2m)^2 \pi^2 \tau^2} \right] \quad (2)$$



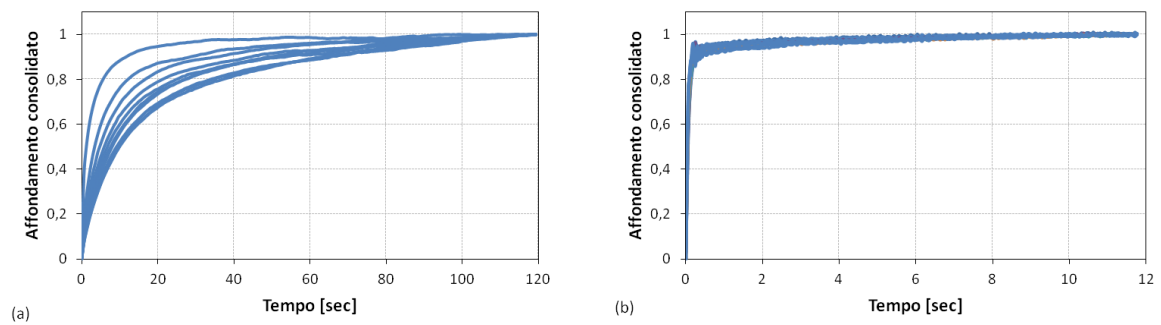
dove  $\tau = \sqrt{P_2 t / Ru(t)}$ ,  $P_1$   $P_2$  parametri del fitting che meglio interpolano i dati sperimentali,  $P_1$  fornisce il salto di affondamento dalla soluzione non drenata (ovvero la configurazione ottenuto a seguito di un'applicazione di un incremento di carico virtualmente istantaneo) a quella drenata (ovvero la configurazione ottenuta a transitorio esaurito e pressioni del fluido in eccesso totalmente dissipate),  $P_2$  che nella condizione di compressione confinata, di cui si dispone di soluzione analitica, può essere espresso come  $P_2 = \frac{3Kk^d}{\mu} \frac{1-v^d}{1+v^d}$  dipende dalla permeabilità e dal modulo elastico del materiale.



**Figura 1 - Curva carico-tempo prove di creep di indentazione multiloading da 0.1:0.1:1mN tempo di hold 120 sec (a); dettaglio rampa di carico livello 0.1:0.2mN, velocità rampa di carico 1mNsec<sup>-1</sup> (b).**

## 2.2. Analisi numerica

L'analisi numerica è stata condotta utilizzando il codice commerciale ad elementi finiti Abaqus 6.8-EF1 (Simulia, Providence, RI, USA) in condizioni di assialsimmetria. Sono state definite geometrie, condizioni al contorno e di contatto analoghe a quelle utilizzate nelle prove sperimentali per poter effettuare un confronto tra i risultati numerici e sperimentali. Dalle prove sperimentali è stato ricavato il modulo di indentazione drenato, dal quale è possibile ricavare il modulo di Young per un materiale elastico, lineare ed isotropo  $E = E_{ind}(1 - \nu^2)$ . Gli ulteriori parametri meccanici richiesti dal modello poroelastico sono stati ricavati da dati presenti in letteratura.



**Figura 2 – Curve creep affondamento consolidato campioni di cartilagine (a), campioni di PDMS (b).**

### 3. Risultati

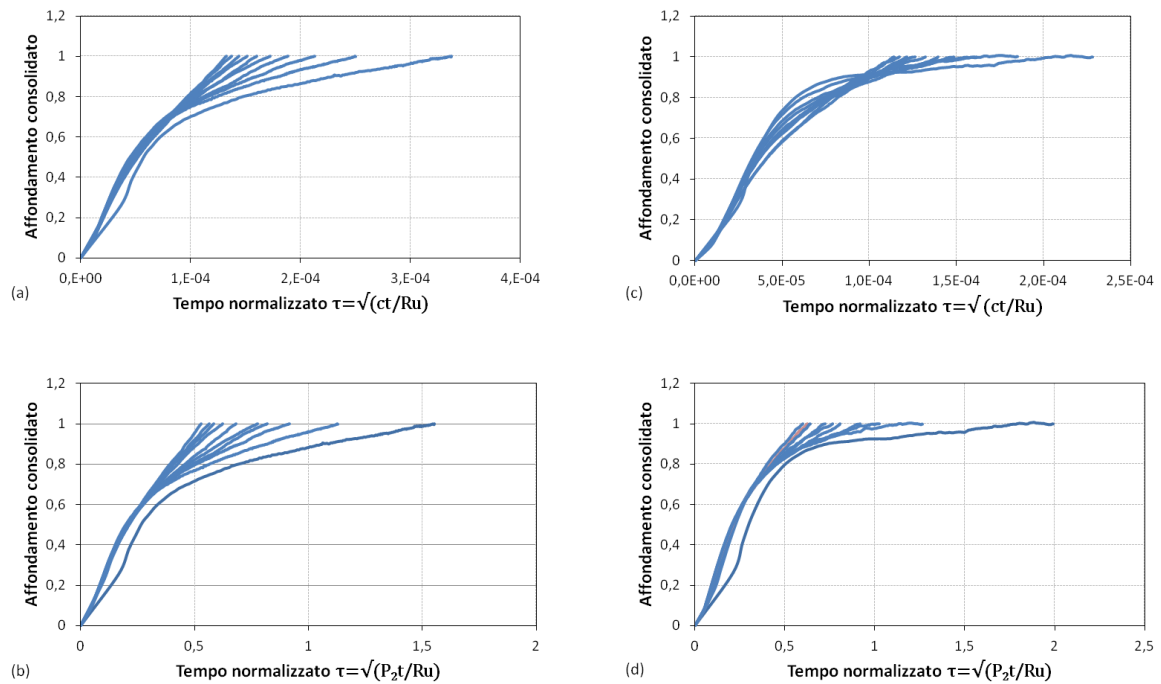
Dall'analisi delle curve di creep di affondamento consolidato è emerso il comportamento poroelastico della cartilagine. A differenza di un materiale puramente viscoelastico le curve di creep non si sovrappongono per diversi livelli di carico e dimensioni della punta di indentazione (Figura 2). Su scala temporale normalizzata per  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  con  $c$

parametro costante dipendente da permeabilità e modulo elastico, le curve di creep si sovrappongono per i campioni di cartilagine bovina, mentre per i campioni di cartilagine porcina rimangono separate. In entrambi i casi la dipendenza dal livello di carico e dalla punta di indentazione viene risolta (ad eccezione del primo livello di carico) introducendo i

parametri  $P_2$  all'interno di  $\tau = \sqrt{P_2 t / Ru(t)}$  con  $P_2$  parametri ottenuti dall'interpolazione dei

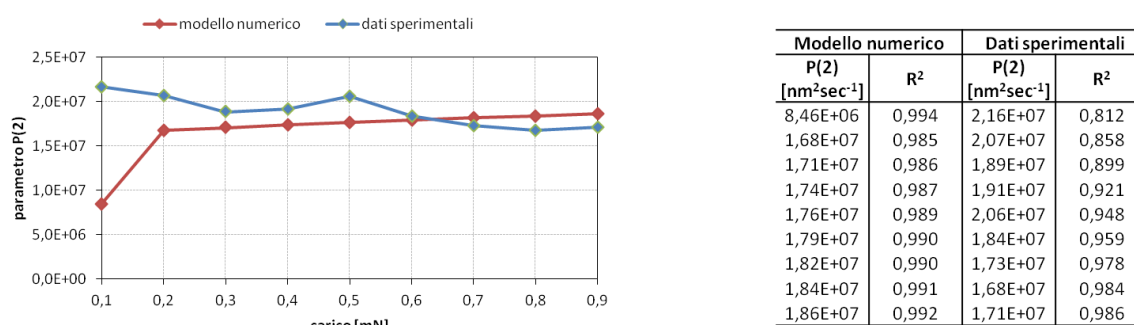
dati sperimentali (Figura 3). La risposta temporale della cartilagine è quindi caratterizzata da un comportamento puramente poroelastico, in accordo con la soluzione analitica per un problema di indentazione di un materiale poroelastico, in cui l'affondamento della punta di

indentazione è determinato dal rapporto  $\sqrt{P_2 t / Ru(t)}$ .



**Figura 3 – Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  (a,c) e  $\tau = \sqrt{P_2t/Ru(t)}$  (b,d);  $P_2$  parametri ottenuti dall'interpolazione poroelastica curve creep completo.**

Il modello poroelastico implementato nelle prove numeriche di creep multiload è risultato soddisfacente nel riprodurre il comportamento tempo dipendente della cartilagine. In particolare è emerso come il comportamento della curva di creep relativa al primo livello di carico si discosta dalle restanti curve a causa del diverso comportamento meccanico del materiale che passa da una modalità indeformata prima dell'applicazione del carico ad una deformata che viene mantenuta nei livelli di carico successivi. La validità della soluzione analitica per un problema di indentazione di un materiale poroelastico è stata verificata e i parametri  $P_2$  relativi alle curve di creep completo hanno un andamento costante, in accordo con le assunzioni del modello di permeabilità e modulo elastico costanti. Confrontando i risultati dei parametri  $P_2$  numerici e sperimentali è possibile ottenere un valore di permeabilità medio drenato per i campioni di cartilagine analizzati sperimentalmente (Figura 4).



**Figura 4 – Parametri  $P_2$  ottenute da interpolazione poroelastica curve creep sperimentali e numeriche con permeabilità  $K=K^{10}$ .**

I moduli di indentazione ottenuti tramite interpolazione dei dati sperimentali di affondamento con il modello di Hertz sono risultati in accordo con i valori noti in letteratura per prove di indentazione. Il modulo di indentazione drenato è risultato dipendente dalle dimensioni della punta di indentazione con valori pari a 597-531 KPa per punta da 25  $\mu\text{m}$  e 328-277 KPa per punta da 400  $\mu\text{m}$ . Il modello di Hertz per l'affondamento non drenato non è risultato soddisfacente nel caso di punta da 400  $\mu\text{m}$  probabilmente perché si sviluppano deformazioni di creep durante la fase di carico stessa del campione.

#### 4. Conclusioni

Dai risultati ottenuti si è concluso che se la poroelasticità è l'unico meccanismo responsabile del comportamento tempo dipendente della cartilagine, la dipendenza dai parametri costitutivi viene risolta riportando i risultati su una scala temporale normalizzata

per  $\tau = \sqrt{\frac{P_2 t}{Ru(t)}}$ . Infatti la soluzione analitica per un problema di indentazione di un

materiale poroelastico mostra come la risposta temporale dell'affondamento della punta di

indentazione sia dipendente dal rapporto  $\tau = \sqrt{\frac{P_2 t}{Ru(t)}}$ . Eventuali dipendenze da ulteriori

fattori dimensionali coinvolgono altri meccanismi dissipativi quali la viscoelasticità intrinseca della cartilagine.

Si può così concludere che in questo lavoro di tesi è stato introdotto una nuova metodologia interpretativa del comportamento poroelastico della cartilagine, grazie alla versatilità della prova meccanica di nanoindentazione sferica, che consente di effettuare

prove caratterizzate da dimensioni geometriche differenti. Tale metodologia di prova consente quindi, da un lato di mettere in evidenza il comportamento viscoelastico o poroelastico di un tessuto biologico complesso come la cartilagine e dall'altro, di determinare, grazie all'ausilio di una modellazione teorica e numerica, i valori numerici di alcuni parametri costitutivi caratteristici di ciascuna scala geometrica. In questo lavoro ci si è concentrati sulla permeabilità e sul modulo di indentazione. Quest'ultimo in particolare, è un parametro costitutivo peculiare per la prova di indentazione che, nel caso di materiale a comportamento isotropo, instaura un semplice legame tra il modulo di Young ed il modulo di Poisson. Ovviamente gli strati superficiali della cartilagine articolare presentano una caratteristica anisotropa marcata che non è stata specificatamente indagata attraverso i metodi di interpretazione utilizzati in questa tesi, pur non influenzando i risultati e le conclusioni ottenute in questo lavoro.

# Abstract

## **1. Introduction**

Nowadays, the mechanical characterization of tissues and other biological materials is of paramount relevance in both clinical and biomaterials science. The mechanical properties have to be analyzed and their links with probing technique length scale and time is topical. In the present work the articular cartilage is considered as a paradigm of a complex tissue with mechanical functions dependent to the length scale and time.

From a structural viewpoint, articular cartilage can be seen as a porous solid saturated with fluid that can flow through pores. From a mechanical point of view, articular cartilage is a complex structure both inhomogeneous and anisotropic, which exhibit a time dependent mechanical behavior. This time dependent behavior is due to two main mechanisms: i) viscoelasticity that is intrinsically dependent on the molecular structure and, ii) poroelasticity that is an extrinsic mechanism related to the fluid flow through pores.

The aim of this work is to study the mechanical behavior of articular cartilage with specific regard to the time response and the effects of probing technique length scale. To achieve our goal several creep nanoindentation tests with increasing load levels have been carried out (we will recall these tests as multiloading tests in the following sections). The effects of characteristic length scale are investigated using spherical tips with different nominal radius and indentation depth (which is equal to set increasing load levels). In fact, for a given indenter radius, different indentation depths are linked with different contact area between sample and indenter. Creep experiments on PDMS samples have been carried out in order to compare the viscoelastic behavior of a purely viscoelastic material (PDMS), with the poro-viscoelastic behavior of cartilage.

While viscoelasticity has been widely studied and closed form solutions for the interpretation of data are available, the interpretation of the poroelastic response still remain an open issue. So in this work, we have analyzed experimental data with the analytical solution for confined compression tests of a poroelastic material layer. Although confined compression test differs from an indentation one, the analytical solution is adjusted for the multiloop creep nanoindentation experiments performed in this experience. The poroelastic model has allowed to investigate the effects of constitutive parameters and characteristic length scale of the probing technique.

We used as comparison with the results obtained in this work, experimental tests on cartilage carried out at the Department of Biophysics and Electronic, University of Genova by using dynamic indentation with atomic force microscopy (AFM), in order to compare frequency response with time response of cartilage.

A numerical analysis is employed for poroelastic model validation. By comparing numerical and experimental interpolation with the poroelastic analytical asolution, we show how it is possible to extract a permeability value from experimental tests.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Experimental tests**

Experimental tests are carried out on full-thickness articular cartilage samples with underlying subchondral bone. Bovine cartilage samples are taken from lateral and medial femoral condyles using a core drills engine and conserved in PBS 0,154M NaCl (pH 7,4). Porcine articular cartilage was obtained from 8 months minipig and cryoconserved at -80°C until use. The procedure of collection and processing of porcine cartilage samples were performed at the IRCCS Galeazzi Orthopedic Institute. All experiments were performed using a indentation machine (Micromaterials Nanotest System, Wrexham, UK) equipped with spherical indentation tip with nominal radius equal to 25  $\mu\text{m}$  and 400  $\mu\text{m}$ . Test procedure consists of 10 increasing loading steps each equal to 0.1 mN as amplitude, with a constant load application velocity equal to 1 and 10 mNsec<sup>-1</sup>. Holding time is kept at 120 sec for each load level. We have also performed creep indentation experiments on polydimethylsiloxane PDMS samples, in order to compare mechanical behavior of a purely viscoelastic material as PDMS, with a poro-viscoelastic material as cartilage.

Drained and undrained indentation modules are obtained by load-displacement curves  $F - u$  with  $F$  applied load and  $u$  displacement, fitted with Hertz contact model, defined for a rigid spherical tip in contact with an elastic, linear and isotropic material:

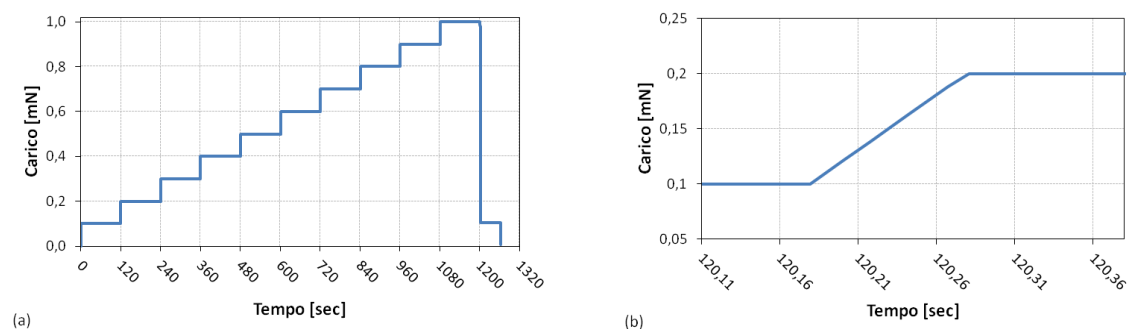
$$F = \frac{4}{3} E_{ind} \sqrt{Ru}^{3/2} \quad (3)$$

Time dependent behavior is analyzed by creep curves interpolation with the analytical solution for a poroelastic indentation problem [3.2.1]. The analytical model is implemented using Matlab computing software (MathWorks, Natick, MA, USA) and the tip indentation displacement is given by the relation:

$$u(\tau) = u_0 + P_1 \sum_{m=0}^N \frac{8}{(1+2m)^2 \pi^2} \left[ 1 - e^{-(1+2m)^2 \pi^2 \tau^2} \right] \quad (4)$$

where  $\tau = \sqrt{\frac{P_2 t}{Ru}}$ ,  $P_1$ ,  $P_2$  are parameters that best fit experimental data.  $P_1$  gives information about the difference between the undrained solution (material configuration in the case of step-loading condition) and the drained solution (in which the effect of pore pressure vanishes), while  $P_2$  is defined as  $P_2 = \frac{3Kk^d}{\mu} \frac{1-\nu^d}{1+\nu^d}$ , as can be inferred from the

analytical solution of a confined compression test and  $P_2$  depends on cartilage permeability and elastic modules.



**Figure 5 – Load-displacement plots multiloading creep indentation tests 0.1:0.1:1 mN, hold time 120 sec (a); ramp loading with constant loading velocity equal to 1 mNsec<sup>-1</sup> (b).**



## 2.2 Numerical analysis

Numerical analysis are carried out using the commercial FE code Abaqus 6.8-EF1 (Simulia, Providence, RI, USA) in axialsymmetric conditions. We used geometry, boundary conditions and contact definition similar to the experimental conditions in order to allow a comparison between numerical and experimental results. The indented material is modeled as homogeneous, isotropic and linear elastic with Young modulus obtained from experimental in the drained conditions, Poisson ratio  $\nu=0,2$  and constant permeability  $K = 10^{-5} \mu m/sec$ .

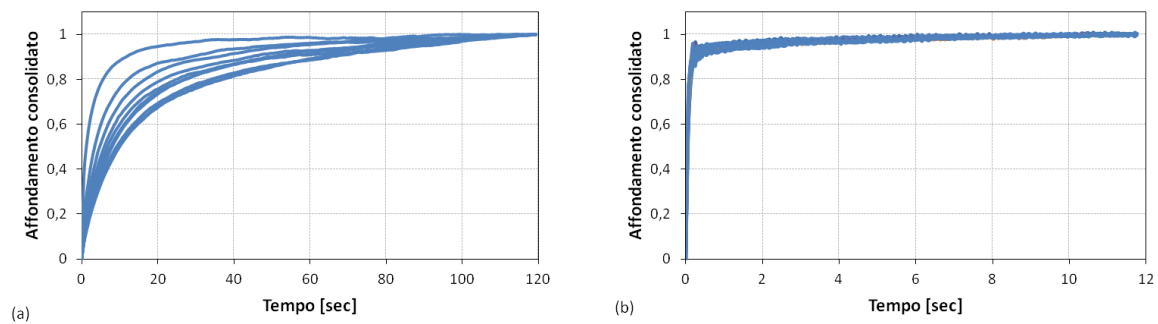
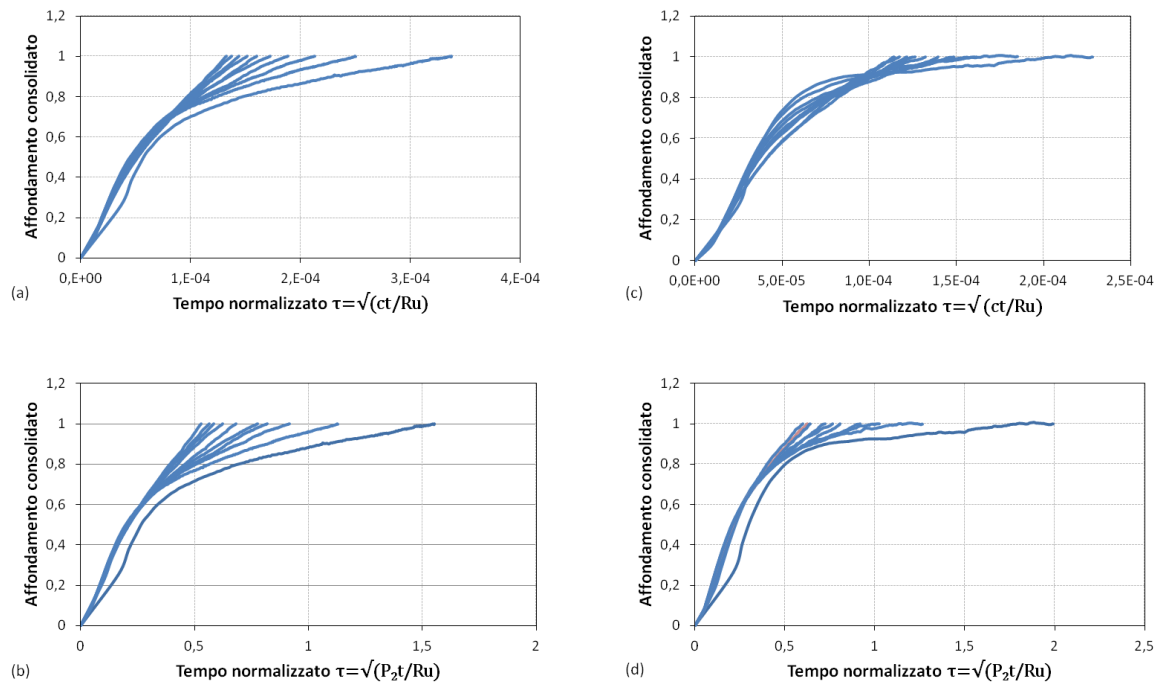


Figure 6 – Consolidating creep plots against time cartilage sample (a), PDMS sample (b).

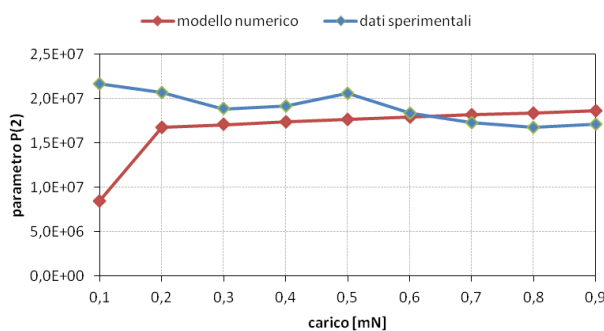
## 3. Results

Experimental results have shown articular cartilage poroelastic behavior and creep curves does not overlap for different load levels or indenter radius, while for a purely viscoelastic material all curves overlaps (figure 6). For bovine samples, when normalized time is used  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  all curves overlaps (except for the first load level curve), while for porcine samples load levels and indenter radius dependence still remain. In both cases we show that when normalized time is used  $\tau = \sqrt{P_2 t / Ru(t)}$ , the geometric effects disappear by introducing  $P_2$  parameters obtained by fitting creep curves with the poroelastic analytical solution. As a consequence cartilage time dependent response is characterize by a purely poroelastic behavior, as can be inferred from the analytical solution implemented for a poroelastic indentation problem.



**Figura 7 – Consolidating creep plots against time normalized  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  (a,c) and  $\tau = \sqrt{P_2t/Ru(t)}$  (b,d) with  $P_2$  poroelastic fitting parameters.**

The poroelastic model implemented within the numerical work has been found satisfactory by reproducing cartilage time dependent behavior. In agreement with experimental results, the first load level creep curve deviates from the remaining. This behavior can be due to the fact that the increment of strain occurring during the first load level is higher in respect to the strain increments occurring during subsequently load levels. Numerical parameters  $P_2$  plots versus load show a constant trend, in agreement with the constant permeability and elastic modulus assumed in the model. Comparing numerical and experimental  $P_2$  values, permeability could be obtained for experimental sample.



Modello numerico		Dati sperimentali	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
8,46E+06	0,994	2,16E+07	0,812
1,68E+07	0,985	2,07E+07	0,858
1,71E+07	0,986	1,89E+07	0,899
1,74E+07	0,987	1,91E+07	0,921
1,76E+07	0,989	2,06E+07	0,948
1,79E+07	0,990	1,84E+07	0,959
1,82E+07	0,990	1,73E+07	0,978
1,84E+07	0,991	1,68E+07	0,984
1,86E+07	0,992	1,71E+07	0,986

**Figure 8 –  $P_2$  poroelastic fitting parameters obtained by interpolating numerical creep curves with**

permeability  $K$  equal to  $K=K^{10}$ .

In the case of drained displacement, we have found a good agreement between experimental data and Hertz contact model. In the case of porcine articular cartilage, indentation modules are dependent to indenter radius, values are equal to 597-531 KPa for the 25  $\mu\text{m}$  spherical tip and 328-277 KPa for 400  $\mu\text{m}$ . In undrained condition, experimental data fitting with Hertz model was not satisfactory for indenter radius equal to 400  $\mu\text{m}$  cause creep deformation begins during load application.

#### **4. Conclusions**

The results obtained in the present work lead to an important conclusion: if poroelasticity is the main dissipation mechanism for cartilage exhibiting a time dependent response, then the results in terms of normalized time will be independent of constitutive parameters. Consequently, if further size dependence is still observed in the dimensionless time domain, then further dissipative mechanism are playing a role and intrinsic viscoelasticity would probably be involved.

In this thesis work a method for the interpretation of poroelastic response of cartilage has been introduced, by using nanoindentation tests with spherical tip. This mechanical test is able to show viscoelastic and poroelastic behavior of a complex biological tissue as cartilage and to extract constitutive parameters by applying numerical and analytical models. In this work we had specific regards for permeability and indentation modulus. The latter in particular, in the case of isotropic and elastic material, is linked with the Young modulus and Poisson modulus. In our study we did not focus on anisotropic property of the tissue, however this assumption did not affects the results and conclusions obtained in this work.

# Capitolo 1

## *Introduzione*

Negli ultimi anni un crescente interesse è stato riposto verso lo studio della cartilagine articolare e le proprietà meccaniche sono state investigate attraverso prove di compressione confinata, non confinata e indentazione. Le proprietà meccaniche misurate in prove di compressione confinata possono però differire da quelle fisiologiche a causa dei danneggiamenti che la cartilagine può subire durante la fase di preparazione del campione. In prove di indentazione il campione non richiede invece una particolare preparazione. In aggiunta, la possibilità di investigare diverse lunghezze caratteristiche del materiale facendo variare le condizioni di prova, fanno di questa tecnica uno strumento efficace per analizzare il comportamento meccanico a livello locale ed ottenere informazioni riguardo l'eterogeneità strutturale della cartilagine.

Nel presente lavoro viene analizzata la risposta temporale della cartilagine articolare in prove di creep di nanoindentazione. Questa tecnica sperimentale rappresenta una soluzione efficace perché permette, oltre che misurare le proprietà locali e le eterogeneità del materiale, di determinare modalità di deformazione diverse al variare della geometria della punta di indentazione, condizioni di carico e durata della prova. L'efficacia della nanoindentazione come tecnica per la caratterizzazione meccanica della cartilagine articolare, è stata evidenziata nel lavoro di Han et al. (Han et al., 2011), in cui la poroelasticità determinata dal flusso di fluido è stata identificata come meccanismo principale di dissipazione energetica. Tuttavia l'interpretazione dei dati sperimentali e una loro correlazione con le proprietà meccaniche rimane ancora una questione aperta per tessuti saturi di fluido; in queste condizioni la risposta del materiale è infatti dipendente sia

dal tempo sia dalle lunghezze geometriche caratteristiche della prova. Gli effetti dei parametri geometrici sono stati enfatizzati da diversi autori: Shima et al. (Shima et al., 2007) hanno mostrato gli effetti del diametro di punte coniche e punte cilindriche sul modulo di indentazione, Hu et al. (Hu et al., 2010) hanno estratto diverse funzioni di rilassamento adimensionali per punte di geometria differente.

Nel presente lavoro la risposta dipendente dal tempo della cartilagine articolare viene interpretata con l'ausilio della soluzione analitica per prove di compressione confinata di un materiale poroelastico, la quale, pur facendo riferimento ad una configurazione di prova leggermente differente, viene adattata alle prove di creep di indentazione multiloading condotte sperimentalmente. Analisi numeriche di un materiale isotropo e poroelastico vengono inoltre condotte per la validazione della soluzione poroelastica di un problema di indentazione impiegata per l'analisi dei dati.

Il presente lavoro si articola quindi nel seguente modo:

- Nel Capitolo 2 viene discussa la struttura e la composizione della cartilagine articolare e come la struttura influisca sulle proprietà meccaniche della cartilagine articolare;
- Nel capitolo 3 viene presentata una breve panoramica relativa ai modelli analitici per lo studio della cartilagine articolare disponibili in letteratura e successivamente viene presentato il modello poroelastico assunto come riferimento nel presente lavoro. La soluzione analitica per un problema di indentazione viene ricavata a partire dalla soluzione di un problema di compressione confinata di un materiale poroelastico;
- Nel capitolo 4 vengono descritte le prove sperimentali di indentazione utilizzate e i modelli analitici impiegati per ricavare le proprietà meccaniche e descrivere il comportamento poroelastico della cartilagine. Nello stesso capitolo viene presentata l'implementazione numerica col software Abaqus 6.8-EF1 (Simulia, Providence, RI, USA) del modello poroelastico;
- Nel capitolo 5 vengono presentati i risultati delle prove sperimentali e numeriche e confrontati tra loro;
- Nel capitolo 6 vengono discussi i risultati ottenuti nel capitolo 5 e vengono presentate le conclusioni dedotte dal presente lavoro di tesi.

# Capitolo 2

## *Struttura e proprietà della cartilagine articolare*

La cartilagine articolare (AC) è un tessuto connettivo che ricopre articolazioni diartrodiali quali tibia, femore o la superficie posteriore della patella (figura 2.1).

Le principali funzioni della cartilagine articolare sono ridurre gli sforzi causati dai carichi applicati, distribuendoli su un'area di contatto più ampia attraverso la deformazione della cartilagine stessa. Un'altra importante funzione della cartilagine articolare è facilitare una reciproca e più morbida concordanza dei capi articolari e ridurre l'usura degli stessi nelle sollecitazioni fisiologiche e nei microtraumi. Quest'ultima funzione è garantita dalle eccellenti proprietà di lubrificazione della AC in presenza del liquido sinoviale. Tale proprietà lubrificante viene discussa estensivamente in letteratura e attribuita alla pressurizzazione interstiziale (Gleghorn et al., 2008; Ateshian, 2009) e alla lubrificazione dovuta alle molecole cariche (Raviv et al., 2003; Schmidt et al., 2007). Il coefficiente di attrito del tessuto cartilagineo è estremamente basso pari a 0.001 (Fung, 1993), inferiore di un ordine di grandezza rispetto a quello che è possibile realizzare in campo ingegneristico.

La cartilagine articolare ha eccellenti proprietà meccaniche dovute alla complessità della sua struttura. AC consiste di due fasi: una fase solida e una fase fluida. La prima comprende condrociti (cellule della cartilagine), una matrice di collagene, proteoglicani (PG) e una modesta quantità di proteine, glicoproteine e lipidi. La fase fluida interstiziale è

formata da acqua e ioni liberi mobili ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) (Julkunen, 2008; Wilson et al., 2005).

Fisiologicamente l'AC è un tessuto avascolare, aneurale e alinfatico. I nutrienti necessari sono trasportati dal liquido sinoviale. La densità cellulare è inferiore rispetto ad altri tessuti, meno del 10% del volume di tessuto umido e la potenzialità mitogenica è molto bassa, di conseguenza la capacità rigenerativa della AC è molto bassa (Mow et al., 2000).



**Figura 2.1 - Anatomia articolazione del ginocchio destro**

## **2.1 Struttura e composizione della cartilagine articolare**

### **2.1.1 Collagene**

La matrice di collagene forma circa il 15%-22% del peso umido della AC (Mow et al., 2000). La cartilagine articolare è principalmente composta da collagene tipo II, con una quantità minore di tipo V, VI, IX e XI (Wilson et al., 2007).

Nella cartilagine articolare il collagene è distribuito in maniera non omogenea e in base al contenuto e alla distribuzione di collagene si possono distinguere tre strati (figura 2.2): lo strato superficiale (10-20% dello spessore), lo strato intermedio (40-60% dello spessore),

lo strato profondo (30-40% dello spessore). Lo strato superficiale presenta la maggior quantità d'acqua (80% del peso umido) e di collagene (85% del peso secco). Le fibrille di collagene hanno piccolo diametro e sono orientate parallelamente alla direzione del movimento della superficie articolare, caratteristica che rende questo strato particolarmente resistente agli sforzi di taglio derivanti dal movimento articolare. La percentuale di collagene diminuisce del 15% nello strato intermedio dove le fibrille sono caratterizzate da diametri maggiori e non presentano un orientamento preferenziale. Analogamente diminuisce il contenuto di acqua il cui contributo diviene del 65% del peso umido. Nello strato profondo il contenuto di collagene e di acqua rimane costante. Le fibrille di collagene si orientano perpendicolarmente alla superficie dell'osso sottostante col quale si fondono.

Il collagene è essenziale per la resistenza meccanica della cartilagine articolare. Grazie alla struttura del tropo collagene (tripla elica) e alla presenza di numerosi collegamenti ponte tra le diverse fibre, il collagene presenta un'alta resistenza a trazione. Le fibre di collagene presentano invece una bassa resistenza a compressione, perché tendono al collasso in seguito a sollecitazioni di compressione. Il collagene di tipo II determina la resistenza meccanica del tessuto, mentre i componenti minori determinano l'integrità del tessuto, attraverso interazioni con gli altri componenti della matrice solida.

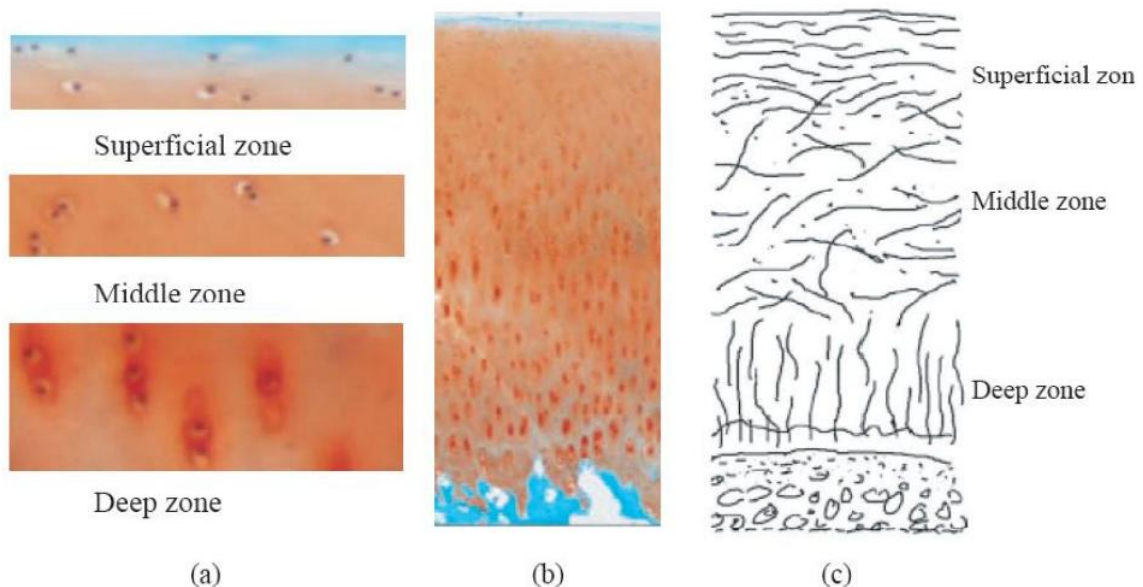


Figura 2.2 - (a-b) Istologia della cartilagine articolare; (a) mostra i diversi strati; (b) lo spessore intero



della cartilagine; (c) rappresentazione schematica della struttura a strati della matrice di collagene (riprodotta da Wang e Zheng 2007).

### **2.1.2 Condrociti**

La cartilagine è uno tra i tessuti con la più bassa densità cellulare, pari a meno del 10% del peso umido dell'AC. La loro funzione è di secernere, organizzare e degradare i proteoglicani e le fibre di collagene in modo tale da permettere alla cartilagine di svolgere le sue principali funzioni.

Come le fibre di collagene, anche i condrociti cambiano forma e distribuzione al variare della profondità. Nello strato superficiale hanno una forma ovoidale, sono orientati parallelamente alla superficie e la loro attività metabolica è relativamente limitata. Nello strato intermedio la forma è più sferica, il diametro è maggiore e l'attività metabolica è maggiore rispetto allo strato superficiale. Nello strato profondo la forma è sferica e hanno un'alta attività metabolica.

### **2.1.3 Proteoglicani**

In condizioni fisiologiche il contenuto di proteoglicani nella AC varia tra 4% a 7%. I proteoglicani sono molecole che consistono in un asse proteico principale, ialuronano HA, a cui sono legate covalentemente molecole di aggrecano. Gli aggrecani sono costituiti da due tipi di glicosamminoglicani carichi negativamente: condroitina solfato CS e cheratan solfato KS. Lo spazio tra molecole di aggrecano adiacenti lungo la catena di HA varia tra 20nm e 50nm, formando quindi aggregati di aggrecano (figura 2.3). In vivo le molecole di aggrecano sono bloccate all'interno della matrice porosa di collagene, in quanto le dimensioni dei proteoglicani sono troppo elevate per diffondere fuori dal tessuto. Nelle prime fasi dell'osteoartrite, gli aggrecani sono tra i primi componenti ad essere degradati e rilasciati dalla cartilagine (Sandy et al., 1991; Lark et al., 1995).

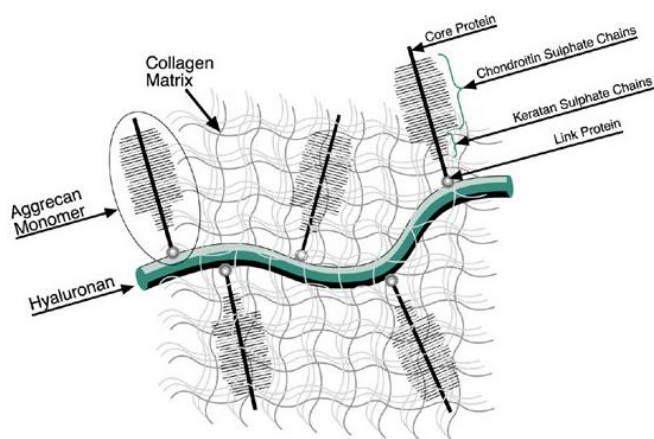


Figura 2.3 - Rappresentazione schematica della struttura di un proteoglicano e componenti

### 2.1.4 Fluido interstiziale

Il fluido interstiziale è composto da acqua e ioni mobili ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Nello strato superficiale la concentrazione di acqua è molto elevata pari all'80% del peso umido della cartilagine articolare. La concentrazione di acqua diminuisce al crescere della profondità, nello strato profondo è circa il 65% del peso umido.

Quando la cartilagine viene caricata da forze esterne, la struttura porosa della cartilagine permette il flusso di fluido attraverso la matrice porosa. Il fluido interstiziale oltre che essenziale per il nutrimento delle componenti cellulari dell'AC, risulta fondamentale per il controllo del comportamento meccanico della cartilagine.

## 2.2 Proprietà meccaniche della cartilagine articolare

### 2.2.1 Comportamento viscoelastico

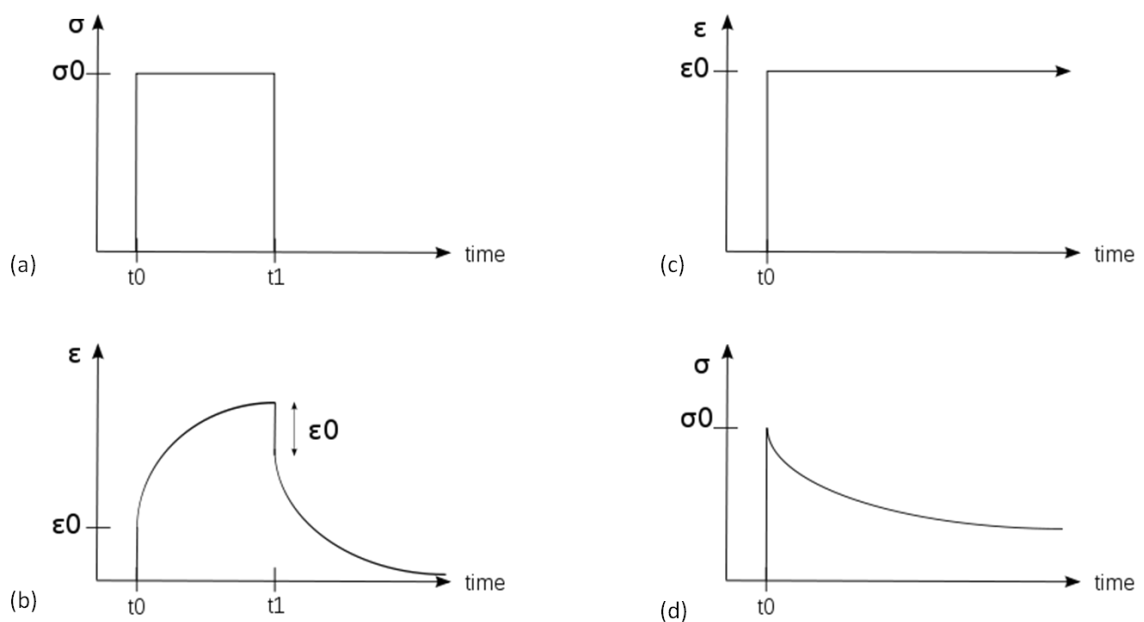
AC è un materiale altamente viscoelastico. Due meccanismi sono responsabili di questo comportamento: (i) le forze di trascinamento del fluido interstiziale che si muove attraverso la matrice solida porosa (viscoelasticità flusso dipendente), (ii) la viscoelasticità intrinseca delle fibre di collagene e proteoglicani (viscoelasticità flusso indipendente).

Il comportamento tempo dipendente della cartilagine viene studiato analizzando la risposta

della AC in prove di rilassamento e creep.

La risposta a creep di un tessuto è la deformazione tempo dipendente dovuta all'applicazione di un carico costante. Il carico viene applicato istantaneamente alla cartilagine e viene mantenuto costante per una fase di hold. Il fluido fuoriesce dalla cartilagine e si sviluppano deformazioni di creep fino a quando non viene raggiunto un equilibrio. Il valore della deformazione all'equilibrio è governato dal modulo elastico della sola matrice solida, mentre la storia di deformazione è legata al flusso fluido e quindi alla permeabilità della AC.

La risposta a rilassamento è la diminuzione tempo dipendente degli sforzi in seguito alla applicazione di una deformazione. La deformazione di compressione viene applicata istantaneamente e viene mantenuta costante. Lo sforzo risultante aumenta durante la fase di carico mentre nella fase successiva diminuisce nel tempo fino a quando il tessuto raggiunge un completo rilassamento. L'essudazione di fluido dalla cartilagine si verifica durante la fase di carico, mentre nella fase di rilassamento il fluido si ridistribuisce all'interno della ECM.



**Figura 2.4 –Prova di creep per materiale viscoelastico: sforzo applicato (a), deformazione di creep (b); prova rilassamento: deformazione applicata (c), sforzo di rilassamento (d);**

### **2.2.2 Comportamento a rigonfiamento (swelling)**

I gruppi carichi negativamente presenti sulle catene di proteoglicani determinano una densità di cariche negative FCD (Maroudas, 1975). Per mantenere la neutralità della soluzione un elevato numero di ioni (es.  $\text{Na}^+$ ) deve essere presente nel liquido interstiziale. La concentrazione ionica all'interno della AC risulta quindi maggiore rispetto al liquido sinoviale, causando una differenza di pressione osmotica che conduce al rigonfiamento della cartilagine (Urban et al., 1979). Un'altra causa di swelling della AC è determinata dalla repulsione dei gruppi carichi negativamente dei proteoglicani. Questo fenomeno è noto come repulsione chimica ed è influenzato anche dalla densità degli ioni presenti (Lai et al., 1991).

### **2.2.3 Comportamento a compressione**

I proteoglicani determinano il comportamento meccanico a compressione della AC (Zhu et al., 1993; Bader et al., 1992). Quando la cartilagine viene caricata in compressione, cambiamenti di volume si verificano in seguito al movimento di fluido. Questi cambiamenti di volume determinano un aumento del FCD all'interno del tessuto e quindi della pressione osmotica e della espansione chimica. La rigidità effettiva del tessuto aumenta quindi al diminuire del volume. Sebbene le fibrille di collagene abbiano una bassa rigidità a compressione, prevengono il rigonfiamento del tessuto mantenendo quindi un'elevata pressione di swelling. Attraverso questo meccanismo le fibrille di collagene contribuiscono alla rigidità a compressione della cartilagine.

### **2.2.4 Comportamento elastico**

Il modulo elastico dipende dalla densità e dalla direzionalità delle fibrille di collagene. Quando la cartilagine viene testata in tensione le fibrille di collagene vengono allineate e stressate lungo la direzione di carico. La curva sforzo-deformazione è caratterizzata per bassi sforzi e deformazioni da un comportamento non lineare dovuto all'allineamento delle fibrille di collagene, con un basso valore di rigidità (5-10 MPa). In seguito all'allineamento, per larghe deformazioni le fibrille di collagene resistono ad elevati sforzi

a causa della elevata rigidità intrinseca delle fibrille stesse (5-100 MPa). La rigidità tensionale è quindi dipendente dal livello di deformazione (Kempson et al., 1968; Roth et al., 1980). Inoltre a causa della pressione di swelling causata dalla rete di proteoglicani la rete di collagene è sottoposta ad un pre-carico. Attraverso questo meccanismo la rete di proteoglicani influenza la rigidità tensionale della AC.

# Capitolo 3

## *Modellizzazione poroelastica cartilagine articolare: descrizione e teoria*

### **3.1 Modelli analitici cartilagine articolare**

Sebbene la cartilagine articolare sia un materiale multifasico, non lineare e anisotropo, i primi studi sulla cartilagine hanno assunto il materiale come monofasico, elastico, lineare, isotropo e omogeneo (Hirsch e Frey, 1944; Elmore et al., 1963; Sokoloff, 1966; Kempson et al., 1971). Modelli analitici ed esperimenti di indentazione sono stati sviluppati per descrivere il comportamento meccanico e ricavare le proprietà della cartilagine. Questi modelli presentano però delle limitazioni in quanto sono utilizzabili solamente per risposte istantanee e a lungo termine, ma non possono predire il comportamento transitorio tempo dipendente della cartilagine (Hayes et al., 1972).

Hayes e Mockros (Hayes e Mockros, 1971) analizzano la cedevolezza di taglio e volumetrica della cartilagine articolare tramite prove di torsione e compressione uniassiale, tramite un modello di Kelvin generalizzato, costituito da più elementi disposti in serie, ciascuno a sua volta costituito da una molla e un dissipatore viscoso posti in parallelo, rappresentando quindi la viscoelasticità del materiale. Parsons e Black (Parsons e Black,

1977) applicano la teoria viscoelastica in prove di creep di indentazione eseguite con punte cilindriche ed analizzano la risposta istantanea della cartilagine. Questi modelli tuttavia, non prendono in considerazione il ruolo che la componente fluida di flusso interstiziale svolge nel sostenere il carico applicato sulla cartilagine.

Higginson et al. (Higginson et al., 1976) considerano gli effetti del flusso di fluido interstiziale e concludono che in condizioni di carico ciclico la risposta istantanea per deformazioni di creep è puramente elastica. Johnson et al. (Johnson et al 1977) osservano che in condizioni di compressione uniassiale con sforzo di compressione sinusoidale nel range di frequenze 0.8-2.5 Hz impostato dopo un precarico, la risposta della cartilagine è puramente elastica e non è influenzata dal flusso di fluido interstiziale. Tuttavia Elmore et al. (Elmore et al. 1963) hanno evidenziato come la risposta della cartilagine in prove di indentazione sia principalmente dovuta all'essudazione del fluido interstiziale.

Il modello bifasico analizza il comportamento della cartilagine prendendo in considerazione la meccanica multifasica dei costituenti: in particolare considera come variabili lo spostamento della fase solida  $u$ , e lo spostamento della fase fluida  $U$ , (modelli 'u-U'). La deformazione a compressione della cartilagine è dovuta al flusso di fluido e all'essudazione attraverso il solido poroso e permeabile. Nel caso di deformazioni infinitesime e permeabilità costante, la teoria bifasica lineare spiega le risposte di creep e rilassamento della cartilagine e altri tessuti soffici idratati (Mow et al., 1980; Armstrong e Mow, 1982; Best et al. 1984). Tuttavia la deformazione della cartilagine non è lineare ed è dovuta non solo al carico applicato, ma anche alle forze di trascinamento del fluido interstiziale che fluisce attraverso l'ECM. All'aumentare della deformazione il volume di vuoti diminuisce mentre le forze di trascinamento aumentano e la permeabilità diminuisce (Lai et al., 1980; Warner, 2000). Permeabilità dipendenti dai gradi di deformazione vengono presi in considerazione all'interno della teoria bifasica (Mow et al, 1984, Holmes, 1985, Holmes et al., 1985).

La teoria bifasica lineare assume la viscoelasticità come flusso dipendente, considerando la fase solida puramente elastica. Tuttavia sia le fibre di collagene che il gel di proteoglicani sono caratterizzati da viscoelasticità intrinseca (Viidik, 1968; Zhu e Mow, 1990). Hayes e

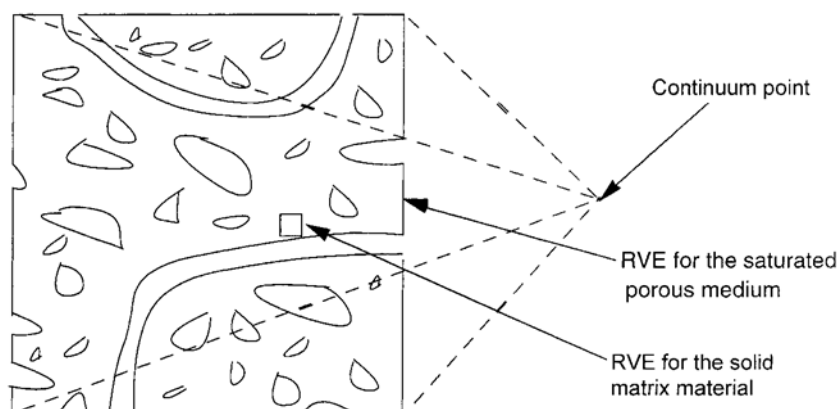
Bodine (Hayes and Bodine, 1978) analizzano la viscoelasticità flusso indipendente della matrice solida, che viene presa in considerazione all'interno della teoria bifasica (Mak, 1986). Il modello poroviscoelastico ben descrive il comportamento della cartilagine sottoposta a indentazione nel corso dell'intera fase di creep. In aggiunta questo modello ha dimostrato buone predizioni anche per dati sperimentali relativi a prove di compressione non confinata (Suh et al., 1999).

Setton et al. (Setton et al., 1993) conducono esperimenti di creep in prove di compressione uniassiale usando il modello bifasico poro-viscoelastico ed evidenziano l'importanza della viscoelasticità intrinseca flusso indipendente nel caso in cui aumenti la permeabilità della cartilagine, come si può verificare per cartilagine danneggiata.

Nell'approccio poroelastico, il tessuto idratato viene invece considerato come un materiale composito di una fase fluida e una solida che riempiono lo spazio in modo omogeneo, in cui due meccanismi hanno un ruolo centrale nell'interazione tra fluido interstiziale e matrice porosa: (i) l'aumento della pressione nei pori che induce una dilatazione volumetrica della matrice solida, (ii) la compressione della matrice che causa a sua volta un aumento della pressione nei pori. Si verifica quindi un processo di consolidazione del materiale, determinato dai movimenti di fluido secondo i gradienti di pressione presenti e il contemporaneo compattamento della matrice solida.

Questo fenomeno fu per primo investigato da Terzaghi in ambito geotecnico (Terzaghi, 1925) che sviluppa un modello monodimensionale per terreni saturi d'acqua, in cui i granuli di terreno legati tra loro da forze intermolecolari, costituiscono una struttura solida porosa ed elastica, riempita di fluido interstiziale. La teoria viene successivamente estesa da Maurice Biot (Biot, 1941), che considera il comportamento in modelli tridimensionali, sia nel caso di materiali isotropi (Biot, 1941), sia anisotropi (Biot, 1955). In entrambi i casi Biot sviluppa il concetto di elemento di volume rappresentativo RVE per un mezzo poroso, largo abbastanza rispetto alle dimensioni dei pori più grandi da poter essere considerato omogeneo e allo stesso tempo piccolo abbastanza in confronto con la scala dei fenomeni macroscopici di interesse, da poter essere considerato infinitesimale nella trattazione matematica.





**Figura 3.1 - Illustrazione degli RVE per un mezzo poroelastico**

Rice e Cleary mettono in risalto i comportamenti limite della teoria poroelastica, gli stati drenato e non drenato, semplificando l'interpretazione dei fenomeni poroelastici (Rice e Cleary, 1976). Cowin e Doty (Cowin e Doty, 2007) applicano il modello poroelastico per tessuti cartilaginei, sviluppando soluzioni analitiche per problemi poroelastici di compressione confinata e non confinata per materiali isotropi e anisotropi.

### **3.2 Modello poroelastico per cartilagine articolare**

In accordo con Cowin e Doty (Cowin e Doty, 2007), vengono considerati due casi limite associati con gli effetti della pressione del fluido per la misura delle costanti elastiche di un materiale poroelastico: lo stato drenato e lo stato non drenato. Nel caso drenato la pressione del fluido è uniforme all'interno dei pori, in equilibrio con la pressione esterna al tessuto: Nello stato drenato il comportamento del materiale sottoposto ad un carico è determinato dalla matrice solida. Il secondo caso limite, quello non drenato, è l'ideale condizione che si verifica nel caso di carico a gradino, in cui la variazione del contenuto di fluido nel materiale è nulla e la componente volumetrica della sollecitazione viene sostenuta interamente dalla componente fluida.

Nel seguito viene considerato il caso di comportamento poroelastico di un materiale la cui parte solida può essere rappresentata attraverso un modello di elasticità lineare (isotropa o anisotropa) e in cui la parte solida e fluida sono virtualmente incomprimibili.

### **Componente solida del materiale**

In accordo con il modello RVE di un mezzo poroso saturo, la deformazione media  $\boldsymbol{\varepsilon}$  è dovuta non solo allo sforzo medio  $\boldsymbol{\sigma}$  agente nell'RVE, ma anche al contributo della pressione porosa  $p$ . La deformazione totale è quindi data da:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{S}^d (\boldsymbol{\sigma} + \mathbf{U}p) \quad (3.1)$$

dove  $\mathbf{S}^d$  rappresenta le costanti elastiche della cedevolezza dello stato drenato e  $\mathbf{U}$  è un vettore a sei componenti definito come  $\mathbf{U} = [111000]^T$ . In termini di sforzo-pressione porosa e deformazione equivale a:

$$\boldsymbol{\sigma} + \mathbf{U}p = \mathbf{C}^d \boldsymbol{\varepsilon} \quad (3.2)$$

$\mathbf{C}^d$  rappresenta il tensore di elasticità dello stato drenato. È possibile quindi introdurre il principio degli sforzi efficaci definendo lo sforzo efficace  $\boldsymbol{\sigma}^{eff} = \boldsymbol{\sigma} + \mathbf{U}p$  che rappresenta la quantità statica responsabile della deformazione del solido poroso saturo di fluido caratterizzato dal tensore di cedevolezza in condizioni drenate:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{S}^d \boldsymbol{\sigma}^{eff} \quad (3.3)$$

### **Il contenuto fluido**

Il materiale di cui è costituita la parte solida ed il fluido sono incomprimibili, la variazione del contenuto in fluido è quindi dovuta alla variazione volumetrica dell'intero dominio. Il contenuto di fluido  $\xi$  può essere posto in relazione con lo stato di deformazione come segue:

$$\xi = \mathbf{U} \cdot \boldsymbol{\varepsilon} \quad (3.4)$$

Sostituendo nella (3.4) la (3.1) si ottiene il contenuto di fluido in funzione dello stato di sforzo e della pressione del fluido:

$$\xi = \mathbf{US}^d \boldsymbol{\sigma} + \mathbf{US}^d \mathbf{U} p \quad (3.5)$$

dove  $\mathbf{US}^d \mathbf{U}$  rappresenta l'inverso del modulo di comprimibilità volumetrica della parte solida drenata:

$$\mathbf{US}^d \mathbf{U} = \frac{1}{k^d} \quad (3.6)$$

Nel caso di isotropia  $\mathbf{US}^d \mathbf{U} = \frac{1}{k^d} = 3 \frac{1-2\nu^d}{E^d}$  con  $E^d$  e  $\nu^d$  modulo di Young e Poisson dello scheletro poroso drenato.

### **Condizioni non drenate**

Nel caso in cui non sia possibile il trasporto di massa fluida attraverso la matrice porosa, il contenuto di fluido rimane costante  $\xi = 0$ . Si può quindi definire il legame costitutivo di un solido poroso in condizioni non drenate come:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{S}^d (\boldsymbol{\sigma} - k^d \mathbf{U} (\mathbf{US}^d \boldsymbol{\sigma})) = \mathbf{S}^u \boldsymbol{\sigma} \quad (3.7)$$

dove la cedevolezza non drenata  $\mathbf{S}^u$  è:

$$\mathbf{S}^u = \mathbf{S}^d - k^d \mathbf{S}^d \mathbf{U} (\mathbf{US}^d) \quad (3.8)$$

### **Legge di Darcy**

Le equazioni (3.3) e (3.5) rappresentano le equazioni costitutive che legano sforzi, deformazione e pressione. Un'ulteriore relazione costitutiva è rappresentata dalla legge di Darcy nella quale il flusso di fluido è correlato al gradiente spaziale di pressione:

$$\mathbf{q} = \begin{pmatrix} \Phi \frac{\rho_f}{\rho_{f0}} \\ \rho_{f0} \end{pmatrix} \mathbf{v} = - \begin{pmatrix} 1 \\ \mu \end{pmatrix} \mathbf{K} \nabla p(\mathbf{x}, t) \quad (3.9)$$

in cui  $\mathbf{K}[m^2]$  è il tensore permeabilità dipendente dalla direzione di flusso, che si riduce ad uno scalare nel caso di isotropia.

***Equazioni di equilibrio indefinito e di conservazione della massa***

Le equazioni di equilibrio indefinito si esprimono in funzione degli sforzi totali:

$$\frac{\delta \sigma_{ij}}{\delta x_j} + b_j = 0 \quad (3.10)$$

In cui sono trascurati gli effetti inerziali e  $\mathbf{b}$  è il vettore di forze di volume distribuite.

La conservazione della massa viene espressa come:

$$\frac{\delta \rho}{\delta t} + \nabla(\rho \mathbf{v}) = 0 \quad (3.11)$$

L'equazione di conservazione della massa viene modificata in modo da applicarla al volume fluido dei pori sostituendo  $\rho$  con  $\Phi \rho_f$  e dividendo per  $\rho_{f0}$ :

$$\frac{1}{\rho_{f0}} \frac{\delta \Phi \rho_f}{\delta t} + \frac{1}{\rho_{f0}} \nabla(\Phi \rho_f \mathbf{v}) = 0 \quad (3.12)$$

Nel caso di incomprimibilità  $\rho_f = \rho_{f0}$  e l'equazione (3.11) diventa:

$$\frac{\delta \Phi}{\delta t} + \nabla(\Phi \mathbf{v}) = 0 \quad (3.13)$$

***Equazioni governanti il problema poroelastico per materiali elastici lineari isotropi***

Sostituendo l'equazione di Darcy nell'equazione di conservazione della massa si giunge alla relazione:

$$\frac{\delta \Phi}{\delta t} - \nabla \left( \frac{K}{\mu} \nabla p \right) = 0 \quad (3.14)$$

Utilizzando la (3.7) e la relazione  $\xi = \phi - \phi_0$ :

$$\frac{\delta\phi}{\delta t} = \mathbf{US}^d \frac{\delta\boldsymbol{\sigma}}{\delta t} + \mathbf{US}^d \mathbf{U} \frac{\delta p}{\delta t} = \frac{1}{3k^d} \frac{\delta \text{tr}(\boldsymbol{\sigma})}{\delta t} + \frac{1}{k^d} \frac{\delta p}{\delta t} \quad (3.15)$$

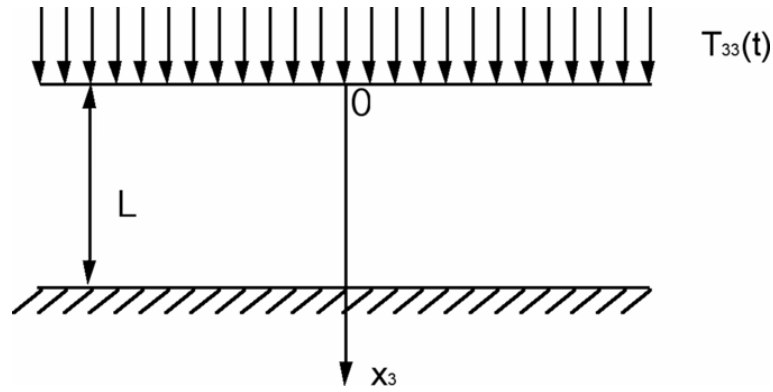
Sostituendo la (3.13) nella (3.12) nell'ipotesi di permeabilità omogenea si ottiene:

$$\frac{1}{k^d} \frac{\delta p}{\delta t} - \frac{K}{\mu} \left( \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 p}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 p}{\partial z^2} \right) + \frac{1}{3k^d} \left( \frac{\delta\sigma_{11}}{\delta t} + \frac{\delta\sigma_{22}}{\delta t} + \frac{\delta\sigma_{33}}{\delta t} \right) = 0 \quad (3.16)$$

Le condizioni al contorno per la soluzione delle equazioni differenziali in (3.16) sono (i) la pressione porosa esterna  $p$  agente sul contorno, (ii) il gradiente di pressione  $\nabla p$  agente sul contorno e una combinazione lineare delle due condizioni (i) (ii), a seconda del problema specifico in esame.

### 3.2.1 Problemi di compressione confinata e indentazione di uno strato di materiale poroelastico

Nella presente sezione viene ricavata la soluzione analitica di un problema di compressione confinata di uno strato di materiale poroelastico isotropo, successivamente adattata ad una prova di indentazione tramite opportuni aggiustamenti. In figura 3.2 viene riportata una rappresentazione di uno strato di materiale poroelastico nel piano  $x_{1,2}$ , sottoposto al carico di compressione  $P(t)$  in direzione  $x_3$ .



**Figura 3.2 - Rappresentazione di uno strato di materiale poroelastico su base rigida impermeabile soggetto ad un carico superficiale uniforme**

### *Equazione di diffusione della pressione porosa*

Nella prova di compressione confinata l'unica componente di deformazione diversa da zero è  $\varepsilon_{33}$  e lo sforzo di compressione  $\sigma_{33} = -P(t)$  è uniforme lungo lo strato. In accordo con (3.1) le relazioni sforzo-deformazione-pressione porosa risultano:

$$0 = \frac{1}{E^d} \{ (1 + \nu^d) \sigma_{11} - \nu^d \text{tr} \sigma + (1 - 2\nu^d) \alpha p \} \quad (3.17)$$

$$0 = \frac{1}{E^d} \{ (1 + \nu^d) \sigma_{22} - \nu^d \text{tr} \sigma + (1 - 2\nu^d) \alpha p \} \quad (3.18)$$

$$\varepsilon_{33} = \frac{\delta u_3}{\delta x_3} = \frac{1}{E^d} \{ -(1 + \nu^d) P(t) - \nu^d \text{tr} \sigma + (1 - 2\nu^d) \alpha p \} \quad (3.19)$$

Dalle soluzioni di queste equazioni per le tre componenti del tensore degli sforzi:

$$\sigma_{11} = \sigma_{22} = -\frac{\nu^d}{(1 - \nu^d)} P(t) - \frac{(1 - 2\nu^d)}{(1 - \nu^d)} p \quad (3.20)$$

$$\text{tr} \sigma = -\frac{(1 + \nu^d)}{(1 - \nu^d)} P(t) - \frac{2(1 - \nu^d)}{(1 - \nu^d)} p \quad (3.21)$$

$$\sigma_{33} = -P(t) = 3k^d \frac{(1 + \nu^d)}{(1 - \nu^d)} \frac{\delta u_3}{\delta x_3} - p \quad (3.22)$$

L'unica equazione di equilibrio che non risulta nulla è:

$$\frac{\delta \sigma_{33}}{\delta x_3} = \frac{\delta}{\delta x_3} \left( 3k^d \frac{(1+v^d)}{(1-v^d)} \frac{\delta u_3}{\delta x_3} - p \right) = 0 \quad (3.23)$$

La legge di Darcy e l'equazione di continuità possono essere applicate per il caso in esame (3.16) che sfruttando la simmetria del problema si riduce:

$$\frac{\delta p}{\delta t} - c \frac{\partial^2 p}{\partial x_3^2} = \frac{\delta P}{\delta t} \quad (3.24)$$

con

$$c = \frac{3Kk^d}{\mu} \frac{(1-v^d)}{(1+v^d)} \quad (3.25)$$

che viene risolta imponendo le condizioni al contorno:

- $p = 0$  per  $x_3 = 0$ , la superficie libera permette il passaggio di fluido;
- $\frac{\delta p}{\delta x_3} = 0$  per  $x_3 = L$ , base su cui poggia il campione è impermeabile.

Il carico viene applicato in  $t=0$  e viene mantenuto costante nel tempo, quindi  $P(t) = P_0 H(t)$  in cui  $P_0$  è l'entità del carico applicato,  $H(t)$  funzione di Heaviside.

Introducendo una trasformazione di variabili  $p^*(x_3, t) = p(x_3, t) - P(t)$  la (3.24) si riduce ad una equazione omogenea:

$$\frac{\delta p^*}{\delta t} - c \frac{\partial^2 p^*}{\partial x_3^2} = 0 \quad (3.26)$$

La soluzione di (3.26) con le condizioni al contorno (i)  $p^*(0, t) = -P(t)$ , (ii)

$\frac{\partial p^*}{\partial x_3}(x_3 = L, t) = 0$  risulta quindi:

$$p^*(x_3, t) = P_0 \left\{ \sum_{m=0}^{\infty} \frac{4}{(1+2m)\pi} \sin \left[ \frac{((1+2m)\pi x_3)}{2L} \right] e^{-\frac{(1+2m)^2 \pi^2 ct}{4L^2}} \right\} - P_0 H(t) \quad (3.27)$$

$$p(x_3, t) = P_0 \left\{ \sum_{m=0}^{\infty} \frac{4}{(1+2m)\pi} \sin \left[ \frac{((1+2m)\pi x_3)}{2L} \right] e^{-\frac{(1+2m)^2 \pi^2 ct}{4L^2}} \right\} \quad (3.28)$$

### ***Spostamento verticale strato superficiale***

Il campo di spostamenti  $u_3(x_3, t)$  viene calcolato a partire dalla soluzione della pressione porosa (3.28) e dalla equazione di equilibrio indefinito (3.23). Lo spostamento totale viene scomposto in due componenti: lo spostamento iniziale  $u_3(x_3, 0)$  e lo spostamento transitorio  $u_3^t(x_3, t)$ :

$$u_3(x_3, t) = u_3(x_3, 0) + u_3^t(x_3, t)$$

Lo spostamento iniziale viene determinato dalla condizione di equilibrio (3.23):

$$u_3(x_3, 0) = \frac{LP_0}{\beta} \left( \frac{x_3}{L} - 1 \right)$$

dove  $\beta = 3k^d \frac{1-v^d}{1+v^d}$ .  $u_3(x_3, 0)$  viene sviluppato come serie di una funzione lineare:

$$\frac{LP_0}{\beta} \left( \frac{x_3}{L} - 1 \right) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{8P_0L}{(1+2m)^2 \pi^2 \beta} \cos \left[ \frac{((1+2m)\pi x_3)}{2L} \right]$$

La soluzione transitoria  $u_3^t(x_3, t)$  viene ottenuta dalla soluzione della pressione porosa (3.28) e dalla stessa condizione di equilibrio (3.23):

$$u_3^t(x_3, t) = \frac{P_0L}{\beta} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{8}{(1+2m)\pi^2} \cos \left[ \frac{((1+2m)\pi x_3)}{2L} \right] \left[ 1 - e^{-\frac{(1+2m)^2 \pi^2 ct}{4L^2}} \right] \quad (3.29)$$

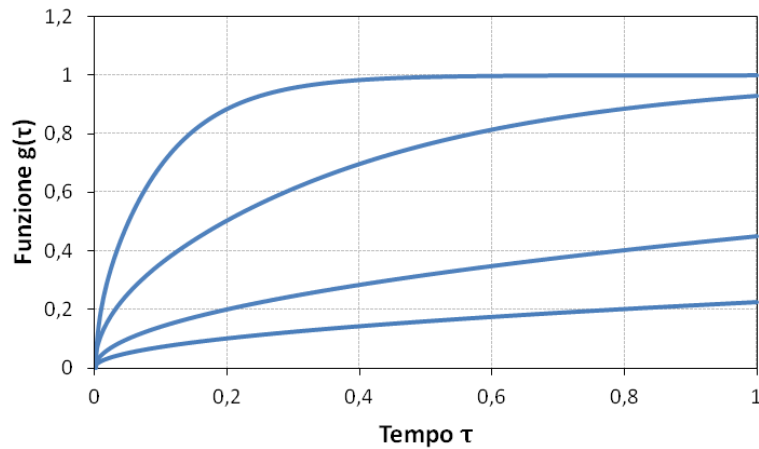


Lo spostamento della superficie libera  $u_3(0,t)$  può essere quindi calcolato come:

$$u_3(0,t) = u_3(0,0) + u_3^t(0,t) = \frac{P_0 L}{\beta} [1 + g(t)] \quad (3.30)$$

$$g(\tau) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{8}{(1+2m)^2 \pi^2} \left[ 1 - e^{-(1+2m)^2 \pi^2 \tau^2} \right] \quad (3.31)$$

dove è stato introdotto il parametro temporale adimensionale  $\tau = \sqrt{ct/4L^2}$ . In figura 3.3 viene rappresentata la funzione  $g(\tau)$  su scala temporale, al variare dello spessore dello strato di materiale poro elastico  $L$ , in particolare le curve sotto quella superiore sono per strati con spessori pari a due, cinque e dieci volte lo spessore dello strato iniziale  $L$ . Si può dunque osservare che il tempo di consolidazione della funzione  $g(\tau)$  verso una soluzione di equilibrio aumenta all'aumentare dello spessore del campione.



**Figura 3.3 – Funzione  $g(\tau)$  dello spostamento verticale per spessori diversi. Le curve sotto la curva superiore sono caratterizzate da spessori due, cinque, dieci volte lo spessore della curva superiore**

### ***Analogia problema indentazione-compressione confinata***

L'idea di ottenere una soluzione analitica per un problema di indentazione di un materiale poroelastico viene proposto da Agbezuge (Agbezuge e Deresiewicz, 1974), e successivamente sviluppato da Deresiewicz (Deresiewicz, 1976). In entrambi i casi il problema viene risolto con una soluzione analitica, che richiede tuttavia soluzioni numeriche basate su funzioni di spostamento di McNamee (McNamee e Gibson, 1960), e

trasformate di Laplace-Hankel. Galli e Oyen (Galli e Oyen, 2009) utilizzano curve generalizzate per l'identificazione dei parametri poroelastici. Le curve generalizzate vengono ricavate tramite modellazione a elementi finiti.

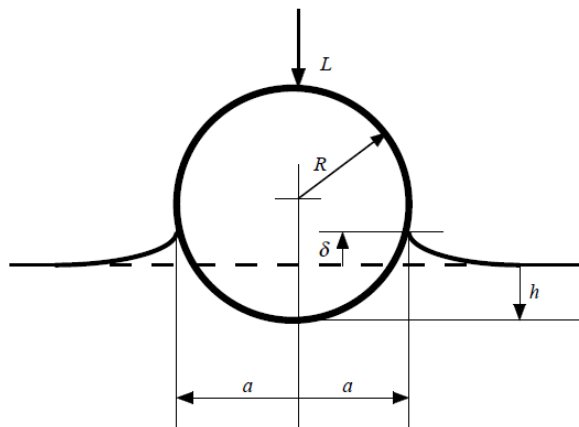
Nel presente lavoro l'equazione dell'affondamento della punta di indentazione viene formulata in analogia al caso di compressione confinata con gli accorgimenti necessari per un problema di indentazione. A differenza della compressione confinata, nella prova di indentazione il carico è concentrato nell'area di contatto punta-campione. e lo sforzo  $\sigma_{33} = -P(t)$  non agisce macroscopicamente come nel caso della compressione confinata (figura 3.2), ma localmente in corrispondenza dell'area di contatto punta-campione. Per un problema di indentazione il raggio di contatto  $a$  è definito pari a  $a = \sqrt{Ru}$  con  $R$  raggio della punta di indentazione e  $u$  affondamento della punta (figura 3.4). Le componenti radiali di deformazione  $\varepsilon_{11}$   $\varepsilon_{22}$  normalmente non nulle in un problema di indentazione non vengono considerate nella soluzione analitica, di conseguenza  $\varepsilon_{33}$  risulta l'unica componente di deformazione diversa da zero.

Risolvendo in maniera analoga al problema di compressione monoassiale, viene formulata l'equazione di diffusione della pressione all'interno del campione (3.28) che viene risolta con le opportune condizioni al contorno. La soluzione analitica dell'affondamento viene ancora scomposta in una componente iniziale e una transitoria (3.30), viene introdotta la funzione  $g(\tau)$  in cui il parametro temporale normalizzato  $\tau$  è definito come (Agbezuge e Deresiewicz, 1974):

$$\tau = \sqrt{ct/Ru(t)} \tag{3.32}$$

dove compaiono come grandezze caratteristiche il raggio della punta  $R$ , l'affondamento  $u$  e il raggio di contatto della punta-campione  $\sqrt{Ru(t)}$ . Da notare il diverso significato fisico rispetto al parametro di tempo adimensionale di un problema di compressione  $\tau = \sqrt{ct/4L^2}$ , in cui compare lo spessore del campione che rappresenta la massima distanza che il fluido deve percorrere per uscire dal campione. La stessa assunzione non può essere assunta per il

raggio di contatto che rappresenta comunque la lunghezza caratteristica che determina il movimento di fluido in una prova di indentazione.



**Figura 3.4 - Schematizzazione di un'indentazione sferica. In figura viene rappresentato il raggio di contatto  $a$ . L'affondamento totale è dato dall'affondamento nel materiale  $h$  e dallo spostamento di "pile up"  $\delta$ .**

# Capitolo 4

## *Prove sperimentali e numeriche*

Nel presente lavoro vengono utilizzati diversi metodi per lo studio del comportamento tempo dipendente e delle proprietà meccaniche della cartilagine articolare. Le proprietà meccaniche della cartilagine in condizioni drenate e non drenate vengono determinate tramite prove di creep di indentazione, assumendo che il materiale si comporti come puramente elastico per tali condizioni. Il comportamento dipendente dal tempo è analizzato tramite soluzione analitica sviluppata per problemi di consolidazione in un materiale poroelastico [3.2.1]. La dipendenza dal tempo viene inoltre investigata tramite modelli numerici a elementi finiti FE, in cui la cartilagine viene definita come un materiale poroelastico lineare, isotropo ed omogeneo.

Come termine di confronto per la caratterizzazione meccanica della cartilagine articolare, viene riportata anche una breve descrizione di prove di microindentazione dinamica effettuate per mezzo del microscopio a forza atomica presso il Dipartimento di Biofisica e Elettronica, Università Genova.

### **4.1 Prove meccaniche su cartilagine articolare a livello micrometrico e nanometrico**

La maggior parte degli studi finalizzati alla caratterizzazione meccanica della cartilagine

articolare hanno analizzato i campioni macroscopici di tessuto cartilagineo, tramite prove di compressione confinata, non confinata e interpretate utilizzando semplici modelli meccanici (Mow et al., 1980, Hayes et al., 1972, Li et al., 2004). Una limitazione di queste tecniche è la necessità che il campione di tessuto cartilagineo sia separato dalla componente ossea, in quanto le superfici del campione devono essere piatte e parallele per una compressione uniforme del campione. Il taglio della cartilagine modifica la struttura interna della matrice extracellulare e la risposta meccanica del tessuto sottoposto a carichi esterni (Soltz et al., 2000; Soulhat et al., 1999). Khoronen (Khoronen et al., 2002) ha messo in evidenza che i valori del modulo di Young misurati in prove di compressione sono inferiori rispetto ai risultati ottenuti in prove di indentazione, a causa del danneggiamento del tessuto cartilagineo in seguito alle procedure di preparazione del campione. Inoltre, in un test di compressione vengono selezionate condizioni che approssimano il comportamento in vivo della cartilagine (confinamento laterale della cartilagine) e le stesse pareti di confinamento e il piatto di supporto del campione possono essere scelti porosi o meno, a seconda che si voglia permettere l'essudazione di fluido fuori dalla cartilagine.

Dal momento che prove di indentazione non richiedono una separazione della cartilagine dalla componente ossea, sono state individuate numerose soluzioni sperimentali di indentazione per la caratterizzazione meccanica della cartilagine articolare. In aggiunta, l'utilizzo di punte di indentazione di dimensioni micro e nanometriche, permette una valutazione dell'eterogeneità strutturale della cartilagine e una quantificazione delle proprietà meccaniche delle diverse regioni identificabili all'interno della cartilagine articolare su scala micrometrica e delle macromolecole costituenti la matrice extracellulare su scala nanometrica.

Nel presente lavoro sono state eseguite prove di nanoindentazione a livello micrometrico per la caratterizzazione meccanica di campioni di cartilagine articolare. Vengono inoltre riportati risultati relativi a prove di nanoindentazione dinamica tramite tecniche di microscopia a forza atomica AFM condotte su campioni di cartilagine articolare, eseguiti presso il Dipartimento di Biofisica e Ingegneria Elettronica, Università di Genova. In Tabella 4.1 vengono riassunte le principali applicazioni e modalità di prova per la caratterizzazione meccanica di tessuti cartilaginei tramite metodi di AFM e di

nanoindentazione.

**Tabella 4.1 – Metodi di caratterizzazione meccanica cartilagine articolare per mezzo di indentazione**

Metodo	Forza-Spostamento	Geometria	Proprietà meccaniche	Materiali
AFM (prove di creep, rilassamento, e carico in modalità dinamica)	$F \sim 0.1nN - 1\mu N$ $D \sim 0.1 - 2\mu m$	Punte piramidale e sferica su superficie planare	$E_{ind}, \tau,  E^* , \delta,$ $E', E''$	Cartilagine nativa, trattata e ingegnerizzata; macromolecole cartilagine
Micro e nano indentazione (prove creep, rilassamento in modalità statica)	$F \sim 1\mu N - 1N$ $D \sim 1nm - 100\mu m$	Punte piramidale e sferica su superficie planare	$E_{ind}, \tau$	Cartilagine nativa, trattata e ingegnerizzata; macromolecole

**Abbreviazioni:**  $E_{ind}$  modulo di indentazione;  $\tau$  costante di rilassamento;  $|E^*|$  modulo di indentazione dinamico complesso;  $\delta$  angolo di fase tra forza-affondamento in prove dinamiche;  $E'$  modulo elastico di indentazione;  $E''$  modulo viscoso di indentazione.

#### 4.1.1 Prove di indentazione

##### 4.1.1.1 Preparazione del campione

Le procedure di prelievo e trattamento dei campioni di cartilagine articolare porcina vengono eseguite presso l'IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi. I campioni di cartilagine porcina di controllo e ingegnerizzata vengono prelevati da condili femorali mediale e laterale delle articolazioni posteriori, rispettivamente sinistra e destra, specie minipig, età 18 mesi e peso 70 kg. Tutti i campioni comprendono sia la componente cartilaginea che quella ossea. Il diametro dei campioni analizzati varia tra 4.5-5mm.

I campioni di cartilagine bovina sono prelevati da condili femorali mediale e laterale di ginocchio da esemplari di maschio adulto provenienti da macello. Il prelievo dei campioni di cartilagine articolare bovina viene eseguito presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche, Politecnico di Milano. Tramite carotaggio dei condili femorali

vengono ottenuti campioni osteocondrali di diametro pari a 10 mm (figura 4.2).

In numerosi studi i campioni di cartilagine vengono conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Boschetti et al., 2006; Chen et al., 2001; Cohen, et al., 1998) o a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Chahine et al., 2004). Gli effetti della crioconservazione sul comportamento meccanico della cartilagine articolare bovina sono stati investigati in prove di indentazione (Kiefer et al, 1989), senza che significative differenze siano state rilevate per campioni di controllo e campioni crioconservati a  $-79^{\circ}\text{C}$ . Più recentemente (Kelvin et al, 2010) è stata valutata la vitalità della componente cellulare di cartilagine porcina per diverse concentrazioni di fattori crioconservanti (VS55), tramite l'utilizzo di un indicatore di attività metabolica cellulare. Una maggiore vitalità è stata osservata per concentrazioni di VS55 maggiori rispetto ai risultati ottenuti in studi precedenti (Song et al., 2004).

Nel presente lavoro i campioni di cartilagine vengono crioconservati a temperature di  $-80^{\circ}\text{C}$ . In seguito allo scongelamento, i campioni vengono posti per 45 minuti in un bagno termico a  $37^{\circ}\text{C}$  prima dell'inizio della prova.

Il principale problema osservato nel corso della preparazione dei campioni per prove di indentazione è la necessità di avere una superficie articolare liscia senza irregolarità, in modo tale che la punta di indentazione non risenta delle eventuali irregolarità nel corso delle prove di indentazione. Le irregolarità della base ossea vengono risolte utilizzando lime per abrasione, una soluzione che non è invece applicabile per la superficie articolare, a causa degli evidenti danni che riporterebbe la superficie stessa. In alcuni studi per ottenere campioni piatti, il campione osteocondrale viene posto all'interno di un microtomo e la superficie libera di cartilagine articolare viene tagliata fino ad ottenere una superficie parallela a quella ossea. Per facilitare le operazioni di taglio, il campione di cartilagine viene ricoperto con ceralacca. Tuttavia la successiva rimozione della ceralacca richiede l'esposizione del campione ad elevate temperature che possono danneggiare la componente extracellulare della cartilagine articolare.

Nonostante tali accorgimenti in fase di preparazione, alcuni campioni di cartilagine porcina di controllo e ingegnerizzata presentavano irregolarità sulla superficie articolare. Di conseguenza sui campioni di cartilagine porcina vengono eseguite prove di indentazione singole e al termine di ogni singola indentazione la punta viene spostata tramite il controllo

di spostamento della macchina, in modo tale da evitare le visibili irregolarità lungo la superficie articolare.

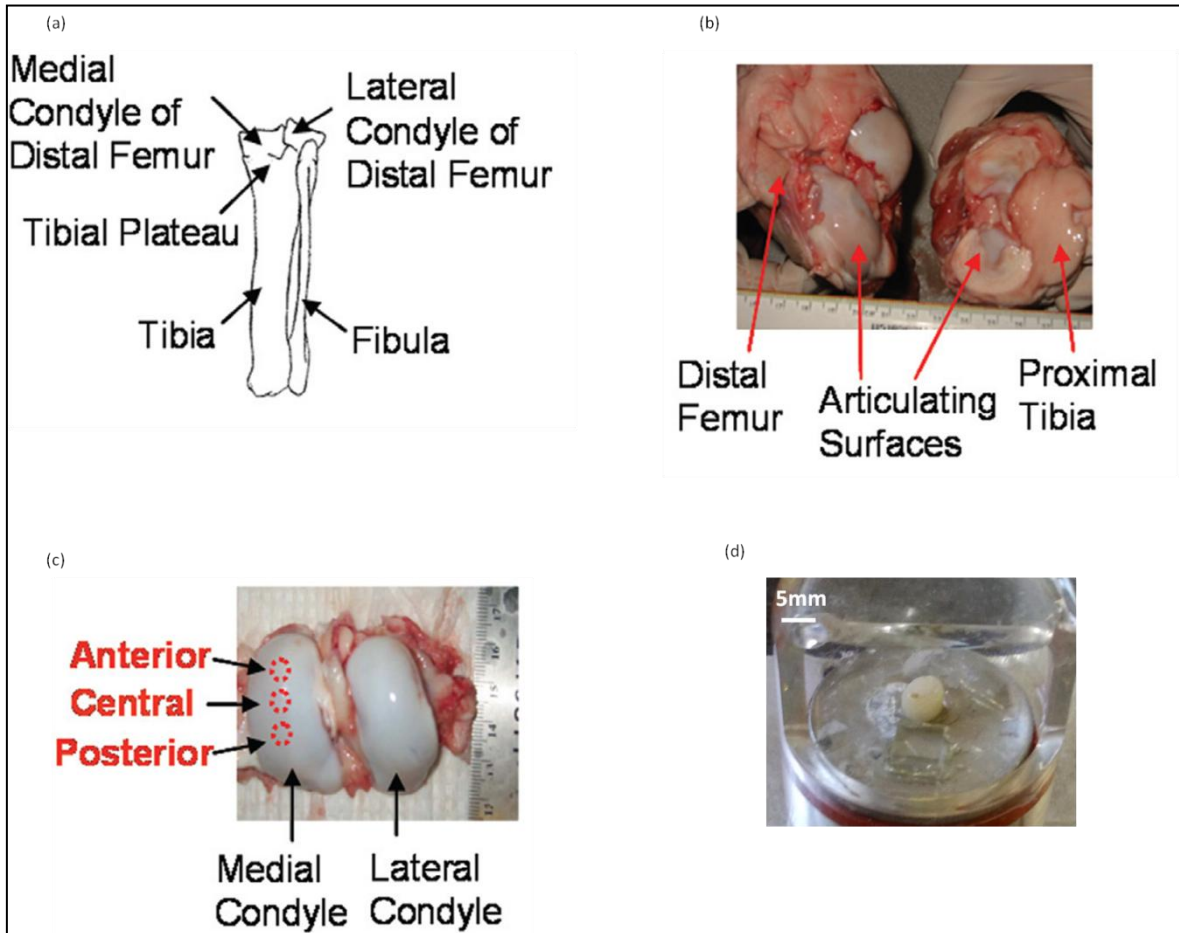


Figura 4.1 – Preparazione di un campione di cartilagine articolare porcina per indentazione: schema di ossa lunghe (a), superfici articolari (b), condili femorali mediale e laterale (c), campione montato all'interno della cella liquida per prove di indentazione (d).



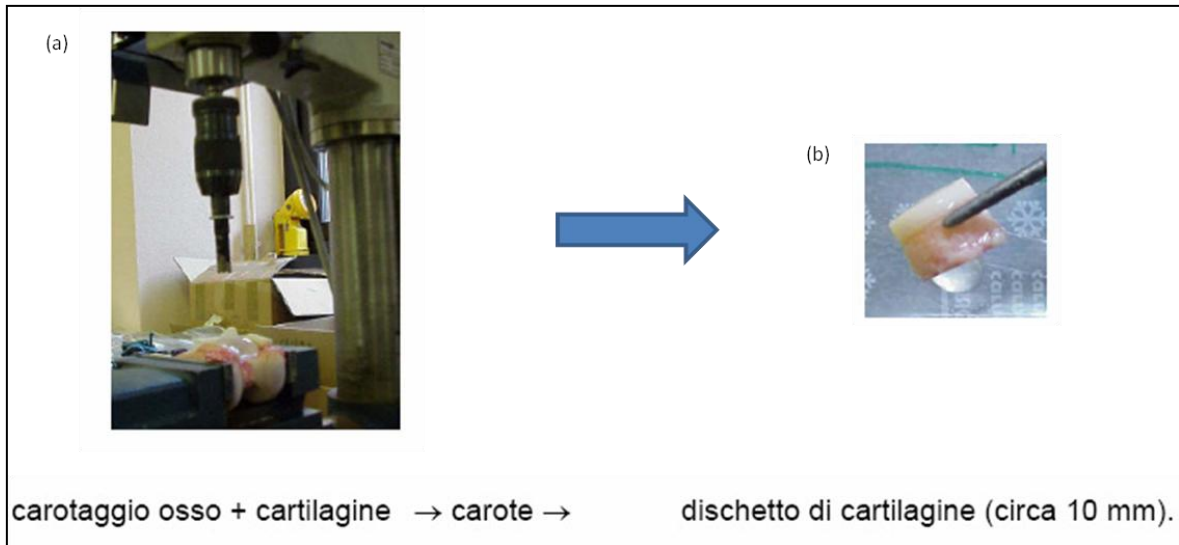


Figura 4.2 – Preparazione campione cartilagine bovina presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche: macchina per carotaggio osso (a), campione osteocondrale diametro 10mm (b).

#### 4.1.1.2 Apparato sperimentale e prove di creep

Le Prove di creep di indentazione su campioni di cartilagine articolare vengono condotte utilizzando una macchina di prova per micro-nanoindentazione (Micromaterials Nanotest System, Wrexham, UK) equipaggiata con una cella liquida, all'interno della quale viene montato il campione. La cella liquida viene riempita con soluzione fisiologica contenente cloruro di sodio 0.9 M NaCl, in modo tale da mantenere il campione idratato e garantire una conservazione della matrice extracellulare. Nel corso della prova, a causa della parziale evaporazione di soluzione fisiologica, la cella liquida viene riempita di acqua per mantenere le concentrazioni saline su livelli costanti ed evitare un accumulo di sali all'interno della matrice extracellulare, con conseguente alterazione delle proprietà meccaniche del campione.

I campioni vengono sottoposti a deformazioni di creep nel corso di ciascuna prova di indentazione. La macchina impiegata funziona in modalità controllo di carico. Tramite il software di controllo della macchina (Materials Testing Platform Three) vengono quindi programmate prove di creep in modalità multiloading con livelli di carico a partire da 0.1 mN e incrementi discreti di 0.1 mN (Tabella 4.2), ciascuno caratterizzato da una rampa di carico seguita da una fase di hold (figura 4.3). All'interno di ogni prova di creep multiloading

vengono mantenute fisse per i diversi livelli di carico sia la velocità della rampa di carico sia la durata della fase di hold. In base a prove precedenti, viene fissato un valore di fondo scala per gli affondamenti pari a 30  $\mu\text{m}$ . Il software della macchina registra in file separati i valori delle curve di carico carico-affondamento e delle curve di creep affondamento-tempo. I valori relativi alle curve di creep vengono elaborati tramite il software Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA).

I campioni di cartilagine bovina vengono analizzati facendo variare la velocità delle rampe di carico, pari a 1  $\text{mNsec}^{-1}$  per il campione 10, 10  $\text{mNsec}^{-1}$  per i campioni 11,12 (Tabella 4.2). In base ad alcuni studi precedenti (Franke et al., 2007) è stata infatti evidenziata la sensibilità dei valori della rigidità di contatto rispetto alla velocità della rampa di carico utilizzata e la conseguente importanza che la metodologia sperimentale assume per una corretta caratterizzazione meccanica del tessuto.

Date le dimensioni dei campioni di cartilagine bovina di diametro pari a 10 mm, tramite il software della macchina vengono programmati per ogni campione array da 10 indentazioni multiloading. La distanza tra le successive indentazioni e array viene fissata pari a 300  $\mu\text{m}$ , cioè pari a più di due volte il raggio di contatto misurato in corrispondenza dei valori massimi di affondamento registrati in prove precedenti (raggio di contatto  $a$  viene calcolato con l'approssimazione  $a \cong \sqrt{Rh}$  in accordo con la teoria di Hertz del contatto meccanico elastico tra due corpi). Una spaziatura di 300  $\mu\text{m}$  viene quindi considerata sufficiente per evitare che la deformazione di una indentazione influisca sull'indentazione adiacente.

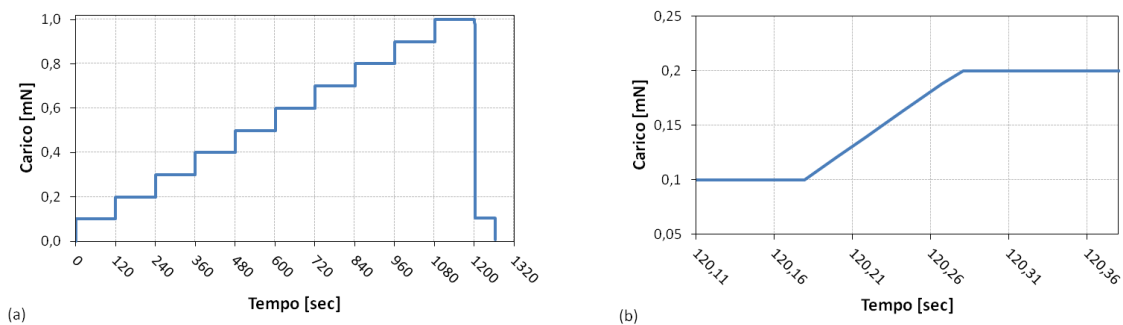
I campioni di cartilagine porcina, di controllo e ingegnerizzata, vengono analizzati con punte di indentazione con raggio nominale pari a 25 e 400  $\mu\text{m}$ , mentre i restanti parametri di prova vengono mantenuti fissi per i diversi campioni (Tabella 4.2). Date le dimensioni ridotte dei campioni di diametro pari a 5 mm e le irregolarità sulla superficie articolare, non vengono programmate strisciate a multiple indentazioni. Vengono invece condotte prove a singole indentazioni multiloading e al termine di ogni indentazione multiloading la punta viene spostata tramite il controllo di spostamento della macchina.

In Tabella 4.2 sono riassunti i campioni analizzati tramite prove di indentazione multiloading

con i relativi parametri fissati per ciascuna prova.

**Tabella 4.2 – Campioni cartilagine analizzati, bovina e porcina, e parametri prove di creep multiload**

	Campione	Velocità rampa di carico [mNsec <sup>-1</sup> ]	Dimensione raggio punta di indentazione [μm]	Tempo fase di hold [sec]	Livelli di carico analizzati [mN]
<b>Cartilagine bovina</b>	10	1	400	120	0.1:0.1:1
	11	10	400	120	0.1:0.1:0.9
	12	10	400	150	0.1:0.1:1
<b>Cartilagine porcina</b>	di controllo	1	25, 400	120	0.1:0.1:1 p400 0.1:0.1:0.7 p25
	ingegnerizzato (solo scaffold)	1	25, 400	120	0.1:0.1:1 p400 0.1:0.1:0.6 p25



**Figura 4.3 – Curva carico-tempo prove di creep di indentazione multiload da 0.1:0.1:1mN tempo di hold 120 sec (a); dettaglio rampa di carico livello 0.1:0.2mN, velocità rampa di carico 1mNsec<sup>-1</sup> (b).**

#### 4.1.1.3 Analisi dei dati e calcolo del modulo di indentazione

Il modulo di indentazione  $E_{ind}$  viene calcolato tramite interpolazione delle curve sperimentali carico-affondamento con modelli analitici di contatto meccanico per materiali elastici, lineari e isotropi. Per la cartilagine l’assunzione di elasticità lineare risulta valida in corrispondenza dello stato drenato, in cui il comportamento del materiale è determinato solamente dalla matrice porosa e in corrispondenza dello stato non drenato per velocità di carico sufficientemente elevate.

Nel caso di contatto meccanico elastico lineare, la relazione tra il carico applicato  $F$  e

l'affondamento registrato  $u$  per una punta di indentazione di forma assial-simmetrica, può essere descritta come (Shahsavari et al., 2009):

$$F = \phi E_{ind} u^{(1+1/n)} \quad (4.1)$$

dove  $\phi$  è funzione della geometria della punta,  $n$  è il grado della funzione omogenea  $\phi$ . Nel caso di punta di indentazione di forma sferica, l'equazione (4.1) diventa:

$$F = \frac{4}{3} E_{ind} \sqrt{R} u^{3/2} \quad (4.2)$$

Tramite interpolazione dell'equazione (4.2) con i dati di affondamento drenato e non drenato delle curve di creep di indentazione multiloading, vengono calcolati i valori dei moduli di indentazione  $E_{ind}$  drenato e non drenato che meglio approssimano i risultati sperimentali. I valori di affondamento drenato considerati per il fitting sono i punti di fine creep di ogni livello di carico, mentre i valori di affondamento non drenato corrispondono con i punti di fine rampa di carico, cui vengono sottratti i valori di affondamento di fine creep relativi ai livelli di carico precedenti (figura 4.4).

In accordo con Delafargue (Delafargue et al., 2004) è inoltre possibile correlare il modulo di indentazione con le proprietà elastiche del materiale secondo la relazione  $E_{ind} = \frac{E}{(1-\nu^2)}$  per il caso drenato,  $E_{ind} = \frac{3E}{2(1+\nu)}$  per quello non drenato, con  $E$  modulo elastico e  $\nu$  modulo di Poisson del materiale.

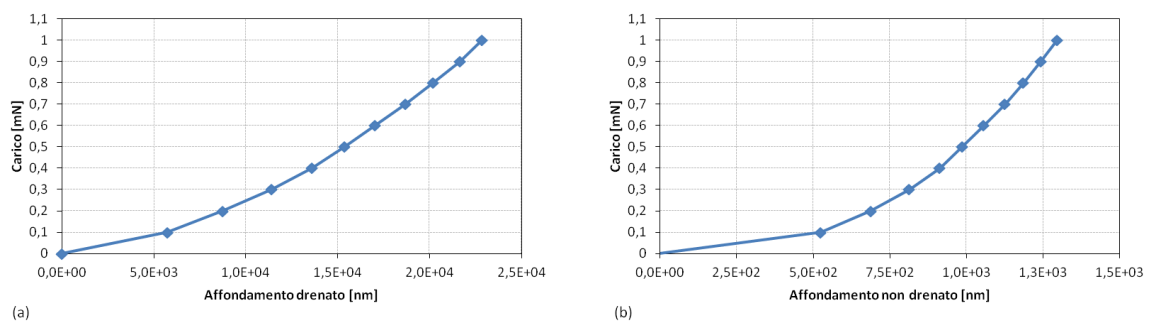


Figura 4.4 – Curve carico-affondamento drenato (a), curve carico-affondamento non drenato (b).

Viene condotta un'analisi preliminare del comportamento tempo dipendente della cartilagine, in cui viene investigata la velocità delle curve di creep per diversi livelli di carico. L'affondamento durante la fase di creep viene analizzato tramite interpolazione con una curva esponenziale a tre termini. La forma della curva interpolante viene espressa come:

$$u = C_0 + C_1 e^{(-t/t_1)} + C_2 e^{(-t/t_2)} + C_3 e^{(-t/t_3)} \quad (4.3)$$

con  $u$  affondamento della punta nel campione durante la fase di creep,  $C_0, C_1, C_2, C_3, t_1, t_2, t_3$  costanti che meglio approssimano i dati di affondamento delle prove di creep. In particolare, i valori delle costanti temporali  $t_1, t_2$  e  $t_3$  individuano due tratti all'interno della stessa curva di creep: un tratto iniziale da  $t_1$  a  $t_2$  e uno finale che da  $t_2$  si sviluppa fino a  $t_3$ .

Per le curve di creep completo e per i tratti di inizio e fine creep viene indagato il comportamento tempo dipendente dovuto agli effetti poroelastici della cartilagine, tramite interpolazione dei dati con la soluzione analitica di consolidazione per un materiale poroelastico. In accordo con la soluzione analitica sviluppata in [3.2.1] per un problema di indentazione di un materiale poroelastico, la componente dipendente dal tempo dell'affondamento della punta di indentazione viene espressa tramite la funzione  $g(\tau)$ :

$$g(\tau) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{8}{(1+2m)^2 \pi^2} \left[ 1 - e^{-(1+2m)^2 \pi^2 \tau^2} \right] \quad (4.4)$$

La funzione  $g(\tau)$  compresa tra 0 e 1 viene adattata alle prove di creep multiloading eseguite, in modo tale da descrivere il comportamento tempo dipendente dei valori di affondamento della punta. All'interno dell'equazione di  $g(\tau)$  sono quindi inseriti i parametri  $P_1$  e  $P_2$  che forniscono informazioni riguardanti rispettivamente i valori di affondamento assoluto della punta di indentazione e le proprietà meccaniche della cartilagine. L'equazione per l'affondamento utilizzata per l'interpolazione dei dati sperimentali delle curve di creep viene quindi espressa:

$$u(\tau) = u_0 + P_1 \sum_{m=0}^N \frac{8}{(1+2m)^2 \pi^2} \left[ 1 - e^{-(1+2m)^2 \pi^2 \tau^2} \right] \quad (4.5)$$

Con  $u_0$  affondamento di inizio creep,  $\tau = \sqrt{P_2 t / Ru}$  normalizzazione del termine temporale,

$P_1$  e  $P_2$  parametri del fitting che meglio approssimano i dati sperimentali. Il parametro  $P_1$  fornisce informazioni riguardo il salto di affondamento dalla soluzione non drenata alla soluzione drenata  $u(\infty) - u(0)$ , il parametro  $P_2$  corrisponde al coefficiente

$c = \frac{3Kk^d}{\mu} \frac{1-\nu^d}{1+\nu^d}$  [3.2.1] e dipende dalla permeabilità e dal modulo di comprimibilità

volumetrica del materiale.

## 4.1.2 Prove di AFM

### 4.1.2.1 Preparazione campione

Campioni di cartilagine bovina sono ottenuti da esemplari di maschi adulti e crioconservati fino all'utilizzo. I campioni sono prelevati da condili femorali in posizione prossimale, tramite punte per biopsia di diametro pari a 2 mm. I campioni di cartilagine articolare comprendono anche la componente osteocondrale. I campioni sono immersi in una soluzione tampone PBS e crioconservati fino al loro utilizzo.

### 4.1.2.2 Apparato sperimentale e prove dinamiche

Le prove sono condotte utilizzando una macchina per microscopia a forza atomica (Agilent Technologies 5500, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipaggiata con un micro-cantilever (NSC12, MikroMasch, Tallin, Estonia) con un coefficiente elastico pari a 10.4 N/m. Viene utilizzata una punta di indentazione sferica con un raggio pari a 7.5  $\mu\text{m}$ .

La punta di indentazione viene portata in contatto con la superficie del campione in modo da applicare un affondamento di precarico costante. Il segnale che viene applicato alla punta di indentazione ha le seguenti caratteristiche: spostamento sinusoidale di 10 nm

picco-picco, con variazioni di frequenza  $f$  da 2 Hz a 200 Hz con incrementi discreti di 0.25 Hz. Il software della macchina registra il rapporto  $R^{i/o} = \frac{\Delta h_c}{\Delta h_o}$  e il ritardo di fase  $\phi$  tra il segnale di input (spostamento verticale del piezo  $\Delta h_o$ ) e l'output (deflessione del cantilever  $\Delta h_c$ ). Assumendo che il cantilever lavori in un range elastico, l'ampiezza della forza applicata è linearmente proporzionale alla deflessione del cantilever  $\Delta P = k_c \Delta h_c$ . Se lo spostamento viene decomposto in  $\Delta h_o = \Delta h_c + \Delta h_s$  (figura 1), si ottiene:

$$\frac{\Delta P}{\Delta h_s} = \frac{k_c \Delta h_c}{\Delta h_o - \Delta h_c} = \frac{k_c R^{i/o}}{1 - R^{i/o}}$$

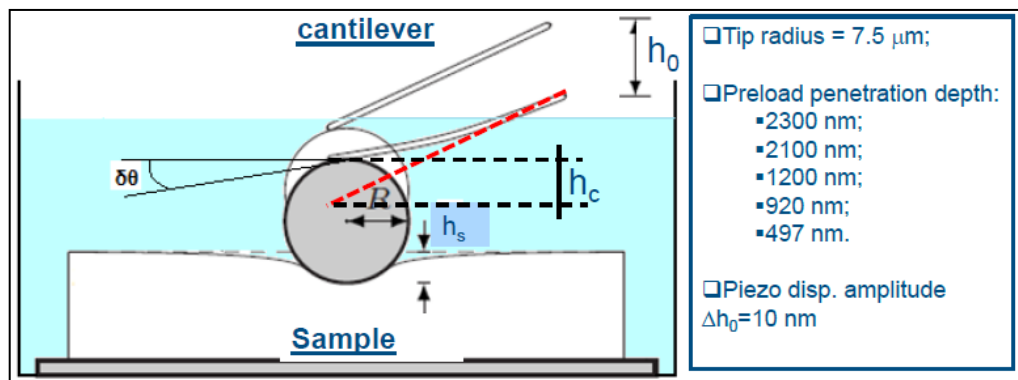


Figura 4.5 – Apparato sperimentale adottato per prove di indentazione dinamica per AFM

#### 4.1.2.3 Analisi dei dati

I moduli di indentazione elastico e viscoso vengono calcolati per tutte le indentazioni effettuate, in accordo con le seguenti relazioni (Cheng et al., 2006):

$$E^* ' = \frac{1}{2} \frac{1}{\sqrt{R h_s}} \left| \frac{\Delta P}{\Delta h_s} \right| \cos \phi$$

$$E^* '' = \frac{1}{2} \frac{1}{\sqrt{R h_s}} \left| \frac{\Delta P}{\Delta h_s} \right| \sin \phi$$

dove  $\Delta P$  è l'ampiezza del carico oscillatorio applicato al campione,  $h_s$  è l'affondamento medio nel campione durante l'oscillazione determinato come l'affondamento corrispondente al carico medio applicato  $P = k_c h_c$ .

## **4.2 Prove numeriche**

Le prove numeriche sviluppate tramite il software Abaqus 6.8-EF1 (Simulia, Providence, RI, USA), vengono utilizzate per la validazione del modello poroelastico per il comportamento dipendente dal tempo della cartilagine articolare, mediante confronto con i dati sperimentali relativi a prove di creep per indentazione. Oggetto di questo studio è stata inoltre la validazione della soluzione analitica per problemi di indentazione di un materiale poroelastico, isotropo e omogeneo [3.2.1].

Il modello numerico deve essere semplice e accurato, ma allo stesso tempo efficiente in termini di tempo necessario per l'analisi e lo sviluppo della soluzione numerica. Di conseguenza vengono elaborate prove di creep multiload con tempi di hold inferiori ai corrispondenti valori usati nelle prove sperimentali.

Geometria, mesh, proprietà del materiale, condizioni al contorno e contatto punta-campione vengono definite tramite il software Abaqus, mentre i risultati degli affondamenti della punta all'interno del campione vengono elaborati tramite il software MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA).

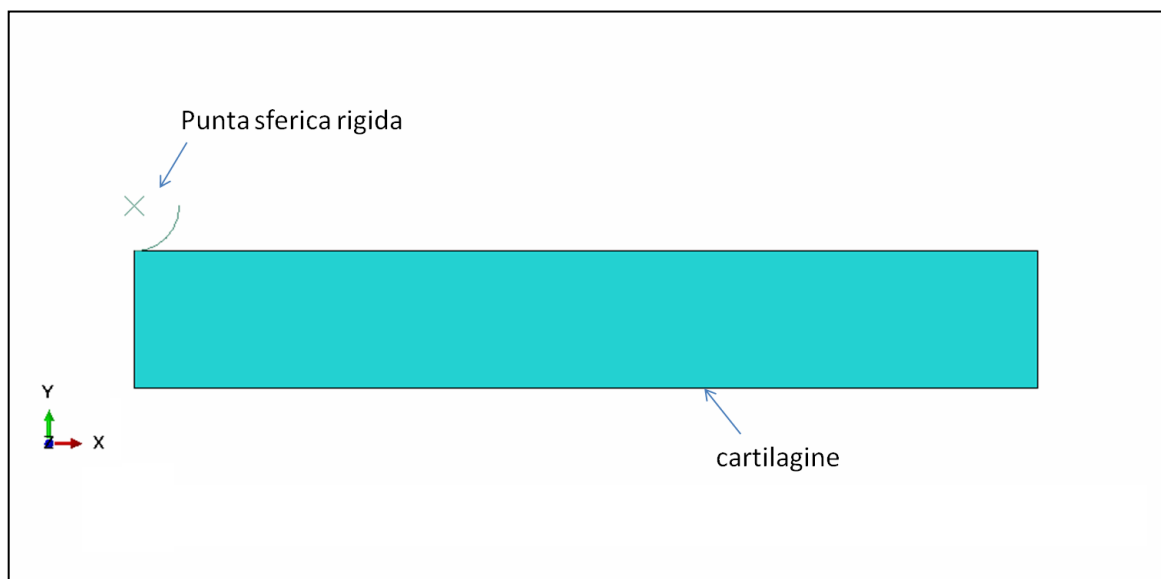
### **4.2.1 Geometria**

In questa parte del lavoro viene esaminato il materiale con cui viene rappresentata la cartilagine articolare. La componente osteocondrale della cartilagine non viene rappresentata, in modo tale da ridurre i materiali e quindi il numero di nodi del modello e per avere minori costi computazionali in termini di durata della prova numerica. Inoltre i valori degli sforzi e delle deformazioni della componente ossea della cartilagine non rientrano negli interessi dell'attività svolta.



Data la simmetria del problema, il campione di cartilagine viene modellato tramite elementi poroelastici assial-simmetrici. Il raggio e lo spessore della cartilagine vengono definiti rispettivamente pari a  $8000\mu\text{m}$  e  $1200\mu\text{m}$ , in modo che le dimensioni della cartilagine siano maggiori di quelle della punta di indentazione e degli affondamenti registrati in fase di creep.

La punta di indentazione sferica viene modellata come un corpo rigido analitico. Viene definito un raggio pari a  $400\mu\text{m}$ , in accordo con le dimensioni della punta sferica usata nelle prove sperimentali su cartilagine bovina. Sforzi e deformazioni agenti sulla punta non sono di interesse del nostro studio, inoltre l'elevata rigidità della punta rispetto alla cartilagine permette di trascurare eventuali componenti di deformazione della punta stessa, che viene quindi definita come un elemento rigido e non poroso.

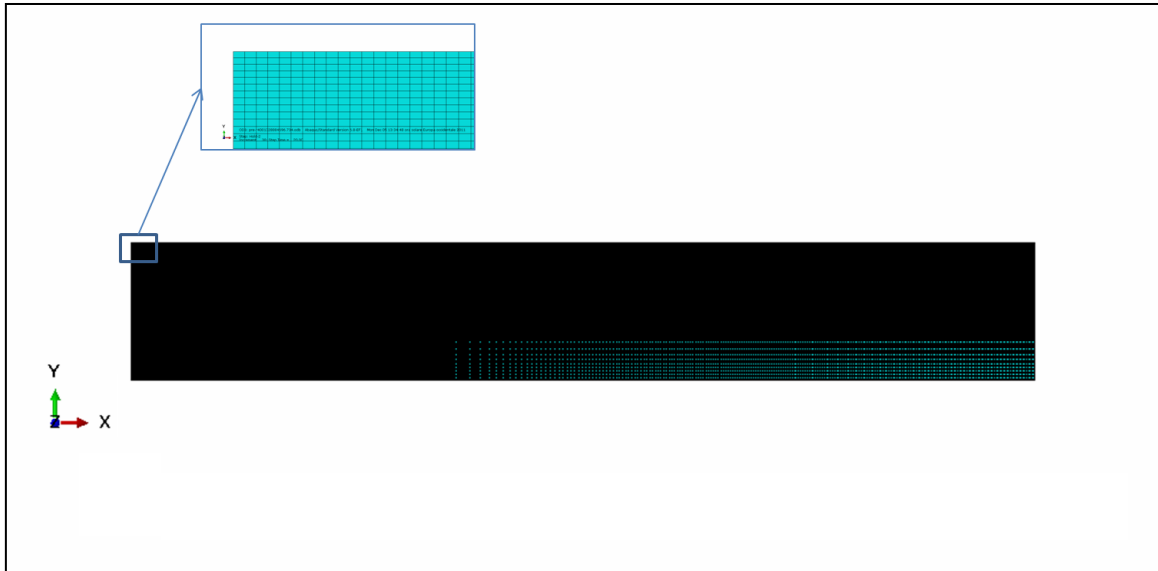


**Figura 4.6 – Geometria assialsimmetrica usata nelle prove numeriche per analisi di un materiale poroelastico. Nelle simulazioni vengono rappresentate la punta di indentazione e il campione di cartilagine.**

#### 4.2.2 Discretizzazione ad elementi finiti

La cartilagine viene discretizzata con elementi continui quadrilateri con funzioni bilineari per spostamento e pressione dei pori (CAX4P). La distanza tra i nodi viene distribuita linearmente sia in direzione radiale, sia in direzione assiale, in modo da creare una mesh

più fine al di sotto della punta di indentazione. Infatti secondo studi di convergenza è necessario un alto numero di nodi in prossimità della superficie di contatto punta-campione per permettere una convergenza della soluzione del problema poroelastico. Il numero di elementi totali è pari a 330001.



**Figura 4.7 – Mesh assialsimmetrica usata nelle prove numeriche per analisi di un materiale poroelastico. Il numero totale di elementi è 330001.**

### 4.2.3 Proprietà del materiale

Le proprietà del materiale per la cartilagine articolare vengono definite appropriatamente, in modo da permettere un confronto tra il comportamento risultante dalle prove numeriche e quello ottenuto invece dalle prove sperimentali. È quindi necessario che le proprietà del materiale del modello poroelastico siano ottenute direttamente dai risultati relativi alle prove di indentazione eseguite sui campioni di cartilagine. Come riferimento viene considerato il campione di cartilagine bovina 10 analizzata secondo le stesse modalità delle prove numeriche.

Attraverso prove di creep di indentazione è possibile calcolare il modulo elastico di indentazione in corrispondenza della soluzione drenata a fine creep. In condizioni drenate è infatti possibile considerare la fase fluida in equilibrio e le proprietà meccaniche della cartilagine dipendere unicamente dalla componente solida della matrice e dalle fibre di

collagene. Per il modello poroelastico è relativamente semplice determinare i parametri meccanici che definiscono la risposta della cartilagine in prove di indentazione, perché data la sua definizione [3.2], non viene fatta distinzione tra il contributo delle fibre di collagene e quello dei proteoglicani. Assumendo quindi il materiale come puramente elastico, i valori del modulo di indentazione vengono ricavati applicando una interpolazione dei dati sperimentali con l'equazione del contatto elastico formulata da Hertz [4.1.1.3].

Per semplicità il materiale viene assunto come elastico, lineare ed isotropo. Il modello poroelastico [3.2] richiede la definizione di tre parametri:  $E$ ,  $\nu$  e  $K$ . Il modulo elastico di Young  $E$  viene ricavato dal valore del modulo di indentazione drenato [4.1.1.3]. Per il modulo di Poisson  $\nu$  e la permeabilità  $K[m^4]$  vengono invece scelti valori presenti in letteratura (Keenan et al, 2009).

**Tabella 4.3 – Proprietà materiale cartilagine prove numeriche**

Modulo elastico [KPa]	Modulo Poisson	Permeabilità [ $\mu\text{msec}^{-1}$ ]	Peso specifico fluido interstiziale [ $\text{mN}\mu\text{m}^{-3}$ ]
0.540	0.2	1e-05	9.81e-12

Per quanto riguarda la punta di indentazione, essendo stata modellata come corpo rigido, non richiede alcuna definizione delle proprietà del materiale.

#### 4.2.4 Condizioni al contorno

Tutti gli spostamenti e le rotazioni della punta di indentazione vengono fissate a zero data la simmetria del problema, ad eccezione dello spostamento in direzione assiale. La punta viene inoltre modellata come impermeabile.

Invece per la cartilagine, gli spostamenti in direzione assiale vengono fissati a zero sulla superficie di base, in modo da rappresentare la presenza della componente osteocondrale. Gli spostamenti in direzione radiale non vengono fissati per permettere l'espansione radiale del materiale, ad eccezione del lato interno della cartilagine, data la simmetria del

problema. Il modello di indentazione presenta condizioni di impermeabilità per la superficie di base del materiale, in quanto non viene permesso flusso di fluido attraverso la componente osteocondrale. Il flusso di fluido viene invece permesso attraverso la superficie libera del materiale, formata dalla superficie superiore e laterale della cartilagine.

#### **4.2.5 Definizione contatto**

La punta di indentazione e la superficie superiore della cartilagine sono poste in contatto e vengono permessi piccoli movimenti privi di attrito.

#### **4.2.6 Modalità di carico**

Il carico di creep viene applicato alla punta di indentazione, in corrispondenza di un punto di riferimento creato al centro della punta stessa. Le prove di creep vengono condotte in maniera analoga alle prove sperimentali [4.1.1.2] in modalità multiload con carichi da 0.1 a 1mN con incrementi discreti di 0.1mN ad ogni livello di carico. La velocità della rampa di carico viene mantenuta costante e pari a  $1 \text{ mNsec}^{-1}$ . Vengono condotte due prove con i tempi di hold fissati a 10 sec e 40 sec.

# Capitolo 5

## *Risultati*

### 5.1 Risultati prove sperimentali

I risultati delle prove di indentazione analizzati sono i valori di affondamento della punta di indentazione durante la fase di creep dalla soluzione non drenata di inizio creep alla soluzione drenata di fine creep.

Gli effetti dei parametri costitutivi sono analizzati attraverso le seguenti grandezze:

- Affondamento normalizzato o grado di consolidazione dell'affondamento nel dominio temporale, definito come:

$$u' = \frac{u(t) - u(0)}{u(\infty) - u(0)}$$

in cui  $u(0)$  rappresenta il valore di affondamento a inizio creep, la soluzione non drenata,  $u(\infty)$  il valore di affondamento a fine creep, la soluzione drenata. In questo modo vengono messi in evidenza gli effetti del livello di carico e delle dimensioni della punta di indentazione.

- affondamento consolidato su scala temporale normalizzata per il fattore:

$$\tau = \sqrt{\frac{ct}{Ru(t)}}$$

dove il parametro  $c$  è proporzionale alla permeabilità e al modulo elastico [3.2.1] e viene mantenuto costante per i diversi livelli di carico. In questo modo è possibile evidenziare un'eventuale dipendenza delle curve di creep dalle proprietà meccaniche della cartilagine.

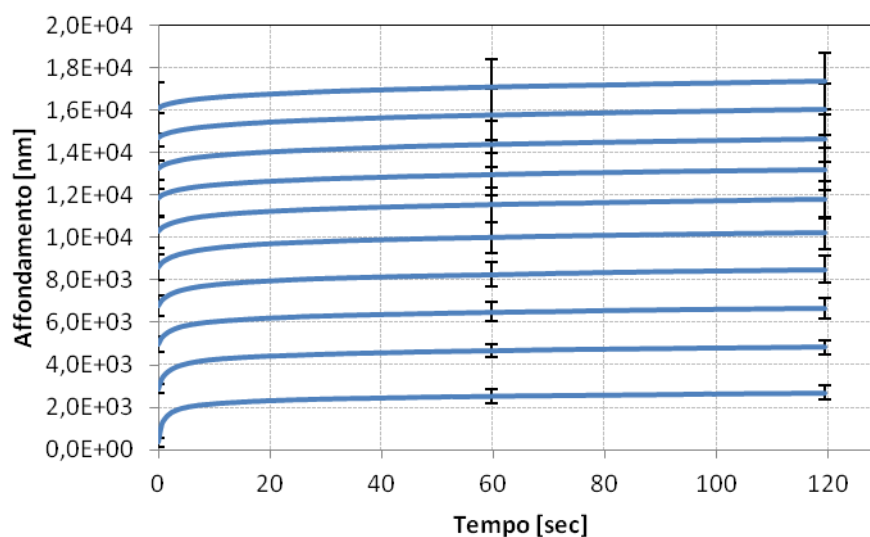
L'applicabilità della soluzione analitica formulata per un materiale poroelastico sottoposto a indentazione [4.1.1.3] viene verificata per i dati sperimentali relativi all'intera fase di creep, per i campioni di cartilagine bovina e porcina di controllo analizzati. Viene eseguita un'indagine preliminare degli affondamenti di ogni livello di carico con una curva esponenziale a tre costante temporali, in modo tale da individuare due tratti di curva con un comportamento meccanico presumibilmente diverso. Tramite interpolazione dei dati sperimentali con la soluzione analitica sviluppata in [3.2.1] e implementata in [4.1.1.3] vengono ricavati i valori dei parametri  $P_1$  e  $P_2$  per le curve di creep completo e per i tratti di inizio e fine creep. In particolare il parametro  $P_2$ , che rappresenta il coefficiente  $c$  introdotto nella formulazione di un problema poroelastico ed è dipendente dalla permeabilità e modulo elastico del tessuto, fornisce indicazioni riguardo le proprietà meccaniche oltre che descrivere la dipendenza dal tempo della curva di creep.

Le proprietà meccaniche del tessuto vengono inoltre analizzate indipendentemente dalla risposta temporale del campione, considerando i casi limite non drenato e drenato di inizio e fine creep rispettivamente. La soluzione analitica adottata per questi casi (modello del contatto meccanico di Hertz) assume che il materiale si comporti come perfettamente elastico. I valori del modulo di indentazione drenato e non drenato sono ricavati come descritto in [4.1.1.3].

### 5.1.1 Curve creep

In figura 5.1 viene rappresentato un tipico andamento delle curve di creep in prove di indentazione in modalità multiload. Poiché le curve analizzate rappresentano i valori medi di diverse indentazioni effettuate sui campioni, per ogni campione vengono effettuati test parametrici "ttest" tra le popolazioni rappresentanti i diversi livelli di carico tra loro successivi. L'ipotesi nulla del ttest è che le due popolazioni siano indipendenti con stessa

media e varianza diversa, contro l'ipotesi che le popolazioni siano indipendenti ma con media diversa. Per il campione 10 di cartilagine bovina l'ipotesi nulla viene negata fino al livello di carico relativo al carico 0.9mN, per i campioni 11,12 e per i campioni di cartilagine porcina, l'ipotesi nulla viene negata per tutti i livelli di carico analizzati.



**Figura 5.1 - Curve creep con barre di errore medio cartilagine bovina, campione 10 (a), campione 12 (b).**

### 5.1.1.1 Curve creep affondamento consolidato

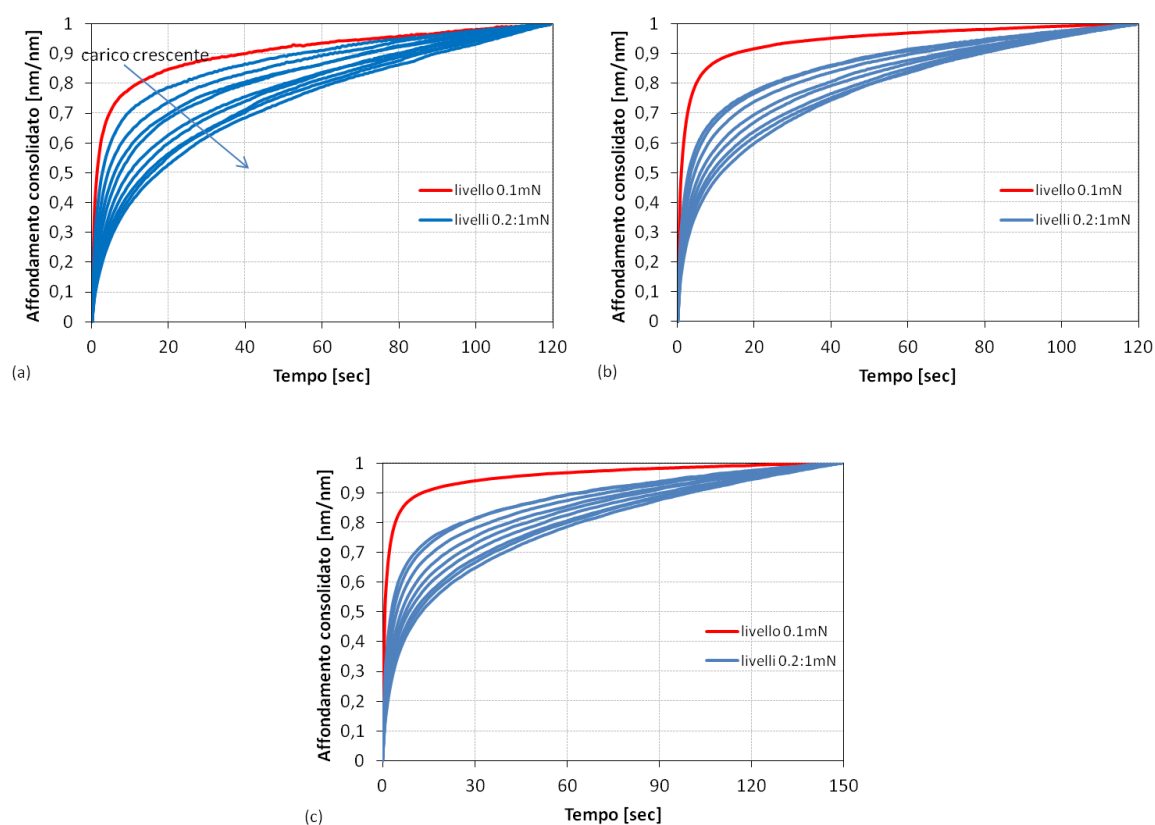
In figura 5.2 sono rappresentati i valori di affondamento consolidato al variare della velocità della rampa di carico, per campioni di cartilagine bovina. In figura 5.3,5.4 sono riportati i grafici relativi agli affondamenti consolidati al variare delle dimensioni della punta di indentazione per campioni di controllo e ingegnerizzata di cartilagine porcina.

Le curve di creep non si sovrappongono al variare del carico applicato e per istanti temporali uguali, il livello di drenaggio raggiunto dalle diverse curve diminuisce all'aumentare del livello di carico.

Per i campioni di cartilagine bovina, si osserva che la curva di creep relativa al primo livello di carico è più rapida per i campioni analizzati con velocità di carico maggiore discostandosi maggiormente dalle restanti curve di creep.

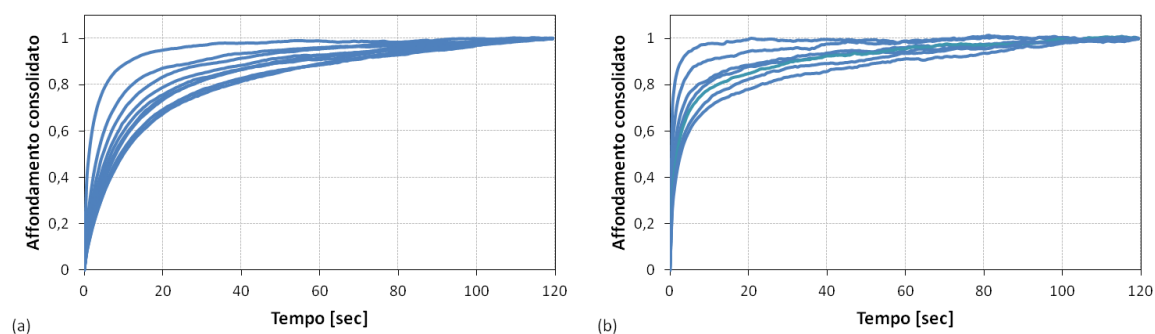
Per i campioni di cartilagine porcina di controllo e ingegnerizzata analizzati con punte di dimensioni 25 e 400  $\mu\text{m}$ , l'affondamento consolidato risulta dipendente dalle dimensioni della punta utilizzata. Infatti a parità di carico applicato, la risposta a creep risulta più

rapida nel caso di punta 25 rispetto alla 400. Anche gli affondamenti registrati per punta 25 risultano superiori ai rispettivi valori misurati per punta da 400. Per la punta p25 sono riportate le curve di creep nello stato consolidato fino al livello di carico 0.7 mN in corrispondenza del quale viene raggiunto il valore di fondo scala imposto alla macchina. Per il campione di ingegnerizzata tale valore viene invece raggiunto per il livello di carico 0.5 mN.

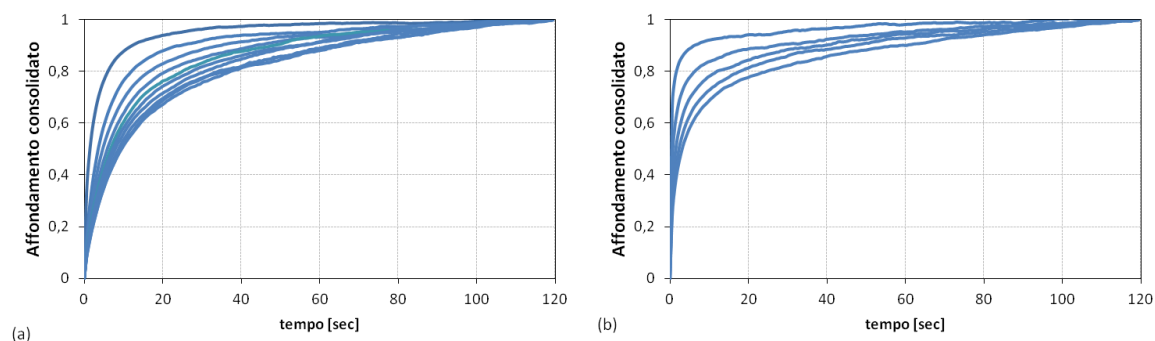


**Figura 5.2 - Affondamento consolidato su scala temporale, campioni cartilagine bovina, velocità di carico 1mNsec<sup>-1</sup> (a), 10mNsec<sup>-1</sup> (b), 10mNsec<sup>-1</sup> (c).**





**Figura 5.3 - Affondamento consolidato campione cartilagine porcina di controllo punta p400 livelli 0.1:1mN (a), punta p25 livelli 0.1:0.7mN (b).**



**Figura 5.4 - Affondamento consolidato campione cartilagine porcina ingegnerizzata punta p400 livelli 0.1:1mN (a), punta p25 livelli 0.1:0.5mN (b).**

Il comportamento della cartilagine viene confrontato con quello del polidimetilsilossano (PDMS), un materiale caratterizzato da una viscoelasticità lineare che viene sottoposto a prove di creep indentazione multiload con punte p25 e p400. Riportando i risultati sullo stesso grafico le curve di creep consolidate si sovrappongono al variare del livello di carico e della punta di indentazione (figura 5.5). Per entrambe le punte utilizzate, le curve presentavano forti oscillazioni nel tratto iniziale dovuti agli effetti inerziali della punta che vengono risolti applicando un filtro passa basso per i dati relativi al tratto iniziale.

Rispetto a un materiale puramente viscoelastico come il PDMS, la risposta temporale della cartilagine è dipendente dal livello di carico e dalle dimensioni della punta di indentazione.

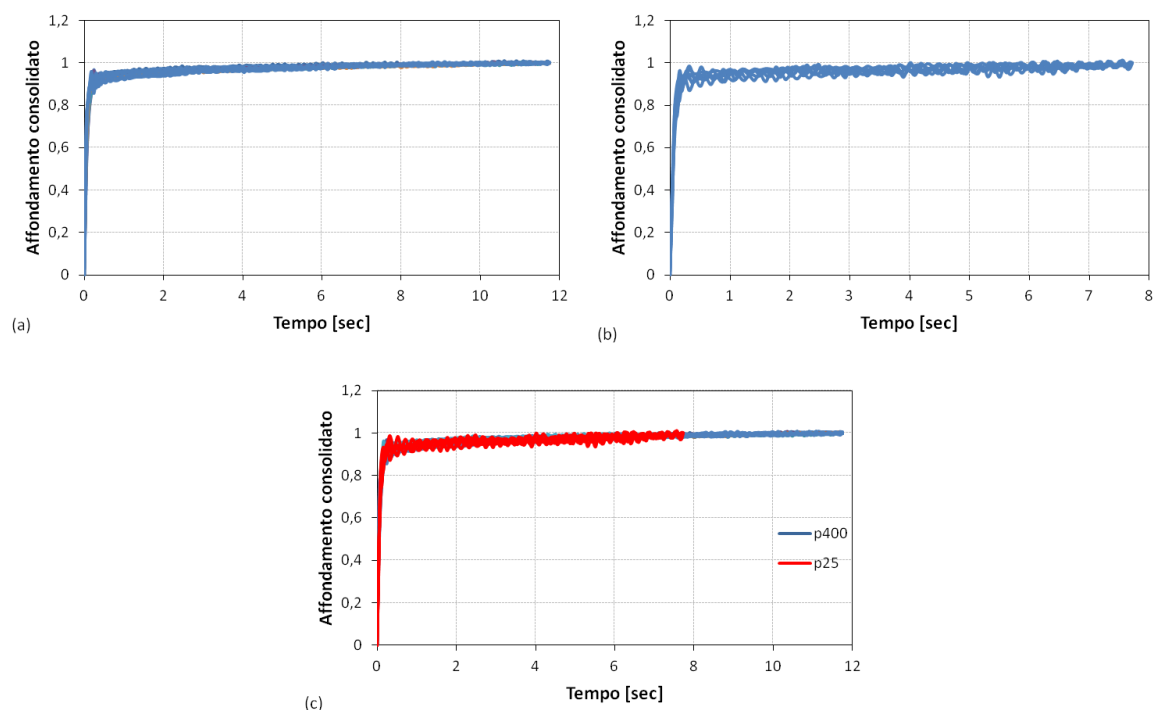


Figura 5.5 - Affondamento consolidato curve creep PDMS punta p400 (a), p25 (b), confronto p400-p25 (c).

### 5.1.1.2 Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata

I valori di affondamento consolidato vengono riportati su scala temporale normalizzata

$\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  con  $c$  parametro mantenuto costante per i diversi livelli di carico.

Per i campioni di cartilagine bovina le curve di creep si sovrappongono ad eccezione del primo carico, per poi divergere nel tratto finale. Tale comportamento è dipendente dalla velocità della rampa di carico della prova. Infatti la curva del primo livello di carico si discosta maggiormente dalle restanti per i campioni 11,12 analizzati con velocità di carico superiore rispetto al campione 10 (figura 5.6).

Per i campioni di cartilagine porcina di controllo e ingegnerizzata la dipendenza delle curve di affondamento consolidato dal livello di carico risulta maggiore rispetto ai campioni di bovina soprattutto nel caso di punta p25. Riportando sulla stesso grafico i risultati per punte diverse p400-p25 le curve rimangono separate (figura 5.7).

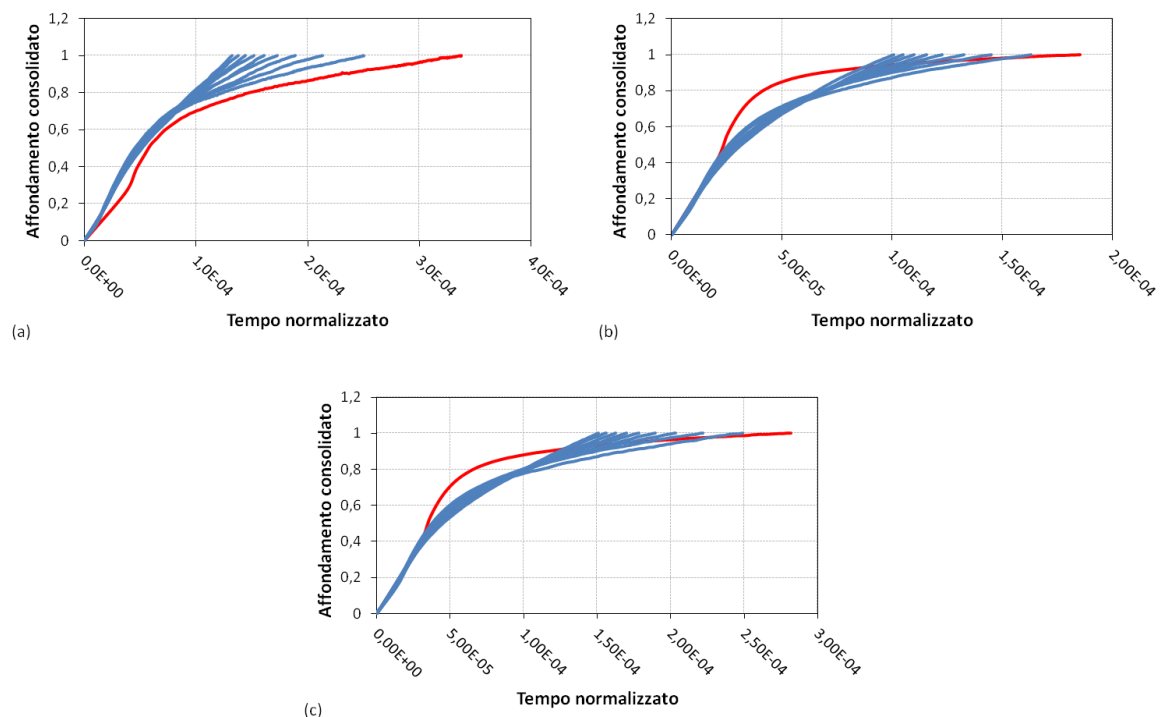


Figura 5.6 - Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata, campione 10 (a), campione 11 (b), campione 12 (c).

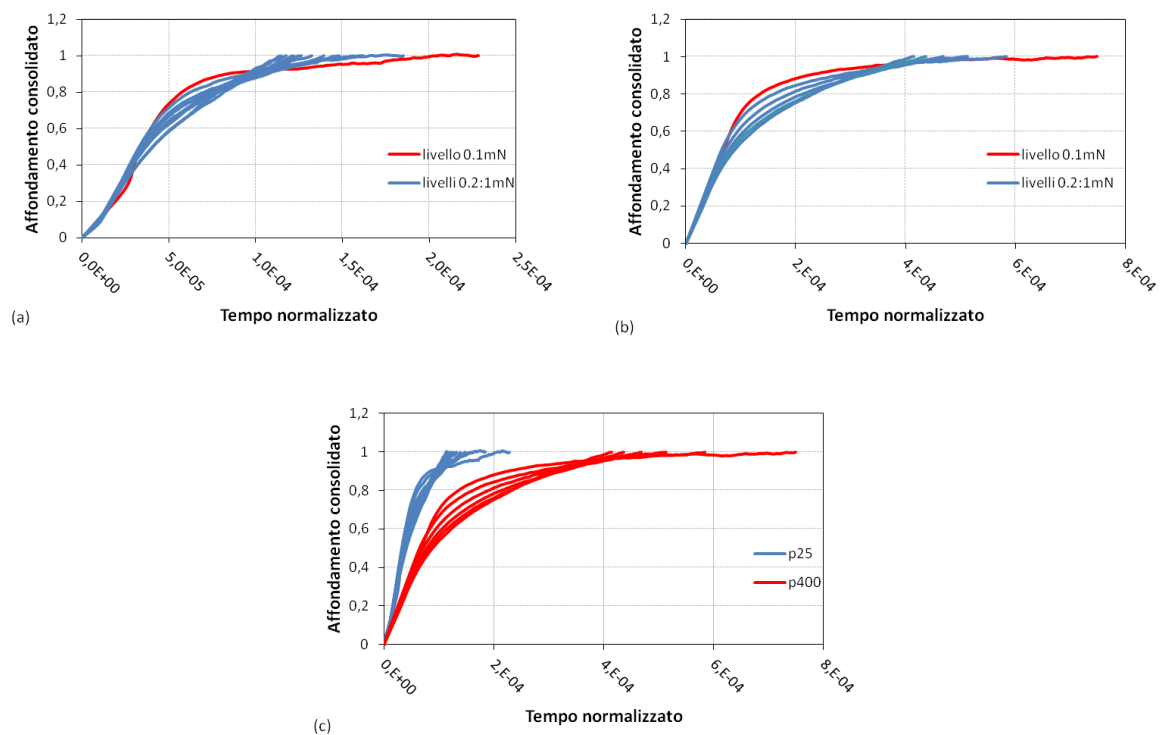


Figura 5.7 - Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata campione cartilagine porcina di controllo, punta p400 (a), p25 (b), confronto p400-p25 (c).

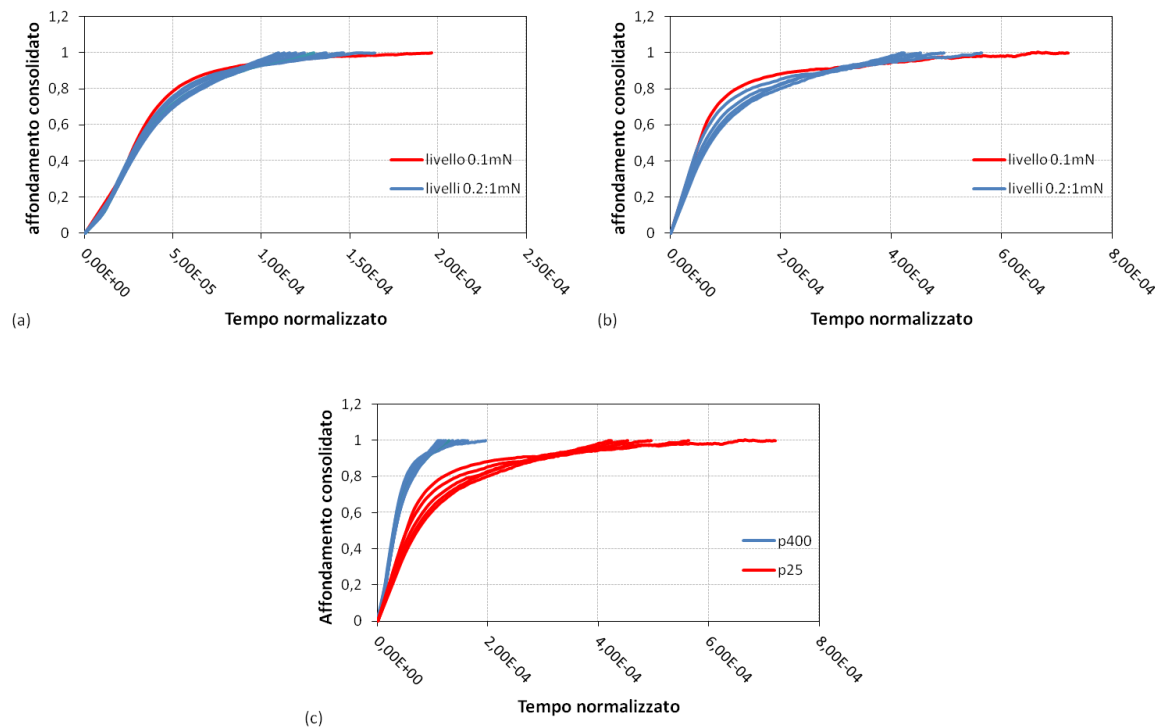


Figura 5.8 - Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata campione cartilagine porcina ingegnerizzata, punta p400 (a), p25 (b), confronto p400-p25 (c).

### 5.1.2 Comportamento tempo dipendente: risultati interpolazione poroelastica curve di creep

In Tabella 5.1 sono riportati i valori delle costanti temporali individuati dall'interpolazione esponenziale delle curve di creep relative ad ogni livello di carico. Ogni set di valori di costanti temporali  $t_1, t_2, t_3$  individua due tratti all'interno della relativa curva di creep, presumibilmente caratterizzati da un diverso comportamento meccanico. Nel caso in cui sia rispettata la bontà del fitting esponenziale ( $R^2 > 0,96$ ), per livelli di carico crescenti i valori delle costanti temporali tendono ad aumentare indicando uno sviluppo più lento per l'affondamento nel tempo.

Nelle figure 5.9-5.13 sono riportati i valori dei parametri  $P_1$  e  $P_2$  al variare del livello del carico di creep risultanti dall'interpolazione poroelastica delle curve di creep completo e dei tratti di inizio e fine creep. Il valore discriminante per il tratto di inizio creep da quello di fine viene fissato pari a 7 secondi per i diversi livelli di carico analizzati, valore

risultante da una media delle costanti temporali discriminanti  $t_1, t_2, t_3$  ottenute tramite interpolazione esponenziale delle curve di creep (Tabella 5.1).

I parametri  $P_1$  relativi al creep completo e al tratto di inizio hanno un andamento decrescente all'aumentare del livello di carico applicato. Il valore relativo al carico iniziale si discosta dai restanti valori a causa degli affondamenti maggiori per il primo livello di carico. Tale fenomeno è infatti più evidente per i campioni di cartilagine bovina 11,12 analizzati con velocità di carico maggiori ed è in accordo con i risultati ottenuti per le curve di creep del primo livello di carico [5.1.1.1,5.1.1.2].

Dall'analisi dei parametri  $P_2$  è possibile ottenere alcune informazioni circa le proprietà meccaniche del campione data la definizione di  $P_2$  proporzionale alla permeabilità e al modulo elastico drenato del tessuto [4.1.1.3]. I valori dei parametri  $P_2$  relativi al creep completo del primo livello di carico si discostano maggiormente dai restanti in maniera più evidente per i campioni analizzati con velocità di carico maggiori. Tale fenomeno è presumibilmente dovuto ad un diverso comportamento meccanico del campione che passa da una modalità indeformata prima dell'applicazione del primo livello di carico, ad una modalità deformata che viene mantenuta nei livelli di carico successivi.

Dall'analisi dei parametri  $P_2$  relativi ai tratti di inizio e fine creep emerge invece come il comportamento meccanico della cartilagine cambia all'interno della stessa curva di creep. I valori di  $P_2$  relativi al tratto di inizio creep risultano infatti un ordine di grandezza superiore ai corrispondenti valori di fine creep.

Per i campioni di cartilagine porcina i parametri  $P_2$  sono dipendenti dalle dimensioni della punta di indentazione. In particolare per la punta p25 i valori risultano inferiori ai corrispondenti parametri per la punta p400. Data la definizione del parametro

$$P_2 = \frac{3Kk^d}{\mu} \frac{1-v^d}{1+v^d}$$

dipendente da permeabilità e modulo elastico, è presumibile che le due

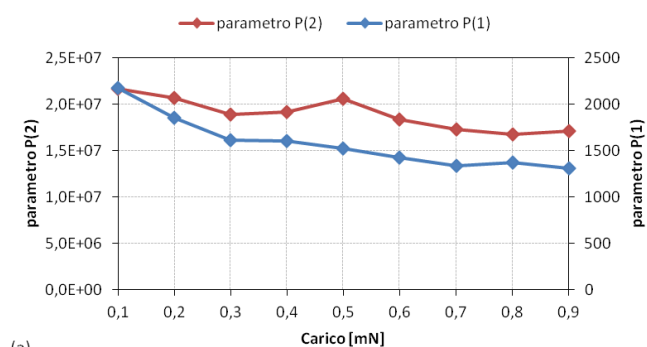
punte di indentazione misurano proprietà meccaniche diverse. In particolare poiché dall'analisi del modulo elastico [5.1.3] il valore drenato per punta p25 è superiore al valore per punta p400, la permeabilità per punta p400 risulterà superiore a quella per punta p25.

**Tabella 5.1 – Costanti temporali fitting esponenziale al variare del livello di carico, campioni cartilagine bovina 10,11,12 e campioni cartilagine porcina di controllo p400,p25.**

Campione 10				Campione 11				Campione 12			
t1 [sec]	t2 [sec]	t3 [sec]	R <sup>2</sup>	t1 [sec]	t2 [sec]	t3 [sec]	R <sup>2</sup>	t1 [sec]	t2 [sec]	t3 [sec]	R <sup>2</sup>
2,446	3,26E-06	34,296	0,9931	34,106	1,39E-04	2,093	0,9985	3,435	49,841	0,522	0,9995
9,92E-05	22,786	5,05E-06	0,9478	1,65E-06	22,605	8,19E-06	0,9560	1,002	6,211	83,730	0,9996
84,946	1,293	7,719	0,9998	61,201	0,879	5,967	0,9997	7,562	1,182	82,273	0,9997
6,25E-06	29,600	0,002	0,9633	6,87E-03	27,107	2,50E-06	0,9357	1,01E-06	29,319	7,12E-05	0,9578
2,50E-06	28,287	0,040	0,9468	1,132	70,880	7,263	0,9998	1,607	98,841	9,361	0,9999
148,454	1,980	11,001	0,9999	1,322	84,161	9,344	0,9999	88,326	1,631	9,232	0,9999
8,176	79,117	1,423	0,9999	2,50E-06	39,940	0,052	0,9551	112,980	1,826	11,891	0,9999
2,878	407,097	25,314	0,9998	4,232	63,328	1,83E-06	0,9995	1,847	114,996	11,335	0,9999
8,19E-07	78,037	6,177	0,9995	2,50E-06	35,227	9,22E-09	0,9856	1,834	106,256	10,809	0,9999
17,646	535,051	2,287	0,9999					1,980	115,850	11,735	0,9999

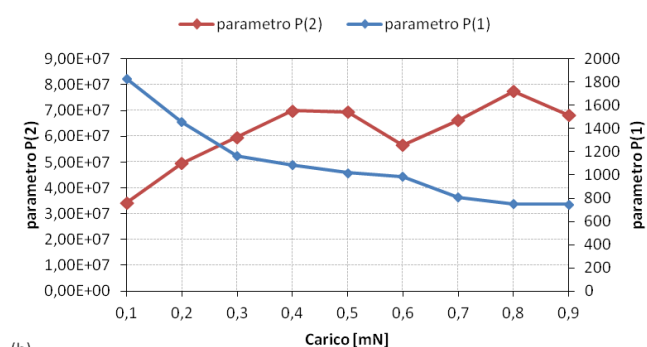
  

Campione di controllo p400				Campione di controllo p25			
t1 [sec]	t2 [sec]	t3 [sec]	R <sup>2</sup>	t1 [sec]	t2 [sec]	t3 [sec]	R <sup>2</sup>
2,559	69,410	0,0004	0,9976	0,484	4,737	2,25E-06	0,9739
7,21E-07	10,267	0,929	0,9686	3,46E-04	11,766	0,001	0,9487
1,005	4,851	42,680	0,9997	2,70E-04	2,673	36,169	0,9989
3,72E-05	17,480	1,56E-12	0,9671	6,280	0,798	70,195	0,9997
2,451	106,450	10,900	0,9999	62,180	5,782	0,812	0,9998
1,82E-06	4,976	46,260	0,9997	1,76E-06	52,845	3,594	0,9991
10,708	140,509	2,273	0,9999				
8,063	86,329	1,511	0,9999				
2,50E-06	45,583	0,021	0,8386				
7,163	81,625	1,666	0,9999				



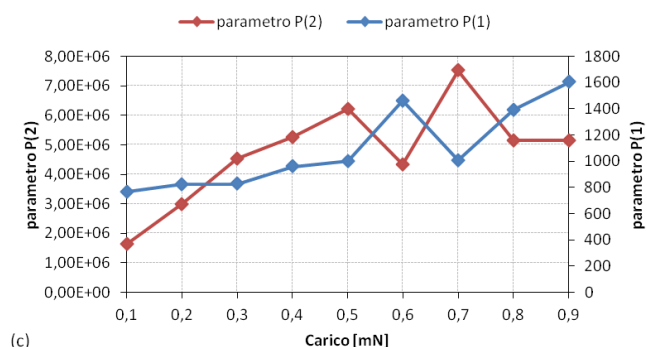
(a)

Parametri creep completo		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
2172	2,16E+07	0,812
1852	2,07E+07	0,858
1611	1,89E+07	0,899
1600	1,91E+07	0,921
1521	2,06E+07	0,948
1425	1,84E+07	0,959
1338	1,73E+07	0,978
1368	1,68E+07	0,984
1310	1,71E+07	0,986



(b)

Parametri inizio creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
1828	3,43E+07	0,952
1458	4,96E+07	0,985
1167	5,97E+07	0,995
1086	7,00E+07	0,998
1021	6,95E+07	0,998
988	5,67E+07	0,997
810	6,63E+07	0,995
751	7,75E+07	0,992
747	6,82E+07	0,992



(c)

Parametri fine creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
765	1,64E+06	0,995
824	2,99E+06	0,998
827	4,54E+06	0,996
960	5,25E+06	0,997
1002	6,21E+06	0,998
1464	4,33E+06	0,993
1007	7,52E+06	0,992
1391	5,14E+06	0,985
1604	5,16E+06	0,987

**Figura 5.9 - Parametri P(1) P(2) fitting poroelastico campioni cartilagine bovina, campione 10; parametri di fitting dell'intera curva di creep (a), parametri inizio creep (b), parametri fine creep (c).**

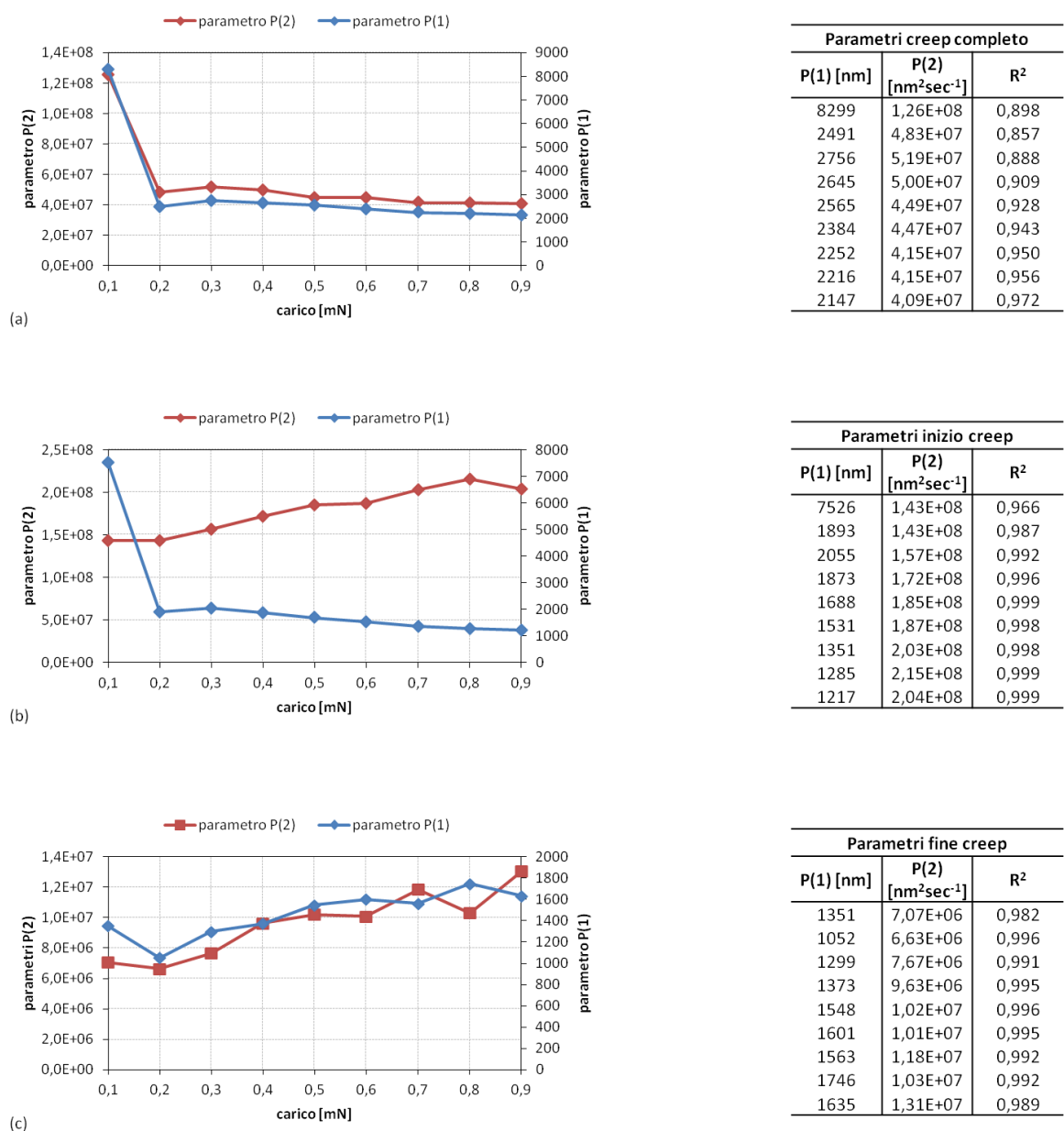
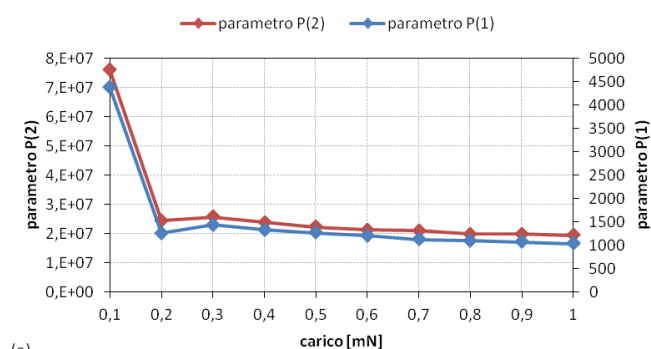


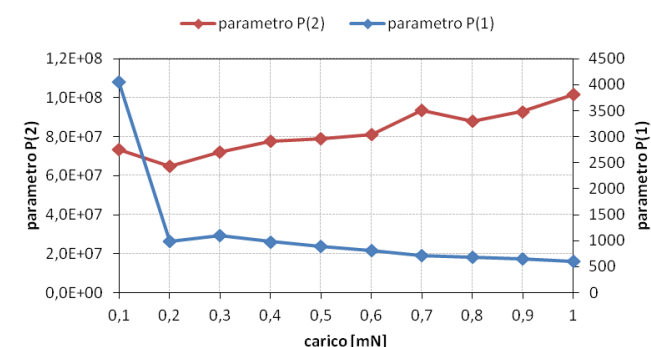
Figura 5.10 - Parametri P(1) P(2) fitting poroelastico campioni cartilagine bovina, campione 11; parametri di fitting dell'intera curva di creep (a), parametri inizio creep (b), parametri fine creep (c).





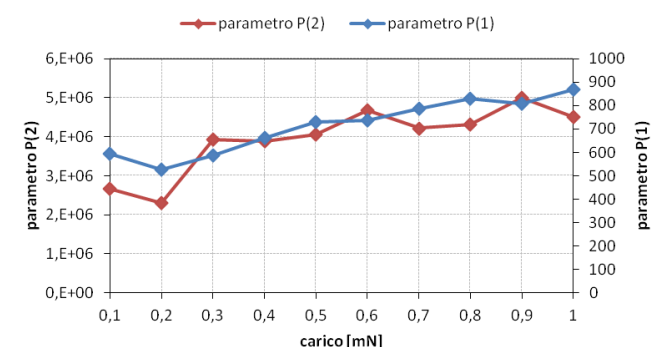
(a)

Parametri creep completo		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
4383	7,61E+07	0,893
1255	2,45E+07	0,840
1439	2,57E+07	0,878
1338	2,39E+07	0,893
1272	2,23E+07	0,917
1208	2,14E+07	0,933
1127	2,10E+07	0,938
1103	1,99E+07	0,948
1075	1,98E+07	0,955
1038	1,95E+07	0,961



(b)

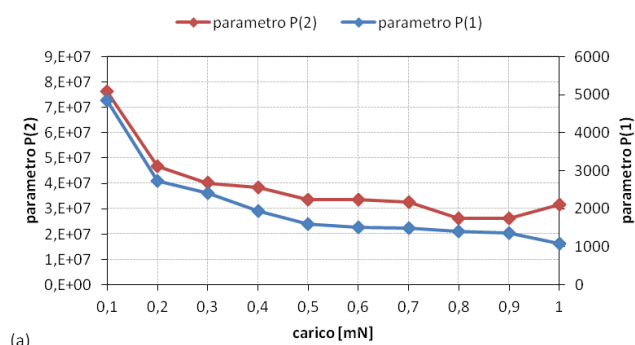
Parametri inizio creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
4048	7,3E+07	0,937
989	6,5E+07	0,987
1103	7,2E+07	0,994
980	7,8E+07	0,997
891	7,9E+07	0,999
815	8,1E+07	0,999
716	9,4E+07	0,999
690	8,8E+07	0,999
650	9,3E+07	0,998
596	1,0E+08	0,998



(c)

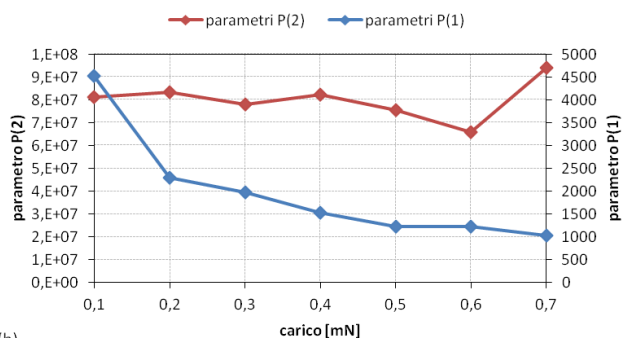
Parametri fine creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
594	2,7E+06	0,976
526	2,3E+06	0,996
589	3,9E+06	0,996
661	3,9E+06	0,996
730	4,1E+06	0,995
737	4,7E+06	0,996
787	4,2E+06	0,995
831	4,3E+06	0,995
809	5,0E+06	0,993
867	4,5E+06	0,993

Figura 5.11 - Parametri P(1) P(2) fitting poroelastico campioni cartilagine bovina, campione 12; parametri di fitting dell'intera curva di creep (a), parametri inizio creep (b), parametri fine creep (c).



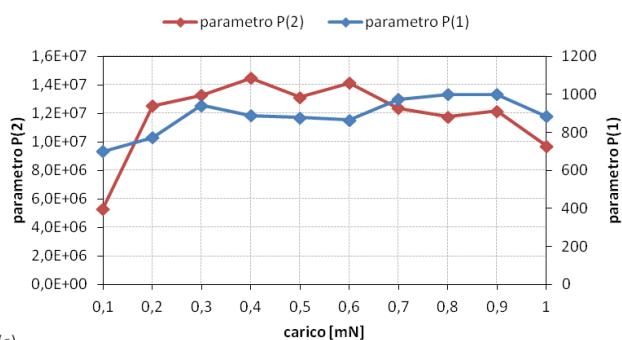
Parametri creep completo		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
4856	8,E+07	0,935
2724	5,E+07	0,948
2405	4,E+07	0,952
1947	4,E+07	0,961
1601	3,E+07	0,967
1507	3,E+07	0,974
1500	3,E+07	0,971
1404	3,E+07	0,981
1356	3,E+07	0,989
1094	3,E+07	0,978

(a)



Parametri inizio creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
4527	8,E+07	0,980
2303	8,E+07	0,996
1975	8,E+07	0,992
1533	8,E+07	0,986
1229	8,E+07	0,983
1231	7,E+07	0,985
1023	9,E+07	0,975

(b)



Parametri fine creep		
P(1) [nm]	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
700	5,3E+06	0,959
773	1,3E+07	0,995
942	1,3E+07	0,996
889	1,4E+07	0,993
878	1,3E+07	0,995
864	1,4E+07	0,997
974	1,2E+07	0,996
1000	1,2E+07	0,994
1000	1,2E+07	0,992
884	9,7E+06	0,997

(c)

**Figura 5.12 - Parametri P(1) P(2) fitting poroelastico campioni cartilagine porcina di controllo, p400; parametri di fitting dell'intera curva di creep (a), parametri inizio creep (b), parametri fine creep (c).**

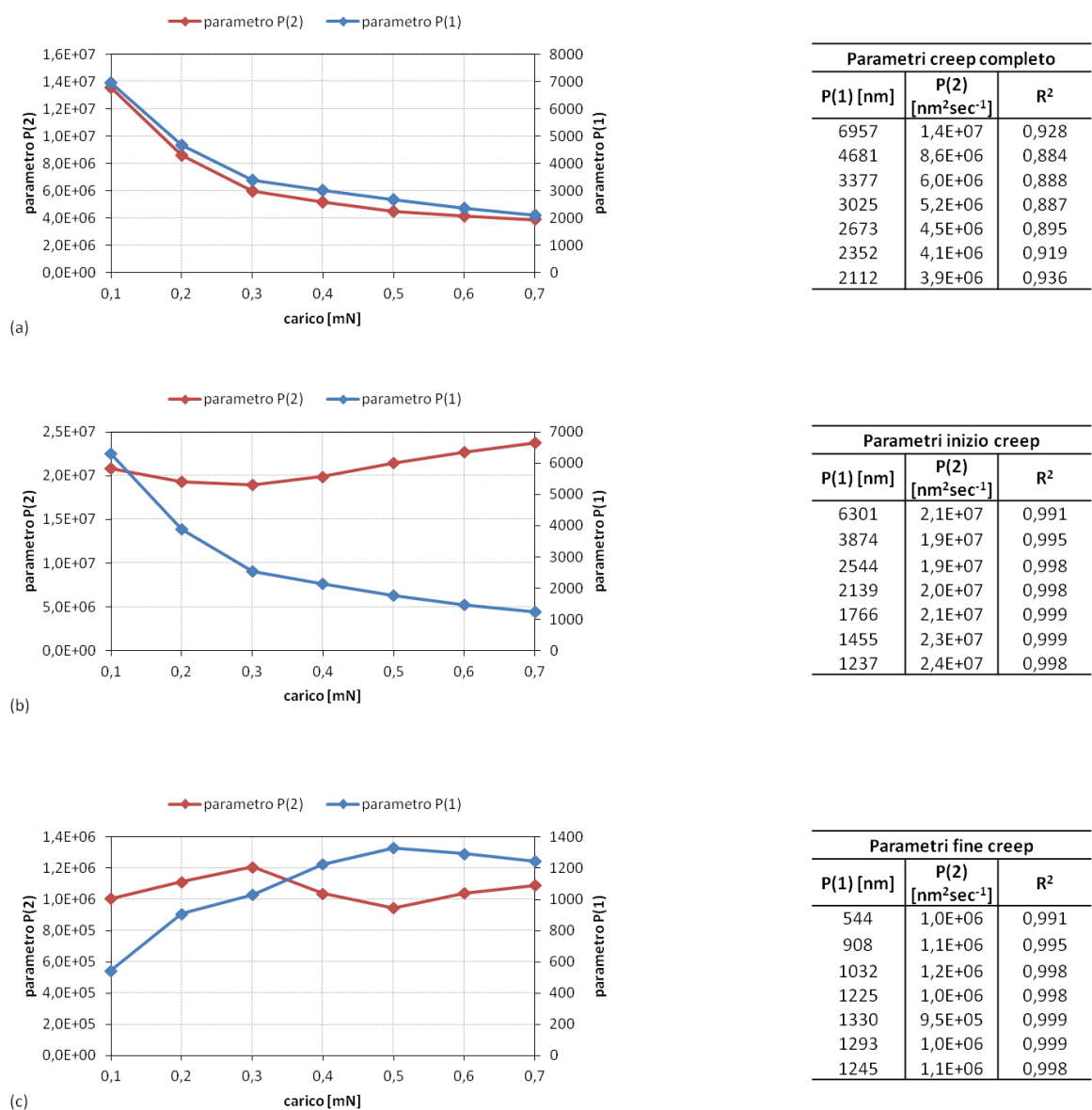


Figura 5.13 - Parametri P(1) P(2) fitting poroelastico campioni cartilagine porcina di controllo, p25; parametri di fitting dell'intera curva di creep (a), parametri inizio creep (b), parametri fine creep (c).

### 5.1.3 Comportamento tempo indipendente: casi limite drenato, non drenato

Nelle figure 5.14-5.16 vengono riportati i valori dei moduli di indentazione  $E'$  e i risultati delle interpolazioni dell'affondamenti drenato e non drenato con il modello di Hertz definito per una punta rigida in contatto con un materiale elastico [4.1.1.3]. Buoni risultati di interpolazione ( $R^2 > 0,96$ ) si ottengono per il comportamento drenato della cartilagine. In base alla definizione del modello di Hertz il modulo di indentazione può dunque essere

considerato costante in corrispondenza dello stato drenato della cartilagine. Per il comportamento non drenato la bontà dell'interpolazione col modello di Hertz è invece dipendente dalle dimensioni della punta di indentazione utilizzata. In particolare per punta p400 si ottengono risultati poco soddisfacenti ( $R^2 < 0,96$ ).

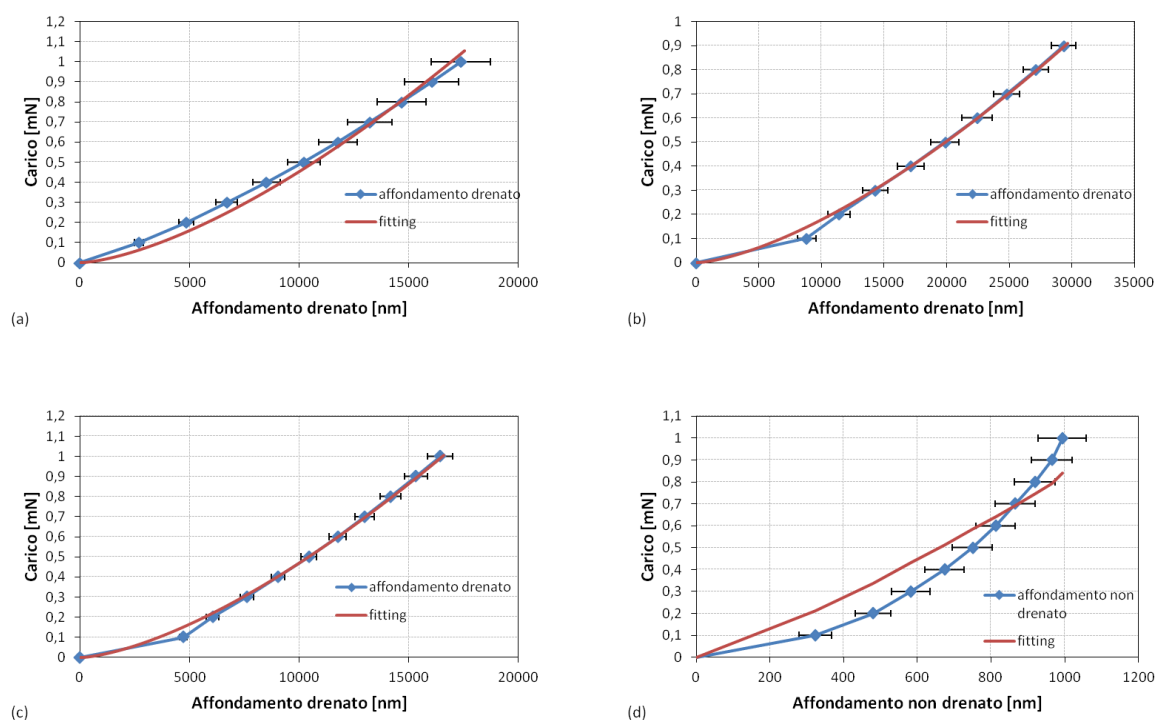
Per il campione di cartilagine bovina 10 il valore del modulo di indentazione non drenato risulta maggiore rispetto al corrispondente modulo drenato, con un rapporto  $E'_{\text{drenato}}/E'_{\text{non_drenato}} = 0,016$ . In accordo con Vena (Vena et al., 2010) è possibile correlare tale valore con un indice di anisotropia tessutale, in particolare un valore basso del rapporto drenato non drenato  $E'_{\text{drenato}}/E'_{\text{non_drenato}}$  caratterizza materiali con un elevato grado di anisotropia. Per i campioni 11 e 12 non è stato possibile ricavare il modulo di indentazione non drenato per problemi di campionamento della macchina durante le fasi di carico.

L'interpolazione dell'affondamento drenato risulta migliore per i campioni analizzati con velocità di carico maggiore. I valori di  $E'_{\text{drenato}}$  calcolati rientrano nel range di valori noti in letteratura (Julkunen et al., 2007; Korhonen et al., 2002) che ricavano valori per il modulo di Young pari a 550-480 KPa al variare delle dimensioni del raggio della punta di indentazione.

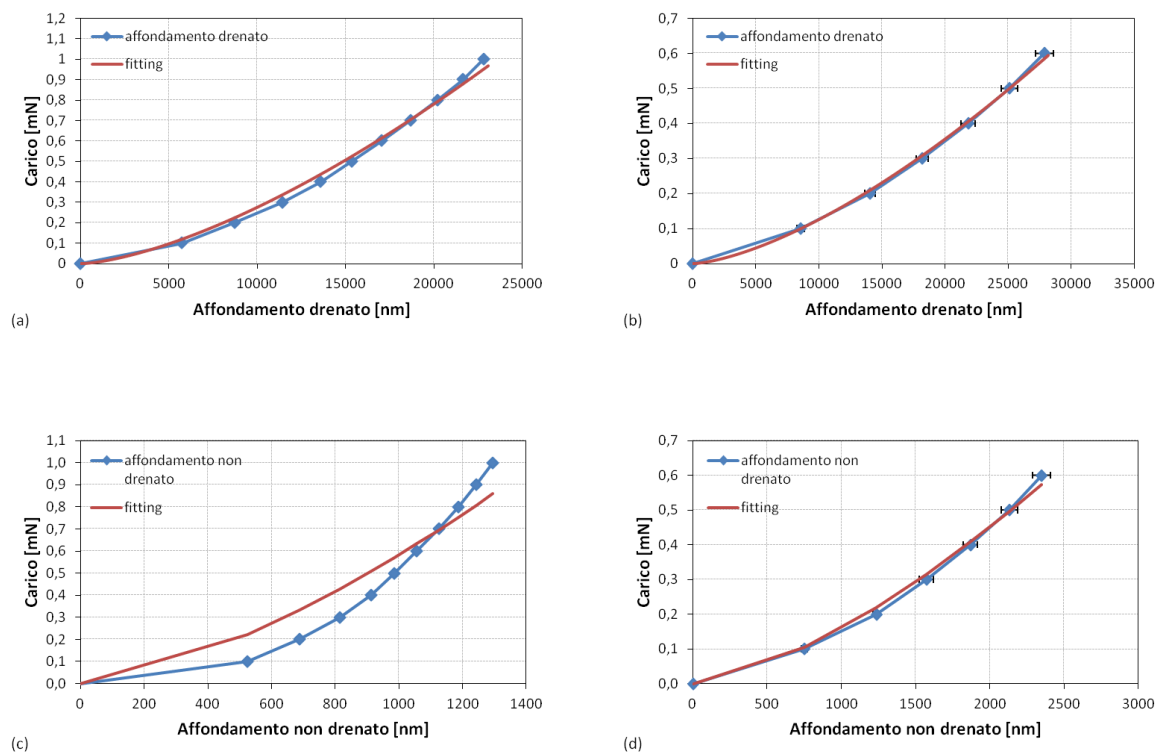
Per i campioni di cartilagine porcina i valori del modulo di indentazione non drenato non risultano dipendenti dalle dimensioni della punta utilizzata. Tale dipendenza è invece più evidente per il modulo di indentazione drenato. I valori dei moduli di indentazione drenato analizzati con punta 25 (597 e 531 KPa) risultano superiori ai corrispondenti valori calcolati con punta 400 (328 e 277 KPa). I risultati sono in accordo con quanto già osservato da Chizhik (Chizhik et al. 2010) in cui però i valori di modulo elastico risultano maggiori (0,7-0,6 MPa per punta da 350  $\mu\text{m}$ , 1,8-0,5 MPa per punta da 30 nm) rispetto a quelli ottenuti nel presente lavoro a causa delle diverse dimensioni delle punte utilizzate. Gli effetti delle dimensioni della punta di indentazione sono stati investigati da Khoronen (Khoronen et al, 2002) per campioni di cartilagine bovina che hanno verificato come i valori del modulo di Young diminuiscano per punte di indentazione di dimensioni maggiori.

**Tabella 5.2 – Moduli di indentazione drenato  $E'_{\text{drenato}}$  e non drenato  $E'_{\text{non\_drenato}}$  con relativi coefficienti di determinazione  $R^2$ .**

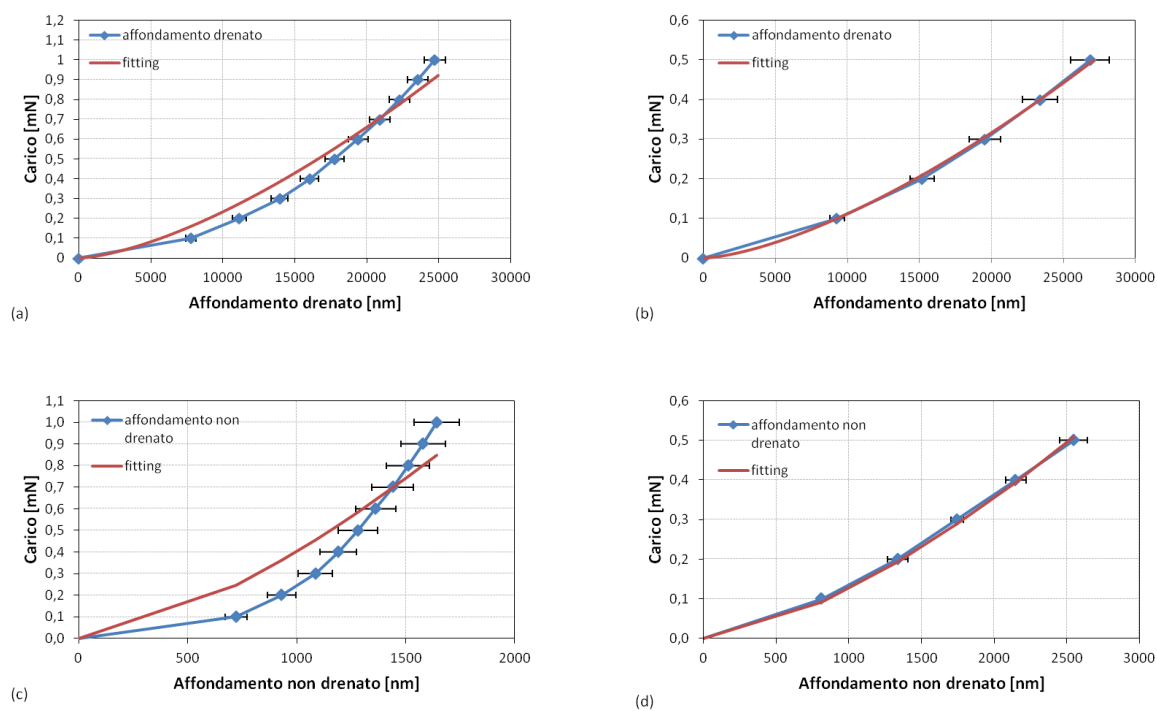
	Campione	Punta indentazione [ $\mu\text{m}$ ]	$E'_{\text{drenato}}$ [MPa]	$R^2_{\text{drenato}}$	$E'_{\text{non drenato}}$ [MPa]	$R^2_{\text{non drenato}}$	$\frac{E'_{\text{drenato}}}{E'_{\text{non\_drenato}}}$
<b>Cartilagine bovina</b>	10	400	0,538	0,985	33	0,948	0,016
	11	400	0,211	0,993	-	-	-
	12	400	0,558	0,995	-	-	-
<b>Cartilagine porcina</b>	di controllo	400	0,328	0,977	21	0,911	0,016
		25	0,597	0,995	23	0,995	0,026
	Ing. solo scaffold	400	0,277	0,965	15	0,880	0,018
		25	0,531	0,999	18	0,998	0,030



**Figura 5.14 – Fitting elastico affondamento drenato drenato cartilagine bovina, campione 10 (a), campione 11 (b), campione 12 (c), fitting elastico affondamento non drenato campione 10 (d).**



**Figura 5.15 – Fitting elastico affondamento drenato cartilagine porcina di controllo p400 (a), p25 (b); fitting elastico affondamento non drenato p400 (c), p25 (d).**



**Figura 5.16 - Fitting elastico affondamento drenato cartilagine porcina ingegnerizzata p400 (a), p25 (b); fitting elastico affondamento non drenato p400 (c), p25 (d).**

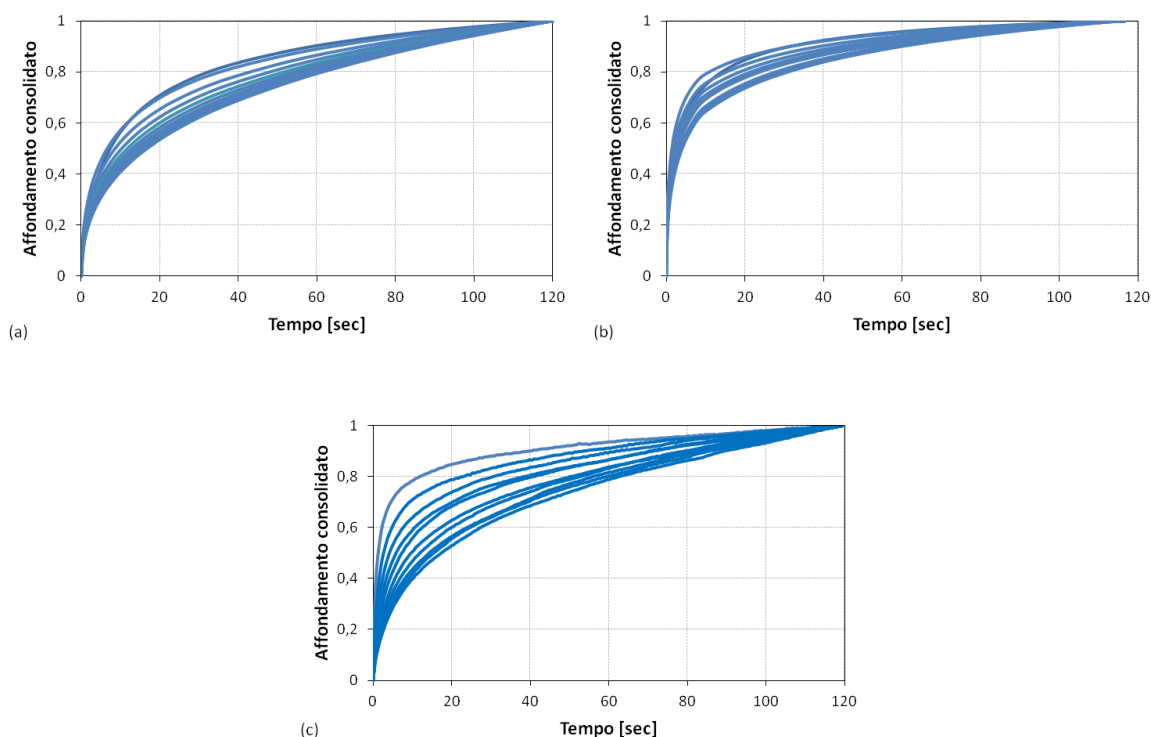
## 5.2 Risultati prove numeriche e confronto con risultati prove sperimentali

I risultati delle prove numeriche sono analizzati su scala temporale normale e normalizzata per il fattore  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  e confrontati con i risultati sperimentali relativi al campione 10 di cartilagine bovina, analizzato con le stesse modalità di carico delle prove numeriche. Le prove numeriche di creep multiload sono condotte facendo variare la durata della fase di hold rispettivamente pari a 10 sec e 40 sec. Per permettere un confronto con i dati sperimentali le curve di creep numeriche sono riportate su scala temporale pari a 120 sec. Data la definizione della legge di Darcy una variazione del fattore temporale implica una variazione della permeabilità secondo la relazione  $Kt = K^* t^*$ . I risultati delle prove numeriche su scala temporale di durata 120 sec assumono quindi diversi valori di permeabilità per il materiale, pari rispettivamente a  $K^{10} = K/12$  e  $K^{40} = K/3$ .

### 5.2.1 Curve creep

#### 5.2.1.1 Curve creep affondamento consolidato

In figura 5.17 i valori di affondamento consolidato sono riportati su scala temporale di durata 120 sec. Le curve relative ai diversi livelli di carico non si sovrappongono al variare del carico applicato in analogia con il comportamento delle curve sperimentali. La rapidità delle curve di creep numeriche di consolidazione è dipendente dalla durata della fase di hold fissata per la prova numerica. I valori di affondamento consolidato per tempi di hold pari a 40 sec raggiungono una condizione di maggiore equilibrio per lo stato drenato rispetto ai corrispondenti valori osservati per tempi di hold di 10 sec.



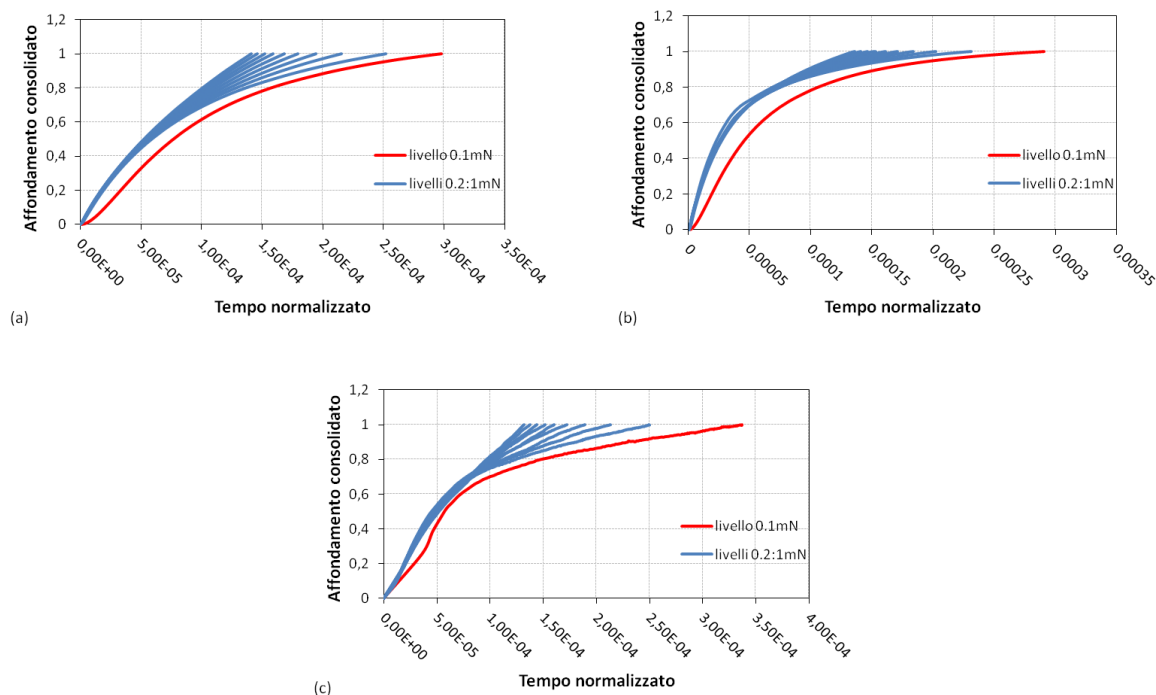
**Figura 5.17 - Affondamento consolidato su scala temporale prove numeriche  $K^{10}$  (a),  $K^{40}$  (b), prova sperimentale campione 10 cartilagine bovina (c).**

### 5.2.1.2 Curve creep affondamento consolidato su scala temporale normalizzata

Le curve relative ai valori di affondamento consolidato su scala temporale normalizzata si sovrappongono ad eccezione della curva relativa al primo livello di carico che si discosta dalle restanti curve come osservato nei risultati delle prove sperimentali (figura 5.18). Il comportamento della curva del primo livello di carico è quindi indipendente dalla natura anisotropa del tessuto in quanto è analogo sia nel caso sperimentale in cui il materiale si può considerare anisotropo, sia nel caso numerico in cui il materiale è isotropo per assunzione del modello. Il fenomeno è quindi legato al cambiamento di conformazione che il materiale subisce in corrispondenza del primo livello di carico, in cui passa da uno stato indeformato prima dell'applicazione del carico, ad uno deformato dopo l'applicazione del carico e che viene mantenuto nei livelli di carico successivi.

Le curve dei livelli di carico da 0.2 a 1mN divergono più rapidamente rispetto al caso sperimentale a causa della breve durata della fase di hold pari a 10 sec. In prove numeriche condotte con tempi di creep pari a 40 sec, le curve di creep divergono più lentamente in quanto raggiungono un livello di consolidamento maggiore.





**Figura 5.18 - Affondamento consolidato su scala temporale normalizzata, prova numeric creep 10 sec(a), creep 40 sec (b), prova sperimentale campione 10 cartilagine bovina (c).**

### 5.2.2 Comportamento tempo dipendente: risultati fitting poroelastico curve di creep

In analogia alle curve sperimentali il comportamento tempo dipendente delle curve di creep numeriche è caratterizzate da tre costanti temporali che permettono di individuare un tratto di inizio e fine creep.

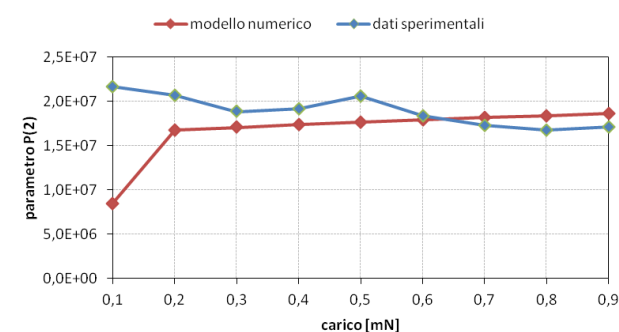
In figura 5.19-5.20 sono riportati i valori dei parametri  $P_2$  ottenuti dall'interpolazione poroelastica delle curve di creep relative alle prove condotte con permeabilità  $K^{10}$  e  $K^{40}$ .

I valori dei parametri  $P_2$  per le curve di creep con permeabilità  $K^{10}$  risultano minori ai corrispondenti valori per  $K^{40}$ , in accordo con la definizione di  $P_2$  proporzionale al valore di permeabilità del materiale [4.1.1.3].

I valori dei parametri  $P_2$  con permeabilità  $K^{10}$  relativi alle curve di creep completo e fine creep approssimano i parametri  $P_2$  relativi ai dati sperimentali di cartilagine bovina campione 10. I parametri con permeabilità  $K^{40}$  risultano superiori ai parametri sperimentali.

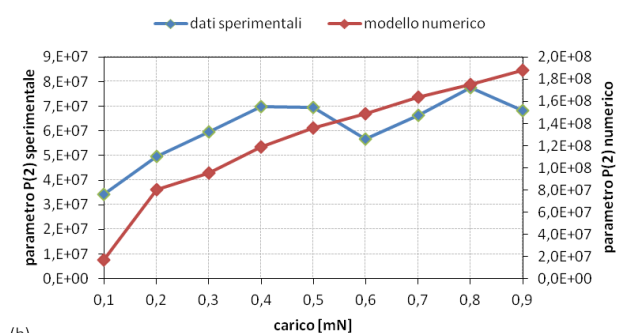
Per il tratto di inizio delle curve di creep, i valori dei parametri  $P_2$  con permeabilità  $K^{10}$  e

$K^{40}$  risultano superiori ai corrispondenti valori relativi alle prove sperimentali.



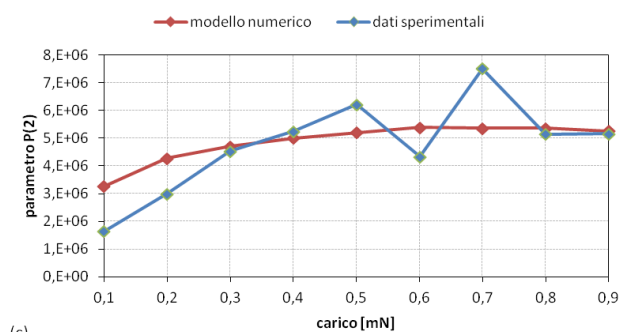
(a)

Modello numerico		Dati sperimentali	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
8,46E+06	0,994	2,16E+07	0,812
1,68E+07	0,985	2,07E+07	0,858
1,71E+07	0,986	1,89E+07	0,899
1,74E+07	0,987	1,91E+07	0,921
1,76E+07	0,989	2,06E+07	0,948
1,79E+07	0,990	1,84E+07	0,959
1,82E+07	0,990	1,73E+07	0,978
1,84E+07	0,991	1,68E+07	0,984
1,86E+07	0,992	1,71E+07	0,986



(b)

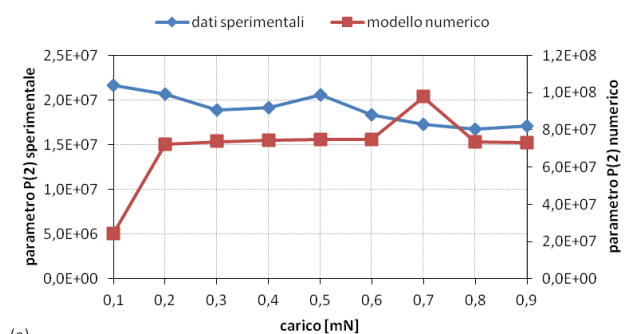
Modello numerico inizio creep		Dati sperimentali inizio creep	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
1,71E+07	0,965756	3,43E+07	0,952
8,01E+07	0,998212	4,96E+07	0,985
9,54E+07	0,997926	5,97E+07	0,995
1,19E+08	0,998517	7,00E+07	0,998
1,36E+08	0,998463	6,95E+07	0,998
1,49E+08	0,998397	5,67E+07	0,997
1,64E+08	0,998575	6,63E+07	0,995
1,75E+08	0,998488	7,75E+07	0,992
1,88E+08	0,99868	6,82E+07	0,992



(c)

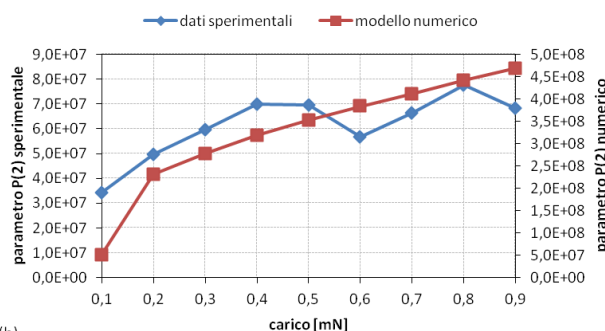
Modello numerico fine creep		Dati sperimentali fine creep	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
3,26E+06	0,992988	1,64E+06	0,995
4,28E+06	0,995632	2,99E+06	0,998
4,71E+06	0,99639	4,54E+06	0,996
5,01E+06	0,996073	5,25E+06	0,997
5,21E+06	0,995524	6,21E+06	0,998
5,39E+06	0,994861	4,33E+06	0,993
5,37E+06	0,994122	7,52E+06	0,992
5,37E+06	0,993422	5,14E+06	0,985
5,27E+06	0,992755	5,16E+06	0,987

Figura 5.19 - Parametri  $P_2$  fitting poroelastico curve creep numeriche permeabilità  $K^{10}$  e parametri  $P_2$  curve sperimentali campione 10 cartilagine bovina, parametri creep completo (a), inizio creep (b), fine creep (c).



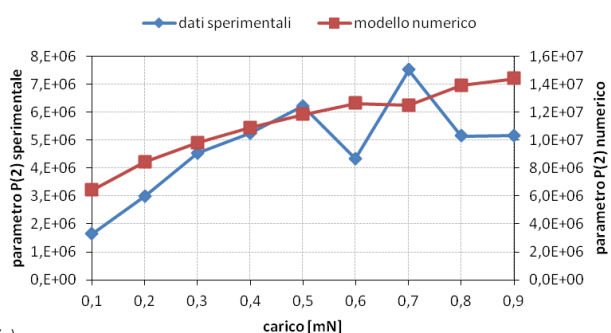
(a)

Modello numerico		Dati sperimentali	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
2,42E+07	0,991031	2,16E+07	0,812
7,23E+07	0,980605	2,07E+07	0,858
7,37E+07	0,979058	1,89E+07	0,899
7,45E+07	0,97798	1,91E+07	0,921
7,47E+07	0,977246	2,06E+07	0,948
7,49E+07	0,976821	1,84E+07	0,959
9,77E+07	0,976212	1,73E+07	0,978
7,36E+07	0,976134	1,68E+07	0,984
7,31E+07	0,975915	1,71E+07	0,986



(b)

Modello numerico inizio creep		Dati sperimentali inizio creep	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
5,05E+07	0,991031	3,43E+07	0,952
2,32E+08	0,980605	4,96E+07	0,985
2,78E+08	0,979058	5,97E+07	0,995
3,19E+08	0,97798	7,00E+07	0,998
3,53E+08	0,977246	6,95E+07	0,998
3,84E+08	0,976821	5,67E+07	0,997
4,12E+08	0,976212	6,63E+07	0,995
4,42E+08	0,976134	7,75E+07	0,992
4,69E+08	0,975915	6,82E+07	0,992



(c)

Modello numerico fine creep		Dati sperimentali fine creep	
P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	P(2) [nm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>
6,4E+06	0,991031	1,64E+06	0,995
8,4E+06	0,980605	2,99E+06	0,998
9,8E+06	0,979058	4,54E+06	0,996
1,1E+07	0,97798	5,25E+06	0,997
1,2E+07	0,977246	6,21E+06	0,998
1,3E+07	0,976821	4,33E+06	0,993
1,3E+07	0,976212	7,52E+06	0,992
1,4E+07	0,976134	5,14E+06	0,985
1,4E+07	0,975915	5,16E+06	0,987

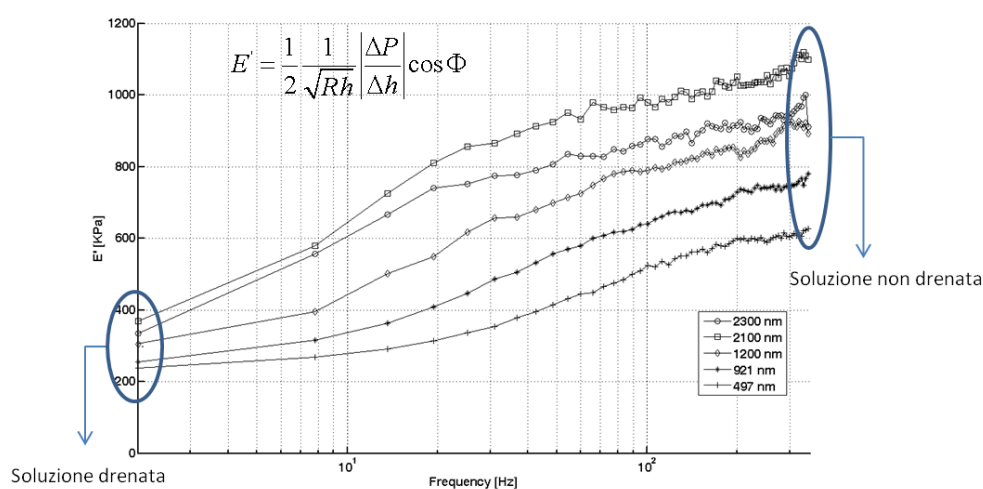
**Figura 5.20 – Parametri  $P_2$  fitting poroelastico curve creep numeriche permeabilità  $K^{40}$  e parametri  $P_2$  curve sperimentali campione 10 cartilagine bovina, parametri creep completo (a), inizio creep (b), fine creep (c).**

### 5.3 Confronto risultati prove sperimentali dominio temporale-dominio delle frequenze

I risultati delle prove sperimentali ottenute nel dominio temporale per i campioni di cartilagine bovina vengono confrontati con i risultati ottenuti nel dominio delle frequenze tramite prove di AFM eseguite anche esse su campioni di cartilagine bovina. Nel caso di AFM vengono calcolati i valori del modulo di indentazione elastico e viscoso in accordo

con le relazioni definite in [4.1.2.3]. Di questi vengono presi in considerazione i valori ottenuti per basse frequenze di prova in cui il campione viene sollecitato in maniera quasi statica in analogia con le prove di indentazione statiche condotte nel presente lavoro.

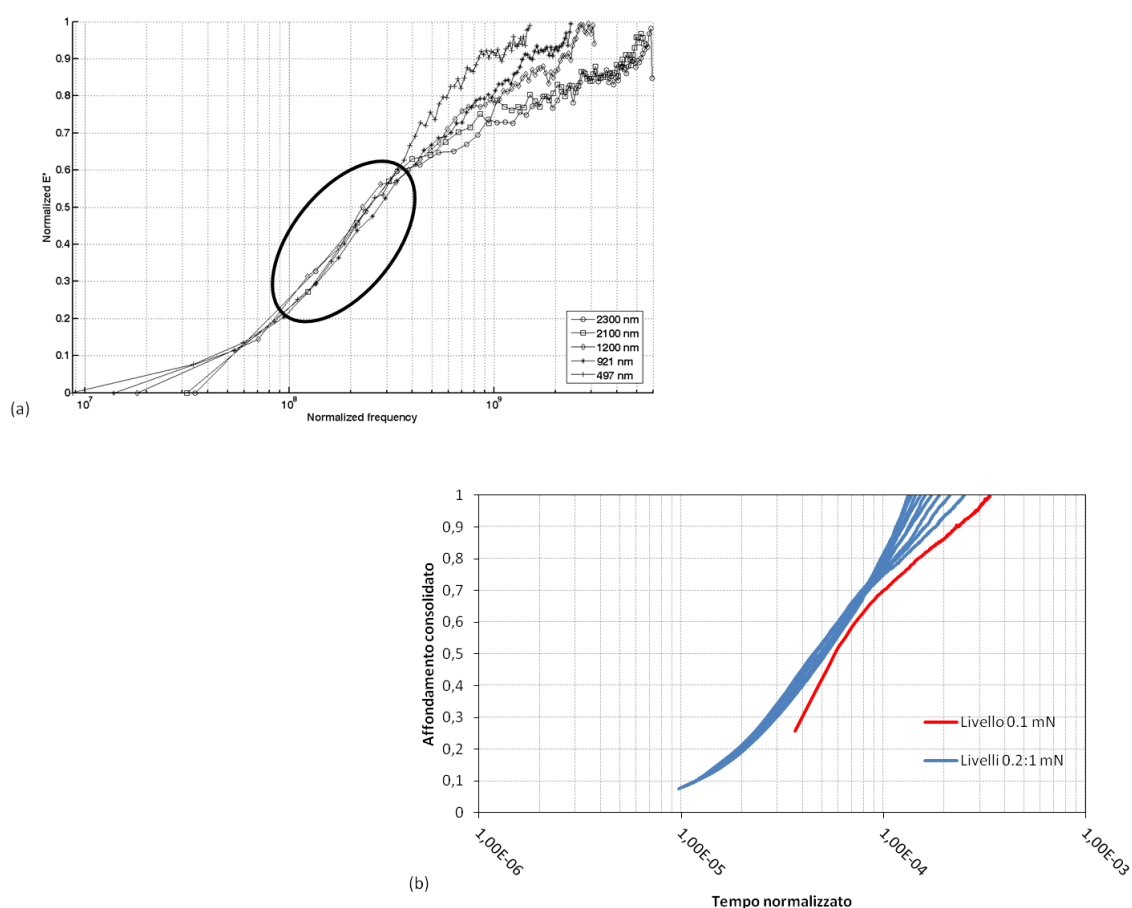
In figura 5.21 sono illustrati i valori della parte reale dei moduli di indentazione calcolati per diversi livelli di affondamento della punta, dalla soluzione non drenata per elevate frequenze di oscillazione della punta, alla soluzione drenata per frequenze di oscillazione pari a zero. In corrispondenza della soluzione drenata si ottengono valori che variano da 200 a 400 KPa, confrontabili con i valori del modulo di indentazione drenato calcolati nelle prove di indentazione nel dominio temporale (da 211 a 558 KPa). Per il modulo di indentazione non drenato nel caso statico si ottiene un valore pari a 33 MPa, mentre nel caso dinamico i valori variano da 600 a 1200 KPa. I valori del rapporto drenato su non drenato risultano rispettivamente 0.35-0.4 e 0.0156 per il caso dinamico e statico, indicando quindi una maggiore anisotropia del tessuto rilevata tramite le prove di indentazione statica (Vena et al., 2010).



**Figura 5.21 –Moduli di indentazione cartilagine bovina prove AFM scala logaritmica (a), prove indentazione (b).**

Il modulo di indentazione normalizzato, che richiama il grado di consolidazione dell'affondamento definito nel dominio temporale, viene analizzato nel dominio delle frequenze normalizzato  $f^* = f \frac{Ru(t)}{c}$  con  $c$  proporzionale alla permeabilità e al modulo elastico, e che viene mantenuto costante al variare delle frequenze analizzate. In analogia

al caso statico le curve relative ai diversi livelli di affondamento si sovrappongono nel passaggio da stato non drenato a quello drenato per poi divergere nel tratto finale della soluzione drenata per il mancato raggiungimento dell'equilibrio al termine della prova (figura 5.22). Le oscillazioni del tratto iniziale in corrispondenza della soluzione non drenata sono dovute agli effetti inerziali della punta e alle forze di trascinamento nel campione. Per il caso statico il comportamento della curva relativa al primo livello di carico è dovuto a quanto già evidenziato nei risultati sperimentali e numerici [5.1.1.2], ovvero al diverso comportamento meccanico della cartilagine in corrispondenza del primo livello di carico in una prova di creep multiload.



**Figura 5.22 – Moduli di indentazione normalizzato su scala delle frequenze normalizzata (a), affondamento normalizzato su scala temporale normalizzata (b), scala logaritmica.**

# Capitolo 6

## *Discussioni e conclusioni*

Nel presente lavoro è stata utilizzata la tecnica di indentazione a livello micro e sub-micro come strumento per l'analisi e l'estrapolazione delle proprietà meccaniche della cartilagine articolare. La risposta temporale della cartilagine articolare è stata investigata tramite l'applicazione di un modello di poroelasticità lineare formulato per un problema di indentazione di un materiale poroelastico.

Dai risultati ottenuti nelle prove sperimentali è emerso come il comportamento temporale delle curve di creep sia dipendente dal livello di carico e dalle dimensioni della punta di indentazione. Questa dipendenza viene risolta (le curve di creep si sovrappongono al variare del carico e della punta, figura 6.1-3) riportando le curve di creep su scala temporale normalizzata e adimensionale tramite la definizione di un nuovo parametro

temporale  $\tau = \sqrt{\frac{P_2 t}{Ru(t)}}$  con  $P_2$  parametro ottenuto dall'interpolazione dei dati

sperimentali con la soluzione poroelastica [4.1.1.3]. Questo comportamento è in linea con una risposta puramente poroelastica della cartilagine, come può essere dedotto dalla soluzione analitica di un problema di compressione confinata per un materiale poroelastico [3.2.1], nella quale la risposta temporale dell'affondamento  $u(t)$  è dipendente dal rapporto

$\sqrt{\frac{ct}{Ru(t)}}$  con  $c$  coefficiente coincidente con il parametro  $P_2$ . Data la definizione del

parametro  $P_2$  [4.1.1.3] è possibile ricavare informazioni riguardanti le proprietà meccaniche drenate della cartilagine (ovvero le proprietà del solo scheletro solido

misurabili al termine della fase di transitorio dopo la totale dissipazione della pressione in eccesso del fluido). In particolare poiché il valore del modulo di indentazione drenato rimane costante al variare del livello di carico [5.1.3] i parametri  $P_2$  forniscono indicazioni circa l'andamento della permeabilità, che è risultato decrescente all'aumentare del livello di carico in accordo con i modelli di permeabilità dipendenti dal livello di deformazione della cartilagine (Mow et al, 1984; Holmes et al., 1985). Tale comportamento è risultato particolarmente evidente per i campioni di cartilagine porcina di controllo la cui risposta di creep su scala temporale normalizzata senza parametri  $P_2$  è dipendente dal livello di carico applicato (figura 6.2).

Tramite il software numerico Abaqus 6.8-EF1 (Simulia, Providence, RI, USA) è stata verificata la validità del modello poroelastico e della soluzione analitica poroelastica [3.2.1] per la cartilagine articolare in prove di creep di indentazione, tramite confronto con i risultati relativi alle prove sperimentali. Dai parametri  $P_2$  ricavati tramite interpolazione dei risultati numerici con la soluzione poroelastica è possibile estrarre un valore di permeabilità media (pari alla permeabilità di riferimento del modello numerico) per i campioni analizzati sperimentalmente, i cui valori di  $P_2$  siano ben approssimati dai corrispondenti parametri relativi alle prove numeriche. Nel presente lavoro il campione 10 di cartilagine bovina viene assunto come riferimento sperimentale e le prove numeriche vengono eseguite definendo un modulo elastico in accordo con i risultati ottenuti in [5.1.3] e facendo variare la permeabilità del materiale. Dal confronto dei parametri  $P_2$  numerici e sperimentali [5.2.2] viene ricavato un valore di permeabilità media per il campione di cartilagine bovina pari a  $K = K^{10} = 8,3 * 10^{-3} \frac{\mu m}{sec} = 8,3 * 10^{-16} m^2$  superiore ai valori noti in

letteratura per prove di compressione confinata  $10^{-17} - 10^{-19} m^2$  (Fergal et al., 2007).

Tale discrepanza può essere giustificata dal fatto che, tradizionalmente, le prove di permeabilità di una cartilagine articolare vengono condotte in condizioni di compressione confinata in cui il fluido fluisce secondo percorsi sostanzialmente perpendicolari rispetto alla superficie articolare. Nella prova di indentazione, il fluido fluisce in modo predominante secondo una direzione radiale (ovvero parallelo alla superficie). Si può quindi ritenere che la misura ottenuta dalla nanoindentazione e quella ottenuta dalla

compressione confinata siano relative a permeabilità in direzioni differenti. È infatti attendibile, un risultato di permeabilità superiore in direzione parallela alla superficie articolare, rispetto a quella misurabile in direzione ad essa perpendicolare.

La risposta meccanica indipendente dal tempo della cartilagine è stata investigata tramite applicazione del modello elastico di Hertz per l'interpolazione dell'affondamento drenato e non drenato. Il modello analitico è risultato soddisfacente per il comportamento drenato della cartilagine e in accordo con Dintwa et al. (Dintwa et al., 2006) tende a divergere dai dati sperimentali per livelli di carico e affondamento crescenti (figura 5.14-16). Per velocità di carico elevate ( $10 \text{ mNsec}^{-1}$ ) il modello di Hertz si discosta dai valori di affondamento drenato relativi al primo livello di carico indicando un diverso comportamento meccanico della cartilagine in corrispondenza del primo livello di carico. Tali risultati sono in accordo con i parametri  $P_2$  ottenuti dall'interpolazione poroelastica, in cui il parametro relativo al primo livello di carico si discosta dai successivi (figura 6.1f). L'interpolazione dei dati sperimentali è risultata migliore nel caso di utilizzo di punta di indentazione di dimensioni  $25 \mu\text{m}$  rispetto alla punta di  $400 \mu\text{m}$  mentre il modello elastico di Hertz è definito per basse deformazioni, con il raggio di contatto  $a$  piccolo rispetto al raggio della punta di indentazione ( $a = \sqrt{Ru(t)} < R$ ). Tale comportamento osservato per i campioni analizzati può essere giustificato da una non perfetta sfericità della punta di dimensioni pari a  $400 \mu\text{m}$  o da un'irregolarità della superficie del campione.

Per il comportamento non drenato della cartilagine la migliore interpolazione dei dati sperimentali per punte di  $25 \mu\text{m}$  è ancora più evidente rispetto al caso drenato. Dal momento che la risposta elastica non drenata è determinata dalla rapidità di applicazione del carico in modo da prevenire una fuoriuscita di fluido, i bassi risultati in termini di interpolazione per punte da  $400 \mu\text{m}$  possono essere dovuti a deformazioni di creep durante la fase di carico stessa che determinano una parziale fuoriuscita di fluido dalla cartilagine.

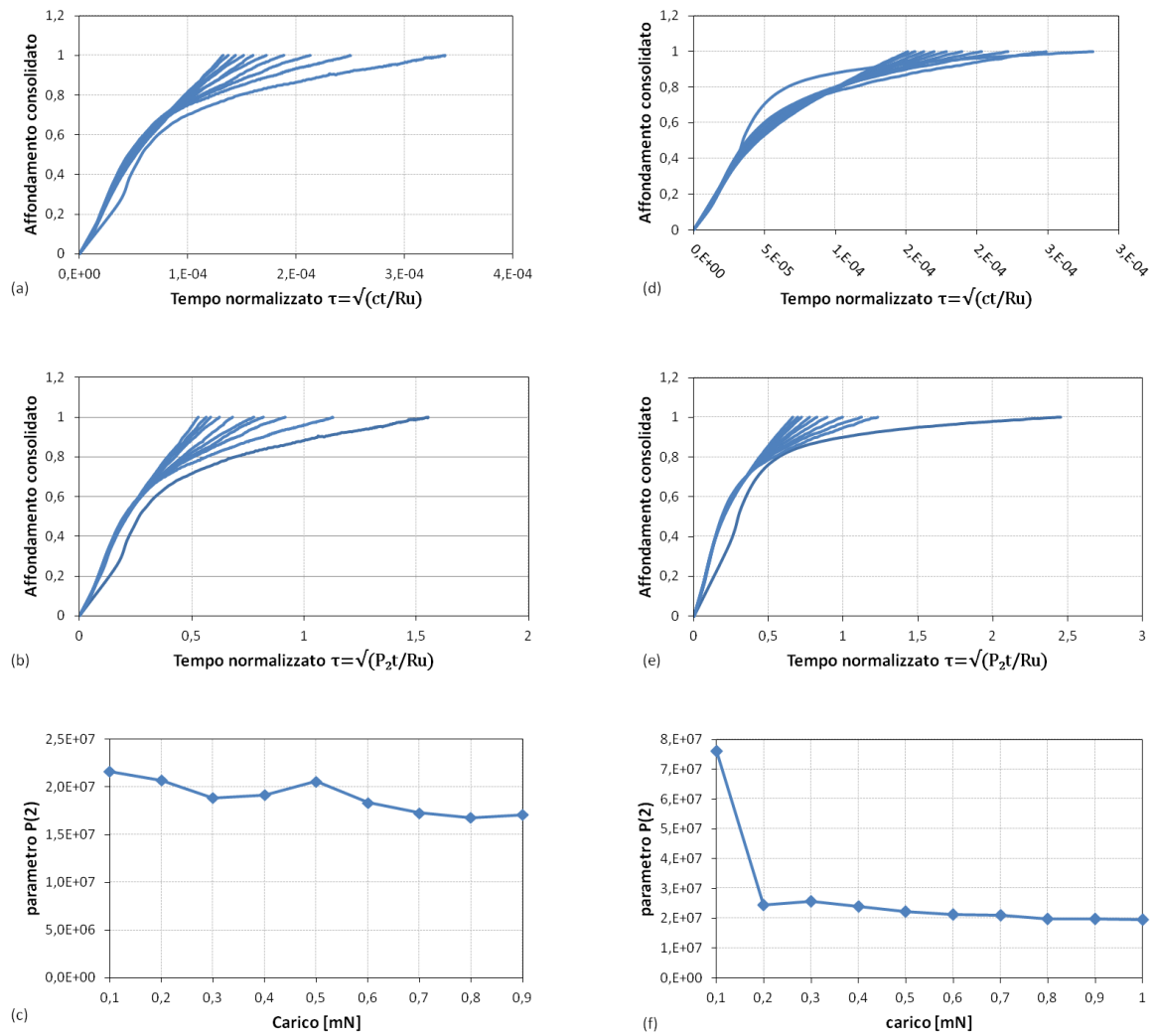
I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno condotto ad una principale conclusione: se la poroelasticità è il principale meccanismo dissipativo per il comportamento dipendente dal tempo della cartilagine sottoposta a prove di indentazione, i risultati riportati su scala temporale normalizzata saranno indipendenti dai parametri geometrici della prova. Di conseguenza se ulteriori dipendenze dimensionali sono osservate nel dominio temporale



normalizzato, ulteriori meccanismi dissipativi entrano in gioco e la viscoelasticità intrinseca delle componenti solide della matrice viene probabilmente coinvolta.

Infine i risultati sperimentali hanno suggerito un comportamento meccanico presumibilmente diverso per i tratti di inizio e fine creep. La soluzione analitica utilizzata nel presente lavoro richiede quindi ulteriori sviluppi per un'affidabile applicazione per la caratterizzazione meccanica della cartilagine, come l'implementazione di una permeabilità funzione della deformazione imposta. Tale assunzione, già ampiamente discussa in letteratura, consentirebbe una migliore interpretazione dei risultati sperimentali in cui il parametro  $P_2$  risulti non costante al variare della forza applicata sul campione.

Si può quindi concludere che in questo lavoro di tesi è stato introdotto una nuova metodologia interpretativa del comportamento poroelastico della cartilagine, grazie alla versatilità della prova meccanica di nanoindentazione sferica, che consente di effettuare prove caratterizzate da dimensioni geometriche differenti. Tale metodologia di prova, consente quindi, da un lato di mettere in evidenza il comportamento viscoelastico o poroelastico di un tessuto biologico complesso come la cartilagine, e dall'altro, di determinare, grazie all'ausilio di una modellazione teorica e numerica i valori numerici di alcuni parametri costitutivi caratteristici di ciascuna scala geometrica. In questo lavoro ci si è concentrati sulla permeabilità e sul modulo di indentazione. Quest'ultimo in particolare, è un parametro costitutivo peculiare per la prova di indentazione che, nel caso di materiale a comportamento isotropo, instaura una semplice legame tra il modulo di Young ed il modulo di Poisson. Ovviamente gli strati superficiali della cartilagine articolare presentano una caratteristica anisotropa marcata che non è stata specificatamente indagata attraverso i metodi di interpretazione utilizzati in questa tesi, pur non influenzando i risultati e le conclusioni ottenute in questo lavoro.



**Figura 6.1 – Affondamento consolidato su scala temporale normalizzata senza parametri  $P_2$   $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  (a,d), con parametri  $P_2$   $\tau = \sqrt{P_2t/Ru(t)}$  (b,e) cartilagine bovina campione 10 (a,b) campione 12 (d,e). In entrambi i casi le curve relative a diversi livelli di carico si sovrappongono e la dipendenza dei parametri  $P_2$  dal livello di carico è bassa (c).**

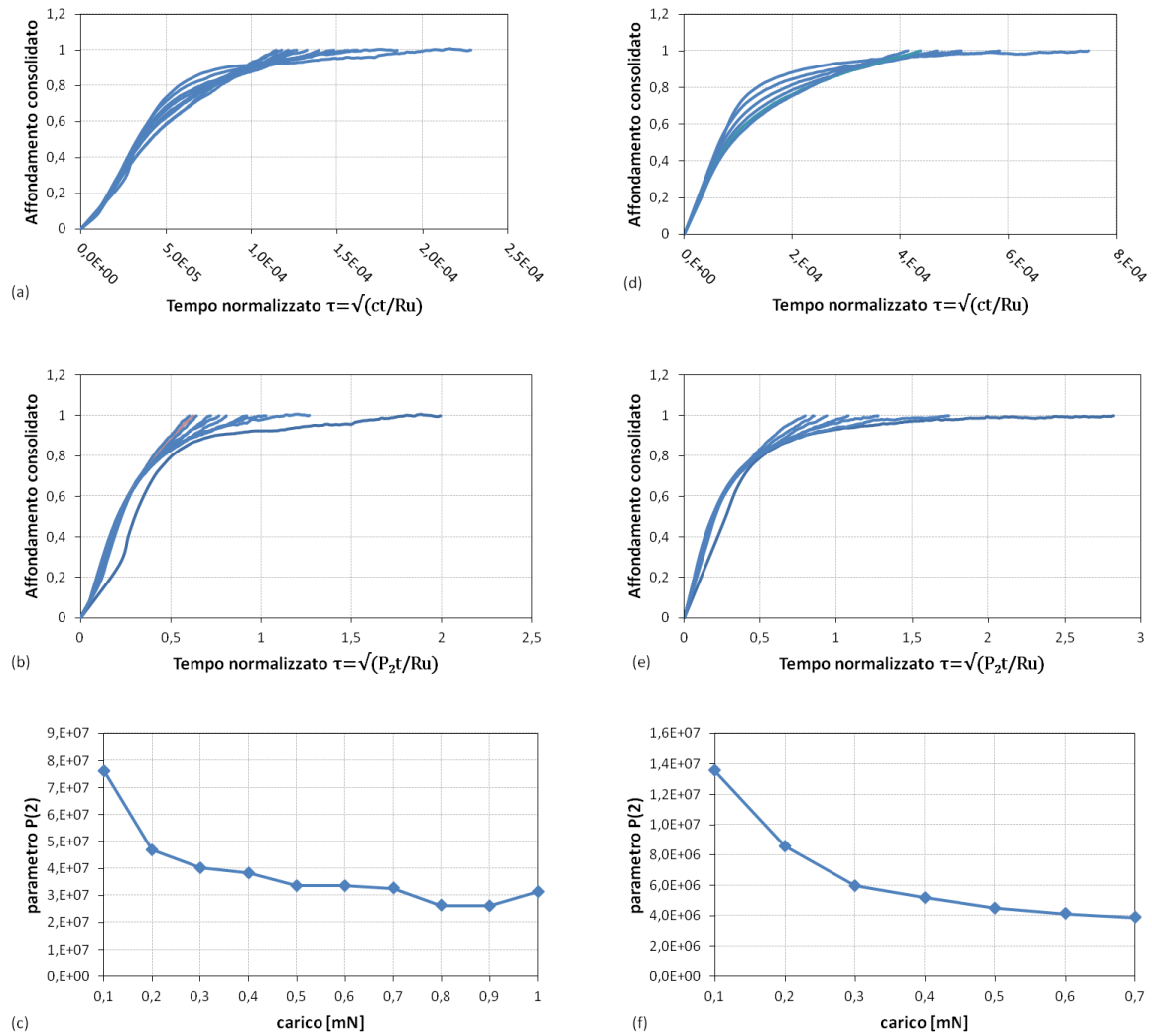


Figura 6.2 – Affondamento consolidato su scala temporale normalizzata campione di cartilagine porcina di controllo, punta p400 (a,b), p25 (d,e). Le curve di creep per diversi livelli di carico si sovrappongono con l’inserimento dei parametri  $P_2$  all’interno di  $\tau = \sqrt{P_2t/Ru(t)}$ .

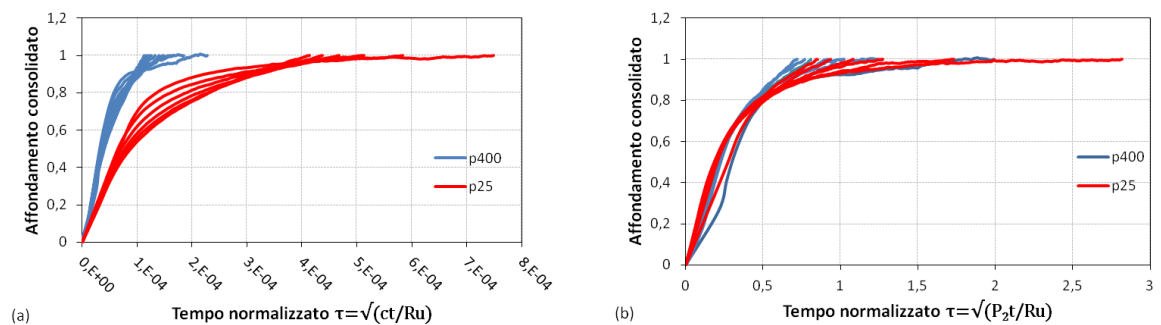


Figura 6.3 – Confronto affondamento consolidato su scala temporale normalizzata  $\tau = \sqrt{ct/Ru(t)}$  (a) e  $\tau = \sqrt{P_2t/Ru(t)}$  (b) campione di cartilagine porcina di controllo punte p400-p25. Con l’inserimento dei parametri  $P_2$  le curve si sovrappongono per diversi livelli di carico, ad eccezione del primo.

# Bibliografia

Agbezuge L.K., Deresiewicz H.. (1974). On the indentation of a consolidating half space. *Israel Journal of Technology*, 12, p. 322-338.

Armstrong C.G., Mow V.C. (1982). Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *Journal of Bone and Joint Surgery-American*, 64(1), p. 88-94.

Ateshian G.A.. (2009). The role of interstitial fluid pressurization in articular cartilage lubrication. *Journal of Biomechanical engineering*, 42, p. 1163-76.

Biot M.A.. (1941). General theory of three-dimensional consolidation. *Journal of Applied Physiology* 12, p. 155-164.

Best B.A., Guilak F., Setton L.A., Zhu W., Saed-Nejad F., Ratcliffe A., Weidenbaum M., Mow V.C.. (1994). Compressive mechanical properties of the human annulus fibrosus and their relationship to biochemical composition. *Spine*, 19(2), p. 212-221.

Boschetti F., Gervaso F., Pennati G., Peretti G., Vena P., Dubini G.. (2006). Poroelastic numerical modelling of natural and engineering cartilage based on in vitro tests. *Biorheology*, 43, p. 235-247.

Chahine N., Wang C., Hung C., Ateshian G.. (2004). Anisotropic strain-dependent material properties of bovine articular cartilage in the transitional range from tension to compression. *Journal of Biomechanics*, 37, p. 1251-1261.

---

Chen A., Bae W., Schinagl R. M., Sah R.. (2001). Depth- and strain-dependent material properties of bovine articular cartilage in the transitional range from tension to compression. *Journal of Biomechanics*, 34, p. 1-12.

Cheng Y.T., Ni W., Cheng C.M.. (2006). Nonlinear analysis of oscillatory indentation in elastic and viscoelastic solids. *Physical Review Letters* 97.

Chizhik S., Wierzcholski K., Trushko A., Zhytkova A., Miszczak A.. (2010). Properties of Cartilage on Micro-and Nanolevel. *Advances in Tribology*.

Cohen B., Lai W. M., Mow V. C. (1998). A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. *Journal of biomechanical engineering* , 120, p. 491-496.

Cowin S.C., Doty S.B. (2007). *Tissue Mechanics*. Springer, Berlin.

Delafargue A., Ulm F.J.. (2004). Explicit approximations of the indentation modulus of elastically orthotropic solids for conical indenters. *International Journal of Solids and Structures* 41, p. 7351-7360.

Dintwa E., Tijsskens E., Ramon H.. (2008). On the accuracy of the Hertz model to describe the normal contact of soft elastic spheres. *Granular Matter* 10, p. 209-221.

Elmore S.M., Sokoloff L., Norris G., Carmeci P. (1963). Nature of "imperfect" elasticity of articular cartilage. *Journal of Applied Physiology*, 18(2), p. 393-396.

O'Brien F.J., Harley B.A., Waller M.A., Yannas I.V., Gibson L.J., Prendergast P.J.. (2007). The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technology and Health Care*, 15(1), p. 3-17.

Franke O., Durst K., Maier V., Göken M., Birkholz T., Schneider H., Hennig F., Gelse K.. (2007). Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. *Acta Biomaterialia*, 3, p. 873-881.

Fung, Y. C. (1993). Biomechanics: mechanical properties of living tissue. *Springer*, Berlin.

Gleghorn J., Bonassar L.. (2008). Lubrication mode analysis of articular cartilage using Stribeck surfaces. *Journal of Biomechanical engineering*, 41, p. 1910-18.

Han L., Frank E.H., Greene J.J., Lee H.Y., Hung H.H.K., Grodzinsky A.J., Ortiz C.. (2011). Time-dependent nanomechanics of cartilage, *Biophysical Journal*, 100, p. 1846-1854.

Hayes W.C., Mockros L.F. (1971). Viscoelastic properties of human articular cartilage. *Journal of Applied Physiology*, 31(4), p. 562-568.

Hayes W.C., Keer L.M., Herrmann G., Mockros L.F.. (1972). A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *Journal of Biomechanics*, 5(5), p.541-551.

Hayes W.C., Bodine A.J.. (1978). Flow-independent viscoelastic properties of articular cartilage matrix. *Journal of Biomechanics*, 11(8-9), p. 407-419.

Higginson G.R., Litchfield M.R., Snaith J.. (1976). Load-displacement-time characteristics of articular cartilage. *International Journal of Mechanical Sciences*, 18(9-10), p. 481-486.

Hirsch C., Frey H.D.. (1944). A contribution to the pathogenesis of chondromalacia of the patella; a physical, histologic and chemical study, by Carl Hirsch. *Acta chirurgica Scandinavica (Supplementum)*, 83., p. 106.

Hu Y., Zhao X., Vlassak J.J., Suo Z.. (2010). Using indentation to characterize the poroelasticity of gels. *Applied physics and letters*, 96, p. 121904-1:3.

Johnson G.R., Dowson D., Wright V. (1977). The elastic behaviour of articular cartilage under a sinusoidally varying compressive stress. *International Journal of Mechanical Sciences*, 19(5), p. 301-308.

Julkunen, P. (2008). Relationships between structure, composition and function of articular cartilage - Studies based on Fibril Reinforced Poroviscoelastic modeling. Doctoral dissertation, University of Kuopio, Department of Physics.

Keenan K.E., Kourtis L.C., Besier T.F., Lindsey D.P., Gold G.E., Delp S.L., Beaupre G.S.. (2009). New resource for the computation of cartilage biphasic material properties with the interpolant response surface method. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 12(4), p. 415-22.

Kelvin, Brockbank G.M., Chen Z.Z., Song. Y.. (2010). Vitrification of Porcine Articular Cartilage. *Cryobiology*, 60(2), p. 217-221.

Kempson G.E., Freeman M.A.R., Swanson S.A.V. (1971). The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. *Journal of Biomechanics*, 4(4), p. 239-250.

Kiefer G. N., Sundby K., McAllister D., Shrive N.G., Frank C.B., Lam T., Schachar N.S.. (1989). The Effect of Cryopreservation on the Biomechanical Behavior of Bovine Articular Cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 7, p. 494-501.

Korhonen R.K., Laasanena M.S., Toyrasa J., Rieppob J., Hirvonena J., Helminenb H.J., Jurvelina J.S.. (2002). Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *Journal of Biomechanics* 35, p. 903-909.

Lark M.W., Bayne E.K., Lohmander L.S.. (1995). Aggrecan degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Acta Orthopaedica Scandinavica. Suppl.* 266, p. 92-97.

Li L.P., Herzog W.. (2004). Strain-rate dependence of cartilage stiffness in unconfined compression: The role of fibril reinforcement versus tissue volume change in fluid pressurization. *J Biomech*;37, p. 375-382.

McNamee J.; Gibson R.E. (1960). Displacement functions and linear transforms applied to diffusion through poroelastic media. *Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics*, 13, p. 98-111.

Mow V.C., Kuei S.C., Lai W.M., Armstrong, C.G. (1980). Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments. Transactions of ASME, *Journal of Biomechanical Engineering*, 102, p. 73-84.

Mow V.C., Gibbs M.C., Lai W.M., Zhu W.B., Athanasiou K.A. (1989). Biphasic indentation of articular cartilage - II. a numerical algorithm and an experimental study. *Journal of Biomechanics*, 22(8/9), p. 853-861.

Mow V.C., Lai. (2000). Basic biomechanics of the musculoskeletal system. In Nordin, & Frenkel.

Parsons J.R., Black J. (1977). The viscoelastic shear behavior of normal rabbit articular cartilage. *Journal of Biomechanics*, 10(1): p. 21-29.

Raviv U., Giasson S., Kampf N., Gohy J.F., Jerome R., Klein J.. (2003). Lubrication by charged polymers. *Nature* 425, p. 163-65.

Rice J.R., Cleary M.P.. (1976). Some basic stress diffusion solutions for fluid-saturated elastic porous media with compressible constituents. *Rev Geophys Space Phys* 14, p. 227-241.

Sandy J.D., Neame P.J., Boynton R.E., Flannery C.R.. (1991). Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *Journal of Biological Chemistry*. 266, p. 8683-85.



Schmidt T.A., Sah R.L.. (2007). Effect of synovial fluid on boundary lubrication of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, p. 35-47.

Setton L.A., Zhu W., Mow V.C.. (1993). The biphasic poroviscoelastic behavior of articular cartilage: Role of the surface zone in governing the compressive behavior. *Journal of Biomechanics*, 26(4-5), p. 581-592.

Shahsavari R., Ulm F.J.. (2009). Indentation analysis of fractional viscoelastic solids, *Journal of Mechanics of Materials and Structures* 4, p. 523-550.

Simha N.K., Jin H., Hall M.L., Chiravambath S., Lewis J.L.. (2007). Effect of indenter size on elastic modulus of cartilage measured by indentation. *Journal of Biomechanical Engineering*, 129, p. 767-775.

Song Y.C., Lightfoot F.G., Chen Z., Taylor M.J., Brockbank K.G.M.. (2004). Vitreous preservation of rabbit articular cartilage. *Cell Preservation Technology*, 2(1), p. 67-74.

Soltz M.A., Ateshian G.A.. (2000). A conewise linear elasticity mixture model for the analysis of tension-compression nonlinearity in articular cartilage. *J Biomech Eng*, 122, p. 576-586.

Sokoloff L.. (1966). Elasticity of aging cartilage., in Federation proceedings. *Federation Of American Societies For Experimental Biology: United States*, p. 1089-1095.

Soulhat J., Buschmann M.D., Shirazi-Adl A.. (1999). A fibril-networkreinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression. *J Biomech Eng*, 121, p. 340-347.

Suh J.K., Spilker R.L.. (1994). Indentation analysis of biphasic articular-cartilage - nonlinear phenomena under finite deformation. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME*, 116(1), p. 1-9.

---

Suh J.K., DiSilvestro M.R.. (1999). Biphasic Poroviscoelastic Behavior of Hydrated Biological Soft Tissue. *Journal of Applied Mechanics*, 66, p. 528-535.

Vandamme M., Ulm F.J.. (2006). Viscoelastic solution for conical indentation. *International journal of Solid and Structures*, 43, p. 3142-3165

Vena P., Taffetani M., Bertarelli E., Gottardi R., Raiteri R.. (2012). Modelling of the frequency response to dynamic nanoindentation of soft hydrated anisotropic materials: application to articular cartilage. Sottoposto a revisione per pubblicazione su *Computer Modeling in Engineering and Science*.

Viidik A.. (1968). A Rheological Model for Uncalcified Parallel-Fibered Collagenous Tissues. *Journal of biomechanical engineering*, 1, p. 3-11.

Wang Q., Zheng, Y. (2007). Ultrasound measurement of swelling behaviors of articular cartilage in situ. *In Biomechanical systems technology*, p. 271-295.

Wilson W., van Donkelaar C., Huyghe J. (2005). A comparison between mechano electrochemical and biphasic swelling theories for soft hydrated tissues. *Journal of biomechanical engineering*, 127, p. 158-155.

Wilson W., van Donkelaar C., van Rietbergen R., Huiskes R.. (2007). The role of computational models in the search for the mechanical behavior and damage mechanisms of articular cartilage. *Medical Engineering & Physics*, 27, 810-826.