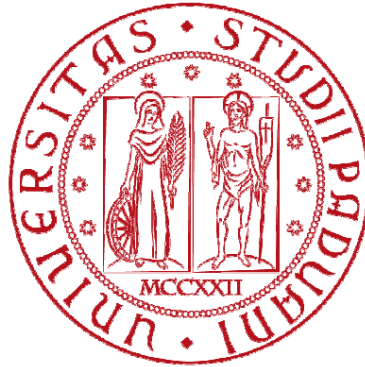


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



**ANALISI FEM DEL COMPORTAMENTO
MECCANICO DI SUBSTRATI PDMS PER LO STUDIO
DI FENOMENI DI MECCANO-TRASDUZIONE
DI CELLULE MUSCOLARI**

Relatore:

Prof. PIERO PAVAN

Laureando:

RICCARDO CAPPELLETTI

Corso di laurea Magistrale in Bioingegneria

ANNO ACCADEMICO 2011/2013

Ai miei genitori e a mio fratello

INDICE

<i>Abstract</i>	9
CAPITOLO 1	11
UTILIZZO DI SIMULATORI FEM PER L'ANALISI DELL'INTERAZIONE CELLULE-SUBSTRATI	
1.1 – LA SIMULAZIONE.....	11
1.2 – METODO A ELEMENTI FINITI (FEM).....	12
1.2.1 – CENNI STORICI.....	13
1.2.2 – CENNI SUL FUNZIONAMENTO.....	14
1.3 – INTERAZIONE CELLULA-SUBSTRATO.....	17
1.3.1 – LE PROPRIETA' FISICHE DEI SUBSTRATI.....	19
1.3.2 – LE PROPRIETA' CHIMICHE DEI SUBSTRATI.....	27
1.3.3 – FUNZIONALIZZAZIONE DELLE SUPERFICI.....	29
1.3.4 – GLI STIMOLI MECCANICI.....	31
1.4 – MODELLO A ELEMENTI FINITI PER LO STUDIO DELLA MIGRAZIONE CELLULARE.....	33
1.5 – MODELLI A ELEMENTI FINITI PER IL CONTATTO SUBSTRATO-CELLULA DURANTE UNA DEFORMAZIONE CICLICA.....	37

1.6 – ANALISI DELLE PROPRIETA' MECCANICHE NONLINEARI DEL MATERIALE COSTITUENTE IL SUBSTRATO CON MODELLI FEM.....	44
--	----

1.7 – PRESENTAZIONE DEI PROBLEMI TRATTATI.....	48
--	----

CAPITOLO 2.....	49
------------------------	-----------

BIOMATERIALI PER LA COSTRUZIONE DI SCAFFOLDS CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL PDMS

2.1 – SCAFFOLD.....	49
---------------------	----

2.1.1 – VANTAGGI E SVANTAGGI DEGLI SCAFFOLD.....	50
--	----

2.2 – BIOMATERIALI UTILIZZATI PER LA COSTRUZIONE DEGLI SCAFFOLDS.....	51
---	----

2.2.1 – LA BIOCAMPATIBILITA'.....	53
-----------------------------------	----

2.2.2 – POLIMERI.....	53
-----------------------	----

2.2.2.1 – PDMS.....	57
---------------------	----

2.3 – PROPRIETA' MECCANICHE DEL PDMS.....	59
---	----

2.3.1 – CURVA TENSIONE DEFORMAZIONE E INCOMPRIMIBILITA'.....	59
--	----

2.3.2 – STIMA DEL MODULO DI TAGLIO DEL PDMS.....	61
--	----

2.3.3 – INFLUENZA DELLA TEMPERATURA DI RISCALDAMENTO.....	65
---	----

2.3.4 – INFLUENZA DEL RAPPORTO BASE:POLIMERO.....	69
---	----

CAPITOLO 3.....71

DEFINIZIONE DEI MODELLI COSTITUTIVI IPERELASTICI

3.1 – INTRODUZIONE.....	71
3.2 – DEFINIZIONE DEL MODELLO COSTITUTIVO.....	72
3.3 – MATERIALI IPERELASTICI ISOTROPICI INCOMPRESSIBILI.....	74
3.4 – MODELLI COSTITUTIVI IPERELASTICI.....	76
3.4.1 – NEO – HOOKEAN FORM.....	78
3.4.2 – OGDEN FORM.....	78
3.4.3 – POLYNOMIAL FORM.....	79
3.5 – CONSIDERAZIONI.....	79
3.6 – VISCOELASTICITA’.....	80

CAPITOLO 4.....83

ANALISI NUMERICA DI TEST MECCANICI APPLICATI A SUBSTRATI DI PDMS

4.1 – INTRODUZIONE.....	83
4.2 – COSTRUZIONE DEL MODELLO CON PATRAN.....	84
4.3 – CALCOLO CON ABAQUS STANDARD.....	88
4.4 – ANALISI DEI RISULTATI CON ABAQUS/CAE.....	89

4.5 – TEST MONOASSIALE E EQUIBIASSIALE PER PDMS 5:1 E PDMS 10:1	89
4.5.1 – GEOMETRIA DEL MODELLO.....	90
4.5.2 – DEFINIZIONE DEL MATERIALE.....	90
4.5.3 – CONDIZIONI DI VINCOLO E ALLUNGAMENTI IMPOSTI.....	91
4.5.4 – MODELLO COSTITUTIVO.....	92
4.5.5 – MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI.....	92
4.5.6 – ANALISI DEI RISULTATI DELLE SIMULAZIONI.....	93
4.6 – BULGE TEST.....	94
4.6.1 – GEOMETRIA E COSTRUZIONE DEL MODELLO.....	95
4.6.2 – DEFINIZIONE DEL MATERIALE.....	96
4.6.3 – CONDIZIONI DI VINCOLO E PRESSIONE IMPOSTA.....	97
4.6.4 – MODELLO COSTITUTIVO.....	98
4.6.5 – MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI.....	98
4.6.6 – RISULTATI E CONCLUSIONI.....	99
4.7 – TEST DI TRAZIONE MONOASSIALE.....	125
4.7.1 – GEOMETRIA E COSTRUZIONE DEL MODELLO.....	126
4.7.2 – DEFINIZIONE DEL MATERIALE.....	129
4.7.3 – CONDIZIONI DI VINCOLO E ALLUNGAMENTO IMPOSTO.....	130
4.7.4 – DEFINIZIONE DEL MODELLO COSTITUTIVO.....	133
4.7.5 – MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI.....	133
4.7.6 – RISULTATI E CONCLUSIONI.....	135

CONCLUSIONI.....147

BIBLIOGRAFIA.....149

Abstract

L'analisi numerica è uno strumento molto potente, utilizzato oggi in molti campi e per diversi scopi, dalle simulazioni per le previsioni metereologiche fino alle simulazioni ingegneristiche. In questa tesi si sono utilizzati programmi che implementano questo strumento, per studiare il comportamento meccanico di substrati di PDMS (polidimetilsilossano), un polimero altamente biocompatibile e con buone proprietà meccaniche e chimiche, di dimensioni molto ridotte.

L'obiettivo di questa tesi è appunto la determinazione delle risposte meccaniche di scaffolds polimerici sottoposti a differenti test meccanici, per la valutazione dei fenomeni di meccanotrasduzione delle cellule muscolari.

La simulazione numerica rappresenta una svolta nelle varie discipline in cui viene utilizzata, poiché permette di studiare fenomeni, senza riprodurli in laboratorio, con una importante influenza sul costo e sul tempo nell'ambito della ricerca.

La trattazione della tesi parte da una descrizione generica dell'uso di simulatori FEM (basati sul Metodo a Elementi Finiti) per lo studio dell'interazione che sussiste tra cellule e substrati. Vengono dapprima descritti i simulatori FEM, con brevi cenni sul loro funzionamento; poi vengono riportate le caratteristiche dei substrati che influenzano l'interazione con le cellule; infine vengono riportati dalla letteratura scientifica alcuni articoli che utilizzano questi simulatori per l'analisi dell'interazione cellula-substrato.

La tesi continua con la descrizione del biomateriale utilizzato, il PDMS, e le proprietà meccaniche che caratterizzano il suo comportamento.

Si passa poi alla descrizione dei modelli costitutivi, in particolare quelli utilizzati nella parte successiva di simulazione.

Infine viene riportata l'analisi numerica dei substrati in PDMS sottoposti a differenti test (test a gonfiamento e test a trazione monoassiale), vero oggetto di studio della nostra tesi.

CAPITOLO 1

UTILIZZO DI SIMULATORI FEM PER L'ANALISI DELL'INTERAZIONE CELLULE-SUBSTRATI

1.1 LA SIMULAZIONE

Sin dall'inizio degli anni sessanta la simulazione ha avuto un ruolo guida nella risoluzione di problemi derivanti dall'ingegneria e dalle scienze applicate. Sulla scia di questo successo nuove discipline si sono aperte all'uso della simulazione numerica, quali la tecnologia dell'informazione e della comunicazione, la bioingegneria e molte altre.

La simulazione numerica è una tecnica che permette di imitare il funzionamento di un sistema reale attraverso la definizione di un modello (realizzato al computer). In genere viene applicata a sistemi molto complessi, ed è uno degli strumenti maggiormente utilizzati per determinare il comportamento del sistema senza verificarlo sperimentalmente.

Quindi tra modello computazionale e sistema reale esiste una corrispondenza; nella relazione che lega il modello al sistema si possono distinguere due fasi. La prima, detta *modellizzazione*, che consiste appunto nella creazione del modello computazionale a partire dal sistema reale. È un processo di astrazione che comporta numerose approssimazioni, dovute alla scelta delle componenti principali del sistema (ad esempio decidendo di utilizzare le componenti significative del sistema, escludendo invece le componenti il cui ruolo si ritiene irrilevante per lo studio del fenomeno interessato). Il modello ricavato da queste approssimazioni del sistema reale ha valore solo se valgono le ipotesi in base alle quali è stato definito. La validità deve quindi essere valutata con riferimento all'uso che del modello si intende fare e nel caso in cui si varia il contesto della definizione del modello deve essere ridiscussa anche la validità. In questa fase vengono identificati i componenti del sistema, il principio di funzionamento di ciascuno di essi e le relazioni funzionali che li legano. La seconda fase, successiva a quella di modellizzazione, è la fase di *simulazione*, che consiste nell'esecuzione dei modelli computazionali costruiti per verificare che il comportamento risultante dalla simulazione sia simile al comportamento che si ottiene con il sistema reale di partenza.

È importante osservare che una simulazione numerica si limita a studiare il modello di un sistema fisico, quindi fornisce una descrizione approssimata dei fenomeni, non la vera soluzione.

La ragione del crescente successo dell'utilizzo della simulazione è senza dubbio lo sviluppo crescente del calcolo scientifico, disciplina che consente di tradurre un modello matematico (risolubile in forma analitica solo in rarissime situazioni) in algoritmi che possono venire trattati e risolti da calcolatori di potenza sempre più elevata [1].

1.2 METODO A ELEMENTI FINITI (FEM)

Con la sigla FEM, dall'inglese *Finite Element Method*, si individuano i Metodi a Elementi Finiti.

Il metodo degli elementi finiti permette di risolvere problemi per i quali non è ricavabile la soluzione analitica come ad esempio problemi complessi di determinazione dello stato di sforzo e deformazione di elementi sottoposti a carichi applicati.

È una tecnica che cerca di risolvere in modo approssimato, riducendo ad un sistema di equazioni algebriche, le equazioni differenziali alle derivate parziali che descrivono i problemi analizzati. Si parla di approssimazione in quanto le equazioni sono ottenute da un numero finito di elementi, mentre l'esattezza matematica si ottiene solo con infiniti elementi. Il metodo a elementi finiti non è l'unica strategia per creare una simulazione numerica, infatti oltre a questa ne esistono molte altre come: il metodo alle differenze finite, il metodo dei volumi finiti, il metodo degli elementi al contorno, il metodo delle celle, il metodo spettrale e molti altri. Tra tutte queste tecniche numeriche il metodo FEM rimane comunque la tecnica preferita ed adottata nella maggior parte dei codici di analisi automatici disponibili in commercio. In generale, il metodo agli elementi finiti si adatta molto bene a risolvere i problemi quando il dominio ha forma complessa (geometria complessa del sistema in analisi, come il telaio di un'automobile), quando il dominio cambia durante l'analisi (un mutamento nelle condizioni al contorno), quando si richiede una soluzione accurata in una parte del dominio (in un crash test dove l'accuratezza della soluzione deve essere maggiore nel momento dell'impatto, che è appunto l'obiettivo di questa prova) e quando la soluzione è irregolare.

Con una sigla simile, FEA (dall'inglese *Finite Element Analysis*), si individua invece l'analisi a elementi finiti.

Passiamo ora ad analizzare i vantaggi e gli svantaggi che si ottengono quando viene utilizzata un'analisi agli elementi finiti.

I vantaggi consistono:

- definizione di problemi con geometrie complesse (ciò rappresenta il cuore e la potenza dei metodi FEM);
- possibilità di trattare una larga varietà di problemi ingegneristici (meccanica dei solidi, dei fluidi, del calore, di elettrostatica, ecc.);
- definizione di problemi con condizioni di vincolo complessi;
- definizione di problemi con condizioni di carico complessi.

Gli svantaggi consistono:

- impossibilità di generare una soluzione in forma chiusa e parametrizzabile del problema;
- approssimazioni della soluzione: errori derivanti dalla discretizzazione del dominio cercando di approssimare una forma non regolare mediante l'assemblaggio di elementi finiti di forma molto regolare; errori derivanti dall'interpolazione utilizzando semplici funzioni polinomiali nella definizione dei singoli elementi finiti;
- errori connessi alle procedure di calcolo utilizzate: errori inerenti ai troncamenti decimali delle quantità numeriche a causa del numero limitato di cifre significative con cui lavora un computer;
- errori di modellazione conseguenti da scelte inappropriate dell'utente.

1.2.1 CENNI STORICI

Le origini della nascita del metodo degli elementi finiti derivano dalla necessità di risolvere problemi complessi di analisi elastica e strutturale nell'ingegneria civile ed aeronautica. La nascita del metodo può essere fatta risalire agli anni 1930-35 per mezzo di A. R. Collar e W.

J. Duncan, i quali idearono una forma primitiva di elemento strutturale per la risoluzione di un problema di aeroelasticità, poi di seguito negli anni 1940-41 Alexander Hrennikoff e Richard Courant concepirono, anche se con differenti approcci, l'idea di suddividere il dominio del problema in sottodomini di forma semplice (gli elementi finiti). Tuttavia la nascita vera e propria del metodo è fatta risalire alla seconda metà degli anni '50 grazie al contributo fondamentale di M. J. (Jon) Turner della Boeing, il quale formulò e perfezionò il primo approccio agli elementi finiti nel campo del continuo: il Direct Stiffness Method. Il metodo è stato perfezionato e migliorato negli anni successivi grazie a vari contributi tra cui: B. M. Irons, che ideò gli elementi isoparametrici, il concetto di funzione di forma e un algoritmo per la risoluzione del sistema algebrico lineare; R. J. Melosh, che inquadrò il metodo FEM nella classe dei metodi Rayleigh-Ritz¹; E. L. Wilson, che sviluppò il primo software FEM che permise la nascita del SAP. Nel 1967 Zienkiewicz pubblicò il primo libro sugli elementi finiti. Il metodo a elementi finiti, a partire dagli anni '70, è stato utilizzato per la modellazione numerica di sistemi fisici, anche nelle discipline ingegneristiche. Sempre negli anni '70 nacquero la maggior parte dei codici di analisi FEM commerciali, tra cui i più famosi: NASTRAN, ADINA, ANSYS, ABAQUS, SAMCEF, ecc.

1.2.2 CENNI SUL FUNZIONAMENTO

Il procedimento risolutivo per elementi finiti si attua secondo una serie di fasi tipiche che vengono di seguito elencate in maniera sintetica [2]:

- *idealizzazione* del sistema reale che si vuole analizzare con la scelta del modello matematico a base del calcolo. Questa è la prima e necessaria fase che deve essere svolta per qualsiasi problema strutturale. Essa comprende l'introduzione di opportune ipotesi: sulla geometria e sul carico come la semplificazione del contorno e particolari simmetrie della geometria e del carico, sul materiale come la scelta del comportamento assunto per la specifica analisi, sulla risposta della struttura, sul

¹ Il metodo di Rayleigh-Ritz è un procedimento risolutivo che si basa sul teorema della stazionarietà dell'energia potenziale totale per cui il campo di spostamenti viene approssimato tramite una combinazione lineare di funzioni rispettose della congruenza. La funzione risultante è cinematicamente ammissibile, per ognuno dei coefficienti.

comportamento strutturale, e altre assunzioni. Le ipotesi fatte devono essere tenute in considerazione, quando poi si va ad analizzare i risultati ottenuti dalla simulazione.

- *discretizzazione* (fase di pre-processione): suddivisione della geometria della struttura analizzata in elementi finiti (mesh). Un'attenzione particolare deve essere rivolta sulla scelta del tipo di elementi finiti utilizzati nella discretizzazione, e sulla ottimizzazione della mesh in base alla raffinatezza della soluzione che si vuole ottenere (infittimento della maglia in corrispondenza di zone ove sono attesi forti gradienti di sforzo). La discretizzazione può essere fatta manualmente o anche automaticamente attraverso algoritmi definiti all'interno del programma.

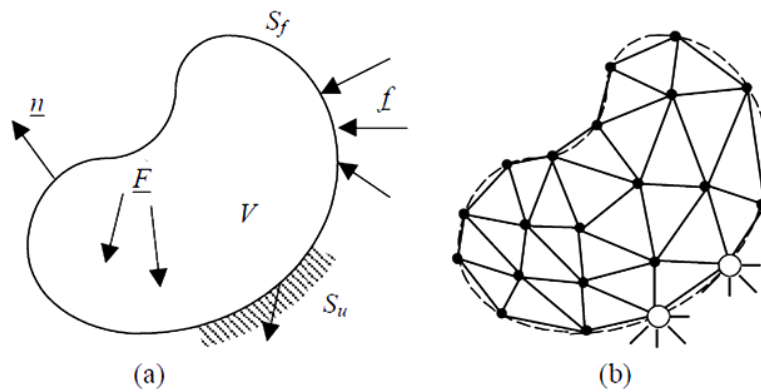


Fig. 1.1 Esempio di discretizzazione di un corpo generico (a) e la sua suddivisione in elementi finiti (b) [2].

- *modellazione*: consiste nella definizione delle funzioni di forma, nella scelta dell'ordine di interpolazione e nel calcolo delle quantità caratteristiche di ogni elemento finito come la determinazione delle matrici di rigidezza. Questi procedimenti vengono svolti con il calcolo automatico all'interno del programma.
- *assemblaggio* degli elementi finiti con conseguente formazione delle equazioni nei gradi di libertà di tutto il sistema. In questa fase vengono formate le matrici di rigidezza dell'intera struttura e vengono imposte le condizioni al contorno sui gradi di libertà vincolati.

- *soluzione*: risoluzione in forma discreta del sistema delle equazioni di equilibrio ottenute. In tale fase si utilizzano algoritmi di calcolo numerico per la soluzione dei sistemi. Tali algoritmi sfruttano le proprietà della matrice di rigidezza quali ad esempio la simmetria. Gli algoritmi che risolvono le equazioni possono essere di tipo diretto o per eliminazione, oppure di tipo indiretto o iterativo. Gli algoritmi sviluppati nei vari programmi di calcolo permettono la soluzione di sistemi, che hanno un numero molto elevato di gradi di libertà, in tempi rapidi e con notevole precisione.
- *ricostruzione* dei campi incogniti. Noti i valori degli spostamenti nodali calcolare gli spostamenti locali all'interno degli elementi finiti, calcolare le deformazioni all'interno degli elementi e a partire dalle deformazioni, per mezzo del legame costitutivo, determinare gli sforzi .
- *rappresentazione e visualizzazione dei risultati ottenuti* (fase di post-processione): preparazione di diagrammi, grafici con mesh deformate, isovalori delle componenti di sforzo e deformazione, dell'energia elastica, ecc. Questa fase è fondamentale in quanto permette di visionare i risultati e valutarli criticamente. Di conseguenza si può precludere ad una o più successive reiterazioni del metodo per ottenere ulteriori raffinamenti e validazioni degli esiti dell'analisi strutturale.

Come abbiamo visto in precedenza la fase cruciale per il metodo a elementi finiti è la discretizzazione. Il metodo si applica quindi a corpi fisici che possono essere suddivisi in un certo numero, anche molto grande, di elementi finiti con forma definita e dimensioni contenute. Ogni singolo elemento finito viene considerato un continuo con caratteristiche omogenee. Per ogni elemento finito, la soluzione del problema è espressa dalla combinazione lineare delle funzioni di forma (*shape functions*). Le funzioni di forma sono funzioni scelte in modo arbitrario che descrivono lo spostamento dei punti interni dell'elemento. È importante notare che le funzioni di forma sono approssimazioni in quanto non forniscono il valore esatto della soluzione, in cui il grado di approssimazione dipende sia dal tipo di funzione di forma utilizzata sia dalla grandezza dell'elemento considerato. Il metodo agli elementi finiti viene in genere utilizzato per risolvere problemi lineari, come i problemi di sforzo-deformazione in campo elastico e la diffusione del calore all'interno di un corpo. Però la grande svolta che è stata ottenuta dall'uso del metodo agli elementi finiti in associazione con il calcolo

automatico è appunto l'analisi di materiali che presentano un comportamento anche fortemente non lineare, andando quindi nel campo della plasticità e della viscoelasticità.

1.3 INTERAZIONE CELLULA-SUBSTRATO

Per andare ad analizzare le interazioni cellula-substrato, è richiesto innanzitutto l'utilizzo di substrati al fine di fornire il microambiente ottimale per la crescita delle cellule seminate; tali substrati sono anche chiamati *scaffolds*. Negli ultimi anni è aumentato l'utilizzo di substrati sintetici, che imitano il sistema fisiologico naturale.

L'analisi dell'interazione cellula-substrato è di fondamentale importanza al fine di progettare scaffolds biomimetici in grado di sostituire gli organi vitali danneggiati, o tessuti, o per assistere ai processi di guarigione naturale del corpo. La capacità di una cellula di riconoscere ed interagire con il substrato rappresenta il primo indispensabile passo, senza il quale processi come proliferazione, migrazione, adesione e differenziamento cellulare non sarebbero possibili. Uno dei requisiti fondamentali richiesti a un biomateriale è la capacità di promuovere efficientemente l'adesione delle cellule da cui verrà colonizzato. Affinchè tale adesione avvenga ci deve essere una fase precedente in cui la cellula riconosce il substrato. Pertanto la comprensione dei meccanismi che determinano le fasi precoci dell'adesione cellula-materiale, nonché il loro controllo, è indispensabile per la progettazione dei biomateriali. Sia le proprietà meccaniche che biochimiche del materiale determinano l'efficacia e l'avidità con cui le cellule riconoscono il materiale.

Gli aspetti principali che richiedono considerazioni nella progettazione di un potenziale biomateriale sono discussi di seguito. L'influenza di questi fattori sul comportamento cellulare è ulteriormente illustrata con esempi pertinenti derivanti dalla letteratura.

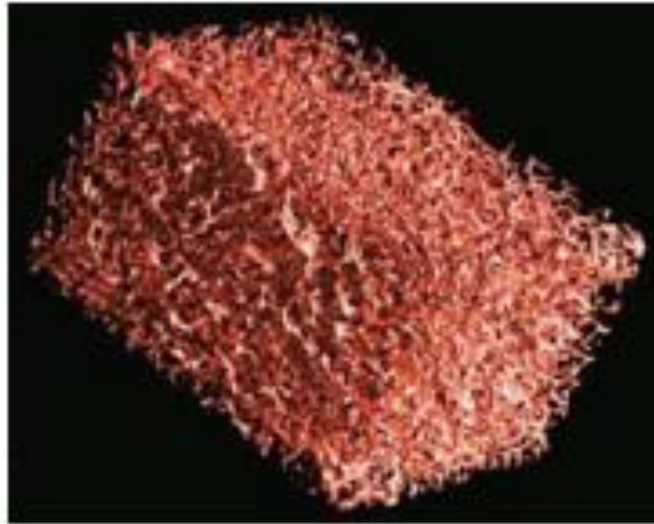


Fig. 1.2 Esempio di scaffold per il tissue engineering.

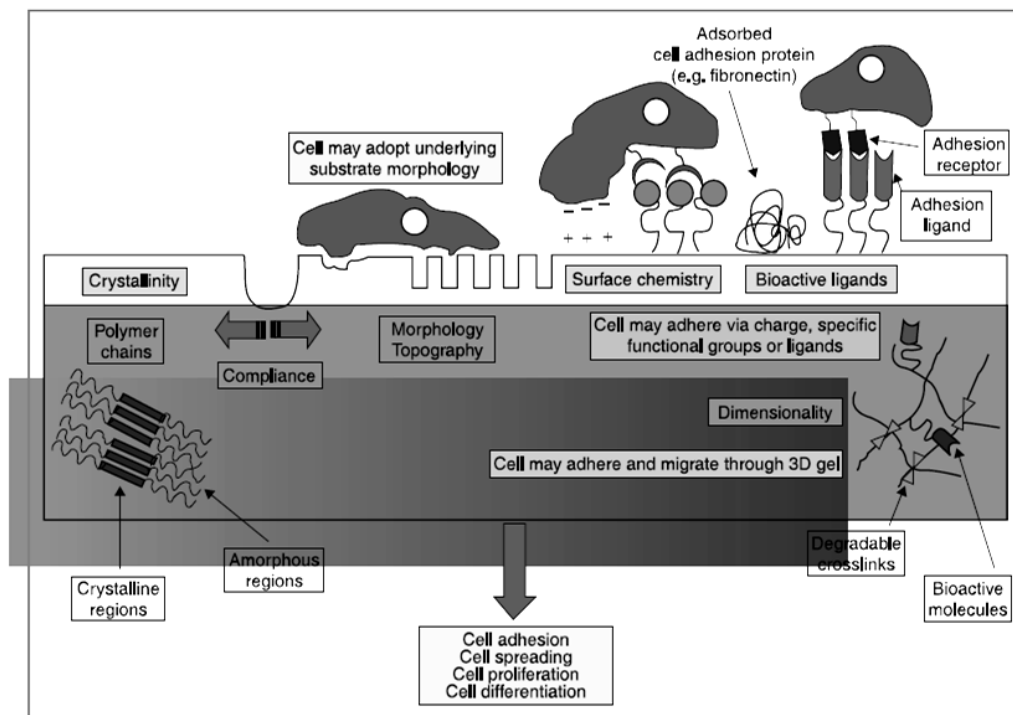


Fig. 1.3 Insieme delle varie caratteristiche del materiale che influiscono sul comportamento cellulare [3].

Sebbene metalli e ceramiche sono importanti biomateriali, i polimeri sono i materiali più comunemente utilizzati nelle applicazioni dell'ingegneria tessutale e della medicina rigenerativa. Per cui nel seguito focalizzeremo l'attenzione sull'uso dei polimeri. Comprendere le interazioni cellulari con i polimeri è importante sia per la progettazione di substrati per colture cellulari in vitro sia per l'impianto in vivo. Per le applicazioni in vivo, in particolare, le proprietà meccaniche del substrato devono necessariamente corrispondere alle esigenze meccaniche del sito di impianto, in modo tale che le cellule seminate in sito abbiano lo stimolo biomeccanico necessario al fine di proliferare, differenziarsi e ripopolare la zona danneggiata [3].

1.3.1 LE PROPRIETA' FISICHE DEI SUBSTRATI

Le proprietà fisiche come la cristallinità, la morfologia e la rigidità dei materiali vengono analizzate di seguito in quanto influenzano l'adesione cellulare e conseguentemente il loro comportamento.

Cristallinità del substrato

La cristallinità in un polimero rappresenta uno stato in cui gli atomi, molecole o ioni di cui è costituito hanno una disposizione geometrica regolare, che si ripete indefinitamente nelle tre dimensioni spaziali. A causa delle loro dimensioni e complessità, le molecole polimeriche sono spesso solo parzialmente cristalline, in quanto le regioni cristalline sono disperse nel materiale amorfo. Il grado di cristallinità dipende dalla velocità di raffreddamento durante la solidificazione del polimero, dalla configurazione della catena e dal tempo di raffreddamento. Ad esempio un tempo sufficiente di raffreddamento favorisce un allineamento delle catene. La cristallizzazione è favorita nei polimeri con una struttura chimicamente semplice. I polimeri cristallini sono generalmente più forti e resistenti al calore. La cristallinità oltre a influire sulle proprietà meccaniche come la forza e la resistenza alla fatica del polimero, gioca un ruolo importante nella determinazione delle proprietà fisico-chimiche della superficie, gli stati chimici, la polarità, la rugosità superficiale e la bagnabilità, che influenzano la risposta cellulare.

Controllando la microstruttura amorfo-cristallina dello strato superficiale del substrato si può ad esempio migliorare la compatibilità delle superfici al sangue. Sono state testate superfici con differenti gradi di cristallinità e si è potuto notare un incremento dell'adesività delle piastrine su substrati che presentavano la cristallinità minore. La particolare microstruttura amorfo-cristallina della superficie modificava anche la denaturazione delle proteine adsorbite. Ad esempio la particolare microstruttura amorfo-cristallina di superfici apolari come il propilene (con cristallinità dello strato superficiale del 55%) ha mostrato di ridurre l'attività piastrinica [4].

Durante la progettazione di scaffold per l'impianto in vivo, la cristallinità può influenzare anche la biodegradabilità dello scaffold e conseguentemente la risposta cellulare. La regione cristallina infatti risulta più resistente all'infiltrazione dell'acqua e quindi ritarda la degradazione del biomateriale. Ad esempio è stata testata l'adesione, la proliferazione e la morfologia dei condrociti umani della cartilagine articolare in funzione della cristallinità di vari polimeri degradabili. I risultati hanno suggerito che la proliferazione cellulare risulta più lenta su polimeri cristallini rispetto a polimeri amorfi. Questo mette in evidenza l'interessante dinamica tra cellula e substrato in funzione della cristallinità del materiale [5].

Una variazione nella cristallinità può anche influire sulla rugosità superficiale, su scala nanometrica. Di conseguenza si è analizzata la risposta cellulare a substrati di materiale polimerico con differente cristallinità. Le variazioni nella cristallinità comportavano delle variazioni nella rugosità superficiale su scala nanometrica, di conseguenza anche sul comportamento cellulare, poiché è stato dimostrato che le cellule sono estremamente sensibili a questi cambiamenti. Per questo motivo sono stati generati substrati con differenti gradi di cristallinità e si sono analizzate le superfici risultanti con microscopia a forza atomica. Degli osteoblasti sono stati seminati in seguito sui substrati polimerici e il loro numero è stato misurato utilizzando la microscopia a fluorescenza. I risultati hanno dimostrato che il tasso di proliferazione era maggiore sulle regioni lisce dei substrati, mentre era minore sulle regioni rugose; è stata osservata una variazione monotona decrescente della proliferazione in funzione della rugosità. La rugosità critica sopra la quale si verifica una riduzione significativa del tasso di proliferazione è 1.1 nm. Si è dimostrato quindi che le cellule rispondono direttamente alla topografia del substrato, in quanto sono sensibili a variazioni nanometriche della topografia del substrato [6].

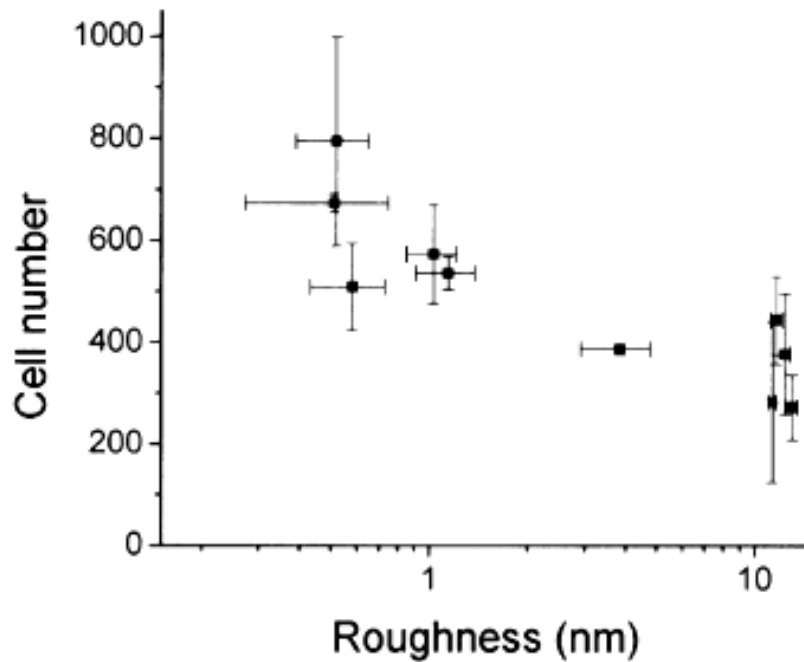


Fig. 1.4 Grafico riguardante la proliferazione delle cellule in funzione della rugosità della superficie, dopo una cultura cellulare di 3 giorni [6].

Morfologia del substrato

La morfologia del substrato può influenzare l'adesione cellulare, influenzando la capacità del substrato di adsorbire proteine e/o alterando la conformazione delle proteine adsorbite. L'adesione cellulare al substrato è quasi sempre mediata da queste proteine che vengono adsorbite sulla superficie.

Ad esempio la rugosità ha dimostrato di alterare l'adesività delle piastrine alle superfici idrofobe e idrofile. Il sangue normalmente coagula quando viene esposto a superfici differenti da quelle endoteliali biologiche, per questo motivo sono stati effettuati vari tentativi per trovare un materiale sintetico che sia biocompatibile con il sangue. Quando le superfici sono state testate in una cella a flusso laminare si è potuto notare che una rugosità aggiunta della superficie ha portato ad una diminuzione dell'adesione piastrinica su superfici idrofile, mentre un incremento dell'adesione piastrinica si è riscontrata su superfici idrofobe. Questo a dimostrazione che la morfologia influenza le proprietà del materiale e quindi l'interazione che esso ha con le cellule [7].

Un altro aspetto della morfologia da tenere in considerazione al fine di controllare la risposta cellulare è la topografia superficiale. La topografia, accoppiata con i segnali biochimici e fisici, regola le funzioni cellulari quali la migrazione, l'adesione, la morfogenesi, la differenziazione e l'apoptosi. La topografia non solo consente lo studio sistematico delle interazioni cellula-substrato, ma può anche controllare l'orientamento e la morfologia cellulare, che a sua volta controlla le altre risposte cellulari. Quindi acquisiscono molta importanza le tecniche utilizzate per creare le superfici dei substrati (le tecniche sono di seguito elencate nella successiva tabella). Inoltre è importante anche la risoluzione con cui le tecniche riescono a generare le topografie. Fino ad ora si potevano generare topografie con un livello di risoluzione che arrivava ai micrometri, ma con l'avanzamento delle tecniche di modellazione e della tecnologia, il livello di risoluzione ha raggiunto la scala nanometrica. Questo è importante in quanto la maggior parte delle strutture in vivo si trovano su scala nanometrica (come le fibrille di collagene della membrana basale).

Tabella 1.1 (a) Tecniche per la fabbricazione di scaffold con patterning chimico [8].

Tecniche	Modifica della topografia	Modifica chimica del substrato	Risoluzione laterale	Vantaggi	Svantaggi
Chemical patterning					
Micro-contact printing	può essere evitato con back-filling	si	40 nm linewidth	semplice	induce cambiamenti nella topografia
From nanoparticle arrays	si	si	punti con spaziatura di 28 nm	dimensioni modificabili	induce cambiamenti nella topografia
Molecular-assisted patterning by lift-off	può essere evitato	si	100 nm linewidth	si possono ottenere una varietà di superfici con diversità chimiche	risoluzione
Supra-molecular nanostamping	altezza molecolare	si	punti con spaziatura di 14 nm	chimica modificabile, condizioni acquose	
LB films/spin-coated block co-polymers	si	si	50 nm	condizioni acquose, dimensione modificabile	forme limitate, chimica limitata
Dip-pen nano-lithography	si	si	sotto i 15 nm	grande controllo sulla dimensione e forma	lenta

Tabella 1.1 (b) Tecniche per la fabbricazione di scaffold patterning topografico [8].

Tecniche	Modifica della topografia	Modifica chimica del substrato	Risoluzione laterale	Vantaggi	Svantaggi
Patterning topographical					
Photolithography	si	no	40 nm linewidth	ampiamente usato, possibile qualsiasi forma	costosa
Transfer from self-assembled polymer film	si	può essere evitato	50 nm	possibile su substrati differenti	solo su un tipo di forma
Polymer demixing	si	si, ma c'è la possibilità di essere evitato	inferiori ai micron	facile da fare	poco controllo sulla forma
Nanoimprint lithography	si	no	100 nm linewidth	senza chimicità	bassa risoluzione
Colloidal lithography	si	no, ma è possibile se si desidera	50 nm	anche spaziatura	mancanza di flessibilità della forma
Surface roughening	si	no	non facile da controllare, in range nanometrico	superfici uniformi con controllo della chimicità	struttura della superficie non controllabile
Anodic oxidation of metals	si	no	15 nm per i nanotubi	controllo della chimicità, facile modificare le dimensioni	piccolo range di strutture

Come è stato detto in precedenza la topografia può indurre cambiamenti nella morfologia cellulare, influenzando quindi le risposte cellulari quali la proliferazione, l'espressione genica e la funzione cellulare. Queste risposte variano anche a seconda del tipo di cellule che vengono utilizzate nella semina.

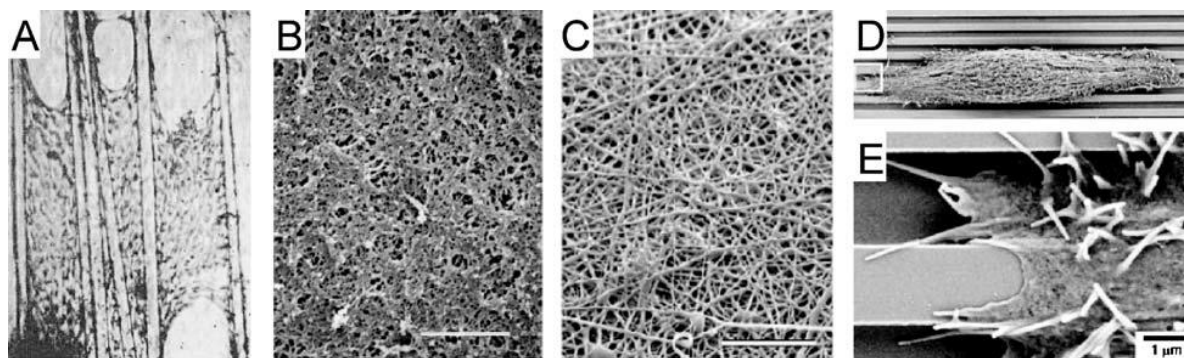


Fig. 1.5 Immagini SEM di varie topografie superficiali dei substrati [9].

Per esempio la sperimentazione condotta con superfici su cui sono stati prodotti dei canali ha rivelato che molti tipi di cellule tendono ad allinearsi lungo l'asse principale dei canali stessi e che spesso anche l'organizzazione dei componenti citoscheletrici e dei contatti focali risulta orientata nella medesima direzione. Il grado di allineamento cellulare nella direzione individuata dai canali dipende in modo complesso dalle caratteristiche proprie della struttura topografica della superficie [9].

Infine, è stato osservato che anche la simmetria e la regolarità della struttura topografica, a parità di altre sue caratteristiche morfologiche e dimensionali, sono proprietà importanti del substrato che influenzano il comportamento cellulare. I risultati hanno mostrato che la topografia regolare riduce l'adesione delle cellule molto marcatamente, mentre delle discontinuità sulla superficie hanno migliorato l'adesione cellulare. Questo dimostra che la topografia del substrato è importante per l'adesione cellulare e quindi per l'interazione cellula-substrato [10].

Rigidità del substrato

La rigidità di un materiale viene misurata con il modulo di elasticità o modulo di Young. È importante avere una rigidità sufficiente del substrato affinché le cellule ancoraggio-dipendenti possano aderire alla superficie. La rigidità, caratteristica propria del substrato, è fondamentale per la caratterizzazione delle interazioni che modulano le vie di segnalazione intracellulare e gli eventi cellulari, dalla espressione genica alla locomozione cellulare.

Il movimento cellulare può essere guidato dalla manipolazione della rigidità dei substrati. In uno studio [11] è stato dimostrato come le proprietà meccaniche della matrice influiscono sulla differenziazione delle cellule staminali. Come si può vedere dalla seguente figura al variare della rigidità del substrato variava la proliferazione e la mobilità cellulare. In particolare sono stati creati diversi tipi di substrati con rigidità differenti, che sono poi stati seminati con NSPC². I risultati hanno dimostrato che la rigidità ottimale per la proliferazione era di 3.5 kPa; mentre la rigidità ottimale per la differenziazione dei neuroni è inferiore a 1 kPa.

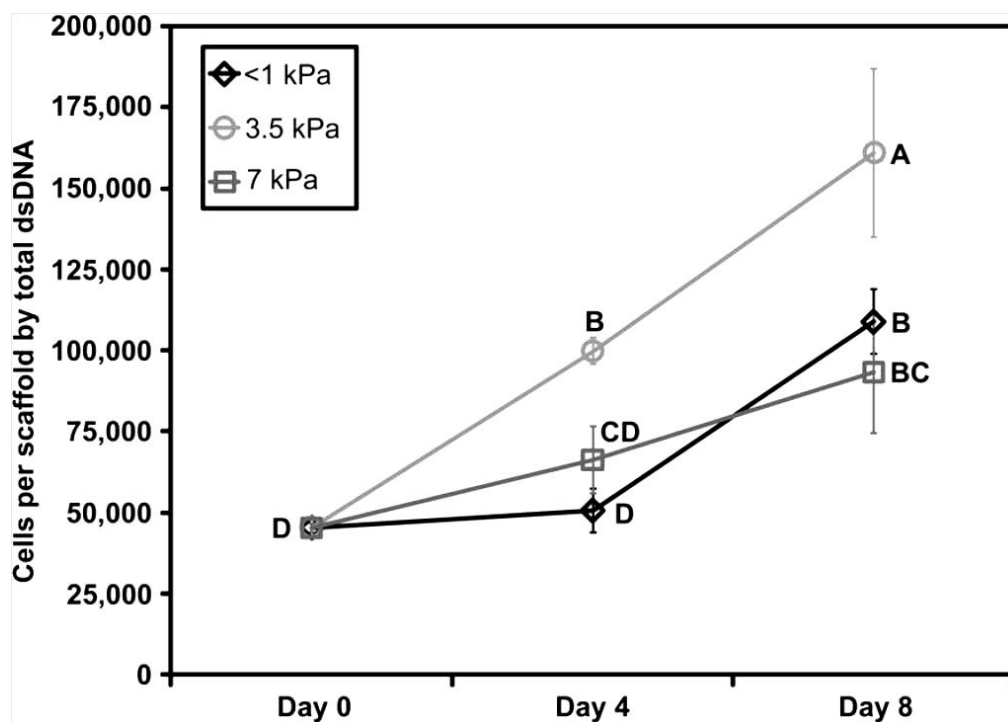


Fig. 1.6 La proliferazione cellulare per tre substrati con diversa rigidità, in una coltura cellulare di 8 giorni [11].

Questo influenzerà anche il nostro successivo lavoro, in quanto diversi tipi di PDMS sono disponibili (variando il rapporto base/agente reticolante) con una conseguente influenza sul modulo di Young.

² NSPC, Neural Stem Progenitor Cell.

1.3.2 LE PROPRIETA' CHIMICHE DEI SUBSTRATI

Le proprietà chimiche influenzano la caratterizzazione superficiale di un polimero e di conseguenza, il comportamento cellulare. Quando le cellule vengono esposte ad una superficie polimerica, uno strato di proteine vengono adsorbite sulla superficie entro pochi millisecondi. Così le cellule “vedono” lo strato di proteine adsorbite piuttosto che l'effettiva superficie polimerica. La chimica della superficie di un polimero può essere messa a punto al fine di controllare l'adsorbimento delle proteine, che a sua volta controlla l'adesione cellulare. A seconda del risultato desiderato, le caratteristiche chimiche della superficie di un polimero possono essere modificate per modulare le interazioni delle cellule aderenti al substrato, con conseguente influenza sulla morfologia, migrazione, differenziazione, proliferazione e apoptosi della cellula. L'effetto sul comportamento cellulare inizia nel punto di interazione. Inoltre la conformazione chimica della superficie influenza anche la via di immobilizzazione delle proteine e l'adsorbimento di queste sulla superficie.

Ad esempio, substrati polimerici con maggiore idrofobicità hanno dimostrato di promuovere maggiore osteogenesi in vivo [12]. L'idrofobicità del biomateriale infatti, molto probabilmente, è un criterio di progetto importante per scaffold polimerici che dovrebbero favorire la guarigione di difetti ossei. È stato proposto un confronto tra due materiali cioè: 70:30 (NVP³:BMA⁴) e la controparte più idrofoba 50:50. I risultati hanno mostrato che il materiale più idrofobo è meno citotossico, più biocompatibile e favoriva la osteoconduzione in vivo. Una possibile spiegazione di questa differenza può risiedere nel fatto che il materiale 50:50 ha un equilibrio più favorevole tra proprietà idrofobe e idrofile. Perciò al materiale 50:50 può essere associato una migliore adesione delle cellule.

Superfici idrofiliche sembrano invece inibire l'adesione dei leucociti e le cellule adese mostrano una diminuzione della risposta della citochina. Ciò provoca una reazione infiammatoria attenuata e una ridotta fusione dei macrofagi [13]. Così le superfici polimeriche idrofiliche possono offrire un approccio per limitare l'adesione dei leucociti e di conseguenza migliorare la biocompatibilità di un impianto. Le modifiche delle caratteristiche chimiche della superficie di un biomateriale consentono di modificare le interazioni del materiale con le cellule senza cambiare le proprietà proprie del materiale. Questo risultato è ottenuto

³ NVP 1-vinyl-2-pyrrolidinone.

⁴ BMA n-butyl methacrylate.

principalmente mediante un rivestimento dello strato superficiale o da un trattamento al plasma.

Nel contesto delle biointerazioni, l'importanza delle proprietà chimiche della superficie polimerica deve essere raggruppata in base alla bagnabilità e alla carica.

Bagnabilità della superficie

La bagnabilità di una superficie polimerica è una misura della sua idrofobicità e idrofilicità. Le molecole d'acqua su una superficie polimerica si riorganizzano attorno alle proteine, causando il dispiegamento e l'adsorbimento irreversibile delle proteine native sulla superficie del substrato. Le molecole d'acqua non sono in grado di formare legami a idrogeno con i substrati idrofobici, quindi, formano dei legami a idrogeno tra di loro generando una struttura più ordinata con minore entropia. Le proteine presenti nel siero possono fungere da surfattanti, ovvero possono abbassare la tensione superficiale di un liquido, i domini idrofobici interagiscono col substrato e i domini idrofilici formano legami a idrogeno con le molecole d'acqua, agevolando quindi la bagnabilità delle superfici. Questo comporta un rilascio di molecole d'acqua ordinate il che è energeticamente favorevole a causa dell'aumento di entropia; questo è noto come effetto idrofobico. In generale le proteine vengono preferenzialmente adsorbite su superfici idrofobiche, mediate dai loro domini idrofobici. Le cellule invece di vedere la superficie sottostante, vedono lo strato di proteine adsorbite sulla superficie del substrato, che modulano quindi l'adesione cellulare.

Carica superficiale

La carica superficiale di un polimero influisce sull'adsorbimento e sul dispiegamento delle proteine sulla sua superficie. A differenza della bagnabilità, la forza motrice per il dispiegamento delle proteine su una superficie carica è l'interazione ionica, e non le interazioni idrofobiche. Lo svolgimento delle proteine dipende dalla carica netta che le proteine e le cellule incontrano sulla superficie. Molte proteine hanno una carica netta superficiale negativa, che promuove il loro adsorbimento su una superficie carica positivamente.

1.3.3 FUNZIONALIZZAZIONE DELLE SUPERFICI

Come abbiamo mostrato in precedenza le proprietà fisiche e chimiche del biomateriale svolgono un ruolo fondamentale nel modulare il comportamento cellulare. Le caratteristiche biologiche sono altrettanto importanti, se non più importanti in quanto rappresentano la matrice extracellulare naturale.

I materiali, sia naturali che sintetici, utilizzati nell'ingegneria tessutale e nella medicina rigenerativa non permettono una regolazione efficiente dell'interazione cellula-materiale, per cui oggi si tende a modificare questi materiali in modo che possono interagire attivamente con le cellule, ricreando un microambiente ottimale per lo sviluppo delle cellule. In particolare, si è cercato di modificare i materiali in modo che possano esprimere segnali biologici che migliorino le interazioni con le cellule, ad esempio promuovendo l'adesione e la proliferazione cellulare. Per ottenere tali materiali, si deve prendere polimeri ultrapuri e biodegradabili e bioattivarli, in modo da migliorare e promuovere la crescita e l'impianto di cellule. La bioattivazione dei materiali può essere ottenuta o attraverso trattamenti superficiali, o attraverso l'introduzione di molecole biologicamente attive nel materiale (come fattori di crescita, inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori); in questo modo si può regolare la risposta delle cellule con cui il materiale viene in contatto. Un materiale può essere bioattivato al fine di favorire l'adesione o la migrazione cellulare.

Un modo utilizzato per legare segnali biologici sul materiale è l'adsorbimento proteico⁵. Le cellule seminate sulla superficie di un biomateriale devono aderire e la qualità dell'adesione influenzerà la successiva capacità di proliferare, migrare e differenziare. L'adesione cellulare dipende a sua volta dalle proteine adesive adsorbite sul materiale. Il modo in cui molecole biologiche vengono adsorbite sul materiale influenza l'orientamento delle molecole e, di conseguenza, anche il comportamento delle cellule seminate sul substrato.

Di seguito elenchiamo i limiti derivanti dall'uso di substrati pretrattati con proteine (*protein coated substrates*):

⁵ L'adsorbimento è un fenomeno chimico-fisico che consiste nell'accumulo di una o più sostanze fluide (liquide o gassose) sulla superficie di un condensato (solido o liquido). Nel fenomeno dell'adsorbimento specie chimiche (molecole, atomi o ioni) instaurano tra loro un'interazione di tipo chimico-fisica (attraverso forze di Van der Waals, forze elettrostatiche, legami a idrogeno o legami chimici intramolecolari) sulla superficie di separazione tra due diverse fasi (tale superficie è detta "interfase").

- non è possibile conoscere la densità dei ligandi effettivamente disponibili ai recettori cellulari; inoltre la configurazione spaziale e l'orientamento assunto dalle proteine potrebbe mascherare i ligandi interessati al legame



Fig. 1.7 Le proteine che si depositano sulla superficie del materiale assumono diverse conformazioni e sono diversamente orientate. Non tutti i legandi (zone scure) sono effettivamente disponibili ai recettori cellulari.

- le proteine adsorbite sulla superficie del materiale vanno incontro a denaturazione e il grado di denaturazione è difficilmente prevedibile, in quanto dipende da numerose variabili tra cui la struttura della proteina, la natura del substrato, il pH e la temperatura.
- le proteine del rivestimento (*coat*), ovvero quelle legate alla superficie del substrato, possono modificare la propria attività sia interagendo con altre proteine contenute nel mezzo di coltura sia in seguito al contatto con le cellule presenti in coltura.
- l'adsorbimento proteico può essere reversibile, ovvero la proteina adesa, può staccarsi dal substrato o essere sostituita da altre proteine presenti in soluzione (effetto Vroman), o ancora andare incontro a cambiamenti conformazionali.

Recentemente si è scoperto che i recettori cellulari riconoscono come ligando, non l'intera proteina, ma un dominio molto ristretto dell'intera proteina, rappresentato da una breve sequenza amminoacidica. Quindi oggi la bioattivazione dei materiali viene fatta utilizzando "frammenti" di molecole (peptidi) legati in modo covalente al materiale. La sequenza peptidica maggiormente utilizzata nel campo dell'ingegneria tessutale è l'RGD (tripletta costituita da appena tre amminoacidi Arginina-Glicina-Aspartato), poiché è presente in grande

numero anche nell'organismo e possiede l'abilità di indirizzare più recettori di adesione. L'RGD rappresenta il sito con cui la fibronectina si lega ai recettori cellulari promuovendo l'adesione.

Al fine di controllare la risposta cellulare un altro fattore da tenere in considerazione è la distribuzione spaziale e la densità dei segnali sul substrato. E' stato dimostrato, ad esempio, che le cellule migrano in modo diverso a seconda della distribuzione di tali segnali. In conclusione andando a legare sequenze amminoacidiche sulla superficie del substrato si può controllare i processi cellulari, controllando l'adesione, la proliferazione, la differenziazione e tutto ciò che deriva dal controllo di questi fattori.

1.3.4 GLI STIMOLI MECCANICI

Gli stimoli meccanici sono una componente fondamentale da valutare per la costruzione di innesti cardiovascolari, ossa, cartilagine, tendini e legamenti ingegnerizzati. Il substrato polimerico utilizzato dovrebbe possedere le proprietà fisiche che corrispondono alle proprietà meccaniche del sito implantare, inoltre dovrebbe avere anche la capacità di supportare la forza meccanica esercitata sulla protesi impiantata nel sito. Diversi tipi di sollecitazioni meccaniche sono presenti nei vari tessuti. Inoltre una stimolazione meccanica influisce anche sul comportamento cellulare, guidando così la proliferazione, la differenziazione e altri processi cellulari. Quindi è di nostro interesse valutare l'influenza degli stimoli meccanici sul substrato e conseguentemente sulle cellule. Un tipo di setup sperimentale, che come vedremo in seguito sarà utilizzata anche nel nostro lavoro, comporta la semina di cellule su un substrato flessibile, come una membrana elastica, a cui viene applicato una tensione definita, graduale o ciclica. Le cellule risiedono in un ambiente dinamico nel corpo umano e sono quindi sensibili alle variazioni meccaniche del microambiente anche nelle prove in laboratorio. Forze meccaniche applicate sul costrutto cellula-polimero spesso modificano la risposta cellulare, rendendo così le interazioni cellula-polimero, in presenza di stimoli meccanici, un'importante area di studio.

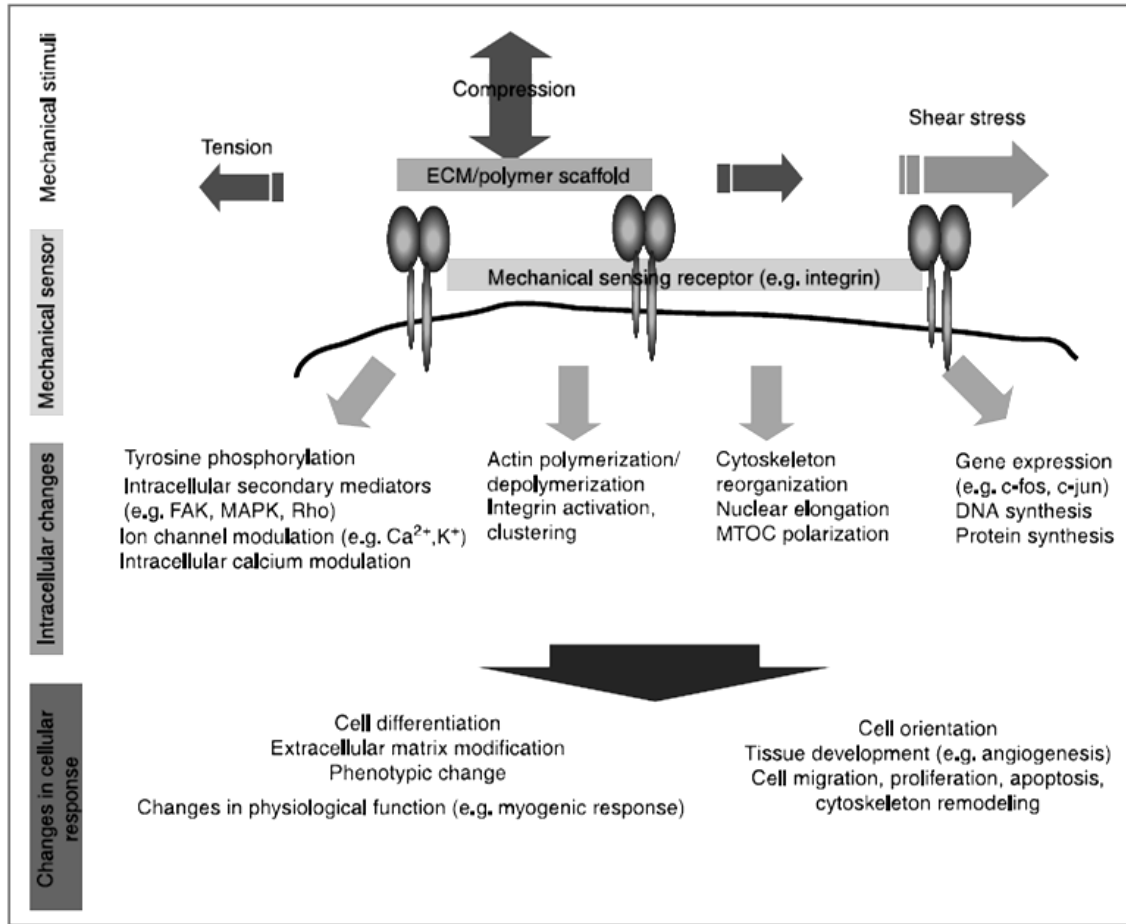


Fig. 1.8 Effetti degli stress meccanici sul comportamento cellulare [3].

Quando la forza è applicata a cellule che crescono su substrati, le cellule percepiscono i cambiamenti dell'ambiente fisico e trasmettono il segnale meccanico in segnali biochimici intracellulari attraverso la trasduzione del segnale. Questo meccanismo è chiamato *meccanotrasduzione*. Uno dei meccanosensori cellulari per eccellenza sono le integrine che fanno parte della classe dei recettori di adesione. Le integrine collegano fisicamente la matrice extracellulare al citoscheletro, consentendo così un diretto collegamento meccanico tra i due. Di conseguenza, esse sono responsabili della determinazione di un continuum meccanico in cui le forze vengono trasmesse dall'esterno all'interno della cellula in modo bidirezionale. La matrice extracellulare costituisce il substrato che consente l'adesione cellulare, la crescita e la differenziazione. È noto che le cellule del tessuto connettivo adattano la loro matrice extracellulare ai cambiamenti del carico meccanico (come avviene nel rimodellamento osseo). A sua volta, variazioni nel contenuto della matrice extracellulare possono influenzare le

prestazioni del tessuto. Evidenze sperimentali confermano che le proteine specifiche della matrice extracellulare sono regolate da stimoli meccanici in vivo.

1.4 MODELLO A ELEMENTI FINITI PER LO STUDIO DELLA MIGRAZIONE CELLULARE

L'adesione delle cellule alla matrice extracellulare è permessa grazie a specifici legami tra legandi presenti nella matrice extracellulare, come la fibronectina, e recettori cellulari di transmembrana come le integrine che sono connesse al citoscheletro all'interno della cellula. Le interazioni cellula-matrice influenzano molti processi biologici, tra cui la migrazione cellulare, la differenziazione cellulare e la proliferazione cellulare. L'obiettivo è stato quello di sviluppare un modello computazionale per investigare come le proprietà meccaniche delle adesioni focali⁶, la rigidità del substrato e gli stress intracellulari influiscono sulle interazioni cellula-matrice durante la migrazione cellulare su superfici piate; [14]. Nel modello computazionale sviluppato la trazione cellula-substrato è risultata proporzionale alla concentrazione dei recettori di legame, alla velocità relativa tra cellula e substrato, e al coefficiente d'attrito tra cellula-substrato. Le simulazioni hanno mostrato che nonostante si tengano fissi il numero dei recettori e la densità dei ligandi, le proprietà meccaniche delle adesioni focali possono ancora modificare le interazioni cellula-substrato.

La geometria della struttura è stata costruita come mostra la seguente figura. Si può notare che la forma iniziale che si è assunta per la cellula è una semplice forma di disco circolare di raggio pari a 25 μm e di spessore pari a 10 μm . Il substrato è stato modellato come una superficie rettangolare con una lunghezza pari a 300 μm , una altezza pari a 100 μm e uno spessore pari a 10 μm .

⁶ Le adesioni focali sono strutture dinamiche che possono disassemblare rapidamente se la cellula aderente è stimolata a muoversi o ad entrare in mitosi. Nella regione di un contatto focale, la membrana plasmatica contiene gli ammassi di integrina che connettono il materiale extracellulare che ricopre la piastra di coltura con il sistema dei microfilamenti di actina del citoscheletro.

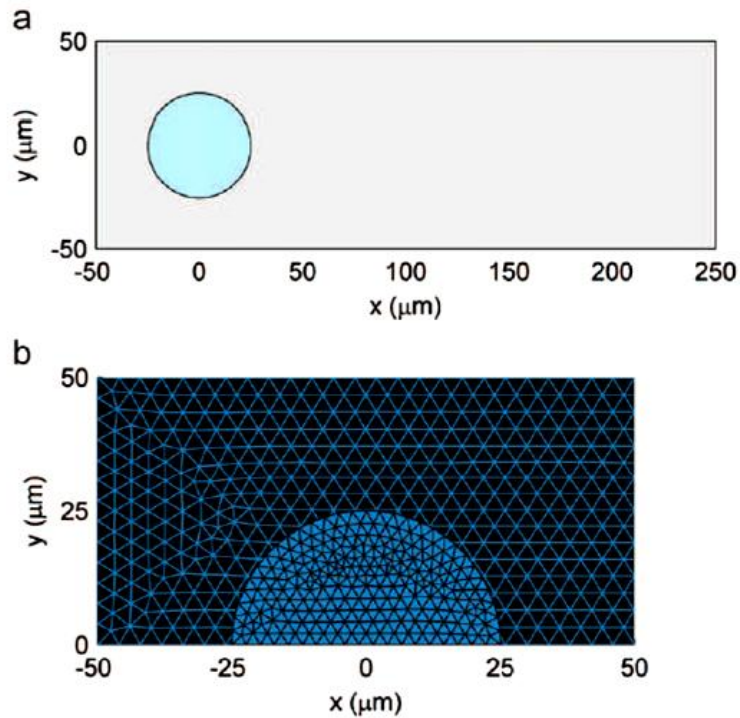


Fig. 1.9 (a) una raffigurazione 2D di un modello di una cellula su una superficie, (b) mostra la discretizzazione del modello attraverso elementi triangolari [14].

Nella simulazione la cellula migra secondo la direzione positiva delle X. Le proprietà meccaniche sia della cellula che del substrato sono state modellate usando una formulazione iperelastica neo-Hookean della funzione energia di deformazione. Alla cellula è stato fornito un modulo elastico pari a 1 kPa, mentre al substrato è stato assegnato un range di valori di moduli di Young variabili tra 0.5 e 100 kPa, per cercare di studiare gli effetti della rigidità del substrato sulla migrazione cellulare. Di seguito vengono riportati i parametri utilizzati nella simulazione.

Tabella 1.2 Parametri utilizzati nella simulazione [14].

Parametri	Descrizione	Valori utilizzati nella simulazione
h	altezza del substrato	60, 100 e 140 μm
E_{cell}	modulo elastico cellulare	1 kPa
E_{sub}	modulo elastico del substrato	0.5, 1, 10 e 100 kPa
P_0	stress attivo intracellulare massimo (anteriore)	400, 500 e 600 Pa
$\beta = \beta_0 C_0$	coefficiente d'attrito medio	10^3 - 10^5 pN s/ μm^3
β_0	coefficiente d'attrito recettore-substrato	4.91-491 pN s/ μm
C_0	concentrazione di recettori	4×10^5 / area della cellula
k_f	coefficiente delle interazioni recettore-ligando davanti	1.3 s^{-1}
k_r^0	coefficiente delle interazioni recettore-ligando dietro con forza zero	0.13 s^{-1}
γ	lunghezza del legame recettore-substrato	0.41 nm
ψ	rapporto di k_r^0 dal posteriore all'anteriore	100

Nelle simulazioni è stata analizzata la variazione della massima trazione cellula-substrato come funzione del coefficiente d'attrito recettori-substrato per substrati con modulo elastico di 0.5, 1, 10, 100 kPa.

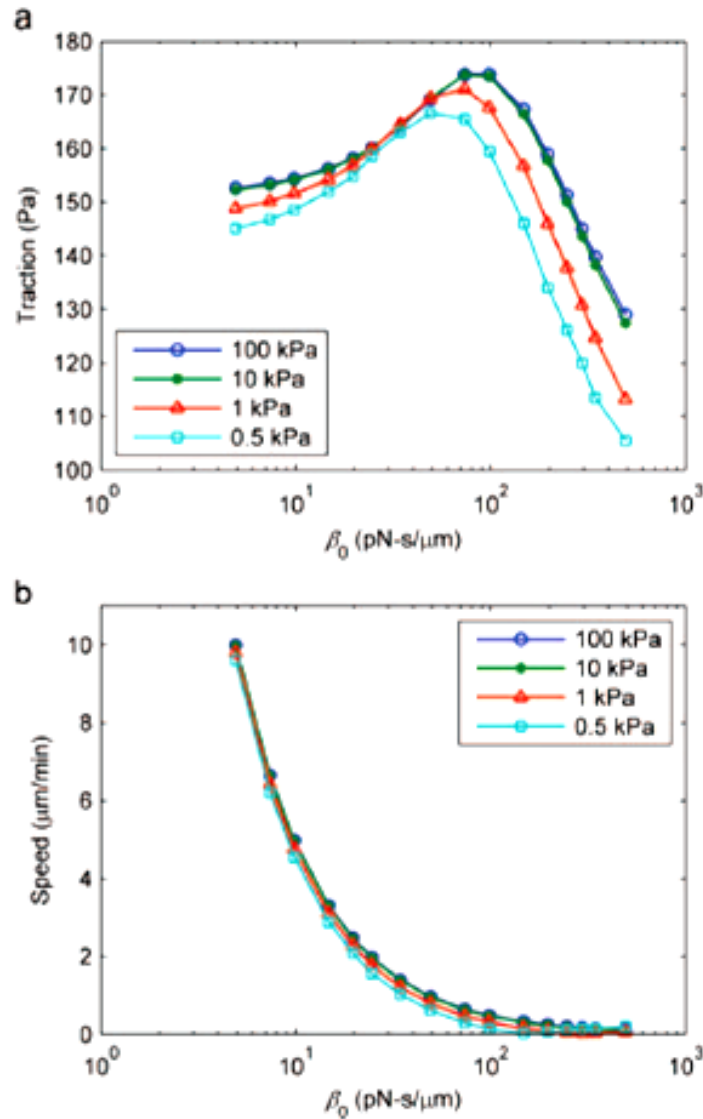


Fig. 1.10 Grafici (a) della trazione massima cellula-substrato per differenti rigidità del substrato, (b) della velocità media delle cellule che diminuisce con l'incremento del valore del coefficiente d'attrito recettori-substrato; sempre per differenti rigidità del substrato [14].

I risultati mostrano che la densità dei recettori o dei ligandi influisce sulla trazione cellula-substrato e su altre quantità importanti nell'adesione della cellula al substrato. Il modello matematico qui sviluppato è stato capace di separare i contributi del numero di recettori, della densità dei ligandi, e del coefficiente d'attrito. È stato dimostrato che sebbene il numero totale dei recettori e dei ligandi è assunto costante, la cellula è capace di controllare l'intensità della forza esercitata sulla matrice extracellulare e la velocità di migrazione attivando cambiamenti

nelle proprietà delle adesioni focali. Il coefficiente d'attrito può essere usato per caratterizzare le proprietà meccaniche delle adesioni focali. Le adesioni focali crescono e diventano più forti con l'incremento della rigidità della matrice e degli stress intracellulari. La velocità di migrazione delle cellule è invece inversamente legata a β_0 , in accordo con i risultati sperimentali. In più si è notato che la trazione cellula-substrato incrementa più velocemente con un E_{sub} maggiore su substrati soffici. Le cellule sono quindi capaci di controllare la trazione esercitata sul substrato e la velocità di migrazione alterando le proprietà meccaniche delle adesioni focali, la rigidità del loro ambiente (la matrice), e lo stress dell'actomiosina. Il modello matematico sviluppato in questo articolo è stato in grado di quantificare gli effetti di questi parametri.

1.5 MODELLI A ELEMENTI FINITI PER IL CONTATTO SUBSTRATO-CELLULA DURANTE UNA DEFORMAZIONE CICLICA

Prove sperimentali effettuate su vari tipi di cellule coltivate su substrati deformabili rivelano che ci sono specifici modelli che descrivono il riorientamento delle cellule in risposta ad uno stiramento ciclico del substrato. L'obiettivo è stato quello di sviluppare modelli a elementi finiti al fine di indagare il ruolo della viscoelasticità della cellula sul riallineamento cellulare in condizioni di stretching ciclico del substrato [15]. Nella letteratura l'attenzione si è concentrata sull'analisi di misure sperimentali relative alle risposte morfologiche di cellule aderenti a substrati che subiscono una deformazione meccanica ciclica, e in particolare per le cellule endoteliali e cellule che formano il rivestimento interno delle arterie. Lo studio in vitro comporta generalmente la semina di cellule su un substrato di silicone, che viene di seguito sottoposto a uno stiramento ciclico. Mentre è stato riportato in molti studi la tendenza generale della cellula al riallineamento lungo la direzione di deformazione minima del substrato, nessuna conclusione rigorosa è stata ottenuta a causa di una serie di fattori. Tipicamente per lo stiramento del substrato è stato imposto un allungamento semplice che comportava però una compressione laterale del substrato a causa del coefficiente di Poisson. Non si è potuto quindi verificare se il riallineamento delle cellule è dovuto alla deformazione di trazione lungo la direzione longitudinale o a causa della compressione risultante dall'allungamento imposto, o a causa di entrambi. Inoltre non è stato stabilito nemmeno se l'allineamento delle cellule è dovuto dal distacco selettivo delle cellule orientate in

determinate direzioni o dal riorientamento effettivo della cellula. Per stabilire il ruolo sia delle tensioni di compressione sia delle tensioni di trazione sul substrato, dei substrati sono stati deformati ciclicamente utilizzando un allungamento semplice (in cui si è verificata la compressione laterale) e allungamenti monoassiali (in cui non si è verificata la compressione laterale).

Il lavoro di [16] ha incontrovertibilmente appurato che il riallineamento cellulare si verifica nella direzione della deformazione minima, le ragioni di tale comportamento non sono state neancora completamente capite.

Nell'articolo qui presentato è stata presa in considerazione una impostazione meccanica di un continuum solido per esaminare i meccanismi di deformazione cellulare e le interazioni cellula-substrato. Usando questo approccio la deformazione e l'interazione possono essere esaminate in modo più approfondito di quanto sia possibile con i modelli stocastici, e ci si può concentrare su come i meccanismi di deformazione e di interazione influiscano sul processo di riorientamento cellulare. Vale la pena notare che il modello continuo elimina la necessità di assumere uno stato di deformazione omogeneo all'interno della cellula; uno stato di deformazione omogeneo a livello cellulare non è fisicamente possibile. Per quanto riguarda la geometria, la struttura e le proprietà fisiche i modelli sono stati formulati utilizzando direttamente i dati derivanti dalla letteratura.

Nello studio di modellazione computazionale qui presentato è stato considerato un approccio di meccanica del continuo e la cellula è stata modellata come un corpo omogeneo isotropo viscoelastico. La cellula è in contatto con il substrato di silicone, che è considerato essere elastico. Uno schema del modello substrato-cellula utilizzato in questo lavoro è mostrato dalla seguente figura.

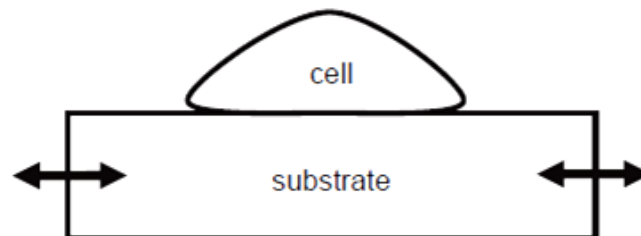


Fig. 1.11 Configurazione del modello cellula-substrato usato in questo articolo. Le frecce indicano la direzione della deformazione ciclica imposta al substrato [15].

L'area generale di adesione cellulare ha ricevuto notevole attenzione in letteratura e, in particolare, sono stati proposti modelli di rappresentazione del fenomeno. Nel presente lavoro l'adesione cellula-substrato è stata rappresentata utilizzando un approccio di meccanica del continuum. È importante notare che anche se i siti di legame sono numerosissimi, non sono uniformemente distribuiti sull'area di contatto cellula-substrato, ma tendono a concentrarsi nelle regioni note come adesioni focali. Studi sperimentali hanno rivelato che la formazione delle adesioni focali dipende dalle proprietà meccaniche del substrato. Ad esempio substrati rigidi causano la formazione di adesioni focali stabili e di morfologia regolare, mentre substrati meno rigidi hanno dato luogo ad adesioni focali di dimensione e forma irregolari. È ragionevole assumere che in assenza di stimoli meccanici l'adesione cellula-substrato non cambia. In questo lavoro è stata utilizzata una formulazione della zona coesiva di Xu e Needleman [17] per creare un modello che descriva il comportamento all'interfaccia tra una cellula endoteliale e un substrato di silicone.

Per la cellula è stata utilizzata una formulazione iperelastica neo-Hookean dell'energia potenziale di deformazione, con un modulo di Young pari a 5kPa, derivante da misure sperimentali sulle cellule, e un rapporto di Poisson pari a 0.49. La geometria generica bidimensionale della cellula-substrato usata per la maggior parte del presente studio è mostrata dalla figura seguente.

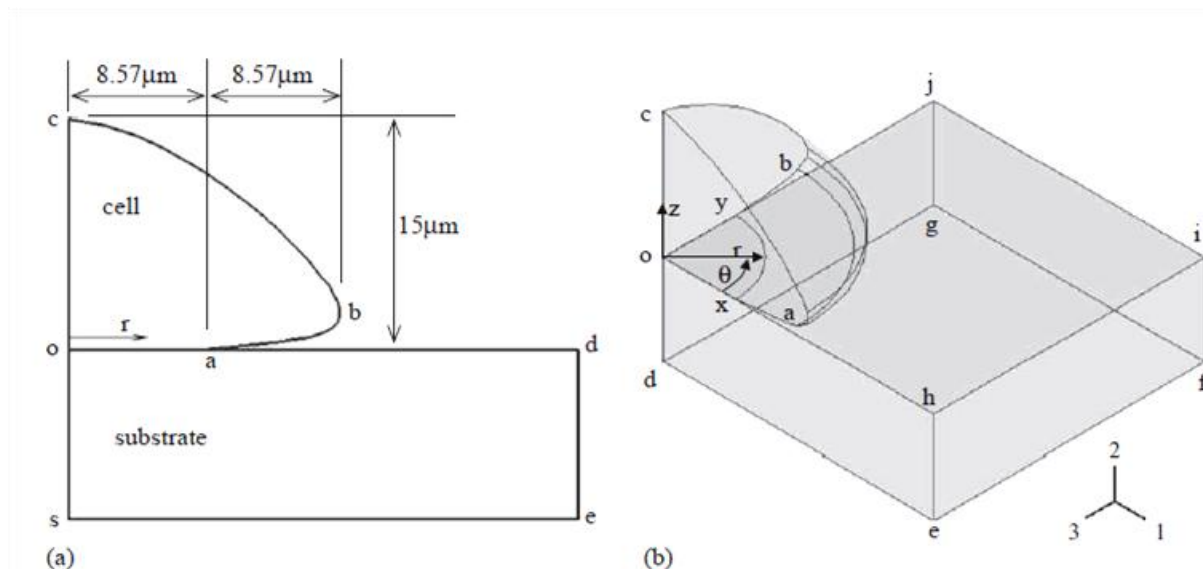


Fig. 1.12 (a) la geometria del modello cellula-substrato nelle due dimensioni, (b) la geometria del modello cellula-substrato nelle tre dimensioni [15].

Un allungamento ciclico del substrato è stato generato dall'applicazione di uno spostamento imposto sinusoidale. Come è stato detto in precedenza due modi di deformazione sono stati implementati in questo studio come si può vedere dalla prossima figura: un allungamento semplice che comporta a una contrazione nella direzione laterale a causa dell'effetto di Poisson, e una deformazione uniassiale in cui vi è l'allungamento nella direzione voluta ma non la contrazione.

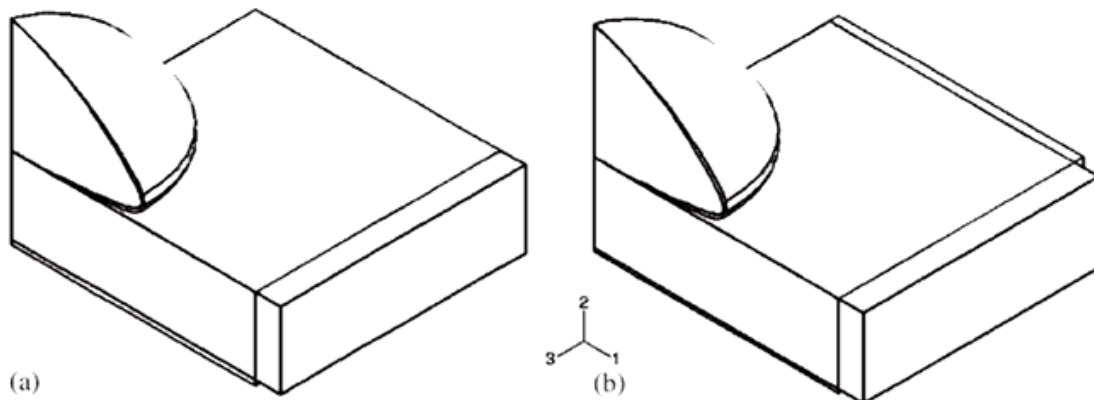


Fig. 1.13 (a) la deformazione monoassiale del substrato, (b) la deformazione biassiale del substrato [15].

Le cellule e il substrato sono stati discretizzati usando elementi quadrilateri a 4 nodi nelle due dimensioni, ed elementi esagonali a 8 nodi per il modello tridimensionale. Sono stati utilizzati elementi di primo ordine poiché per i problemi di contatto sono più robusti rispetto a quelli del secondo ordine. A causa del comportamento quasi incomprimibile del materiale si è optato di utilizzare elementi ibridi. A causa della natura ciclica del problema è stata usata una mesh grossolana, in modo da ridurre l'onere computazionale dell'analisi.

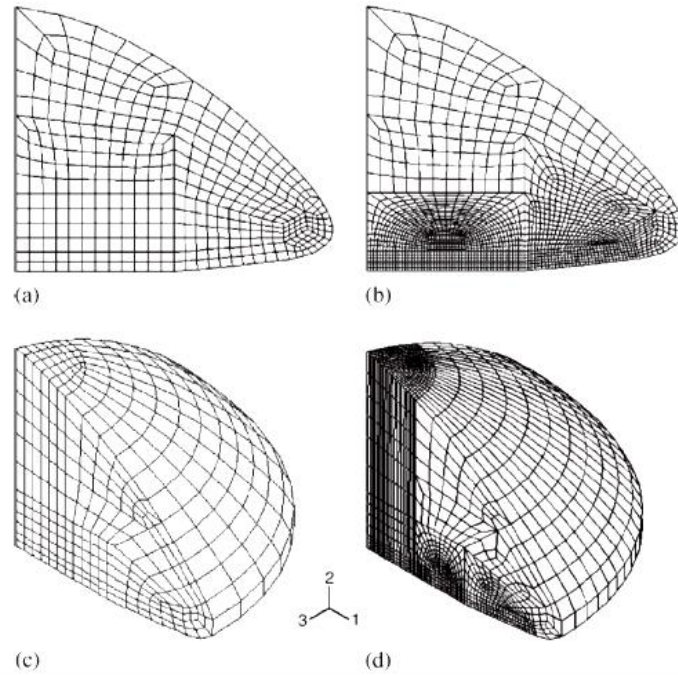


Fig. 1.14 Differenti tipi di mesh utilizzata per la discretizzazione della cellula nell'analisi a elementi finiti **(a, c)** mesh con elementi di lunghezza pari a $0.714 \mu\text{m}$; **(b, d)** mesh con elementi di lunghezza pari a $0.171 \mu\text{m}$ [15].

Come si può vedere è richiesto un affinamento della mesh nelle zone di contatto per permettere di valutare meglio il comportamento della cellula, senza perdita di accuratezza. Il substrato di silicio è stato modellato come un materiale elastico con modulo di Young pari a 2.5 MPa e rapporto di Poisson di 0.4 . A causa della maggiore rigidità rispetto alla cellula e della maggiore regolarità della geometria è stato scelto di utilizzare una mesh grossolana con elementi di lunghezza pari a $5.36 \mu\text{m}$.

Di seguito possiamo notare come varia la componente di deformazione logaritmica nella direzione dell'allungamento ciclico imposto dopo una serie di cicli. Le immagini mostrano che all'aumentare del numero di cicli aumentano anche le deformazioni residue.

Sono riportate di seguito anche le immagini relative alle deformazioni residue: nel primo caso con deformazione monoassiale, nel secondo caso con deformazione biassiale.

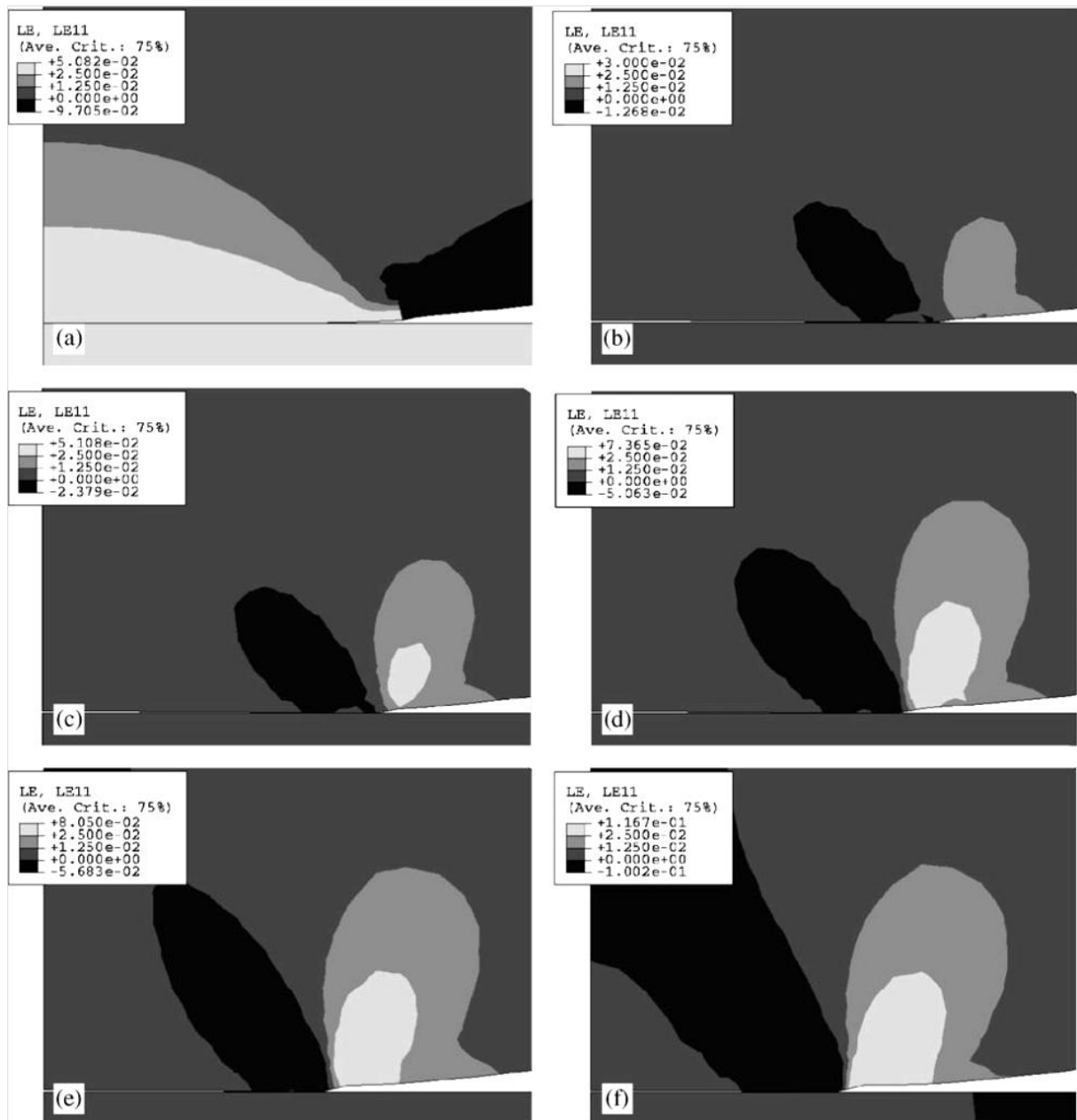


Fig. 1.15 Immagini relative alle deformazioni secondo la direzione di allungamento per (a) 0.5 cicli, (b) 1 ciclo, (c) 3 cicli, (d) 10 cicli, (e) 50 cicli e (f) 1000 cicli [15].

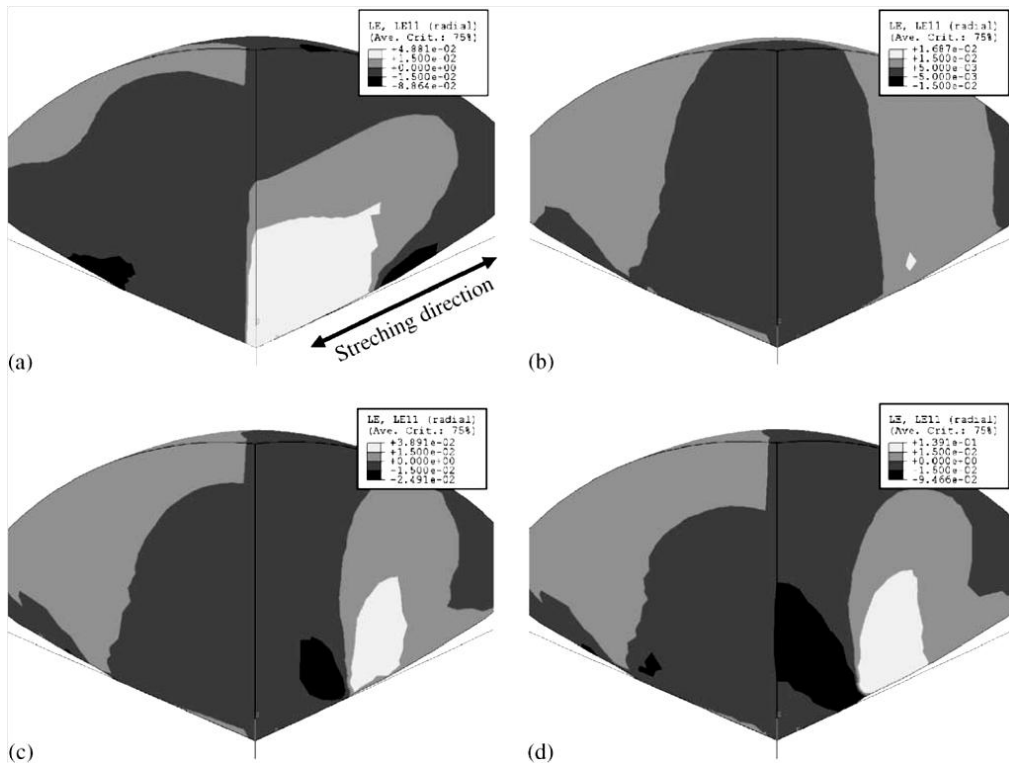


Fig. 1.16 Immagini relative alle deformazioni secondo la direzione di allungamento per la prova monoassiale per (a) 0.5 cicli, (b) 1 ciclo, (c) 10 cicli, (d) 120 cicli [15].

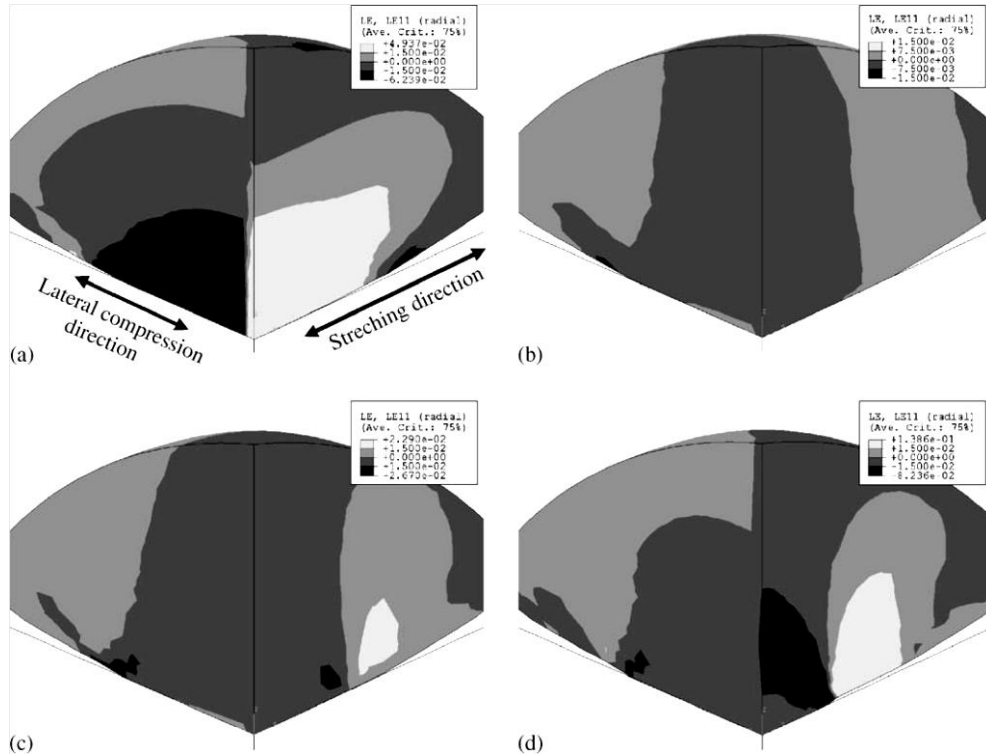


Fig. 1.17 Immagini relative alle deformazioni secondo la direzione di allungamento per la prova biassiale per (a) 0.5 cicli, (b) 1 ciclo, (c) 10 cicli, (d) 120 cicli [15].

L'allungamento del substrato provoca una rottura dei legami tra il substrato e la cellula e il conseguente accumulo di deformazioni dovute alla viscoelasticità della cellula che impediscono il riattacco completo della cellula al substrato al termine di ogni ciclo. Le deformazioni aumentano all'aumentare del numero di cicli.

Le simulazioni prevedono una significativa evoluzione e cambiamento nell'area di contatto cellula-substrato, ma non prevedono un cambiamento significativo nella morfologia della cellula stessa. Tuttavia data l'importanza del contatto cellula-substrato nella segnalazione cellulare i risultati suggeriscono che le forti variazioni dell'area di contatto potrebbe essere uno dei meccanismi coinvolti nel riorientamento delle cellule. Il processo di riorientamento della cellula avviene in due fasi [18]: la fase uno è la riorganizzazione del citoscheletro delle cellule, compreso i filamenti di actina, dove i filamenti stessi si orientano nella direzione della deformazione minima del substrato, e la seconda fase è un riorientamento macroscopico della cellula stessa nella direzione della deformazione minima.

In termini di indagine sperimentale, una indagine più approfondita sull'effetto della deformazione ciclica del substrato sull'allineamento della cellula porterebbe una migliore comprensione sul ruolo della viscoelasticità della cellula nel processo.

1.6 ANALISI DELLE PROPRIETA' MECCANICHE NONLINEARI DEL MATERIALE COSTITUENTE IL SUBSTRATO CON MODELLI FEM

Come abbiamo citato in precedenza la rigidità del substrato è un fattore importante che influenza il comportamento della cellula, e tutte le funzioni che ne derivano. Quindi è stato interessante andare a valutare l'influenza delle differenti rigidità del substrato sulle cellule. L'articolo di seguito presentato mostra tecniche di simulazioni FEM per modellare substrati con differenti rigidità, analizzando la bontà dei risultati ottenuti con misure sperimentali [19]. Vengono determinate le proprietà meccaniche nonlineari del PDMS con differenti rapporti di base/reticolante. I substrati sono stati sottoposti a una tensione uniassiale ciclica e conseguentemente a un test a rottura. La seguente figura mostra le curve sforzo-deformazione di PDMS preparati con diversi rapporti di base/reticolante. Sono state eseguite in sequenza dieci ripetizioni cicliche di trazione monoassiale e tensione a rottura. I dati sperimentali sono stati calcolati automaticamente.

Per il campione PDMS 5:1, ci sono state notevoli differenze nello stress per lo stesso livello di deformazione nelle curve di carico-scarico durante il primo ciclo con deformazione fissata del 100%, ma l'effetto è diminuito già a partire dal secondo ciclo, come mostra la seguente figura. Per i PDMS 10:1 e PDMS 15:1 è stata applicato sempre un carico ciclico carico-scarico con deformazione del 100%, ma le differenze nel primo ciclo tra carico e scarico erano minori rispetto al PDMS 5:1. Inoltre per il PDMS 5:1 il limite di snervamento è risultato più grande per deformazione applicata più bassa rispetto al secondo e al terzo provino di PDMS. Da questi risultati, è stato concluso che le proprietà meccaniche del PDMS sono controllabili, l'isteresi può essere ridotta, la deformazione di snervamento può essere aumentata in condizioni di stress basso, aumentando o diminuendo il rapporto tra la base e gli agenti reticolanti.

I vari tipi di substrati sono poi stati analizzati con differenti tipi di modelli costitutivi disponibili in letteratura. In questo articolo sono confrontati tre differenti modelli iperelastici:

- Modello neo-Hookean
- Modello di Mooney-Rivlin (di terzo ordine)
- Modello di Ogden (di secondo ordine)

Tabella 1.3 Costanti dei vari modelli utilizzati in questo articolo [19].

Modello	Costanti del materiale	PDMS-AB (Base polymer:curing agent)		
		5:1	10:1	15:1
neo-Hookean	C_{10} (Mpa)	0.208978	0.0705019	0.0929535
Mooney-Rivlin	C_{10} (Mpa)	0	0.0308307	0.0013643
	C_{01} (Mpa)	0.1342	0	0.0878638
Ogden	C_{11} (Mpa)	0.0889167	0.0269727	0.0109259
	μ_1 (Mpa)	0.0003428	63.4885	0.244339
	μ_2 (Mpa)	0.131615	0.041103	0.0146323
	α_1	7.7991	6.371e-10	1.01795
	α_2	3.6718	3.81166	3.74094
	Bulk modulus (Mpa)	1214.84	962	739

I risultati mostrano che tutti e tre i modelli sono accettabili per le regioni di piccole deformazioni lineari. Il modello neo-Hookean è preferibile nella zone di piccole deformazioni, se consideriamo il numero di coefficienti richiesti e il tempo di calcolo. Nella zona di non linearità e grandi deformazioni il modello Ogden di secondo ordine descrive bene il comportamento meccanico. In questo articolo si è concluso che per grandi deformazioni e non linearità il modello più adeguato è il modello Ogden di secondo grado.

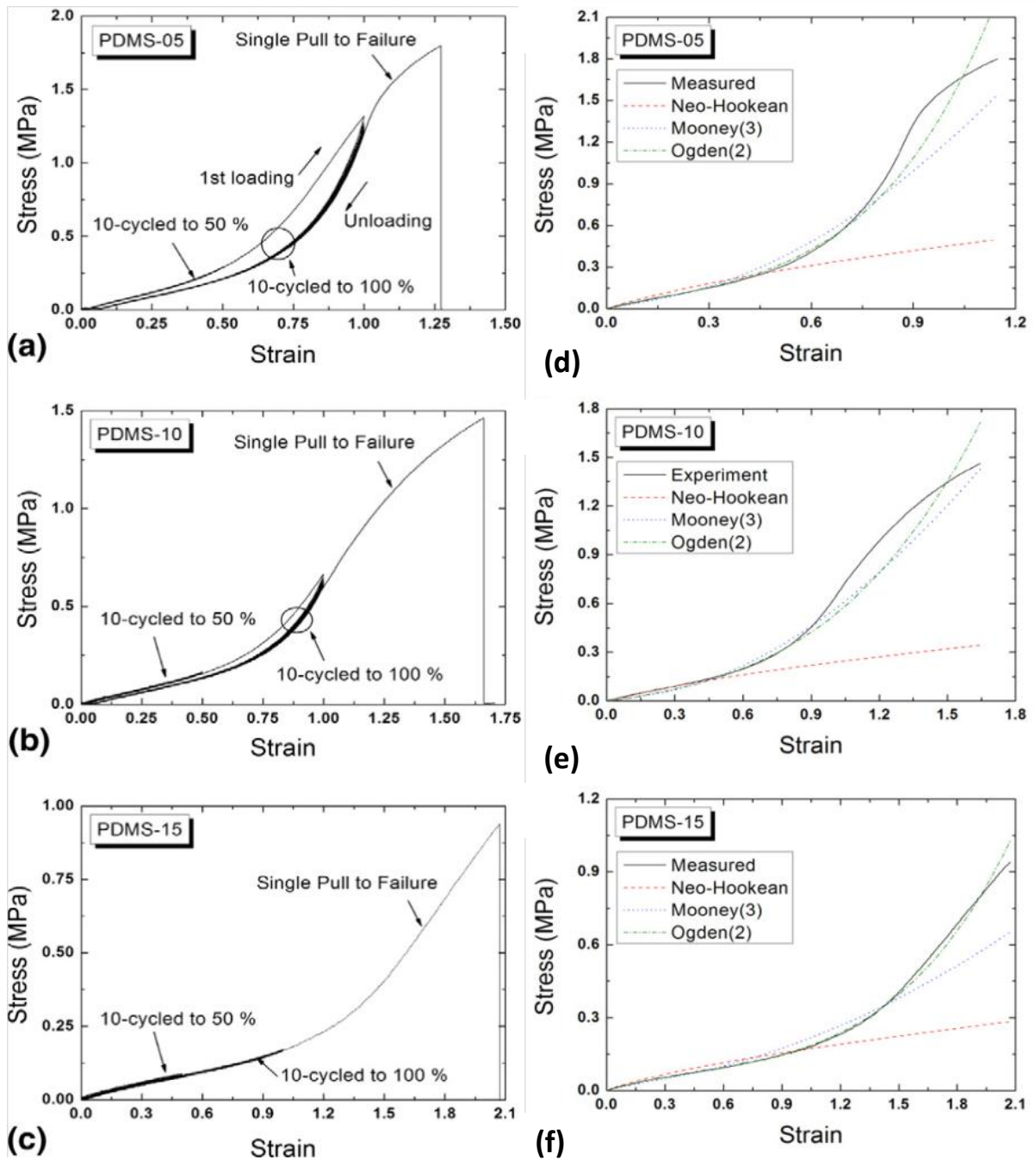


Fig. 1.18 A sinistra curve tensione deformazione per campioni di PDMS con differenti rapporti base/agenti reticolanti. A destra fitting non lineare dei risultati ottenuti dai tre campioni di PDMS a confronto con i tre tipi di modelli utilizzati [19].

1.7 PRESENTAZIONE DEI PROBLEMI TRATTATI

A dimostrazione dell'importanza del substrato al fine di caratterizzare il comportamento delle cellule, in questo lavoro di tesi si è andato a analizzare il comportamento meccanico del substrato in risposta a differenti test meccanici.

Di seguito analizzeremo attraverso l'utilizzo di simulazioni FEM la risposta meccanica di substrati di PDMS. Il nostro scopo è stato quindi quello di valutare la bontà della geometria e delle caratteristiche del materiale, evitando di svolgere i test in laboratorio, portando a una riduzione dei costi e dei tempi.

Per prima cosa abbiamo analizzato la differenza tra due tipi di PDMS di seguito utilizzati:

- PDMS 5:1
- PDMS 10:1

Questi due tipi di PDMS si differenziano in base al rapporto base/agente reticolante come spiegheremo in seguito. Questi PDMS sono stati testati per test monoassiali e per test equibiassiali, valutando le curve tensione/deformazione e analizzando le differenze.

Si è passato poi all'analisi dei PDMS con una prova di gonfiamento. Sono state analizzate le deformazioni e gli spostamenti valutando ancora una volta la differenza tra i due tipi di substrati e le differenti geometrie utilizzate per la membrana.

Per secondo si è analizzato uno scaffold sottoposto a un test di trazione monoassiale e se ne sono valutate le deformazioni le tensioni, gli spostamenti e le reazioni vincolari.

CAPITOLO 2

BIOMATERIALI PER LA COSTRUZIONE DI SCAFFOLDS CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL PDMS

2.1 SCAFFOLD

Grazie allo sviluppo crescente delle tecniche di coltura, nell'ingegneria tessutale si è potuto ricreare tessuti ed organi dal prelievo di poche cellule provenienti da un donatore. Le cellule possono derivare dallo stesso paziente, e allora si parla di trapianto autologo, o derivare da un donatore esterno, e allora si parla di trapianto allogenico. Le cellule però, per proliferare, richiedono degli ambienti specifici e controllati, per questo motivo è necessaria la presenza di substrati, di materiale e forma adeguati, che forniscano un supporto in grado di ospitare e promuovere la proliferazione e il differenziamento delle cellule. Tali supporti prendono il nome di *scaffold*. Questi scaffolds hanno la funzione di ricreare una matrice extracellulare sintetica, che imiti quella naturale organizzando le cellule in una architettura tridimensionale e rilasciando sostanze che dirigono la crescita e la formazione del tessuto desiderato. I substrati sintetici hanno dunque un'importanza cruciale nel generare il tessuto o l'organo desiderato. Nella progettazione degli scaffolds bisogna tener conto di diversi requisiti, infatti oltre a fornire un supporto per la crescita cellulare, lo scaffold deve essere in grado di differenziare le cellule che vengono fatte aderire, deve inoltre rispondere a delle caratteristiche meccaniche specifiche a seconda del tessuto che si vuole rigenerare e della zona in cui sarà impiantato. Molti altri fattori devono essere considerati nella progettazione dei supporti, alcuni dei quali sono stati già elencati nel precedente capitolo (cristallinità, morfologia, rigidità del substrato, bagnabilità e carica della superficie). Il futuro degli scaffolds si dirige verso la costruzione di substrati 3D che grazie alla presenza di segnali molecolari favoriscono la crescita delle cellule formando strutture del tessuto desiderato, in modo riproducibile, economico e su larga scala [20].

Idealmente uno scaffold dovrebbe avere le seguenti caratteristiche [21]:

- biocompatibilità appropriata, senza comportare una reazione avversa nel tessuto ospite;
- tridimensionale e ad alta porosità, con una rete di pori interconnessi per la crescita di cellule e tessuti, per il trasporto dei nutrienti e delle scorie metaboliche;
- biodegradabile o bioriassorbibile con un tasso di riassorbimento controllabile in modo che la degradazione del substrato proceda in parallelo con la crescita di cellule e tessuti, sia in vivo che in vitro;
- una chimica di superficie adatta per l'adesione, per la proliferazione e per il differenziamento delle cellule;
- proprietà meccaniche che imitino quelle del sito di impianto;
- facilmente lavorabili in modo da creare diverse forme e dimensioni.

Lo studio in questa tesi si è concentrato sull'analisi delle caratteristiche meccaniche degli scaffolds in risposta a diverse sollecitazioni.

2.1.1 VANTAGGI E SVANTAGGI DEGLI SCAFFOLD

Come abbiamo visto in precedenza la presenza degli scaffolds è necessaria al fine di permettere la coltura di cellule in vitro. L'utilizzo di questi scaffolds presenta alcuni vantaggi e svantaggi [22].

I principali vantaggi sono:

- lo scaffold rappresenta un substrato, necessario all'adesione e alla proliferazione cellulare;
- uno scaffold poroso è un ambiente di deposizione cellulare ideale;
- lo scaffold oltre a favorire l'adesione cellulare permette la trasmissione di segnali che migliorano la migrazione e la differenziazione cellulare;
- uno scaffold permette di creare una specifica struttura, anche tridimensionale, che deve corrispondere alla struttura del tessuto che deve essere formato;

- si può costruire un supporto con la rigidità richiesta, in modo da conferire buone proprietà meccaniche all'impianto.

I principali svantaggi sono:

- in uno scaffold non si può controllare o migliorare la vascolarizzazione dei tessuti ingegnerizzati in via di formazione;
- non è possibile controllare la corretta e precisa deposizione delle cellule nello scaffold;
- con le tecniche tradizionali è praticamente impossibile ricreare strutture multi-tessutali come può essere quella di un organo;
- la rigidità del supporto è un parametro importante che influisce sulla risposta cellulare;
- lo scaffold all'interno del corpo umano subisce un processo di degradazione, che comporta inevitabilmente un processo infiammatorio.

2.2 BIOMATERIALI UTILIZZATI PER LA COSTRUZIONE DEGLI SCAFFOLDS

Uno dei fattori più importanti che influenza le proprietà degli scaffolds è senza dubbio il materiale utilizzato. A seconda del tipo di tessuto da ricreare e delle sue applicazioni specifiche, verranno utilizzati materiali differenti. I materiali utilizzati nella costruzione degli scaffolds devono possedere una serie di caratteristiche, tra cui la più importante è la *biocompatibilità*, che verrà di seguito spiegata.

I materiali che possono essere utilizzati nella costruzione dei supporti, nel campo dell'ingegneria tessutale e nella medicina rigenerativa, vengono chiamati biomateriali, ovvero materiali che permettono di costruire strutture capaci di sostituire una parte vivente originaria del corpo umano. Una definizione di biomateriale può essere la seguente:

“materiali sintetici per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici, che minimizzano le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo” [23].

I biomateriali più comuni sono:

- metalli (acciai inossidabili, leghe di cobalto, leghe di titanio);

- ceramici (allumina, zirconia, fosfato di calcio, biovetri);
- polimeri;
- compositi.

Tabella 2.1 Riassunto dei biomateriali utilizzati con elenco dei vantaggi e svantaggi legati al loro utilizzo e applicazioni.

Materiali	Vantaggi	Svantaggi	Applicazioni
Metalli (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)	Elevate caratteristiche meccaniche, resistenza alla usura	Scarsa biocompatibilità, alta densità di massa, facilità di corrosione in ambiente fisiologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia e odontoiatria
Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri)	Tenacia, bassa densità, facilità di lavorazione	Bassa resistenza meccanica, degradabilità nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa, dispositivi per il trattamento del sangue
Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carboni)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza alla compressione, resistenza alla corrosione	Bassa affidabilità meccanica, bassa resistenza alla trazione impulsiva, alta densità di massa, fragilità, difficoltà di lavorazione	Protesi d'anca, protesi dentali, dispositivi percutanei
Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficoltà di lavorazione	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache)	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari, protesi valvolari, rivestimenti

2.2.1 LA BIOCOMPATIBILITA'

Un concetto fondamentale a cui ogni biomateriale deve rispondere è la biocompatibilità. La biocompatibilità di un materiale consiste nella caratteristica di stabilire interazioni non sfavorevoli con i sistemi viventi con i quali viene in contatto. La biocompatibilità è un requisito fondamentale, legato alla necessità di migliorare e ripristinare una determinata funzione biologica, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo. Il grado di biocompatibilità è funzione della forma, della struttura, della composizione chimica, delle proprietà fisiche, meccaniche ed elettriche del materiale. Il grado di biocompatibilità dipende inoltre dal sito di impianto nell'organismo e dal tipo di applicazione.

Sfortunatamente, non si hanno a disposizione metodi per misurare la biocompatibilità, poichè non è una grandezza misurabile. Molto spesso la biocompatibilità viene determinata in base alle prestazioni e al successo di un materiale in uno specifico caso [23].

2.2.2 POLIMERI

Come abbiamo spiegato anche nel primo capitolo il nostro interesse si sofferma sull'uso di materiali polimerici, in quanto il PDMS fa parte della grande famiglia dei polimeri.

I materiali polimerici sono costituiti da molecole ad elevato peso molecolare, generalmente organiche, dette macromolecole. Le macromolecole si originano dal concatenamento di un gran numero di piccole unità, dette monomeri⁷, che formano catene che possono essere anche lunghissime. Le catene dei monomeri si possono disporre in modo da formare polimeri:

- lineari;
- ramificati;
- reticolati.

I materiali polimerici trovano un vasto uso come biomateriali in molte applicazioni che riguardano la medicina rigenerativa. Essi possono essere prodotti sotto forma di fibre, tessuti, film, barre e liquidi viscosi [23].

⁷ Col termine monomero si definisce una molecola semplice dotata di gruppi funzionali tali per cui sia in grado di combinarsi ricorsivamente con altre molecole a formare macromolecole.

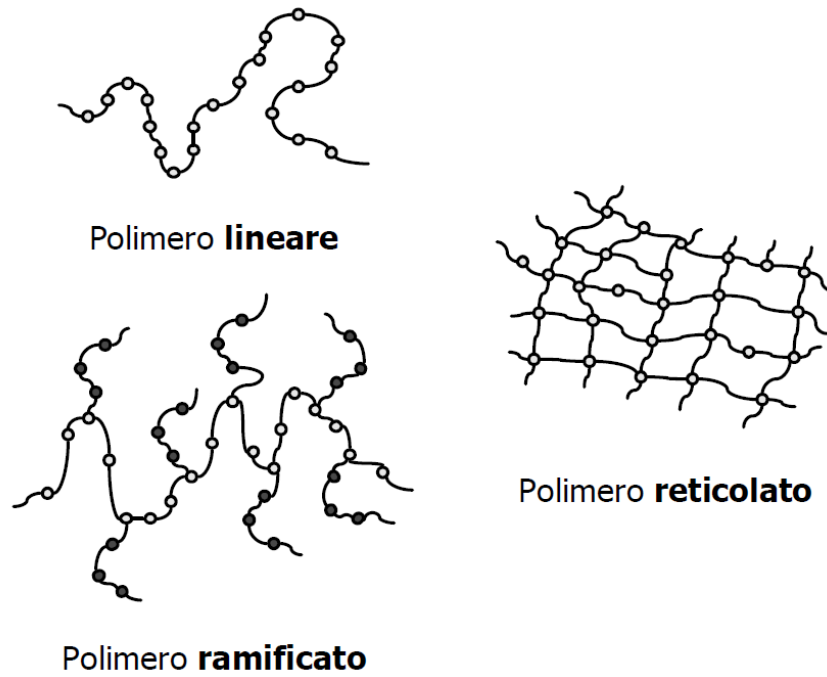


Fig. 2.1 Classificazione dei polimeri in base alla struttura della catena.

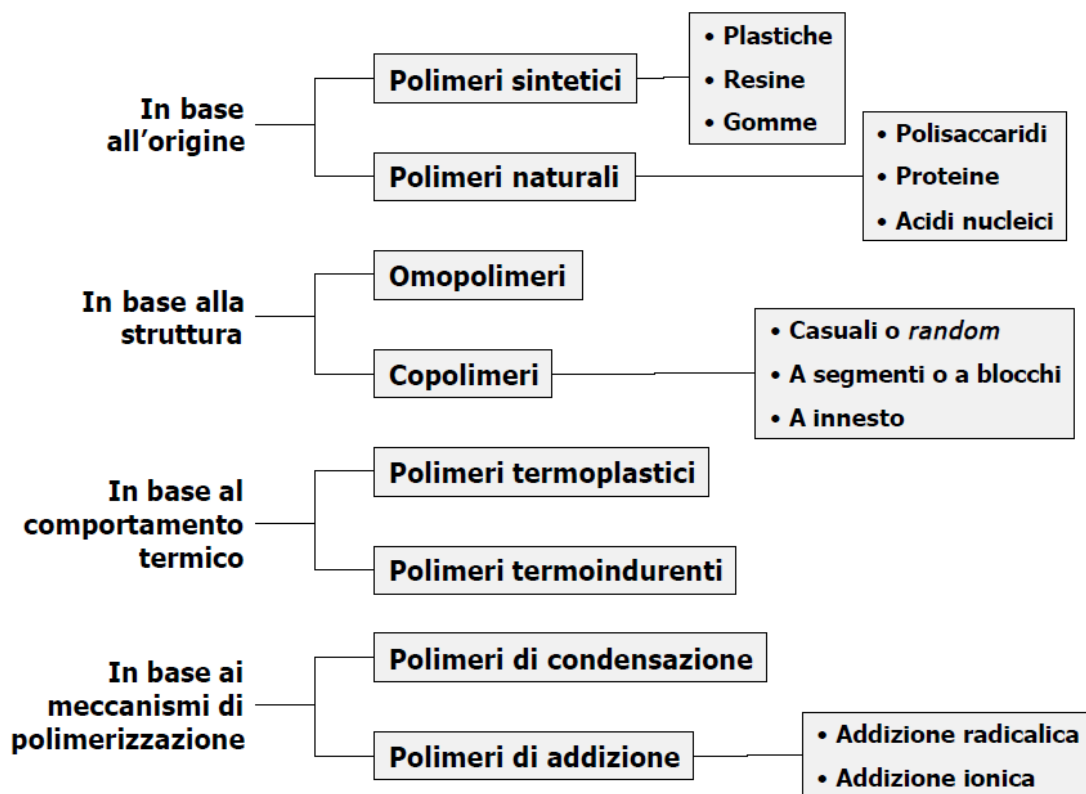


Fig. 2.2 Classificazione dei polimeri.

Lo stato fisico di un polimero dipende strettamente dalla posizione e dalla mobilità delle catene che lo costituiscono. Due aspetti caratterizzano ogni singolo filamento:

- la struttura della catena, se essa cioè è lineare (catena estesa), o ripiegata (*folded chain*), o a gomito;
- il tipo di interazioni esistenti tra le diverse catene, che possono essere forze di Van der Waals, dipolo-dipolo, ioniche, legami a idrogeno, ecc.

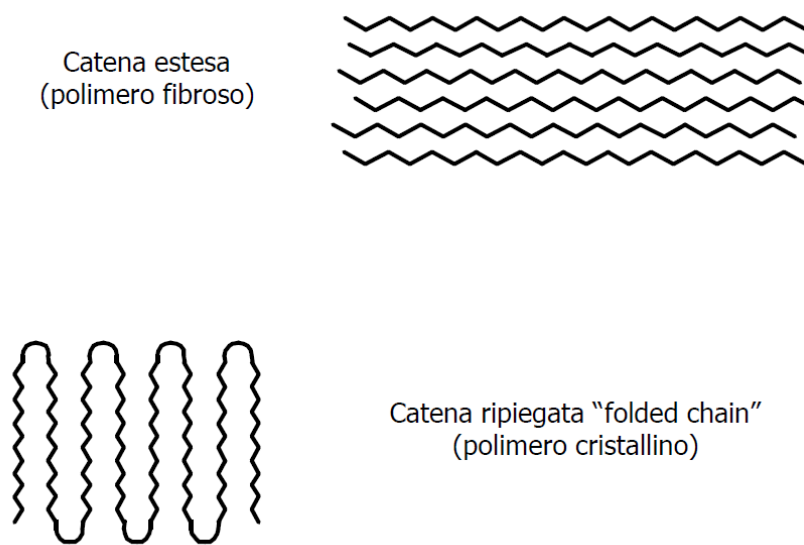


Fig. 2.3 Struttura della catena polimerica.

Nei polimeri, la caratteristica che condiziona in maniera maggiore le proprietà allo stato solido è la dimensione delle molecole.

Infatti, nel processo di passaggio dallo stato liquido a quello solido:

- la viscosità di un materiale polimerico aumenta;
- le macromolecole, a causa delle loro dimensioni, hanno difficoltà a muoversi e a sistemarsi con una regolarità tale da formare un cristallo.

Di conseguenza:

- le lunghe catene si ingarbugliano e le situazioni limite, corrispondenti al perfetto stato cristallino e allo stato completamente amorfo, non possono essere raggiunte dai polimeri se non in casi rari e particolari;
- al variare della temperatura, i polimeri passano dallo stato vetroso allo stato semifluido.

Gli impianti costituiti da biomateriali polimerici posseggono alcuni vantaggi [24]:

- capacità di produrre substrati in diverse forme (solidi, film, network, ecc.);
- possibilità di controllare le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche concatenando due o più monomeri differenti nella stessa catena polimerica (copolimeri);
- non subiscono la corrosione;
- la densità dei polimeri è simile a quella dei tessuti naturali;
- ai polimeri si possono legare delle sostanze che possono rendere i substrati sintetici il più possibile simili ai tessuti naturali.

Gli svantaggi sono invece:

- il basso modulo elastico che impedisce l'uso dei polimeri nelle applicazioni dove è richiesta una grande resistenza meccanica;
- sono facilmente biodegradabili nel corpo a causa della natura stessa della polimerizzazione;
- non è possibile creare polimeri senza utilizzare additivi, antiossidanti e plasticizzanti.

I polimeri possono presentare diverse strutture, che influenzano di conseguenza le proprietà meccaniche che possiedono.

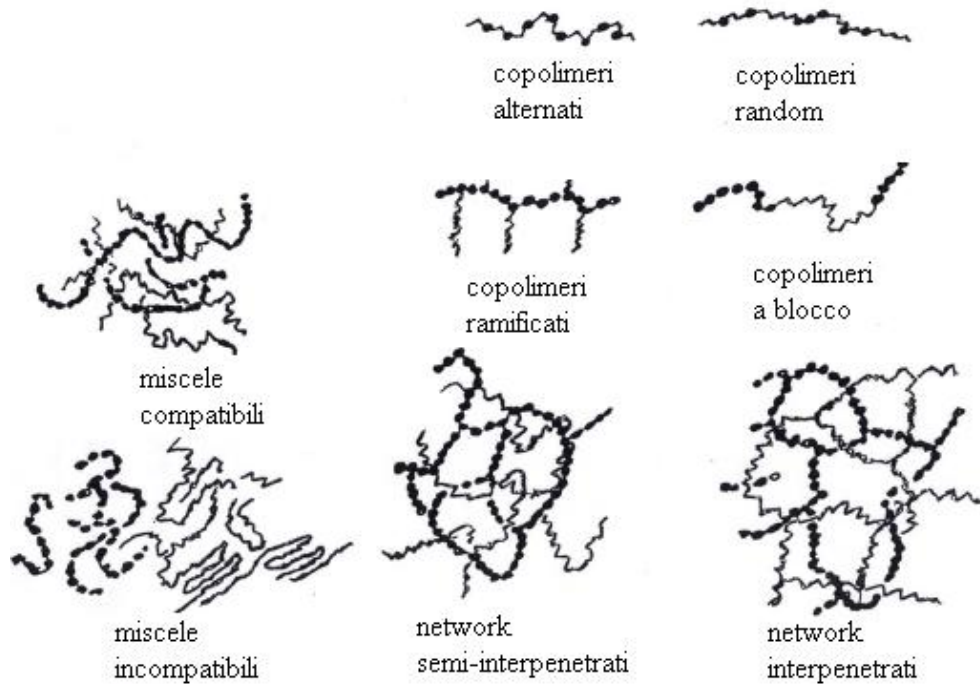


Fig. 2.4 Diverse morfologie in cui possono presentarsi i polimeri

2.2.2.1 PDMS

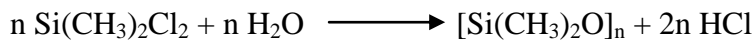
Il materiale utilizzato in questa tesi per le prove di simulazione è il polidimetilsilossano (PDMS), che è il silicone più utilizzato nell'ambito della bioingegneria, ed è particolarmente noto per le sue ottime proprietà.

Le sue applicazioni sono molto varie e vanno dalle lenti a contatto a dei substrati utilizzati per la semina cellulare in vitro.

Il polidimetilsilossano (PDMS) appartiene alla classe dei polisilossani⁸. Inizialmente questo gruppo di materiali fu chiamato silicochetoni o siliconi, ma poiché essi non contenevano un legame doppio, questa definizione non risultava appropriata e quindi in seguito si è fatto riferimento a questa classe col nome di silossani o polisilossani. Il PDMS si ottiene per

⁸ I siliconi o polisilossani sono una particolare classe di polimeri inorganici basati su una catena silicio-ossigeno e gruppi funzionali organici (R) legati agli atomi di silicio.

idrolisi⁹ del dimetilclorosilano, ottenendo silossani ciclici e lineari che successivamente polimerizzati danno luogo ai polimeri siliconici. La reazione che avviene è la seguente:



Il polimero PDMS è formato dalla sequenza del seguente monomero:

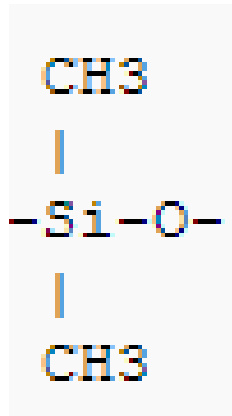


Fig. 2.5 Monomero del polidimetilsilossano.

Il PDMS è un elastomero con una buona stabilità termica, caratterizzato da una notevole resistenza agli attacchi chimici, all'ossidazione, è un ottimo isolante elettrico e resistente all'invecchiamento. Inoltre possiede buona trasparenza, è biocompatibile, inerte, non è né tossico né infiammabile.

La rigidità del polimero è influenzata direttamente dalla quantità dei cross-link presenti in esso. Per variare la densità dei cross-link si va a regolare la concentrazione del polimero base e degli agenti reticolanti. Ovviamente minore sarà il grado di reticolazione del network, meno rigido sarà il substrato. Viceversa, maggiore sarà il grado di reticolazione, più rigido sarà il substrato.

Il più diffuso network di PDMS in ricerca è il PDMS 10:1, che significa dieci masse di polimero base con una massa di agente reticolante [25].

⁹ L'idrolisi è il termine con cui si indicano un insieme di reazioni chimiche in cui le molecole vengono scisse in due o più parti per effetto dell'acqua. Può essere considerata come la reazione inversa della reazione di condensazione.

Nel nostro studio di simulazione ci è interessato in particolare andare a valutare i comportamenti meccanici di due tipi di PDMS:

- il PDMS 5:1;
- il PDMS 10:1.

2.3 PROPRIETA' MECCANICHE DEL PDMS

Di seguito ci soffermiamo sulle proprietà meccaniche del PDMS al variare delle caratteristiche del polimero.

2.3.1 CURVA TENSIONE DEFORMAZIONE E INCOMPRIMIBILITA'

Un tipico andamento della curva tensione-deformazione per il PDMS, è il seguente.

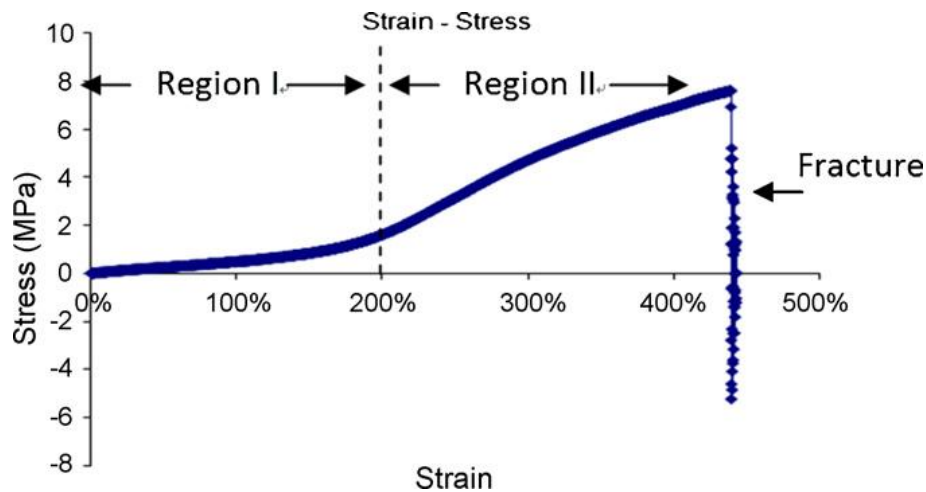


Fig. 2.6 Curva tensione ingegneristica-deformazione nominale per il PDMS [26].

Il modulo di Young viene determinato dal diagramma sforzo-deformazione, mediante la legge di Hooke, nel tratto in cui il materiale subisce una deformazione elastica lineare.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (2.1)$$

dove σ è la tensione e ε è la deformazione.

Come si può notare dalla figura riportata sopra ci sono due differenti regioni: la prima è in prima approssimazione lineare e la pendenza è piccola, ciò significa che ad una applicazione di una piccola tensione la deformazione risultante è molto grande. Tuttavia quando la deformazione supera una certa soglia (circa il 200%), l'aumento della tensione applicata provoca uno slittamento delle catene del polimero, che assorbe una parte del lavoro meccanico applicato. Quindi a differenza della prima regione, nella seconda regione l'andamento non è più lineare e per ottenere un incremento di deformazione uguale, bisogna applicare una differenza di tensione maggiore. Possiamo anche notare che se la tensione non supera i 2 MPa, il PDMS si ritrova nella prima regione, oltre i 2 MPa invece ci ritroviamo nella seconda regione. All'aumentare della tensione aumenta anche la deformazione fino a un punto in cui si verifica la rottura del campione, la tensione a cui si verifica questa rottura viene chiamato UTS (*ultimate tensile stress*), e l'elongazione massima del provino viene chiamata elongazione a frattura.

Molti elastomeri sono incomprimibili, ovvero per qualsiasi trasformazione il volume rimane costante. È quindi essenziale stabilire il grado di incomprimibilità del materiale in esame. La comprimibilità di un materiale viene valutata dal rapporto del *bulk modulus* iniziale k_0 e il modulo di taglio iniziale μ_0 . Questo rapporto viene espresso in termini di coefficiente di Poisson (ν), che misura in presenza di una sollecitazione monodirezionale longitudinale, il grado di restringimento trasversale del campione [27].

$$\nu = \frac{\frac{3k_0}{\mu_0} - 2}{\frac{6k_0}{\mu_0} + 2} \quad (2.2)$$

La tabella di seguito riporta alcuni dei valori più rappresentativi.

Tabella 2.2 Valori del coefficiente di Poisson per vari materiali.

Materiale	Modulo di Poisson
gomma	~ 0.5
oro	0.42
argilla satura	0.4-0.5
magnesio	0.35
titanio	0.34
rame	0.33
lega di alluminio	0.33
argilla	0.3-0.45
acciaio inossidabile	0.3-0.31
acciaio	0.27-0.3
ghisa	0.21-0.26
sabbia	0.2-0.45
cemento	0.2
vetro	0.18-0.3
schiuma	0.1-0.4
sughero	~ 0
materiali auxetici	< 0

Nel nostro caso essendo il PDMS una gomma il coefficiente di Poisson ha un valore prossimo a 0.5; con l'assunzione che sia perfettamente incomprimibile, condizione ideale che nel nostro lavoro assumiamo, imponiamo che il coefficiente di Poisson sia $\nu = 0.5$.

2.3.2 STIMA DEL MODULO DI TAGLIO DEL PDMS

Un parametro importante del materiale da stimare è senza dubbio il modulo di taglio del materiale, che in genere viene misurato in corrispondenza di piccole deformazioni, dove la relazione tensione-deformazione è essenzialmente lineare. In particolare si è presa in considerazione l'applicazione della metodologia DIC (*digital image correlation*) per

determinare il modulo di taglio dei substrati di PDMS [28]. L'uso di questa tecnica è aumentata notevolmente negli ultimi tempi grazie allo sviluppo di telecamere CCD (*Charge Coupled Device*) ad alta risoluzione. Lo scopo in questo lavoro è stato quello di analizzare la deformazione adesiva in un *single lap joint* per stimare il modulo di taglio, usando il metodo ottico DIC. L'idea di base è quella di considerare una configurazione sperimentale che genera un taglio puro. Nell'analisi viene utilizzato come polimero il PDMS e lo si è analizzato nella zona in cui il comportamento corrisponde ad un solido perfettamente elastico. Al fine di lavorare nelle suddette ipotesi, l'esperimento è stato condotto a temperatura ambiente, considerando la condizione di piccole deformazioni e processi quasi statici.

Il setup sperimentale per determinare il modulo di taglio del substrato polimerico è il seguente.

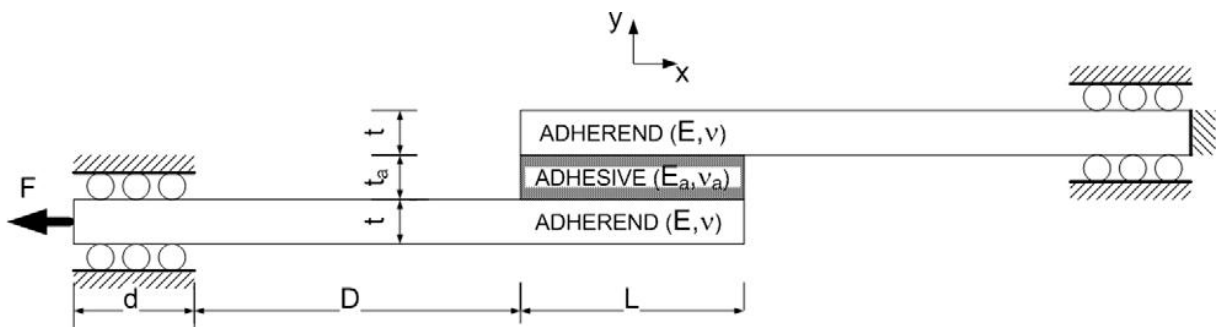


Fig. 2.7 Setup sperimentale di un tipico single lap joint [28].

In questo lavoro sono state fatte le seguenti assunzioni:

- il modulo di taglio degli *adherends* è molto più grande del modulo di taglio dell'*adhesive*;
- *adherends* e *adhesive* hanno un comportamento elastico lineare;
- il legame è perfetto nei contatti;
- sono assunti condizioni di stress piano.

Un taglio semplice può essere ottenuto usando la configurazione sperimentale presentata sopra, e con le condizioni assunte, la deformazione dell'elemento risultante, dovuta allo stress di taglio, è presentato nella prossima figura.

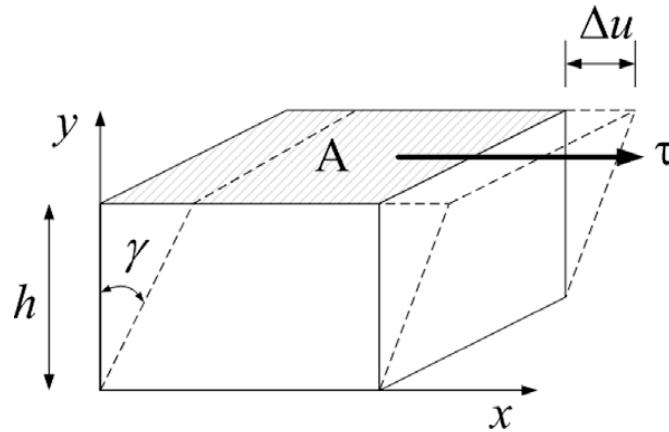


Fig. 2.8 Condizione di taglio semplice, dovuto alle assunzioni fatte in precedenza [28].

Quindi considerando condizioni di piccole deformazioni, una temperatura fissata e un processo quasi statico il comportamento meccanico del polimero ricade nell'ambito di un solido perfettamente elastico. Per materiali isotropici, omogenei, sottoposti a piccole deformazioni, la relazione che definisce il modulo di taglio è la seguente:

$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad (2.3)$$

dove $\tau = \frac{F}{A}$ è lo sforzo tagliante e $\gamma = \frac{\Delta u}{h}$ è lo scorrimento angolare. Conoscendo l'area A , lo spessore del polimero h , lo spostamento orizzontale Δu e la forza applicata F il modulo di taglio G è sempre definito. L'equazione (2.3) può essere utilizzata per ottenere il modulo di taglio, quando eseguiamo test di taglio semplici, in cui la forma del materiale cambia senza cambiamenti nel volume.

Di seguito riportiamo le immagini relative agli spostamenti (lungo $u(x, y)$ e lungo $v(x, y)$) del polimero soggetto a uno sforzo tagliante.

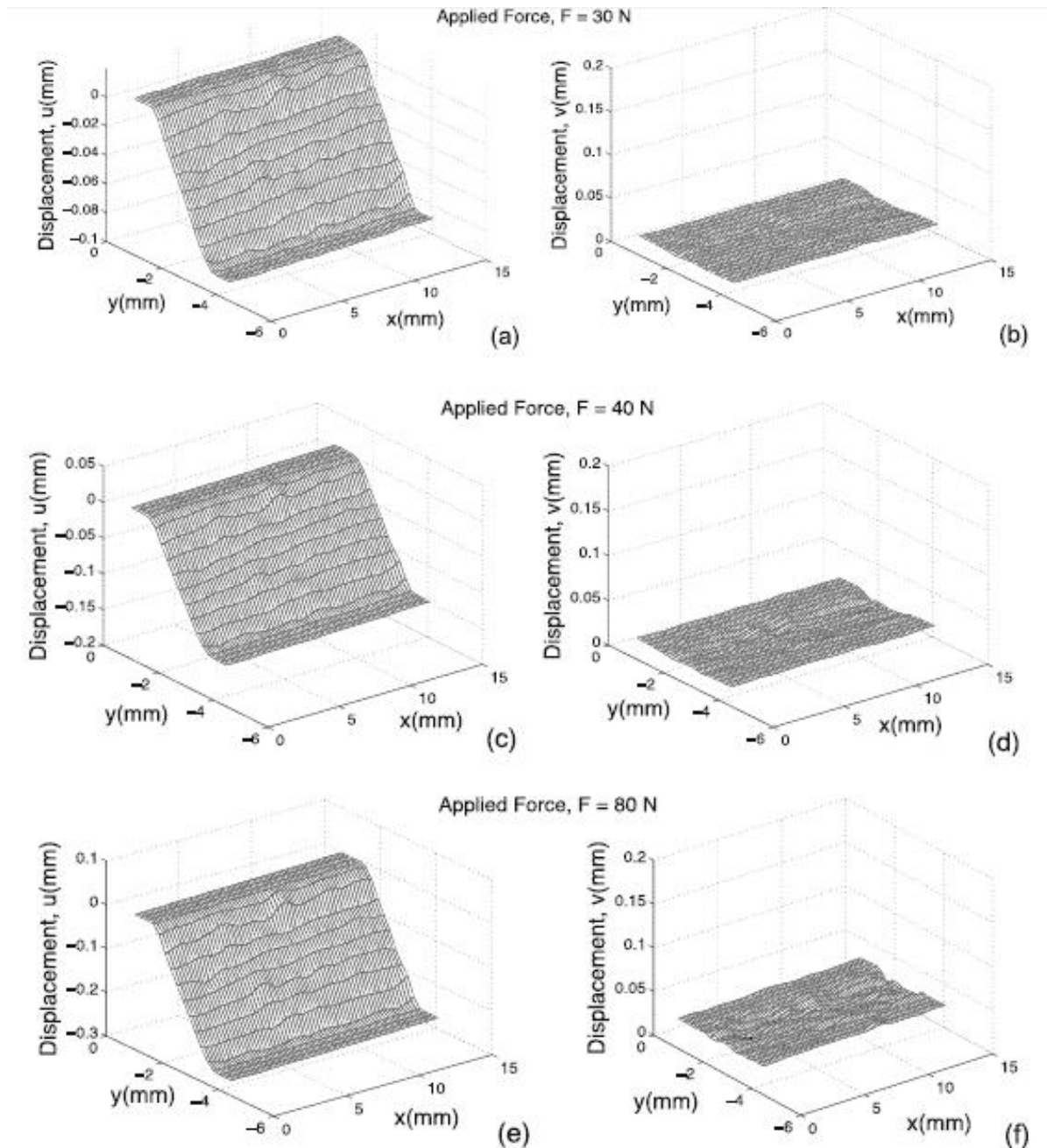


Fig. 2.9 (a, c, e) spostamenti lungo la direzione orizzontale $u(x, y)$, (b, d, f) verticale $v(x, y)$, per le forze applicate: 30 N, 40 N, 80 N [28].

Si può osservare che gli spostamenti lungo $u(x, y)$ hanno un andamento lineare in relazione alla direzione y . Per quanto riguarda gli spostamenti lungo $v(x, y)$ non ci sono significative variazioni al variare della forza applicata e non sono nemmeno rilevanti se confrontati con gli spostamenti orizzontali, sempre per effetto della configurazione del test. Quindi le

corrispondenti deformazioni verticali possono essere trascurate a confronto delle deformazioni orizzontali.

Al fine di valutare il modulo di taglio del PDMS, che è lo scopo di questo lavoro, è stata analizzata la distorsione angolare per tre differenti carichi: 30 N, 40 N e 80 N. I valori della distorsione angolare sono stati ottenuti dal rapporto degli spostamenti $u(x, y)$ e delle y .

$$u = u_0 + \frac{\partial u}{\partial y} \Delta y \quad e \quad \gamma = \frac{\partial u}{\partial y} \quad (2.4)$$

I valori del modulo di taglio sono stati calcolati grazie alla formula (2.3); e i risultati ottenuti sono stati i seguenti.

È importante notare che i valori del modulo di taglio ottenuti sono in accordo con i valori trovati nella letteratura, che per un materiale gommoso elastico, è approssimativamente di 1 MPa.

2.3.3 INFLUENZA DELLA TEMPERATURA DI RISCALDAMENTO

Il calore è normalmente utilizzato per la fabbricazione dei polimeri, come anche la reticolazione. È stato interessante andare ad analizzare l'influenza del calore fornito sulle proprietà meccaniche del polimero (modulo di Young e carico di rottura) [26].

Il PDMS è un polimero composto di due parti, un prepolimero (chiamato anche base o polimero A) ed un componente reticolante (detto anche agente indurente o parte B del componente). Una volta miscelate le due componenti, la miscela liquida ottenuta diventerà solida con un aumento della temperatura, producendo un elastomero reticolato in poche ore. In questo studio sono state testate diverse temperature per il processo di formazione del polimero. Ad esempio per il PDMS, per il quale normalmente viene utilizzata una temperatura di 80°C per due ore, sono state testate temperature maggiori, intorno ai 100-150°C per un tempo di applicazione minore. Queste attività hanno sollevato una questione: quali sono gli effetti del calore sulle proprietà strutturali del PDMS?

Gli autori di questo articolo sono andati quindi a caratterizzare le proprietà meccaniche del PDMS in funzione della temperatura e del tempo del trattamento termico.

I campioni di PDMS sono stati costruiti come mostrato dalla prossima figura.

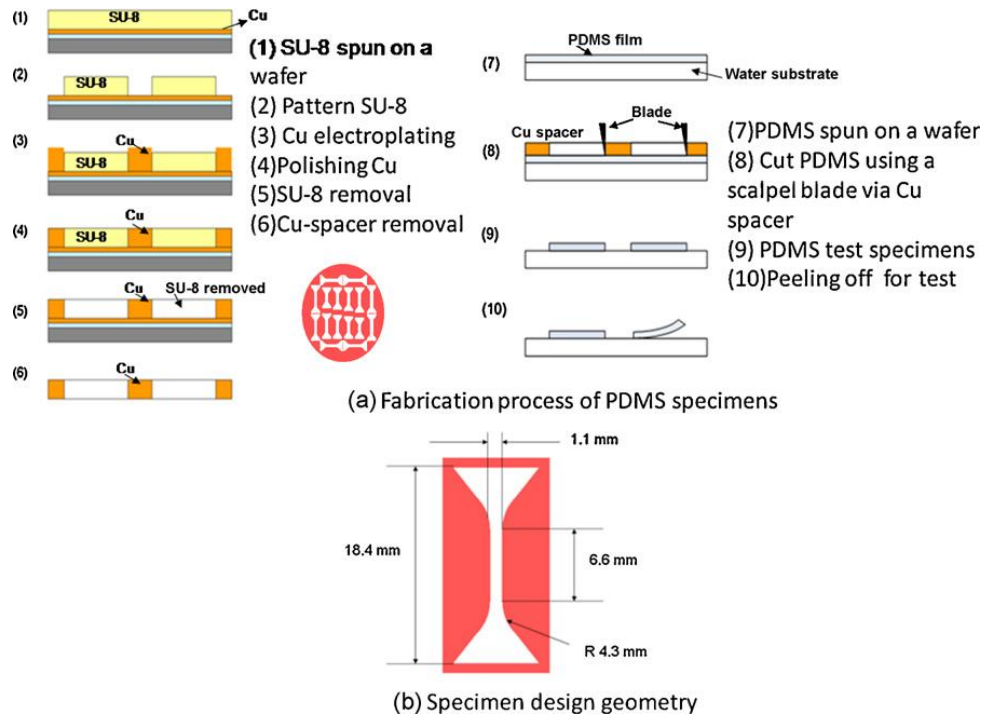


Fig. 2.10 (a) procedimento per la costruzione dei campioni di PDMS, (b) forma del campione [26].

Le temperature testate per la formazione del polimero PDMS sono: 100°C, 150°C, 200°C e 300°C.

I risultati mostrano che ad una temperatura di 100°C il modulo di Young ottenuto è il più alto, in più per questa temperatura il tempo di applicazione del calore non influenza il valore del modulo di Young. Ad una temperatura di 150°C il modulo di Young riscontrato è di circa 100 kPa inferiore a quello ottenuto con una temperatura di 100°C, e il tempo di applicazione anche in questo caso ha una scarsa influenza sul suo valore. Quando la temperatura viene aumentata a 200°C, il valore del modulo di Young per un tempo di riscaldamento breve (30 minuti) è simile a quello ottenuto a 150°C, tuttavia per un tempo superiore ai 30 minuti diminuisce all'aumentare del tempo di esposizione al calore. Se poi la temperatura viene aumentata fino a 300°C, il modulo di Young subisce un notevole decremento. I risultati mostrano che più lungo è il tempo di riscaldamento più è basso il modulo di Young per temperature superiori ai 150°C. Ad esempio per una temperatura di 300°C, un riscaldamento di tre ore produce un decremento del modulo di Young di circa il 50%.

Nella figura seguente sono anche riportati i carichi di rottura UTS che può supportare il PDMS, dopo esser stato sottoposto a un processo termico per temperature differenti. La tensione di rottura del PDMS sottoposto a una temperatura di 100°C è di circa 9 MPa ed è stabile per un tempo di riscaldamento molto lungo. La tensione di rottura del PDMS riscaldato a 150°C è circa 8 MPa, e come il caso precedente è indipendente dal tempo di applicazione del calore. Quando la temperatura di riscaldamento viene aumentata a 200°C, la tensione di rottura si riduce a circa 5 MPa e per tempi di esposizione al calore maggiore di 30 minuti il valore della tensione di rottura diminuisce. Per temperature di 300°C, il valore UTS è diminuito sensibilmente, fino a circa 1 MPa, che è circa il 90% più basso rispetto al primo caso (temperatura di 100°C).

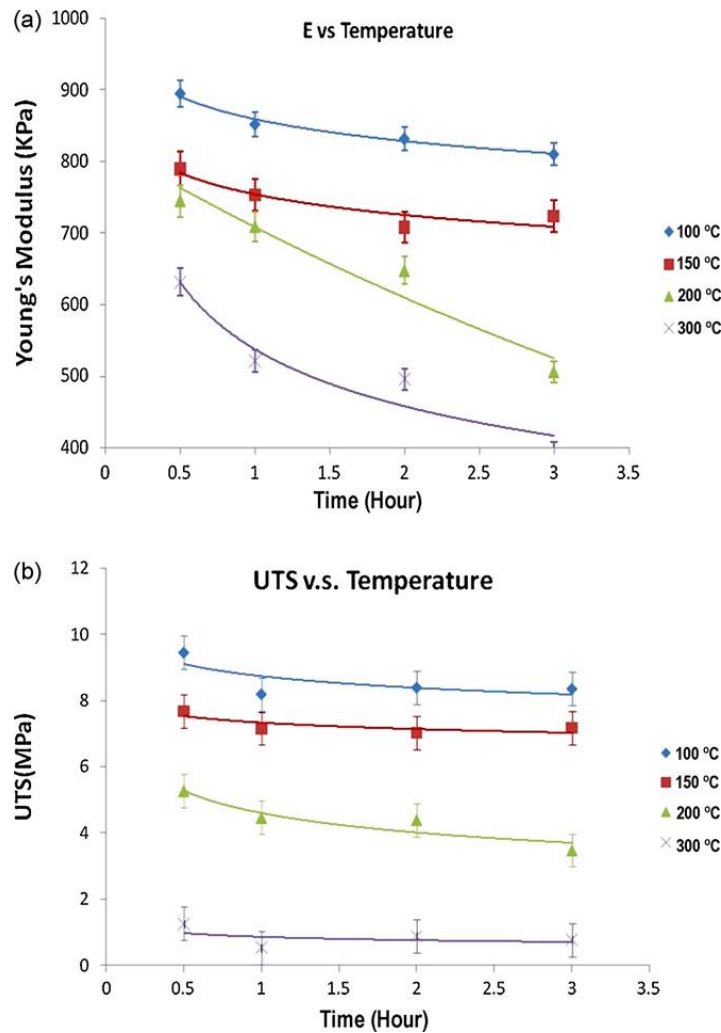


Fig. 2.11 (a) andamento del modulo di Young all'aumentare del tempo di riscaldamento, per diverse temperature; (b) andamento dell'UTS all'aumentare del tempo di riscaldamento, per diverse temperature [26].

A questo punto è stata utilizzata la calorimetria a scansione differenziale (DSC) per studiare la decomposizione termica del PDMS. La DSC è la principale tecnica di analisi termica utilizzabile per caratterizzare molti materiali. Il principio base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. Concentrandosi sulla curva di *heating* si può notare come la decomposizione termica avviene intorno ai 310°C, dove si può notare la presenza di un picco nel flusso termico. Riscaldando il PDMS da 100°C a 200°C si può notare che non vi sono significative variazioni nel flusso termico. Dopo i 200°C il flusso è in costante aumento. A 300°C il flusso è accelerato ed ha un picco a 310°C, dove avviene la decomposizione termica.

I risultati della calorimetria differenziale a scansione hanno mostrato che le proprietà meccaniche del PDMS sono legate alla stabilità termica. Se la temperatura a cui si sottopone il PDMS è superiore a 200°C, si avvia una reazione di decomposizione che porta ad una riduzione della resistenza meccanica del materiale. Per basse temperature, le proprietà meccaniche del materiale non vengono influenzate dal tempo di riscaldamento. Mentre per temperature di riscaldamento superiori ai 200°C, la resistenza meccanica del materiale diminuisce, e diminuisce all'aumentare anche del tempo di esposizione al calore.

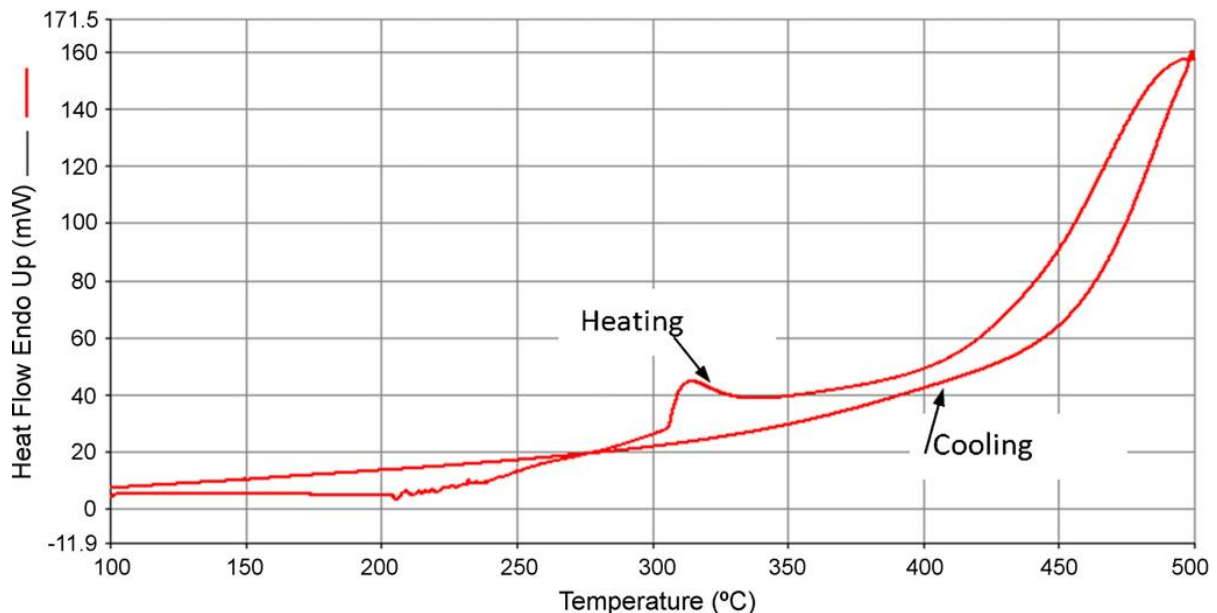


Fig. 2.12 Comportamento del PDMS al variare della temperatura di riscaldamento. Risultati ricavati da DSC [26].

2.3.4 INFLUENZA DEL RAPPORTO BASE:POLIMERO

Il PDMS viene utilizzato ampiamente nello studio delle interazioni cellule-substrato, grazie alle sue capacità di modificare le proprietà meccaniche e di adeguarsi alle caratteristiche meccaniche dell'ambiente fisiologico. I cambiamenti delle proprietà meccaniche del substrato comportano, come riportato nel primo capitolo, dei cambiamenti anche nelle risposte cellulari. In questo studio si cerca di stabilire la correlazione tra composizione del polimero, le proprietà meccaniche del substrato e il comportamento delle cellule muscolari lisce (VSMC) seminate sui substrati [29].

Il materiale utilizzato per la costruzione dei substrati è il PDMS. Essendo un polimero la rigidità del materiale è influenzata dalla concentrazione dei crosslink presenti. Quindi in questo studio si è andato a verificare come per lo stesso polimero, la concentrazione dei crosslink influisce sulle proprietà meccaniche del substrato e conseguentemente sui processi cellulari.

Il rapporto base/reticolante, nel caso del PDMS, può essere aumentato da un valore di 10:1 fino a 50:1, con un conseguente decremento del modulo elastico da 1.783 a 0.048 MPa, come mostra la seguente figura. Il rapporto più utilizzato è senz'altro il 10:1. Sono stati testati di seguito anche PDMS con rapporti inferiori a 10:1, ma i dati hanno mostrato che il modulo elastico raggiunge una zona di plateau (ovvero la rigidità non incrementa in maniera significativa). Mentre per rapporti superiori a 50:1 i substrati erano difficili da manipolare.

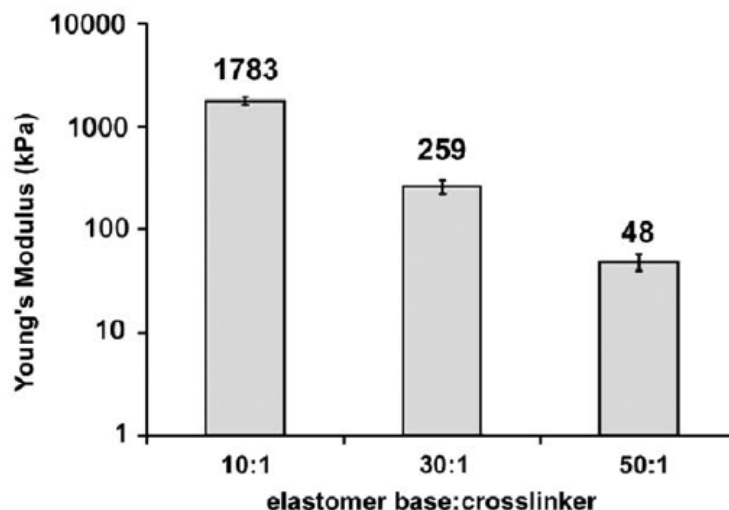


Fig. 2.13 Modulo elastico determinato da test di trazione per substrati di PDMS preparati con differenti rapporti di base/agenti reticolanti [29].

Le superfici di PDMS sono state poi funzionalizzate con la fibronectina¹⁰ per migliorare l'espressione cellulare; e i risultati per i differenti rapporti base/reticolante sono di seguito riportati.

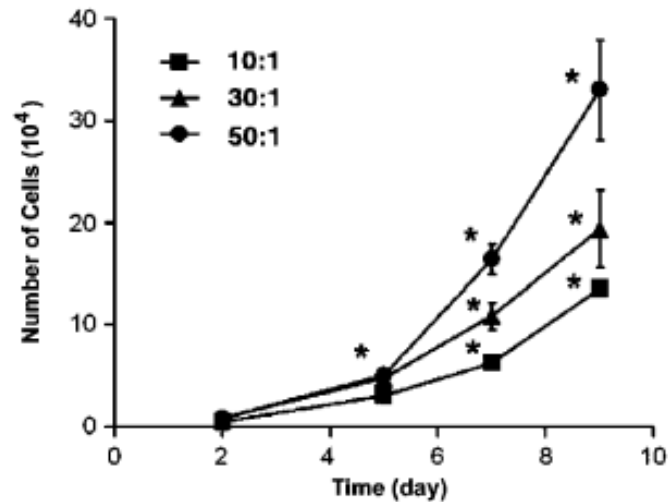


Fig. 2.14 Tasso di proliferazione delle VSMC per i substrato con differenti rapporti base/reticolante [29].

È chiaro che più è bassa la concentrazione dei crosslink più è bassa la rigidità del substrato. Ma la proliferazione cellulare varia inversamente alla rigidità del substrato in PDMS. Apparentemente i risultati sono contraddittori rispetto ai lavori di [30] che hanno mostrato invece che la proliferazione varia in dipendenza diretta con la rigidità del substrato. Questo non deve allarmare, in quanto ci sono notevoli differenze tra i due studi. Per primo il tipo di cellule utilizzate, poi il substrato utilizzato e infine anche il range della rigidità dei substrati. In conclusione è stato mostrato come detto in precedenza che la rigidità del substrato influenza i processi cellulari.

¹⁰ Fibronectina: glicoproteina presente sulla membrana cellulare. È un dimero costituito da due polipeptidi molto simili, legati fra loro a livello delle estremità C-terminali da due ponti disolfuro. La fibronectina fa aderire le cellule a tutti i tipi di matrici extracellulari.

CAPITOLO 3

DEFINIZIONE DEI MODELLI COSTITUTIVI IPERELASTICI

3.1 INTRODUZIONE

Il legame sussistente tra stato tensionale e stato deformativo dipende dal comportamento meccanico (costitutivo) del materiale di cui il corpo è costituito. Un modello matematico atto a descrivere il comportamento meccanico del materiale è detto legame costitutivo o modello costitutivo.

La definizione dei modelli costitutivi diventa quindi una parte essenziale nella costruzione dei modelli all'interno della simulazione numerica.

Per dare una descrizione completa del comportamento meccanico di un corpo è necessario definire le equazioni di bilancio della meccanica classica del continuo e le equazioni costitutive. Le equazioni di bilancio: equazioni di continuità della massa, bilancio della quantità di moto e il bilancio del momento della quantità di moto; da sole non sono sufficienti per descrivere in modo completo il comportamento di un corpo, in quanto non prendono in considerazione il materiale di cui il corpo in esame è costituito. Per questo motivo sono state introdotte le relazioni costitutive, che danno una definizione del materiale, traducendo in formule matematiche il comportamento fenomenologico del materiale analizzato.

La prima relazione costitutiva è stata formulata nel diciassettesimo secolo da Robert Hooke ed è nota oggi come legge di Hooke. Questa legge si riferisce a materiali elastici lineari ed è ancora oggi, in forma generalizzata, la più utilizzata nella risoluzione dei problemi ingegneristici.

Le relazioni costitutive devono rispondere ad alcuni principi di base [31]:

- *Assioma del determinismo*: lo stato di sollecitazione \mathbf{T} di un punto al tempo t è determinato dalla storia passata \mathbf{x}_t di tutti i punti del corpo fino all'istante considerato.

$$\mathbf{T}(\mathbf{x}, t) = \mathbb{T}(\mathbf{x}_t, \mathbf{X}, t) \quad (3.1)$$

In definitiva si afferma che gli sforzi interni a un corpo continuo ad un dato istante dipendono dalla storia del moto fino a quell'istante, quindi dalla storia passata del corpo.

- *Assioma di azione locale*: la tensione in un punto non è influenzata dal moto delle particelle materiali esterne ad un intorno arbitrariamente piccolo della particella in esame.
- *Assioma di indifferenza materiale*: afferma che gli sforzi interni ad un corpo continuo sono oggettivi. Il comportamento di un materiale risulta quindi indipendente dal particolare sistema di riferimento in cui si studia il moto, cioè le equazioni costitutive sono invarianti rispetto a rotazioni rigide del sistema. Per cui due osservatori devono poter determinare la stessa tensione, indipendente dal riferimento in cui si pongono.
- *Il principio di dissipazione universale*: spiega che le relazioni costitutive debbano essere tali per cui ogni processo, a cui il materiale è sottoposto, soddisfa il secondo principio della termodinamica.

Il materiale analizzato in questa tesi è il polidimetilsilossano, che come è stato detto in precedenza è un silicone, per cui si comporta come un materiale gommoso; subisce quindi deformazioni finite e il suo comportamento è elastico. La scelta quindi del modello costitutivo, nel nostro caso, è ricaduta nell'ambito della iperelasticità.

3.2 DEFINIZIONE DEL MODELLO COSTITUTIVO

Si introduce innanzitutto la nozione del secondo principio della termodinamica. Tale principio trae origine da una constatazione; poiché il primo principio della termodinamica (detto anche legge di conservazione dell'energia che stabilisce l'equivalenza fra calore scambiato e lavoro meccanico) non esaurisce la descrizione dei processi che coinvolgono scambi di calore o lavoro col sistema, è stato introdotto il secondo principio per affermare che in natura esistono trasformazioni irreversibili che avvengono sempre in un determinato verso.

Attraverso il secondo principio della termodinamica si mette in luce il fatto che numerosi fenomeni naturali avvengano in un verso ben preciso e che, di conseguenza, risultano

intrinsecamente irreversibili, cioè non è possibile realizzare una combinazione di fenomeni che ripristini esattamente lo stato iniziale [32].

Il secondo principio della termodinamica ha due formulazioni equivalenti:

Formulazione termica

È impossibile realizzare una trasformazione il cui unico risultato sia quello di fare passare calore da un corpo meno caldo ad uno più caldo.

Formulazione meccanica

Considerato un corpo sottoposto alla generica sollecitazione meccanica, non è possibile che l'energia in esso accumulata in forma reversibile (ossia restituibile) superi il lavoro svolto dalle tensioni interne.

La formulazione meccanica è rappresentata dalla disuguaglianza dissipativa di Clausius-Duhem:

$$D_{int} = \frac{1}{2} \mathbf{S} : \dot{\mathbf{C}} - \dot{\psi} \geq 0 \quad (3.2)$$

dove \mathbf{S} è il secondo tensore di tensione di Piola-Kirchhoff, \mathbf{C} è il tensore destro di deformazione di Cauchy-Green, ψ è la funzione energia libera di Helmholtz, che esprime quella porzione del lavoro delle tensioni interne accumulata in modo reversibile entro il punto materiale, e D_{int} è il rateo di dissipazione interna.

La disuguaglianza di Clausius-Duhem impone quindi che l'energia accumulata in modo reversibile entro il punto materiale $\dot{\psi}$ è sempre minore o uguale rispetto al lavoro svolto dalle tensioni interne sul punto materiale stesso $\frac{1}{2} \mathbf{S} : \dot{\mathbf{C}}$. La porzione rimanente del lavoro delle tensioni interne, viene dissipata in calore o alterazioni microstrutturali irreversibili.

La formulazione del modello costitutivo parte dalla definizione di un'espressione per la funzione densità di energia libera di Helmholtz.

$$\psi = \psi(\mathbf{C}, \mathbf{q}_i) \quad (3.3)$$

L'energia libera di Helmholtz dipende quindi dallo stato deformativo istantaneo \mathbf{C} e dalle variabili interne \mathbf{q}_i che esprimono l'evoluzione microstrutturale subita dal punto materiale in conseguenza della storia tenso-deformativa.

Introducendo la definizione di energia libera di Helmholtz (3.3) nella disuguaglianza di Clausius-Duhem:

$$D_{int} = \left(\frac{1}{2} \mathbf{S} - \frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{C}} \right) : \dot{\mathbf{C}} - \frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{q}_i} : \dot{\mathbf{q}}_i \geq 0 \quad (3.4)$$

Definendo poi il secondo tensore di tensione di Piola-Kirchhoff come:

$$\mathbf{S}(\mathbf{C}, \mathbf{q}_i) = 2 \frac{\partial \psi(\mathbf{C}, \mathbf{q}_i)}{\partial \mathbf{C}} \quad (3.5)$$

La disuguaglianza dissipativa può essere riscritta come:

$$D_{int} = - \frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{q}_i} : \dot{\mathbf{q}}_i \geq 0 \quad (3.6)$$

L'equazione (3.6) definisce la legge relativa all'evoluzione delle variabili interne, durante la storia tenso-deformativa.

3.3 MATERIALI IPERELASTICI ISOTROPICI INCOMPRESSIBILI

I materiali iperelastici sono una classe particolare dei materiali elastici, per i quali è reversibile non solo lo stato di sollecitazione e deformazione, ma anche il lavoro di deformazione, cioè il lavoro compiuto dai carichi esterni per deformare il corpo. Infatti un materiale iperelastico è un materiale conservativo, cioè il lavoro meccanico sviluppato sul materiale è uguale all'energia meccanica che il materiale può ritornare.

Nel caso di un materiale iperelastico tutto il lavoro delle tensioni interne viene accumulato in forma reversibile entro il punto materiale, ovvero si ha dissipazione nulla.

$$D_{int} = \frac{1}{2} \mathbf{S} : \dot{\mathbf{C}} - \dot{\psi} = 0 \quad (3.7)$$

Si dice iperelastico un materiale per il quale è possibile postulare l'esistenza di una funzione densità di energia elastica:

$$W = W(\mathbf{F}) \quad (3.8)$$

dove \mathbf{F} è il gradiente di deformazione. L'esistenza di W corrisponde a dire che la tensione non dipende dal percorso deformativo ma solo dallo stato deformativo.

La funzione densità di energia elastica deve dipendere solamente dagli stati puramente deformativi, non quindi da rotazioni rigide \mathbf{Q} che il corpo può subire; possiamo quindi esprimere la funzione densità di energia elastica come:

$$W(\mathbf{F}) = W(\mathbf{QF}) \quad \forall \mathbf{Q} \mid \mathbf{Q}^T \mathbf{Q} = \mathbf{I} \quad \det \mathbf{Q} = 1 \quad (3.9)$$

Per il teorema di decomposizione polare:

$$W(\mathbf{QF}) = W(\mathbf{QRU}) \quad \text{scegliendo} \quad \mathbf{Q} = \mathbf{R}^T \quad \text{si ottiene} \quad W = W(\mathbf{U}) \quad (3.10)$$

Si è resa dunque la densità di energia elastica funzione della sola deformazione effettiva. \mathbf{U} definisce in forma univoca il tensore destro di Cauchy-Green \mathbf{C} e quello di Green-Lagrange \mathbf{E} .

$$W = W(\mathbf{C}) \quad W = W(\mathbf{E}) \quad (3.11)$$

Nel caso particolare di materiale iperelastico il lavoro compiuto dalle tensioni interne lungo il generico processo deformativo è indipendente dallo specifico percorso seguito. La densità di energia libera di Helmholtz coincide allora con la densità di energia di deformazione:

$$\psi(\mathbf{C}) = W(\mathbf{C}) \quad (3.12)$$

Per cui possiamo scrivere il secondo tensore di tensione di Piola-Kirchhoff come:

$$\mathbf{S} = 2 \frac{\partial W(\mathbf{C})}{\partial \mathbf{C}} = \frac{\partial W(\mathbf{E})}{\partial \mathbf{E}} \quad (3.13)$$

La funzione di densità di energia di deformazione inoltre deve essere positiva per stati deformativi non nulli e deve annullarsi se il materiale si trova nello stato indeformato:

$$W(\mathbf{C}) > 0 \quad \text{per} \quad \mathbf{C} \neq \mathbf{I} \quad W(\mathbf{I}) = 0 \quad (3.14)$$

La formulazione della funzione densità di energia di deformazione si basa sulle caratteristiche di simmetria del materiale. Il gruppo di simmetria di un punto materiale può essere definito come l'insieme di tutte le rotazioni rigide tali da non alterare il comportamento del punto stesso.

Nel nostro caso il PDMS ha un comportamento a simmetria isotropa. La simmetria del materiale si dice isotropa quando una qualsiasi variazione della orientazione del punto

materiale non ne altera la risposta meccanica nei confronti del generico stato deformativo, ovvero le proprietà meccaniche non dipendono dalla specifica direzione di analisi.

Nel caso di simmetria materiale isotropa si dimostra che la dipendenza della densità di energia di deformazione dallo stato deformativo può essere espressa per mezzo dei tre invarianti principali del tensore di deformazione destro di Cauchy-Green I_1, I_2, I_3 :

$$I_1 = \text{tr}(\mathbf{C}) \quad I_2 = \frac{1}{2}[I_1^2 - \text{tr}(\mathbf{C}^2)] \quad I_3 = J^2 = \det(\mathbf{C}) \quad (3.15)$$

$$W(\mathbf{C}) = W(I_1, I_2, I_3) \quad (3.16)$$

Per materiali incomprimibili, che non variano il proprio volume, qualunque sia lo stato tensionale deve valere:

$$\det \mathbf{F} = J = \lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 = 1 \quad (3.17)$$

Nel nostro caso come è stato definito in precedenza assumiamo che il polidimetilsilossano sia anche incomprimibile. Per cui possiamo definire la funzione di densità di energia di deformazione dipendente dai soli primi due invarianti:

$$W = W(I_1, I_2) \quad \text{essendo} \quad I_3 = 1 \quad (3.18)$$

In un materiale che ha comportamento iperelastico, la dissipazione interna è uguale a zero per ogni percorso tensione-deformazione, di conseguenza il rateo di dissipazione interna è uguale a zero per ogni processo a cui il materiale è sottoposto.

$$D_{int} = -\frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{q}_i} : \dot{\mathbf{q}}_i = 0 \quad (3.19)$$

3.4 MODELLI COSTITUTIVI IPERELASTICI

I modelli costitutivi iperelastici [27]:

- sono non lineari;
- esibiscono risposte elastiche istantanee fino a grandi deformazioni;
- richiedono la definizione della non linearità geometrica durante la fase di analisi, poiché si verificano deformazioni finite.

L'iperelasticità riesce a descrivere in modo accurato il comportamento reale del materiale anche per grandi deformazioni.

I materiali iperelastici, come detto in precedenza sono descritti in termini di energia potenziale di deformazione, che definisce l'energia di deformazione immagazzinata nel materiale per unità di volume di riferimento (volume nella configurazione iniziale) come funzione della deformazione in quel punto nel materiale. L'energia potenziale di deformazione può essere formulata come funzione degli invarianti di deformazione.

Esistono in Abaqus varie forme di energia potenziale di deformazione per la modellazione approssimativa di elastomeri incomprimibili:

- Arruda-Boyce form
- Marlow form
- Mooney-rivlin form
- Neo-Hookeen form
- Ogden form
- Polynomial form
- Reduced polynomial form
- Yeoh form
- Van der Waals form

I modelli Reduced polynomial e Mooney-Rivlin possono essere visti come casi particolari del modello polinomiale; i modelli Yeoh e neo-Hookean, a loro volta, possono essere visti come caso speciale del modello polinomiale ridotto. Così, si fa riferimento collettivamente a questi modelli con il nome di "Modelli polinomiali."

3.4.1 NEO – HOOKEAN FORM

$$U = C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + \frac{1}{D_1} (J^{el} - 1)^2 \quad (3.20)$$

Dove U è l'energia di deformazione per unità di volume di riferimento; C_{10} , D_1 sono parametri del materiale temperatura dipendenti; \bar{I}_1 è l'invariante deviatorico primo di deformazione; J è il rapporto volumetrico totale; J_{el} è il rapporto volumetrico elastico. Il modulo di taglio iniziale μ_0 è espresso:

$$\mu_0 = 2 C_{10} \quad (3.21)$$

3.4.2 OGDEN FORM

$$U = \sum_{i=1}^N \frac{2\mu_i}{\alpha_i^2} (\bar{\lambda}_1^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_3^{\alpha_i} - 3) + \sum_{i=1}^N \frac{1}{D_i} (J^{el} - 1)^{2i} \quad (3.22)$$

Dove U è l'energia di deformazione per unità di volume di riferimento; μ_i , α_i , D_i sono parametri del materiale temperatura dipendenti; dove $\bar{\lambda}_i = J^{-\frac{1}{3}} \lambda_i$ sono gli allungamenti deviatorici; J è il rapporto volumetrico totale; J_{el} è il rapporto volumetrico elastico. Il modulo di taglio iniziale μ_0 è espresso:

$$\mu_0 = \sum_{i=1}^N \mu_i \quad (3.23)$$

Il modello descritto sopra neo-Hookean può essere ottenuto dal modello Ogden per particolari valori di μ_i e α_i .

3.4.3 POLYNOMIAL FORM

$$U = \sum_{i+j=1}^N C_{ij} (\bar{I}_1 - 3)^i (\bar{I}_2 - 3)^j + \sum_{i=1}^N \frac{1}{D_i} (J^{el} - 1)^{2i} \quad (3.24)$$

Dove U è l'energia di deformazione per unità di volume di riferimento; C_{ij} e D_i sono parametri del materiale temperatura dipendenti; \bar{I}_1 è l'invariante deviatorico primo di deformazione e \bar{I}_2 è l'invariante deviatorico secondo di deformazione; J è il rapporto volumetrico totale; J^{el} è il rapporto volumetrico elastico. Il modulo di taglio iniziale μ_0 è espresso:

$$\mu_0 = 2 (C_{10} + C_{01}) \quad (3.25)$$

3.5 CONSIDERAZIONI

La relazione che lega il rapporto volumetrico elastico J^{el} , il rapporto volumetrico totale J e il rapporto volumetrico termico J^{th} :

$$J^{el} = \frac{J}{J^{th}} \quad J^{th} = (1 + \varepsilon^{th})^3 \quad (3.26)$$

La risposta meccanica di un materiale è definita scegliendo un'energia potenziale di deformazione che si adatti al particolare materiale.

In generale per i modelli costitutivi iperelastici disponibili in Abaqus, è possibile specificare direttamente i coefficienti del materiale oppure si forniscono dati provenienti da test sperimentali e Abaqus in automatico determina i valori appropriati dei coefficienti.

In questa tesi sono stati presi in considerazione tre diversi modelli: modello neo-Hookean, modello polinomiale e modello Ogden.

Per la prima simulazione è stato utilizzato il modello polinomiale, in particolare il modello polinomiale di secondo grado. La scelta è ricaduta su questo modello in quanto è un modello generale che può descrivere a seconda del grado scelto e delle scelte dei parametri i comportamenti del materiale nelle varie situazioni (piccole deformazione, grandi deformazioni). Infatti il modello polinomiale è stato utilizzato anche per analizzare la differenza tra i due materiali polimerici considerati (PDSM 5:1 e PDMS 10:1).

È stato scelto di utilizzare il modello neo-Hookean per la seconda simulazione, in quanto per la deformazione imposta (allungamento del 15%), è in grado di prevedere in modo accurato il comportamento del modello analizzato; inoltre ha una formulazione semplice e non necessita di numerosi parametri per definire il comportamento del materiale in esame. Infatti come è stato mostrato nel primo capitolo tale modello descrive in maniera accurata il comportamento reale del materiale se ci troviamo in regime lineare. Per come è stato costruito il modello e il test meccanico, nella seconda simulazione, si può considerare che il comportamento del substrato in analisi è in regime lineare. Inoltre il modello neo-Hookean da una predizione migliore dei modi generali di deformazione quando i parametri sono basati su un solo test. È stato riportato anche il modello di Ogden perché, come si può notare dal primo capitolo, questo modello descrive in modo più accurato il comportamento del materiale, anche a grandi deformazioni e in regime non lineare.

3.6 VISCOELASTICITA'

Poiché i polimeri non sono classificabili né come solidi elastici né come liquidi viscosi, sono stati raggruppati in una classe di materiali che rispondono al nome di materiali viscoelastici [33].

I modelli elastici si basano sull'ipotesi che la tensione sia funzione del solo stato deformativo:

$$\sigma = \sigma(\varepsilon) = E\varepsilon \quad (3.27)$$

Questa relazione però non è applicabile a tutti i materiali, in quanto non presentano una dipendenza dal solo stato deformativo, si parla quindi di materiali inelastici, per i quali la relazione tra tensione e deformazione può scriversi solo introducendo delle variabili interne \mathbf{q}_i , parametri non misurabili dall'esterno:

$$\sigma = \sigma(\varepsilon, \mathbf{q}_i) \quad (3.28)$$

Le variabili interne dovranno essere valutate nella loro evoluzione temporale per determinare la risposta tensionale del modello.

I materiali viscoelastici sono quindi materiali nei quali si riconosce che la tensione non dipende dalla sola deformazione corrente, ma anche dalla storia di carico, secondo relazioni costitutive dipendenti dalla natura del materiale, quindi dal fattore temporale.

I fenomeni principali evidenziati da un materiale con natura viscoelastica sono:

- dipendenza della rigidezza dalla velocità di deformazione;
- creep: incremento di deformazione nel tempo in condizioni di tensione costante applicata;
- rilassamento: diminuzione delle tensioni nel tempo in condizioni di deformazione costante applicata;
- isteresi: dissipazione di energia per cicli di carico-scarico.

Nei modelli viscoelastici, come dice il nome, interviene sia una componente elastica, sia una componente viscosa. Diversi modelli costitutivi sono stati creati per descrivere tale comportamento, i più comuni sono:

- modello di Maxwell;
- modello di Voigt;

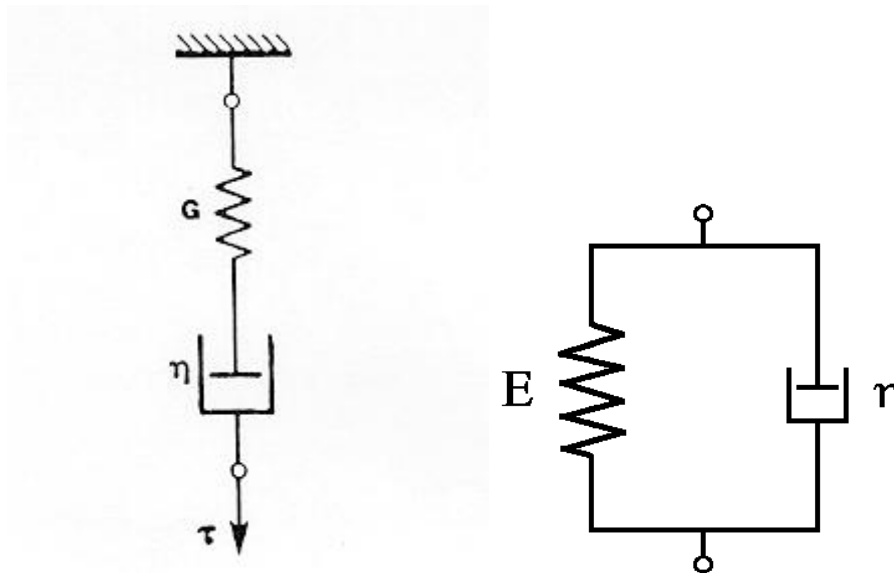


Fig. 3.1 A sinistra è rappresentato il modello di Maxwell, a destra il modello di Voigt.

$$\sigma(t) = E \varepsilon_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{modello di Maxwell} \quad (3.29)$$

$$\sigma(t) = E \varepsilon(t) + \eta \frac{d\varepsilon(t)}{dt} \quad \text{modello di Voigt} \quad (3.30)$$

Nei materiali viscoelastici in conclusione l'andamento della tensione risulta quindi funzione della deformazione corrente e del tempo di rilassamento definito come:

$$\tau = \frac{\eta}{E} \quad (3.31)$$

Dove η è il parametro che misura la viscosità e E è il modulo elastico.

Nel nostro studio la viscosità è un parametro che non interessa la nostra analisi, per cui non viene presa in considerazione.

CAPITOLO 4

ANALISI NUMERICA DI SUBSTRATI DI PDMS

4.1 INTRODUZIONE

L'analisi agli elementi finiti, utilizzata in ampia misura anche nel campo della bioingegneria, è uno strumento essenziale per la valutazione dei comportamenti degli scaffolds sottoposti a test meccanici.

La simulazione numerica è stata implementata da diversi programmi come riportato nel primo capitolo; quelli utilizzati nel nostro caso sono Abaqus (utilizzato come processore e post-processore) e Patran (utilizzato come pre-processore).

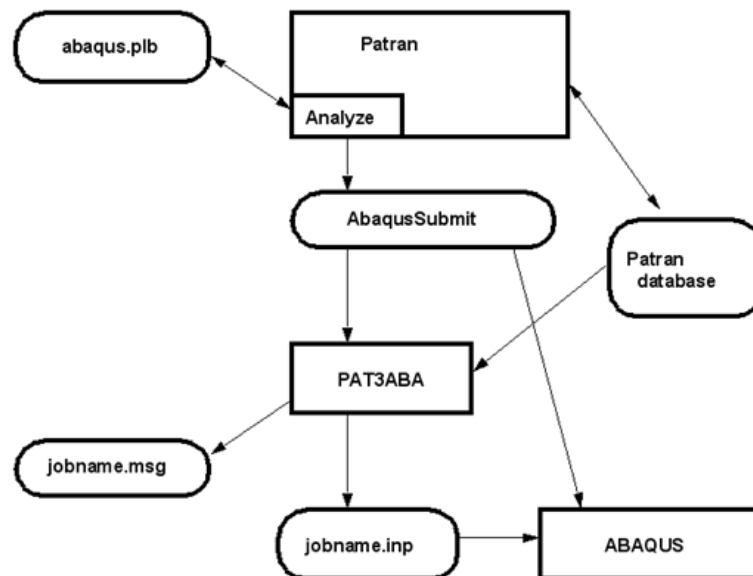


Fig. 4.1 Processo di esecuzione di un'analisi con Patran-Abaqus.

In questa tesi si è cercato di ricreare modelli di substrati in PDMS (polidimetilsilossano) e si è andato a studiare il comportamento meccanico di essi, quando vengono sottoposti a test meccanici diversi.

La fase di simulazione numerica è una fase molto importante perché permette di ridurre il numero delle prove in laboratorio, portando quindi benefici in termini di risorse economiche e in termini di tempo.

Questo lavoro ha quindi lo scopo di fare una valutazione di quello che può accadere agli scaffolds, quando vengono sottoposti a una serie di test meccanici, e ottenere i dati relativi ai test per poi utilizzarli nello studio della meccanotrasduzione delle cellule muscolari.

4.2 COSTRUZIONE DEL MODELLO CON PATRAN

Patran è un programma di pre/post elaborazione che fa parte di un pacchetto di software della MSC.Software, fondata nel 1963.

Patran è un ambiente di modellazione CAE che consente di costruire modelli FEM/FEA altamente complessi e di visualizzare i risultati dell'analisi una volta che i modelli sono stati risolti. Esso consente di preparare modelli di analisi che possono essere risolti dai più diffusi e conosciuti solutori FEM (MD Nastran, Marc, Dytran, MSC.Nastran, Ansys, Abaqus, ...). Questo programma si deve appoggiare quindi ad altri programmi che risolvono il modello creato; in questa tesi è stato utilizzato Abaqus.

Innanzitutto si deve creare il nuovo database in cui andranno inseriti tutti i parametri del modello da analizzare. Si apre così la schermata iniziale di Patran che chiede di definire il codice di analisi ed il tipo di analisi da effettuare.

Nella barra in alto selezionando *Geometry*, si va a definire la geometria del modello che si deve costruire.

Il passaggio successivo ci porta nel menù *Loads/BCs* dove si possono impostare le condizioni di vincolo e l'applicazione dei carichi al modello.

L'ulteriore step è la definizione del materiale di cui il modello è costituito. Nel menù *Properties* si possono assegnare le proprietà intrinseche del materiale definito in precedenza. Nella libreria sono presenti numerosi modelli costitutivi creati ad hoc per l'utente, in cui basta andare ad inserire i valori dei parametri costitutivi per il determinato materiale.

Successivamente si definisce la mesh del modello costruito, andando nel menù *Meshing*, scegliendo la finezza della mesh ed il tipo di elementi finiti con cui si può discretizzare il modello. Anche in questo caso la libreria è fornita di una vasta scelta di elementi finiti adatti per ogni applicazione. Cinque sono gli aspetti che caratterizzano ogni elemento:

- famiglia;
- gradi di libertà (direttamente collegati alla famiglia dell'elemento);
- numero di nodi;
- formulazione;
- integrazione.

Ciascun elemento ha un nome univoco; il nome identifica ciascuno dei cinque aspetti elencati sopra. In particolare, la prima o le prime lettere del nome indicano a quale famiglia l'elemento appartiene. Anche il numero dei nodi dell'elemento è indicato nel nome, in modo tale che sia possibile ricavare l'ordine di interpolazione [34].

- Famiglia

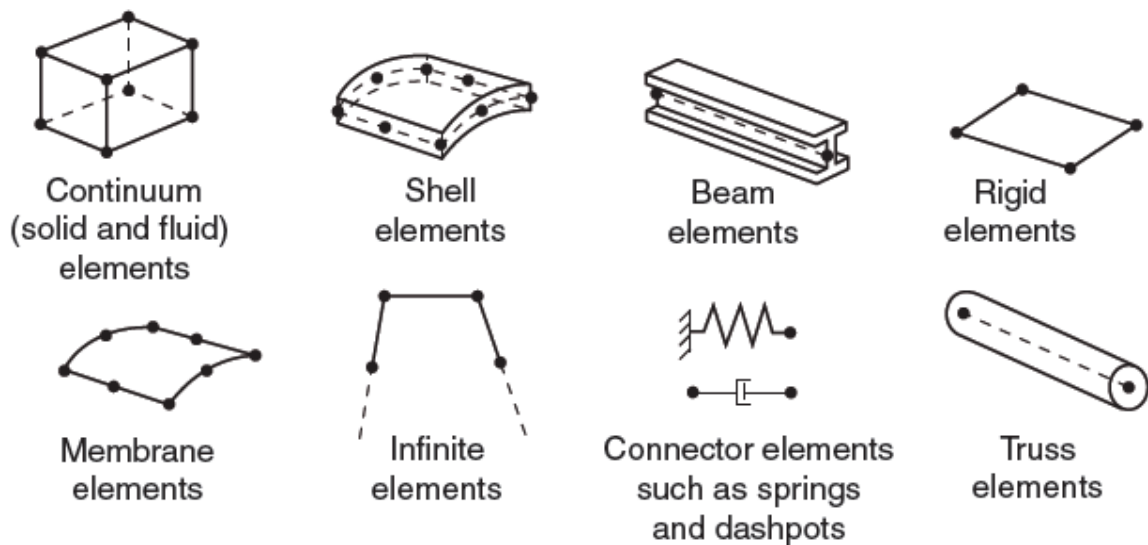


Fig. 4.2 Famiglie di elementi presenti nella libreria [34].

- Gradi di libertà: i gradi di libertà sono le variabili fondamentali calcolate durante l'analisi.
- Numero di nodi o ordine di interpolazione: gli spostamenti sono calcolati nei nodi dell'elemento. I nodi sono punti precisi dell'elemento che ne individuano la

geometria. Su ogni nodo dell'elemento viene associato il valore di un campo o gradiente che interessa l'intera struttura. In qualsiasi altro punto dell'elemento, gli spostamenti sono ottenuti dall'interpolazione degli spostamenti nodali. Solitamente l'ordine di interpolazione è determinato dal numero di nodi utilizzati nell'elemento. Gli elementi che hanno solo i nodi agli angoli, come il *brick-8* utilizzano l'interpolazione lineare in ciascuna direzione e sono spesso chiamati elementi lineari o elementi di primo ordine (figura 4.4 (a)). Gli elementi che hanno i nodi sugli angoli e in mezzo ai lati, come il *brick-20* utilizzano l'interpolazione quadratica e sono spesso chiamati elementi quadratici o elementi di secondo ordine (figura 4.4 (b)). Gli elementi modificati triangolari o tetraedrici con nodi nel mezzo, come il *tet-10* utilizzano un'interpolazione del secondo ordine modificata e sono spesso chiamati elementi modificati o elementi di secondo ordine modificati (figura 4.4 (c)).

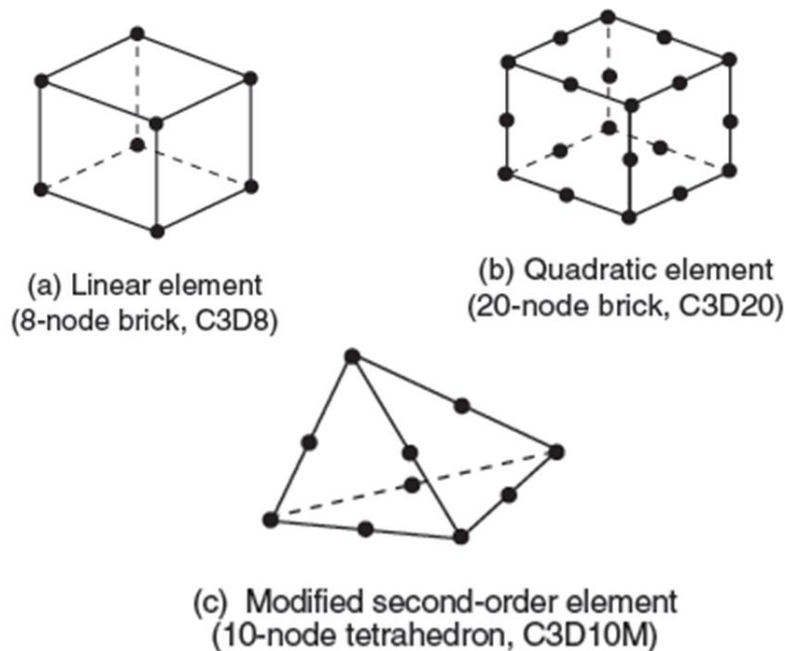


Fig. 4.3 Tipi di elemento con i relativi ordini di interpolazione, in particolare: (a) interpolazione lineare di un elemento esagonale, (b) interpolazione quadratica di un elemento esagonale, (c) interpolazione quadratica modificata per un tetraedro [34].

- Formulazione: la formulazione di un elemento si riferisce alla teoria matematica utilizzata per definire il comportamento dell'elemento. Sono possibili due tipologie di formulazione: lagrangiana o euleriana.

- Integrazione: alcuni elementi possono utilizzare l'integrazione completa o ridotta, una scelta che può avere un effetto significativo sulla precisione dell'elemento per un determinato problema. L'integrazione ridotta utilizza un basso ordine di integrazione per formare l'elemento rigidità, rispetto all'integrazione completa, inoltre riduce il tempo di esecuzione in particolare nelle tre dimensioni.

Infine si passa alla definizione dell'analisi nel menù *Analysis*.

Un concetto base nella simulazione numerica è la divisione della storia del problema in steps. Nella sua forma più semplice uno step è un'analisi statica di un cambiamento di carico da una grandezza a un'altra. In ogni step si sceglie la procedura, questa definisce il tipo di analisi che deve essere fatta durante lo step. La procedura può essere cambiata da uno step ad un altro. Gli effetti della storia precedente sono sempre inclusi nella risposta di ogni nuovo step [35].

Si può effettuare sia un'analisi lineare sia non lineare. I tipi di analisi non lineare sono classificati in base all'origine principale di non linearità:

- non linearità per geometria: se la rigidezza cambia di conseguenza a mutamenti della sola forma, il comportamento è definito di non linearità geometrica. Queste variazioni di rigidezza indotte dalla forma possono manifestarsi quando una parte presenta forti deformazioni. Nel caso di forti deformazioni la direzione del carico può cambiare mentre il modello si deforma. Variazioni nella rigidezza provocate dalla forma si manifestano anche in presenza di piccole deformazioni per particolari configurazioni dei test, come una membrana soggetta a pressione (bulge test).
- non linearità per materiale: se la variazione di rigidezza è indotta solamente dal mutamento delle proprietà del materiale nelle condizioni operative, il problema è definito di non linearità materiale. Un modello di materiale lineare presume che la sollecitazione sia proporzionale allo sforzo. Se i carichi sono sufficienti per causare deformazioni permanenti (come per molte plastiche) o se gli sforzi sono molto elevati (talvolta > 50% come per gomme ed elastomeri) si dovrà utilizzare un modello di materiale non lineare.

Nel nostro caso trattando di un materiale gommoso (il PDMS) sottoposto a grandi deformazioni, intervengono sia la non linearità per geometria sia la non linearità per materiale.

Il sistema delle equazioni all'equilibrio sono scritte nella forma seguente:

$$F^N(u^M) = 0 \quad (4.1)$$

dove F^N è la componente forza coniugata alla N^{th} variabile nel problema e u^M è il valore della M^{th} variabile.

Generalmente, per risolvere le equazioni non lineari si usa il metodo di Newton-Raphson. La motivazione per cui viene preferito questo metodo è la convergenza più rapida rispetto agli altri metodi. Il metodo di Newton-Raphson o metodo delle tangenti è un metodo molto robusto per trovare uno zero di una funzione, procedendo in modo iterativo.

La soluzione è ottenuta quindi attraverso la definizione di una serie di piccoli incrementi. Si presentano due problematiche:

- come l'equazione di equilibrio discretizzato può essere risolta ad ogni incremento;
- come scegliere la grandezza dell'incremento, affinché la soluzione converga.

4.3 CALCOLO CON ABAQUS STANDARD

Il codice di calcolo Abaqus/Standard è sviluppato dalla Hibbitt, Karlsson & Sorensen, Inc. di Pawtucket, RI, Stati Uniti.

Abaqus è un software per le analisi ad elementi finiti che consente di risolvere un'ampia gamma di simulazioni. Abaqus comprende due prodotti principali:

- Abaqus/Standard;
- Abaqus/Explicit.

Abaqus/Standard è un programma che consente di risolvere analisi implicite ad elementi finiti, quali analisi statiche, dinamiche e termiche, mettendo a disposizione numerose tipologie di contatti e di materiali non lineari. Ci sono inoltre interfacce aggiuntive che permettono di risolvere problemi specifici.

È supportato all'interno dell'ABAQUS/CAE, ambiente di modellazione per tutte le esigenze più comuni di pre e post elaborazione.

ABAQUS permette di importare modelli costruiti con altri programmi attraverso l'uso dell'Abaqus Command.

Attraverso l'istruzione "*abaqus job=nome_file*" si procede all'elaborazione del file *.inp* creato da Patran. Quello che si ottiene da questa istruzione è la creazione di un file *.odb* che può essere letto da Abaqus/CAE.

4.4 ANALISI DEI RISULTATI CON ABAQUS/CAE

Il programma ABAQUS/CAE (Complete Abaqus Environment) è un software utilizzato sia per la modellazione sia per l'analisi dei componenti meccanici e degli assemblati (pre-processing) e visualizzazione dei risultati dell'analisi a elementi finiti (post-processing). Un modulo di ABAQUS/CAE include il post-processing che può essere lanciato indipendentemente con ABAQUS/Viewer, che permette oltre la visualizzazione dei risultati, la creazione di grafici e tabelle.

4.5 TEST MONOASSIALE E EQUIBIASSIALE PER PDMS 5:1 E PDMS 10:1

Abbiamo iniziato il nostro lavoro valutando il comportamento del materiale utilizzato per la costruzione degli scaffolds: il PDMS. Come è stato descritto in precedenza, i polimeri sono caratterizzati dal rapporto base/reticolante e le proprietà meccaniche sono influenzate da questo rapporto. Siamo andati quindi ad analizzare i differenti comportamenti di due tipi di PDMS che verranno di seguito utilizzati per la creazione delle membrane. I PDMS utilizzati sono:

- PDMS 5:1
- PDMS 10:1

Tali materiali sono stati testati con prove monoassiali e equibiassiali.

4.5.1 GEOMETRIA DEL MODELLO

Innanzitutto creiamo la geometria del modello adatto per prove di tensione monoassiale e equibiassiale. Il campione come mostra la figura seguente ha una geometria di un esaedro con una lunghezza e larghezza pari a 10 mm e uno spessore di 1 mm. Lo spessore è così ridotto in quanto non ci interessa la risposta meccanica nello spessore del modello.

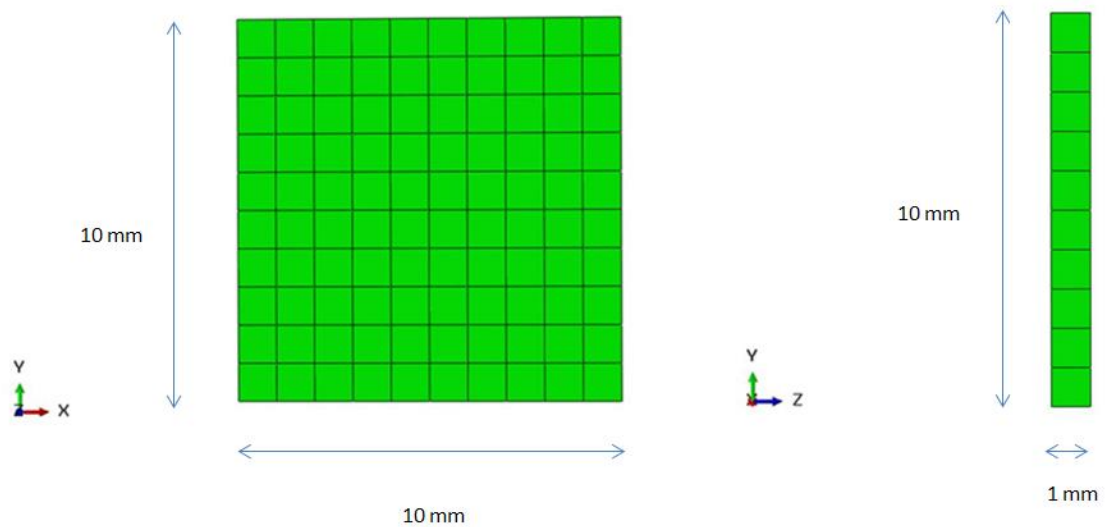


Fig. 4.4 Geometria del modello per le prove di trazione monoassiale e equibiassiale.

Abbiamo scelto di utilizzare per le lunghezze i millimetri [mm] e per le forze i newton [N]. Di conseguenza l'unità di misura relativa alle tensioni risulta il megapascal [MPa].

4.5.2 DEFINIZIONE DEL MATERIALE

Nel nostro caso, come abbiamo detto in precedenza utilizziamo due tipi di materiali:

- PDMS 5:1 (rapporto base/agenti reticolanti 5/1 rispettivamente)
- PDMS 10:1 (rapporto base/agenti reticolanti 10/1 rispettivamente)

4.5.3 CONDIZIONI DI VINCOLO E ALLUNGAMENTI IMPOSTI

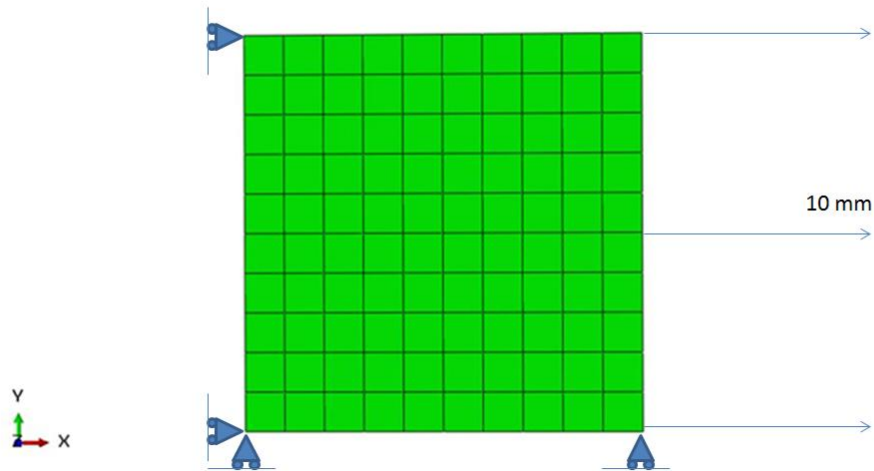


Fig. 4.5 Vincoli e allungamento imposto nella prova di trazione monoassiale; (allungamento imposto pari al 100% della lunghezza del provino secondo la direzione X).

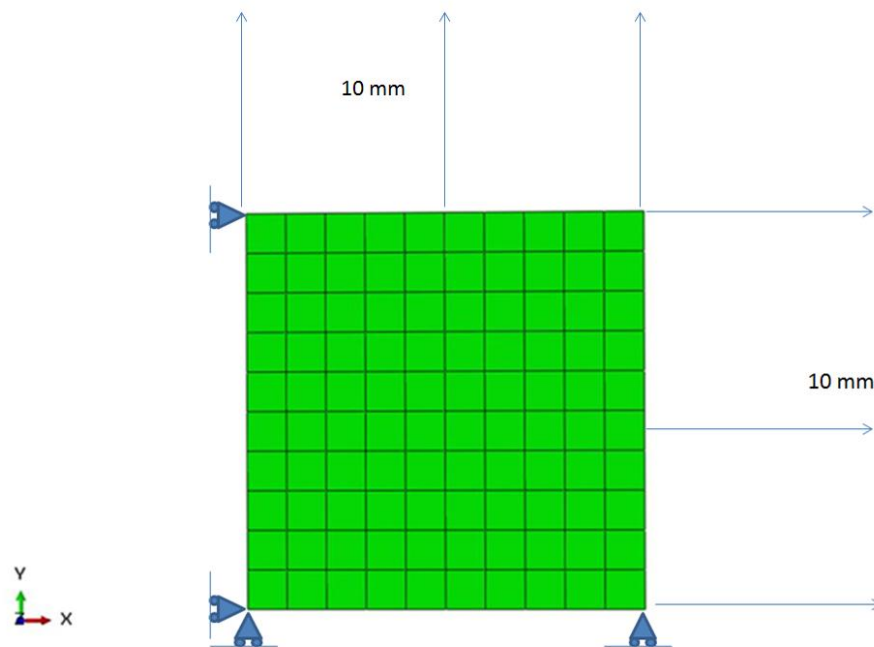


Fig. 4.6 Vincoli e allungamento imposto nella prova di trazione equibiaxiale (allungamento imposto pari al 100% della lunghezza del provino secondo la direzione X e Y).

4.5.4 MODELLO COSTITUTIVO

Nella parte relativa al modello costitutivo è stato utilizzato un modello polinomiale di secondo grado, in quanto è un modello generale che può descrivere a seconda del grado scelto e delle scelte dei parametri i comportamenti del materiale nelle varie situazioni (piccole deformazione, grandi deformazioni).

Tabella 4.1 Valore dei coefficienti del modello, per il PDMS 5:1 e PDMS 10:1.

Materiale	Coefficienti				
	C_{10}	C_{01}	C_{11}	C_{20}	C_{02}
PDMS 5:1	0.727123	-0.109371	0.074933	-0.057608	0.013205
PDMS 10:1	0.364454	-0.029419	0.025153	0.014787	-0.007344

4.5.5 MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI

Per quanto riguarda la scelta degli elementi finiti, nella mesh abbiamo utilizzato elementi C3D8H (cioè elementi esaedrici 3D di primo ordine con integrazione completa e ibridi). La scelta è stata fatta in base alle assunzioni del modello, il quale presenta una semplice geometria tridimensionale e si è ipotizzato che il materiale utilizzato sia incomprimibile.

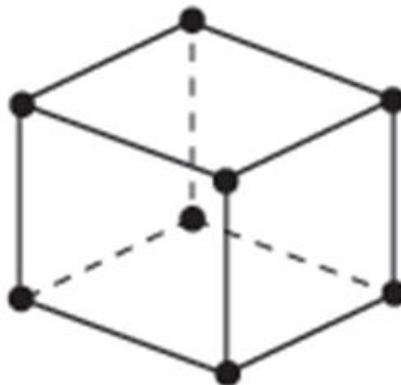


Fig. 4.7 Elemento utilizzato C3D8H.

Vengono utilizzati elementi di primo ordine perché permettono una interpolazione lineare, quindi i lati dei vari elementi possono deformarsi sempre come rette. Elementi di primo ordine sono raccomandati ad esempio, e questo è il nostro caso, per grandi deformazioni e gradienti di deformazione molto elevati.

Sono stati scelti elementi esaedrici perché una buona mesh con tali elementi fornisce una soluzione con una buona precisione e con costi inferiori rispetto a mesh con elementi tetraedrici. Inoltre hanno un tasso di convergenza migliore, e la sensibilità all'orientazione della mesh non è un problema nelle mesh regolari. Gli elementi diventano molto meno precisi quando sono inizialmente distorti.

Infine la scelta è ricaduta sull'utilizzo di elementi ibridi perché siamo in presenza di materiale con comportamento incomprimibile ($\nu = 0.5$). Elementi ibridi hanno più variabili interne delle loro controparti non ibride e sono leggermente più costosi.

4.5.6 ANALISI DEI RISULTATI DELLE SIMULAZIONI

È stato importante valutare a posteriori le curve tensioni/deformazioni dei due provini di PDMS nei test monoassiali e equibiassiali.

Dai risultati si può dedurre che per una deformazione imposta, il PDMS 10:1 presenta una tensione inferiore rispetto al PDMS 5:1. Equivalentemente per una tensione imposta al provino, il PDMS 10:1 presenta una deformazione maggiore rispetto al PDMS 5:1. Possiamo quindi concludere che il PDMS 5:1 è più rigido rispetto al PDMS 10:1 per una prova di trazione monoassiale. Inoltre il PDMS 5:1 mostra un andamento più lineare rispetto al provino di PDMS 10:1. La rigidità maggiore del PDMS 5:1 è evidente anche nel test di trazione equibiassiale; la differenza tra i due materiali è maggiore per deformazioni superiori a 0.4, in cui si nota che i due comportamenti divergono in maniera significativa.

La rigidità maggiore del PDMS 5:1 era un risultato che ci aspettavamo di trovare in quanto come detto precedentemente questo PDMS ha una concentrazione di agenti reticolanti maggiore del corrispettivo PDMS 10:1, con un'influenza sulla quantità di crosslink presenti nel network polimerico.

4.6 BULGE TEST

In questo test vengono analizzate membrane di PDMS soggette a una pressione uniformemente applicata su di essa; la configurazione dell'esperimento è la seguente.

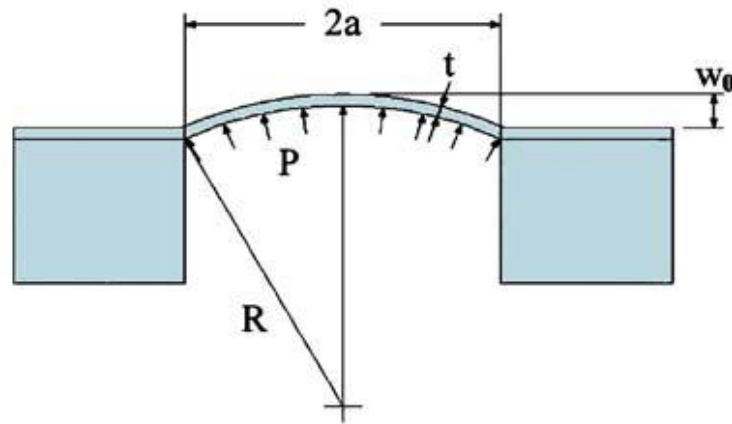


Fig. 4.8 Presentazione schematica del setup sperimentale, della geometria della membrana e delle condizioni di carico.

Le membrane sono una parte essenziale del test, perché fungono da scaffold per la semina cellulare. Per studiare la meccanotrasduzione delle cellule muscolari, bisogna infatti applicare degli stimoli meccanici su di esse, ma questo non è possibile direttamente; sono quindi necessarie queste membrane per trasmettere la sollecitazione meccanica alle cellule adese su esse.

Il nostro problema è quello innanzitutto di capire come si comportano queste membrane per una stessa pressione applicata, analizzando la risposta al variare della geometria della membrana e del materiale con cui essa è costruita.

Il passo successivo riguarda la determinazione delle pressioni, per tutte le diverse membrane, a cui si verificano certe condizioni di deformazione della membrana, e conseguentemente delle cellule. Il limite che si impone è che la deformazione massima sulla superficie della membrana non deve superare il 15%. Siamo quindi andati a determinare le pressioni massime per cui questa condizione è verificata.

Le simulazioni che andiamo a svolgere sono quindi un ausilio per capire come rispondono le membrane, al variare della geometria e del materiale, ad una applicazione di una pressione uniforme, e per valutare la distribuzione delle tensioni e delle deformazioni nella membrana.

4.6.1 GEOMETRIA E COSTRUZIONE DEL MODELLO

In questo lavoro sono stati analizzati quattro differenti geometrie di membrane di PDMS, al fine di valutare, se la geometria influisce sul comportamento della membrana, quando viene sottoposta a una stessa pressione.

È utile fin da subito notare che grazie alle proprietà specifiche del test, non è stato necessario riportare l'intero modello, ma solo una parte di esso, poiché è assialsimmetrico.

Un problema strutturale si definisce “problema assialsimmetrico” se ha per oggetto un solido di rivoluzione sottoposto ad un carico assialsimmetrico. Un solido di rivoluzione è un corpo tridimensionale generato per rotazione di una sezione piana attorno ad un asse per 360° .

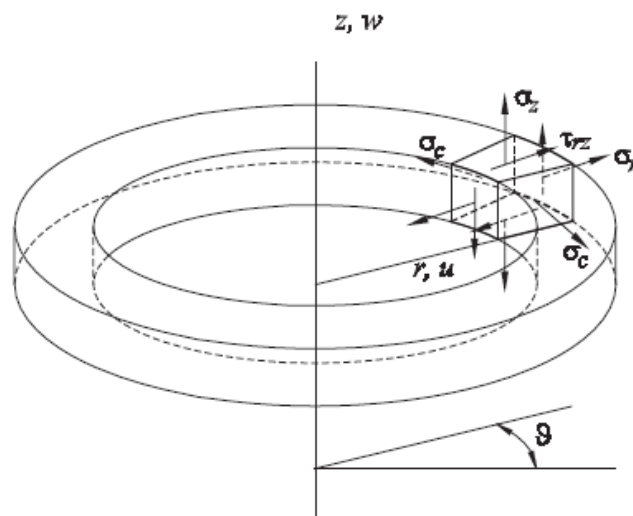


Fig. 4.9 Solido di rivoluzione.

Un solido di rivoluzione è assialsimmetrico se le proprietà geometriche e del materiale sono indipendenti dalla anomalia θ . Se il carico è anch'esso assialsimmetrico il problema si riduce al caso bidimensionale (nel nostro caso il piano che consideriamo è il piano XY) e l'analisi è essenzialmente coincidente con quella del problema piano.

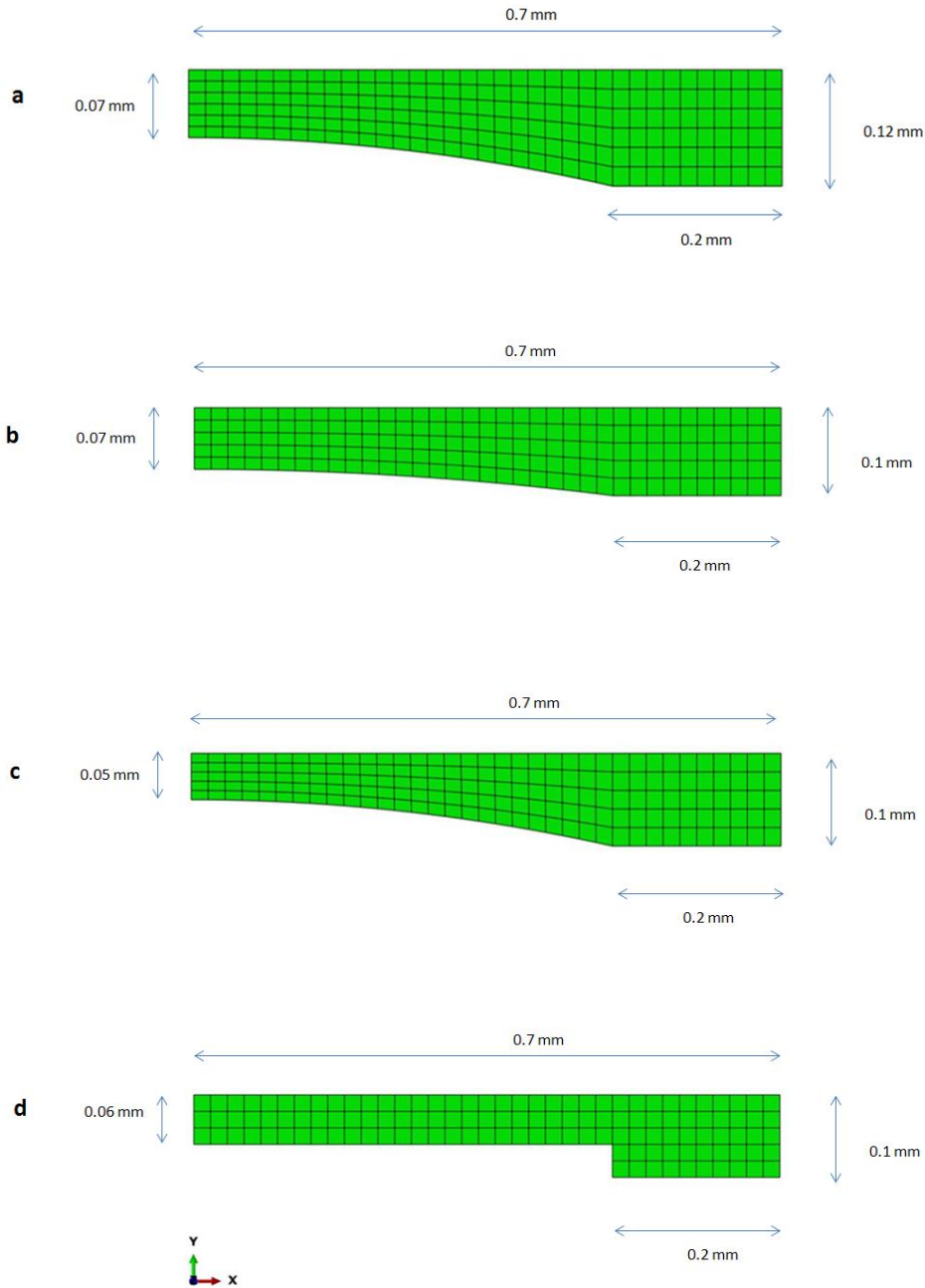


Fig. 4.10 Geometria dei campioni analizzati.

4.6.2 DEFINIZIONE DEL MATERIALE

Anche in questo caso si utilizzano due tipi di PDMS, elencati anche prima: il PDMS 5:1 il PDMS 10:1.

4.6.3 CONDIZIONI DI VINCOLO E PRESSIONE IMPOSTA

I vincoli sono stati applicati per ogni provino, come mostra la seguente figura. Abbiamo da principio testato la pressione massima applicabile nelle condizioni sperimentali, pari a 0.2 MPa.

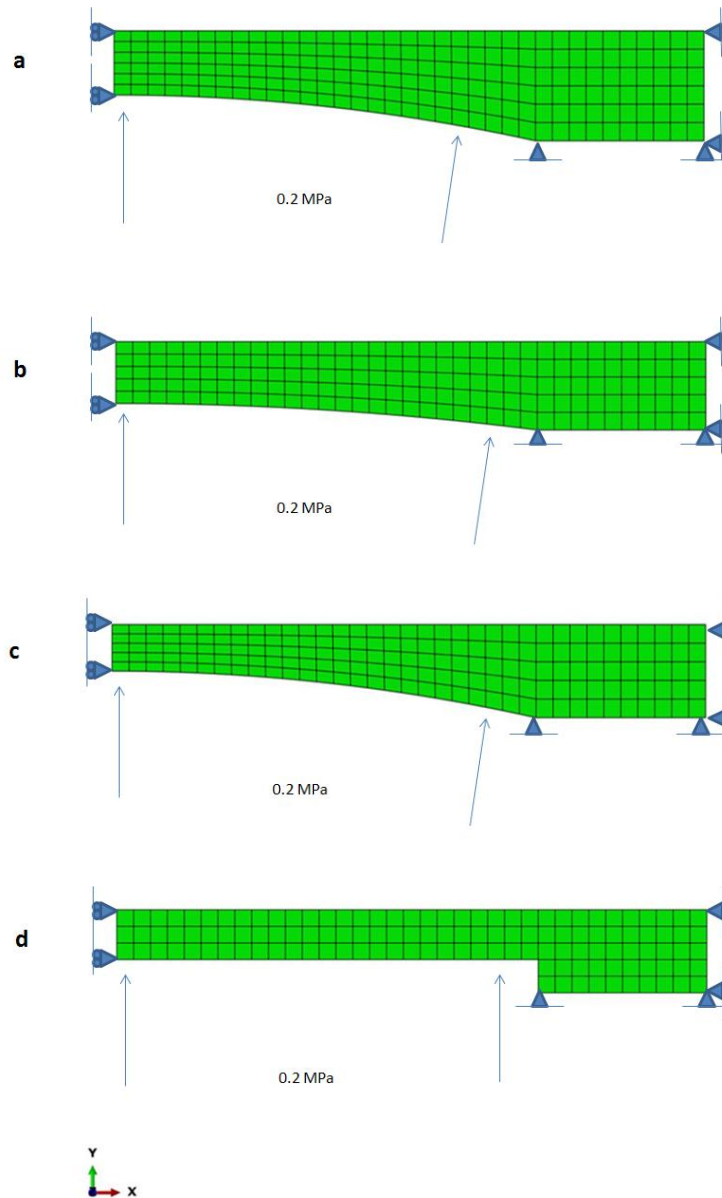


Fig. 4.11 Vincoli e carichi imposti alle quattro membrane.

4.6.4 MODELLO COSTITUTIVO

Abbiamo utilizzato un modello polinomiale di secondo grado, come quello utilizzato per i precedenti test monoassiali e equibiassiali. I valori dei coefficienti del modello sono riportati precedentemente nella tabella 4.1.

4.6.5 MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI

Dovendo creare delle membrane con la geometria mostrata nella figura 4.13 è sufficiente utilizzare elementi solidi continui assialsimmetrici. Per le caratteristiche del modello abbiamo utilizzato per la discretizzazione del provino gli elementi CAX4H; cioè elementi quadrilateri 2D assialsimmetrici ibridi.

Vengono utilizzati elementi di primo ordine e ibridi per gli stessi motivi accennati nel paragrafo 4.5.5.

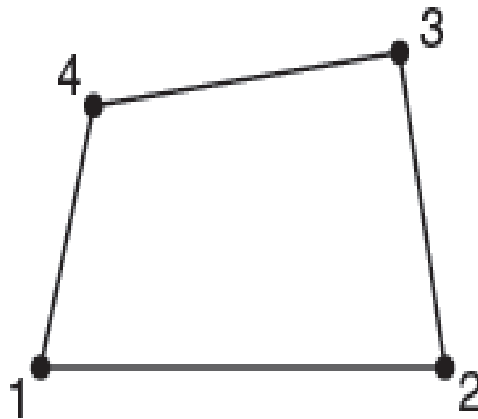


Fig. 4.12 Elemento di primo ordine quadrilatero.

4.6.6 RISULTATI E CONCLUSIONI

Una volta effettuata l'analisi siamo andati ad analizzare le deformazioni e le tensioni principali, e gli spostamenti del centro del provino lungo la direzione Y, per i due diversi tipi di substrati utilizzati (PDMS 5:1 e PDMS 10:1), mostrando che il materiale e la geometria con cui sono stati realizzati gli scaffolds sono fattori importanti che influenzano la risposta del modello.

L'interesse si è soffermato in particolar modo sulla superficie della membrana, poiché ci interessa sapere che deformazioni e tensioni la membrana impone alle cellule (seminate sulla superficie).

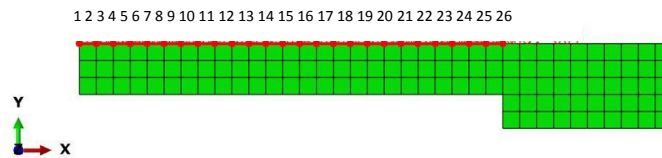


Fig. 4.13 26 nodi presi in considerazione per le tensioni e le deformazioni principali ottenute.

Sono state analizzate di seguito le tensioni e le deformazioni delle diverse membrane sottoposte a una pressione uniforme di 0.2 MPa.

Possiamo subito notare, prendendo in considerazione i primi due provini, che rispondono in modo equivalente alla pressione applicata, sia per quello che riguarda le tensioni principali, sia per le deformazioni principali. Questo è dovuto principalmente perché presentano una geometria molto simile, come mostra la seguente figura. Un piccolo aumento delle tensioni e deformazioni è riscontrabile sul secondo provino in quanto la parte della membrana vincolata risulta più sottile.

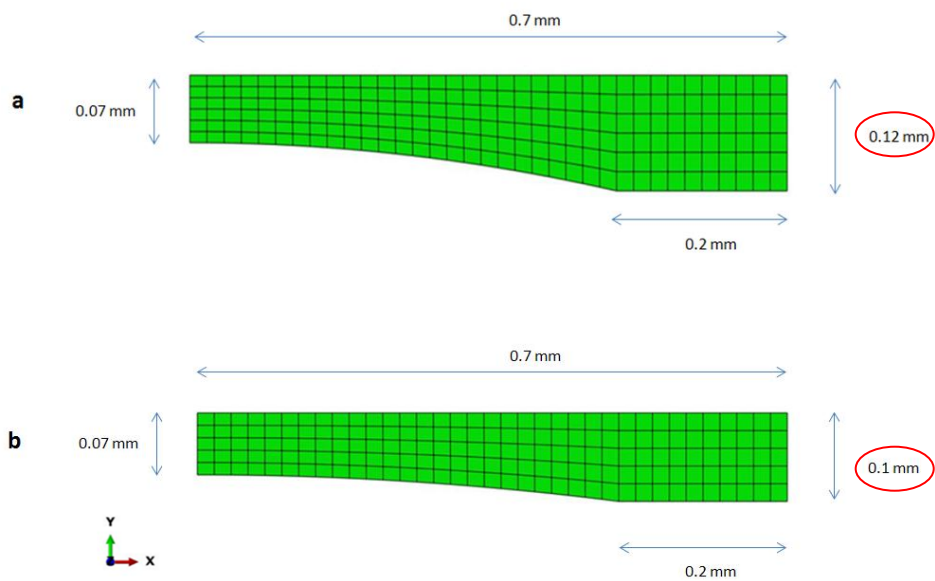


Fig. 4.14 Geometria (a) del primo provino, (b) del secondo provino. Viene evidenziata la differenza di spessore nella parte della membrana vincolata.

Siamo passati poi ad analizzare il terzo provino, che mostra invece una significativa differenza nel valore delle tensioni e delle deformazioni principali rispetto ai primi due provini in particolar modo nella zona centrale della membrana. Questo è dovuto al fatto che il terzo provino presenta uno spessore della membrana inferiore ai due precedenti provini, come mostra la prossima figura. Di conseguenza nel mezzo della membrana si riscontrano dei valori di tensione e deformazione maggiori rispetto alle prime due membrane. Una attenta analisi mostra che per il PDMS 5:1 le tensioni e le deformazioni al centro della membrana del terzo provino risultano maggiori rispetto a quelle del quarto provino, ciò si spiega in ragione del fatto che il terzo provino presenta uno spessore della membrana minore; invece per il PDMS 10:1 le tensioni e le deformazioni del terzo provino, sempre al centro della membrana, sono risultate inferiori a quelle del quarto provino, ciò può essere spiegato dalla minor rigidità di quest'ultimo materiale.

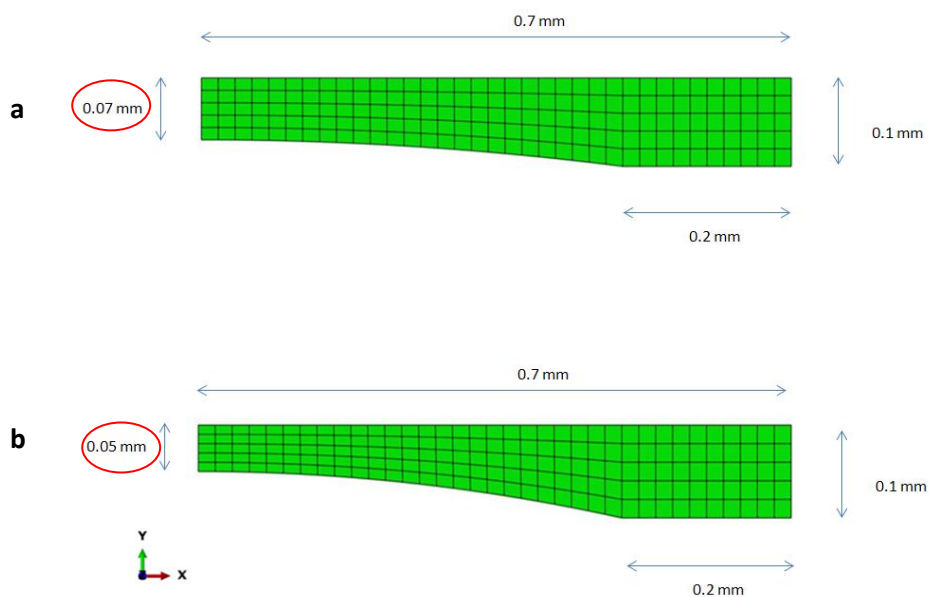


Fig. 4.15 Geometria (a) del secondo provino, (b) del terzo provino. Viene evidenziata la differenza di spessore nella parte centrale della membrana.

Infine siamo passati ad analizzare il comportamento del quarto provino, sempre analizzando le tensioni e deformazione. Si sono riscontrate delle differenze rispetto ai primi tre provini in prossimità della parte vincolata della membrana, mostrando valori di tensione e deformazione maggiore, in quanto la configurazione geometrica della membrana è differente, ovvero la membrana mantiene lo stesso spessore fino alla parte vincolata come mostra la seguente figura.

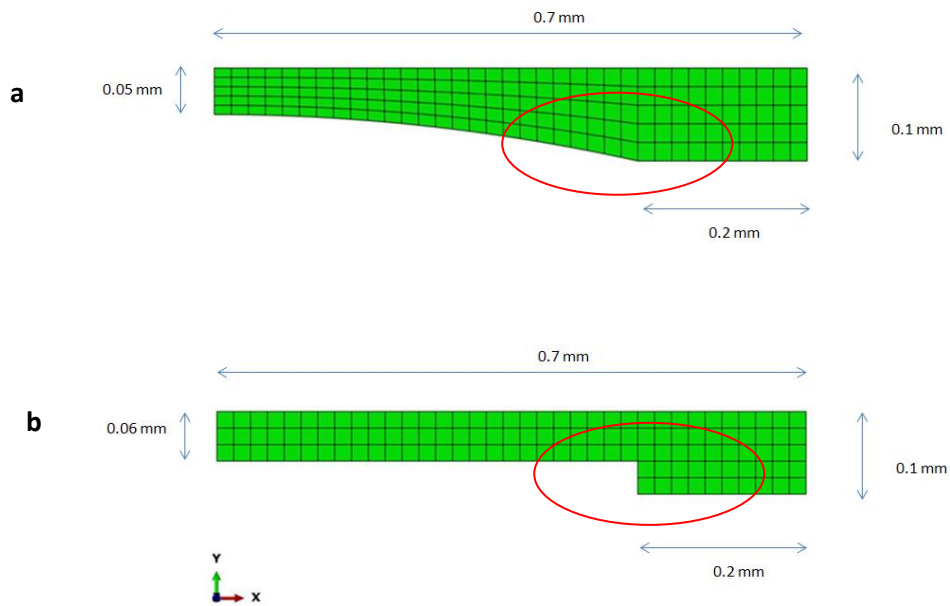


Fig. 4.16 Geometria (a) del terzo provino, (b) del quarto provino. Viene evidenziata la differente configurazione geometrica nella parte della membrana che viene vincolata.

Di seguito sono riportati i grafici che mostrano le deformazioni e le tensioni principali della superficie della membrana per una pressione applicata di 0.2 MPa.

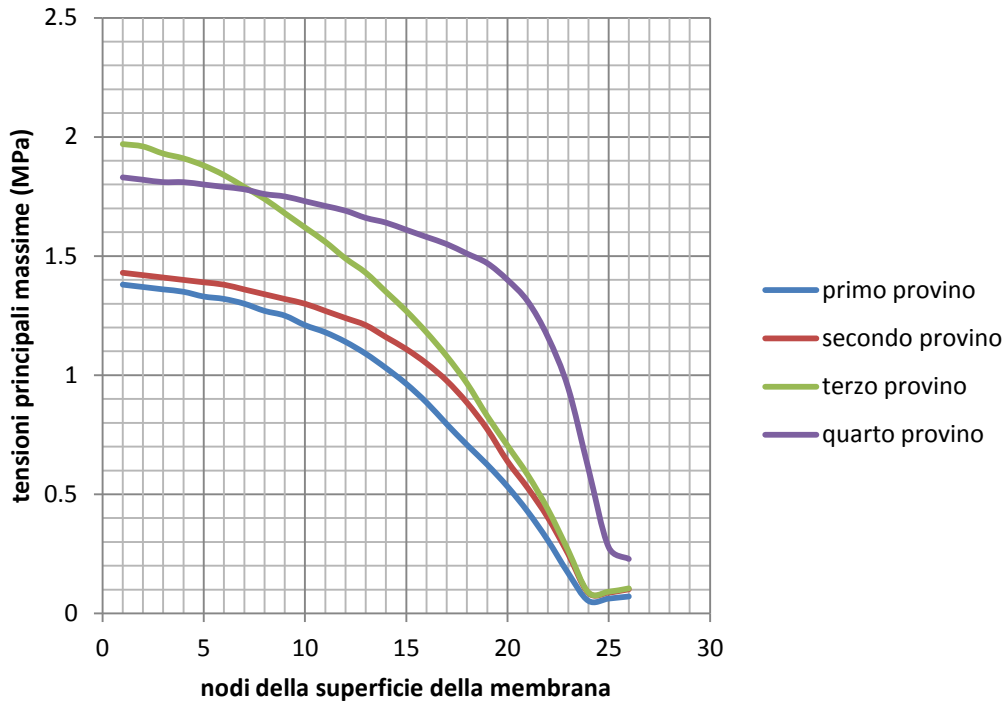


Fig. 4.17 Tensioni principali massime per i nodi sulla superficie della membrana per una applicazione di pressione uniforme pari a 0.2 MPa. PDMS 5:1.

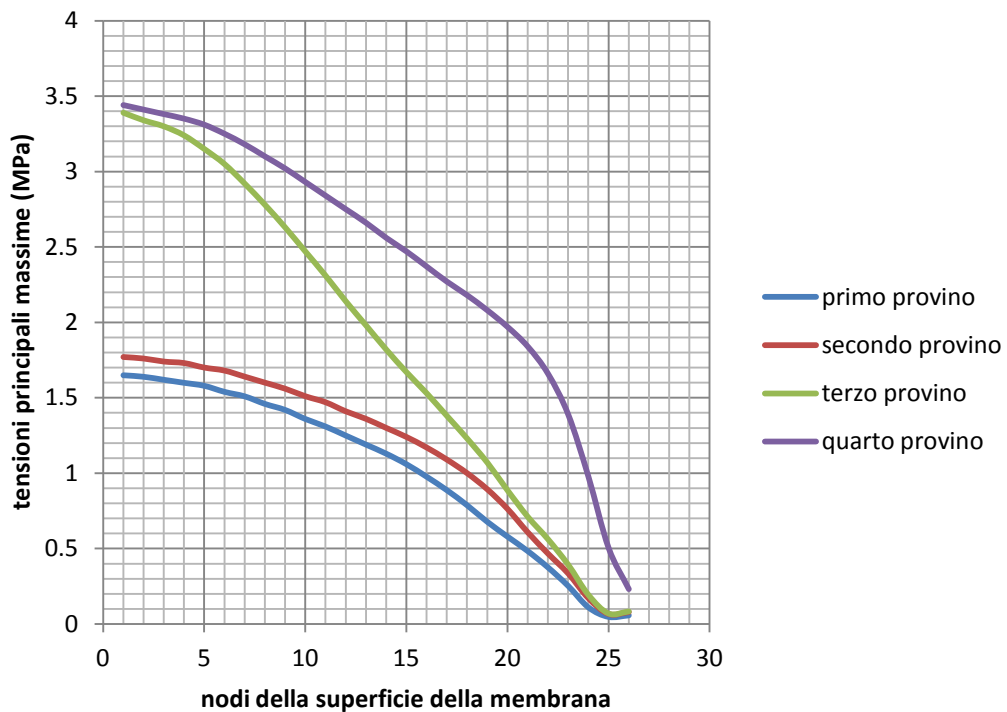


Fig. 4.18 Tensioni principali massime per i nodi sulla superficie della membrana per una applicazione di pressione uniforme pari a 0.2 MPa. PDMS 10:1.

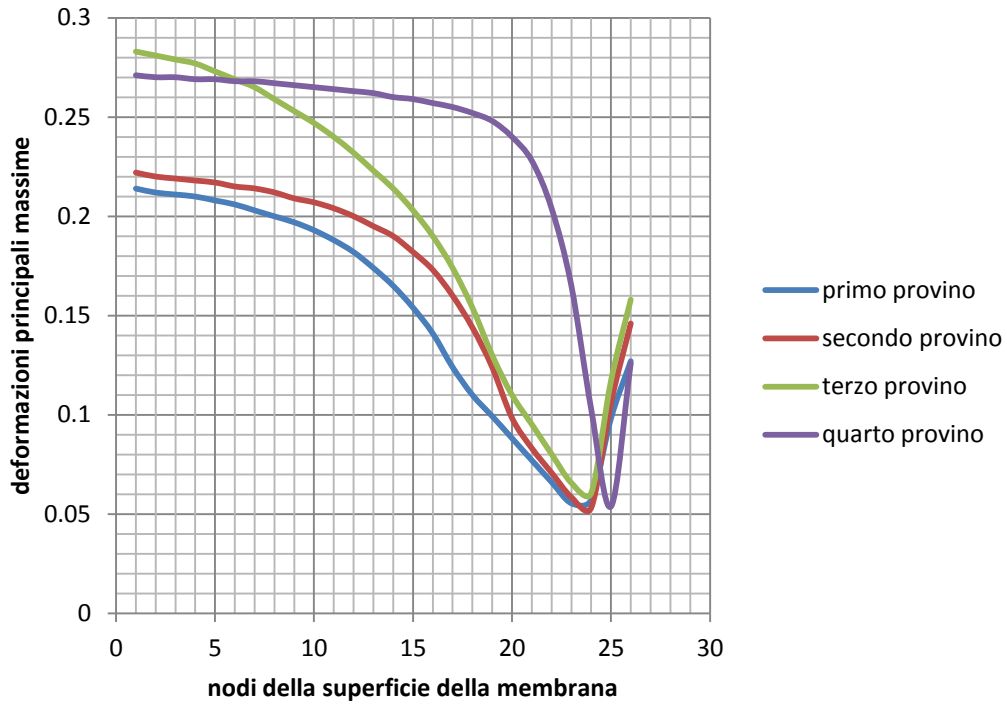


Fig. 4.19 Deformazioni principali massime per i nodi sulla superficie della membrana per una applicazione di pressione uniforme pari a 0.2 MPa. PDMS 5:1.

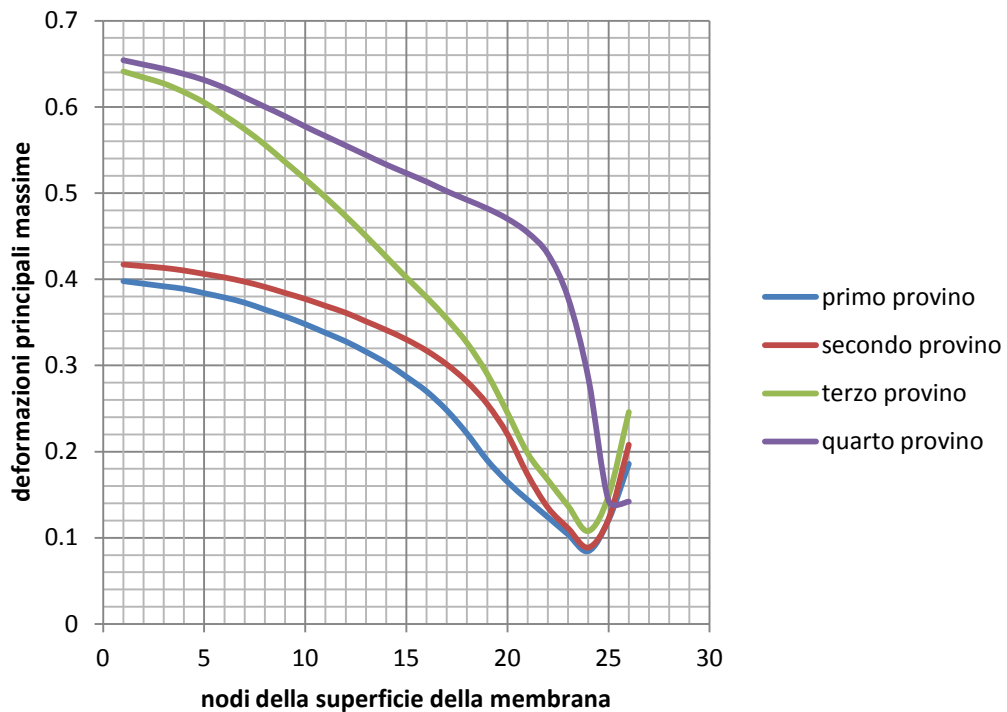


Fig. 4.20 Deformazioni principali massime per i nodi sulla superficie della membrana per una applicazione di pressione uniforme pari a 0.2 MPa. PDMS 10:1.

Per quanto riguarda gli spostamenti lungo Y, abbiamo considerato il nodo al centro della membrana, poiché subisce il maggiore spostamento lungo Y, e siamo andati ad analizzare il suo andamento all'aumentare della pressione fino a un valore finale di 0.2 MPa.

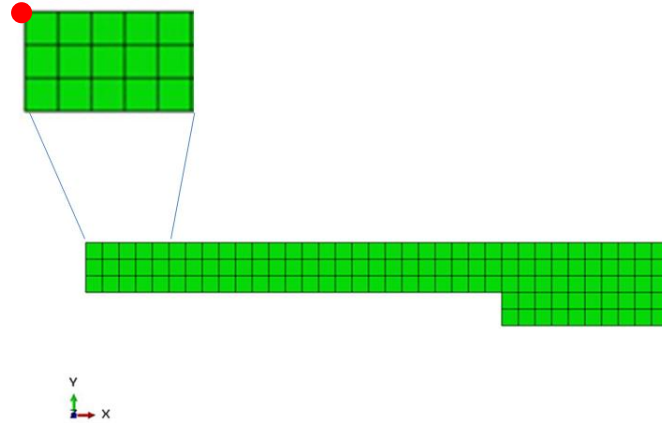


Fig. 4.21 Nodo selezionato per gli spostamenti ottenuti.

Possiamo notare dai seguenti grafici che il quarto provino subisce gli spostamenti maggiori rispetto a tutti gli altri provini. Questo a dimostrazione del fatto che la geometria della membrana gioca un ruolo chiave nel comportamento meccanico.

Di seguito sono riportati i grafici che riguardano la deflessione delle membrane.

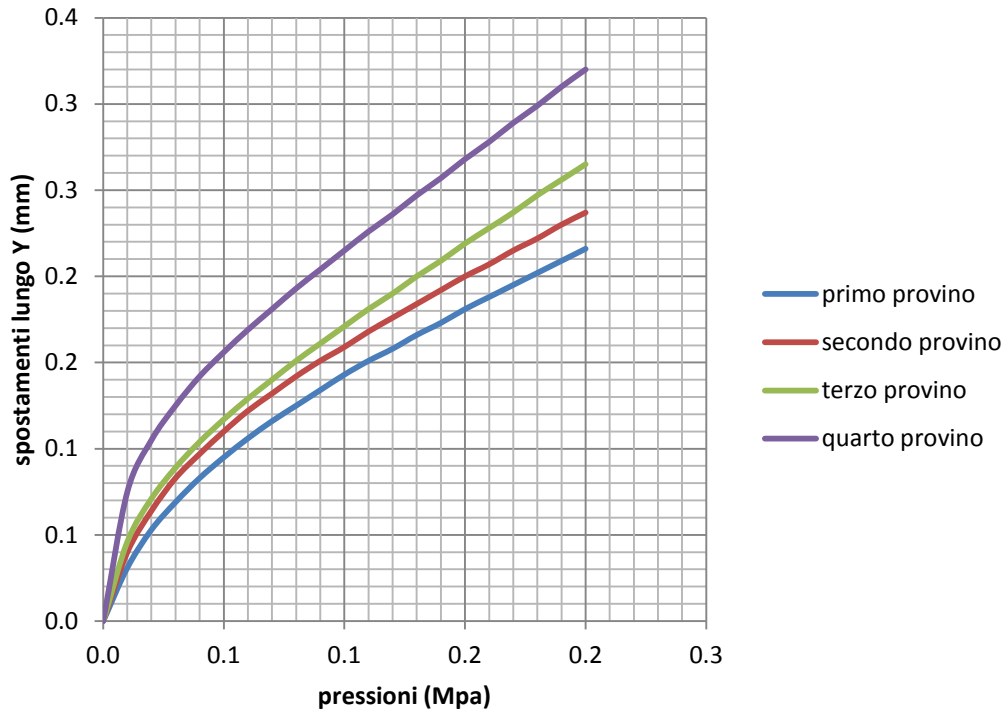


Fig. 4.22 Spostamenti lungo Y per l'applicazione di una pressione pari a 0.2 MPa, per il PDMS 5:1.

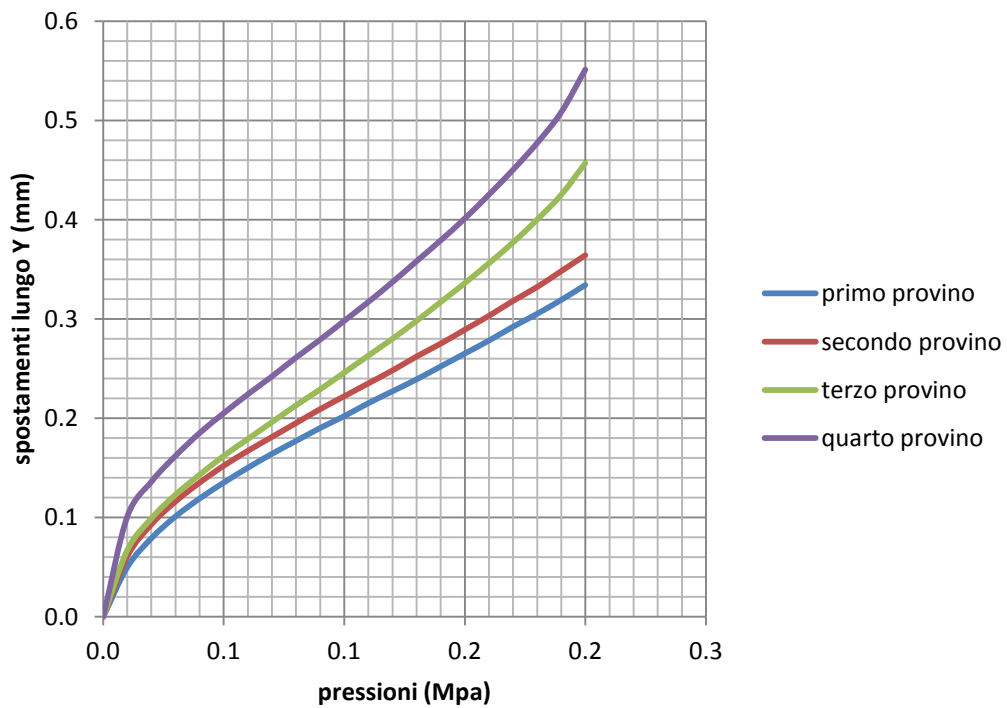


Fig. 4.23 Spostamenti lungo Y per l'applicazione di una pressione pari a 0.2 MPa, per il PDMS 10:1.

Analizzata la differenza tra PDMS 5:1 e PDMS 10:1 e la differente geometria delle membrane, e l'influenza che essi hanno sulla risposta meccanica in un test di gonfiamento, il nostro interesse si è rivolto nell'analisi delle pressioni, che dovranno essere calibrate in modo tale da dare deformazioni membranali massime del 15%.

Questo limite nelle deformazioni è dovuto essenzialmente alla presenza delle cellule sulla superficie della membrana; in particolare di cellule muscolari.

Il nostro scopo è stato quello di andare a valutare per ogni campione, quale pressione bisognava applicare affinché le deformazioni massime della superficie della membrana fossero inferiori della soglia.

Interessante è stato anche valutare le deformate dei vari campioni per la stessa pressione applicata.

Per il PDMS 5:1 le pressioni massime da applicare a ciascuna membrana sono:

- per la prima membrana $P = 0.13$ MPa;
- per la seconda membrana $P = 0.125$ MPa;
- per la terza membrana $P = 0.1$ MPa;
- per la quarta membrana $P = 0.105$ MPa.

Per il PDMS 10:1 le pressioni massime da applicare a ciascuna membrana sono:

- per la prima membrana $P = 0.073$ MPa;
- per la seconda membrana $P = 0.07$ MPa;
- per la terza membrana $P = 0.056$ MPa;
- per la quarta membrana $P = 0.059$ MPa.

Ovviamente per il PDMS 5:1 si sono dovute applicare pressioni maggiori sempre in ragione del fatto che per la composizione chimica con cui questo polimero è costituito, risulta più rigido.

Di seguito riportiamo: le tabelle che mostrano le deformazioni principali massime dei nodi sulla superficie della membrana per le pressioni sopra riportate e le immagini relative alle deformazioni principali massime, per vedere dove si concentrano e che distribuzione hanno.

Tabelle 4.2 e 4.3 Dati delle deformazioni dei nodi sulla superficie delle membrane 1 e 2 con PDMS 5:1. In evidenza la deformazione principale massima.

PDMS 5:1 primo provino	
P=0.13 Mpa	
nodi	deformazione vera
1	0.1488
2	0.1473
3	0.1462
4	0.1456
5	0.1446
6	0.1434
7	0.1417
8	0.1397
9	0.1371
10	0.1337
11	0.1295
12	0.1241
13	0.1174
14	0.1093
15	0.09934
16	0.08911
17	0.08137
18	0.07404
19	0.0666
20	0.05913
21	0.05169
22	0.04436
23	0.03724
24	0.05475
25	0.08006
26	0.09547

PDMS 5:1 secondo provino	
P=0.125 Mpa	
nodi	deformazione vera
1	0.1486
2	0.1473
3	0.1464
4	0.146
5	0.1455
6	0.1449
7	0.1441
8	0.1431
9	0.1418
10	0.14
11	0.1377
12	0.1346
13	0.1305
14	0.125
15	0.1181
16	0.1091
17	0.09806
18	0.08417
19	0.06959
20	0.0617
21	0.05371
22	0.04573
23	0.03787
24	0.05433
25	0.08882
26	0.109

Tabelle 4.4 e 4.5 Dati delle deformazioni dei nodi sulla superficie delle membrane 3 e 4 con PDMS 5:1. In evidenza la deformazione principale massima.

PDMS 5:1 terzo provino	
P=0.1 Mpa	
nodì	deformazione vera
1	0.1483
2	0.1465
3	0.1451
4	0.1441
5	0.1427
6	0.1411
7	0.1392
8	0.137
9	0.1345
10	0.1316
11	0.1281
12	0.1239
13	0.1187
14	0.1121
15	0.104
16	0.09383
17	0.08164
18	0.07071
19	0.06298
20	0.05527
21	0.04766
22	0.04024
23	0.03311
24	0.05576
25	0.08329
26	0.09716

PDMS 5:1 quarto provino	
P=0.105 Mpa	
nodì	deformazione vera
1	0.1486
2	0.1476
3	0.1469
4	0.1468
5	0.1468
6	0.1468
7	0.1469
8	0.147
9	0.1471
10	0.1473
11	0.1475
12	0.1477
13	0.1478
14	0.1478
15	0.1476
16	0.1468
17	0.1452
18	0.142
19	0.1369
20	0.1277
21	0.1146
22	0.0928
23	0.06266
24	0.03587
25	0.05582
26	0.1081

Tabelle 4.6 e 4.7 Dati delle deformazioni dei nodi sulla superficie delle membrane 1 e 2 con PDMS 10:1. In evidenza la deformazione principale massima.

PDMS 10:1 primo provino		PDMS 10:1 secondo provino	
P=0.073 Mpa		P=0.07 Mpa	
nodì	deformazione vera	nodì	deformazione vera
1	0.1497	1	0.149
2	0.1481	2	0.1477
3	0.1471	3	0.1468
4	0.1464	4	0.1465
5	0.1455	5	0.146
6	0.1444	6	0.1455
7	0.1428	7	0.1448
8	0.1409	8	0.1438
9	0.1384	9	0.1426
10	0.1352	10	0.141
11	0.1311	11	0.1388
12	0.1259	12	0.1358
13	0.1194	13	0.1319
14	0.1115	14	0.1267
15	0.1017	15	0.1199
16	0.09085	16	0.1112
17	0.08227	17	0.1003
18	0.0749	18	0.08649
19	0.06741	19	0.07039
20	0.05987	20	0.0622
21	0.05236	21	0.05417
22	0.04495	22	0.04613
23	0.03773	23	0.03821
24	0.05459	24	0.05412
25	0.08044	25	0.0889
26	0.09627	26	0.1095

Tabelle 4.8 e 4.9 Dati delle deformazioni dei nodi sulla superficie delle membrane 3 e 4 con PDMS 10:1. In evidenza la deformazione principale massima.

PDMS 10:1 terzo provino	
P=0.057 Mpa	
nodì	deformazione vera
1	0.1487
2	0.1468
3	0.1455
4	0.1445
5	0.1432
6	0.1417
7	0.1399
8	0.1378
9	0.1354
10	0.1326
11	0.1293
12	0.1252
13	0.1203
14	0.1139
15	0.106
16	0.09602
17	0.08398
18	0.07133
19	0.06358
20	0.05583
21	0.04816
22	0.04068
23	0.03348
24	0.05558
25	0.08358
26	0.09788

PDMS 10:1 quarto provino	
P=0.059 Mpa	
nodì	deformazione vera
1	0.1491
2	0.148
3	0.1473
4	0.1473
5	0.1473
6	0.1474
7	0.1475
8	0.1477
9	0.1479
10	0.1482
11	0.1485
12	0.1488
13	0.1491
14	0.1493
15	0.1492
16	0.1486
17	0.1472
18	0.1442
19	0.1394
20	0.1306
21	0.1177
22	0.09587
23	0.06527
24	0.0367
25	0.05487
26	0.1077

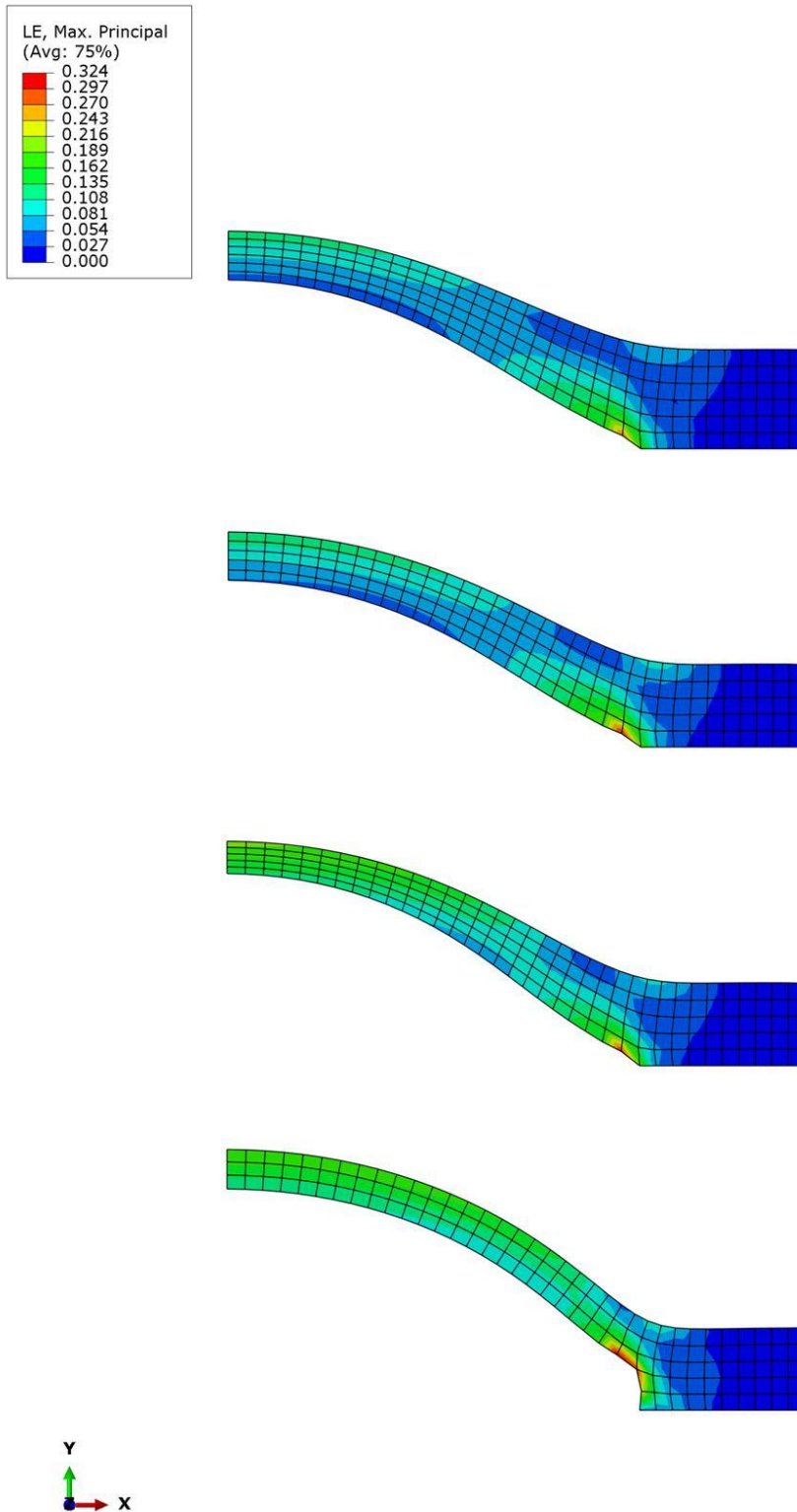


Fig. 4.24 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 10:1 per una pressione applicata di $P = 0.056$ MPa.

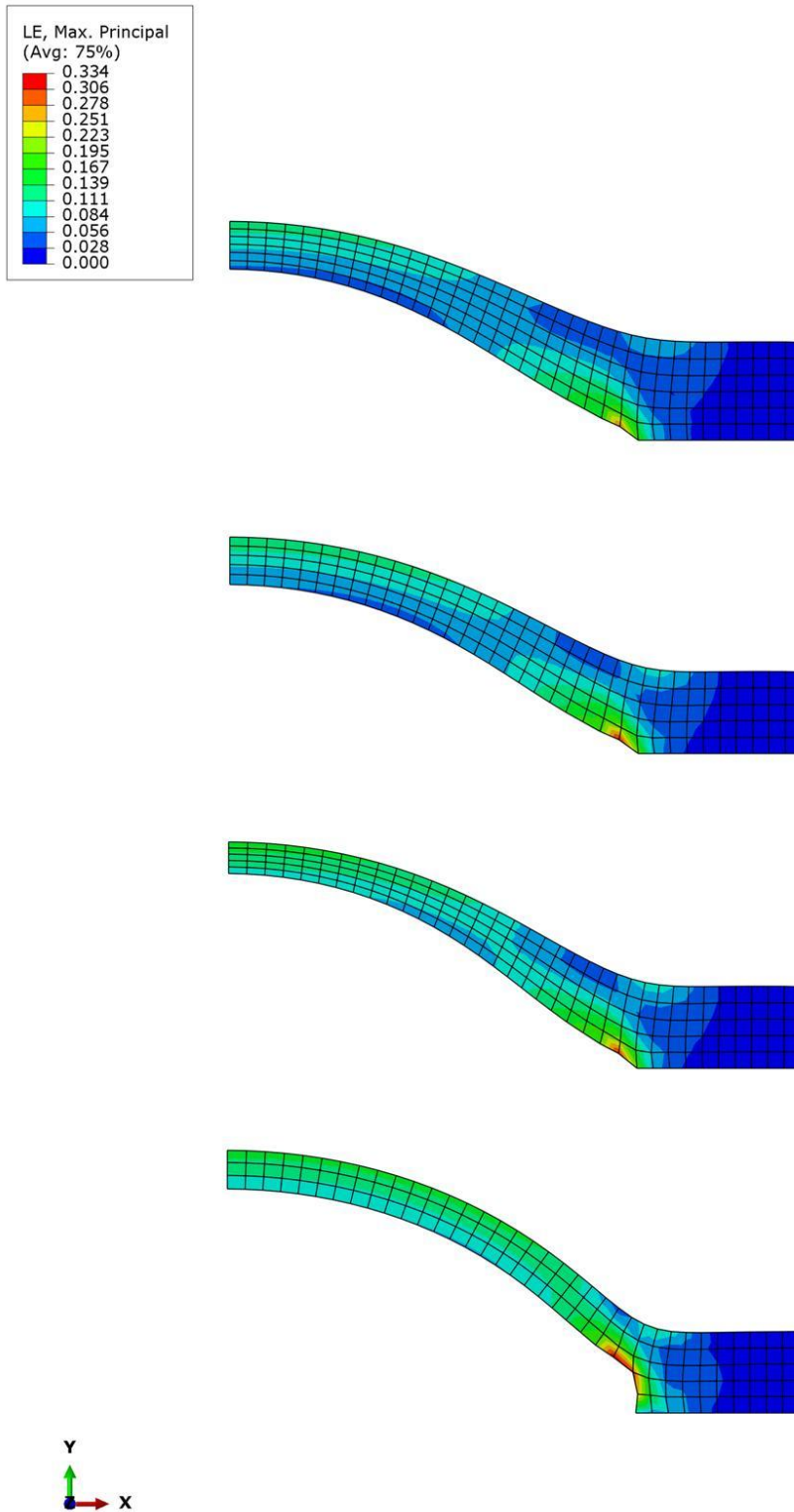


Fig. 4.25 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 10:1 per una pressione applicata di $P = 0.059$ MPa.

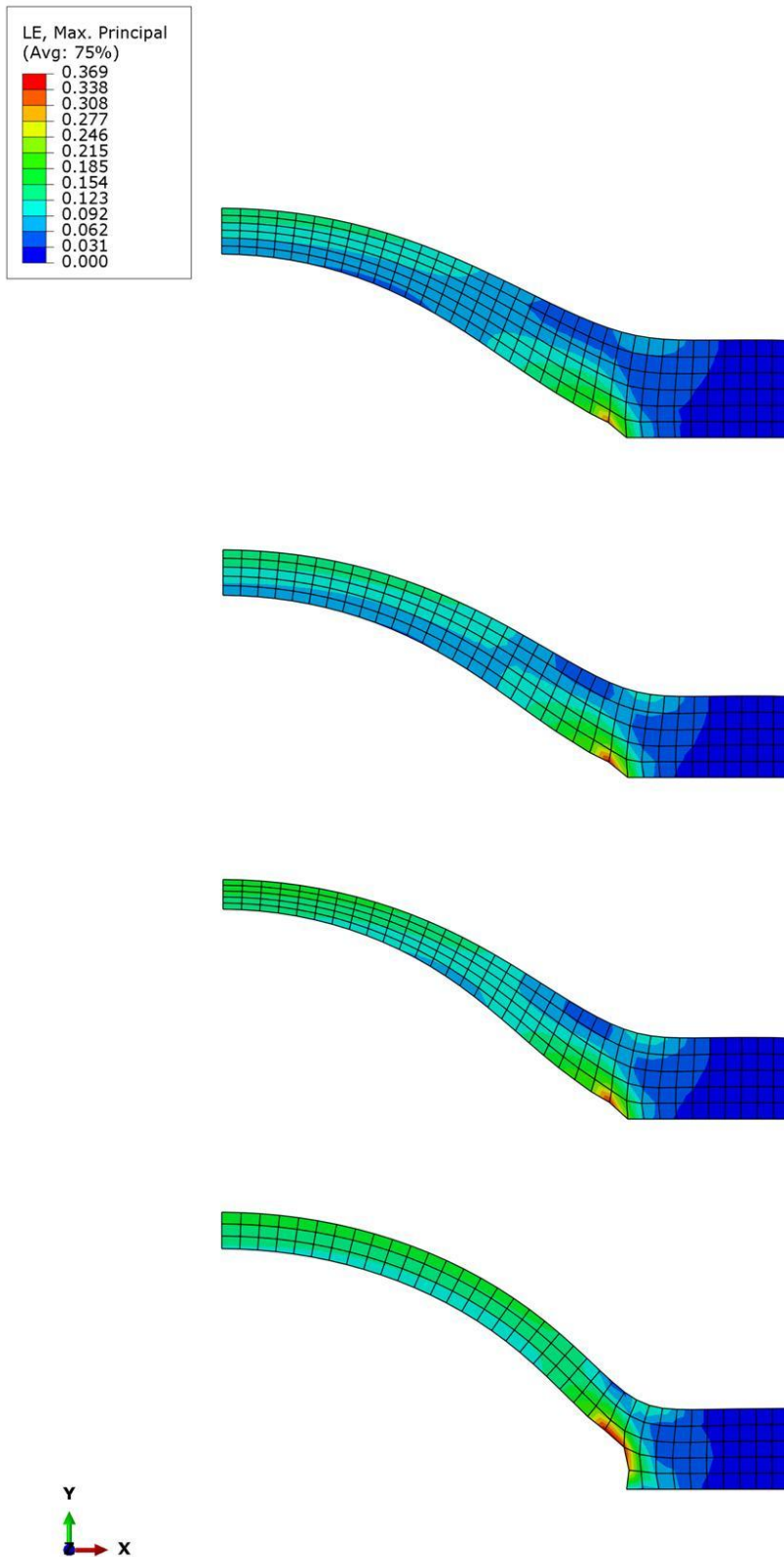


Fig. 4.26 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 10:1 per una pressione applicata di $P = 0.07$ MPa.

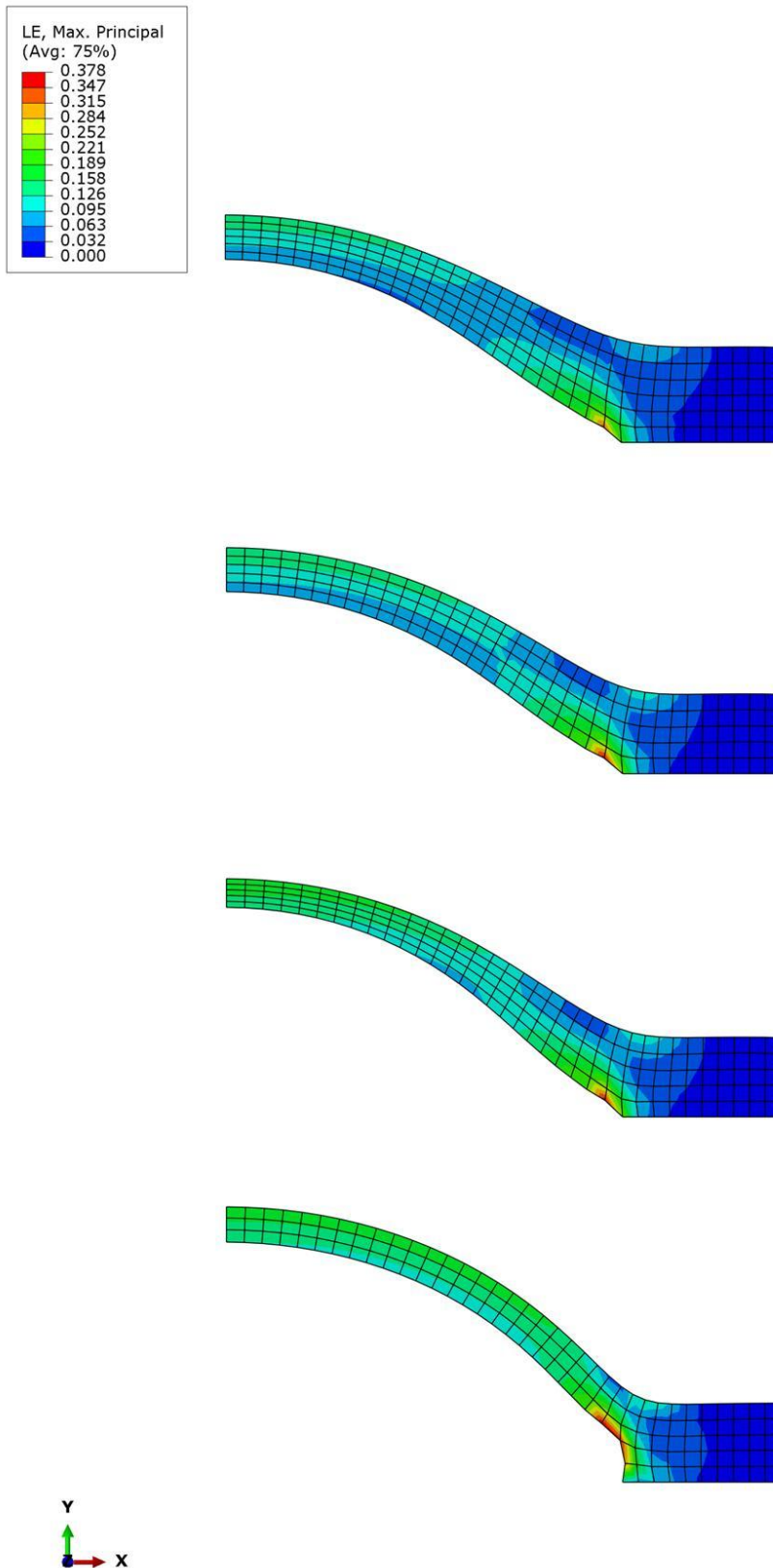


Fig. 4.27 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 10:1 per una pressione applicata di $P = 0.073$ MPa.

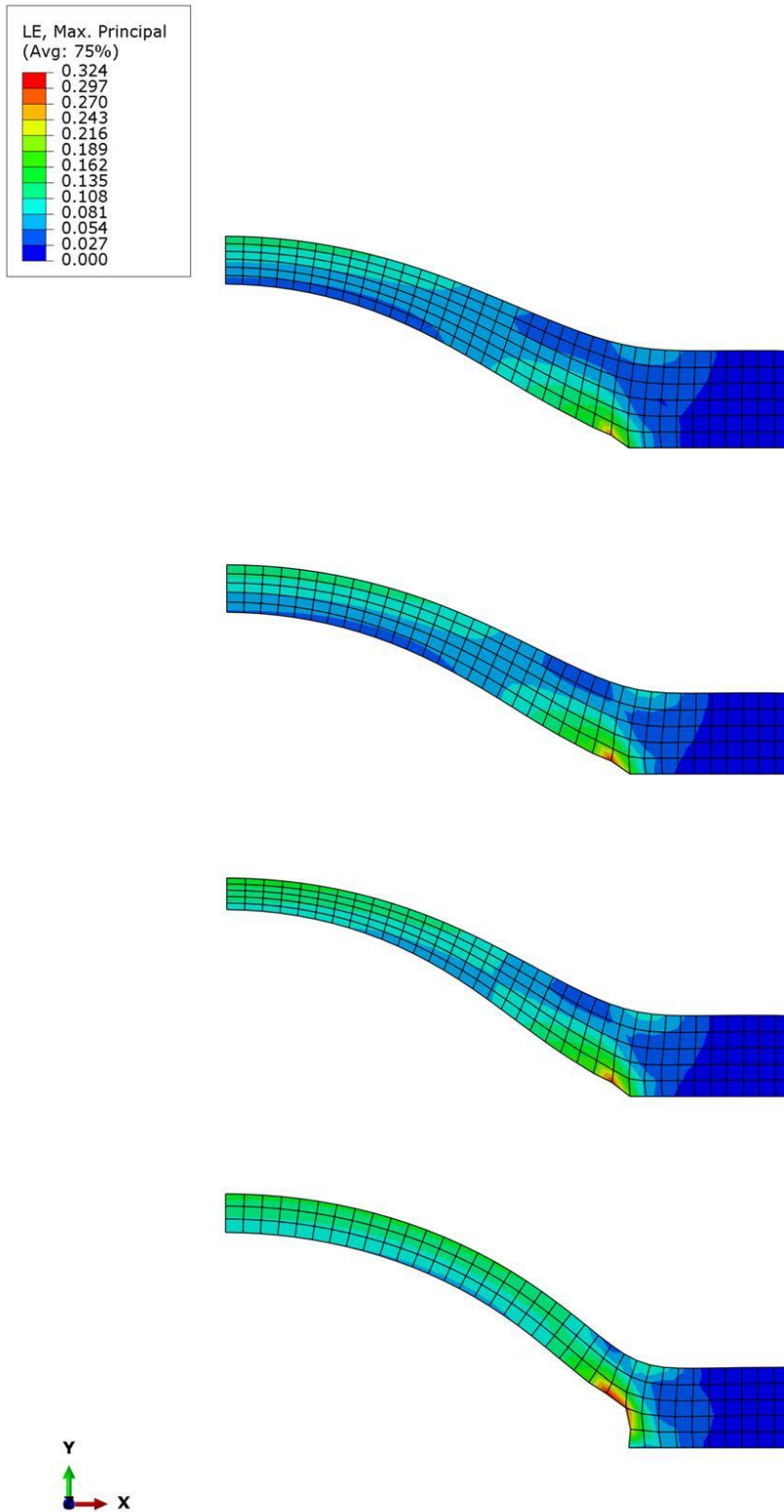


Fig. 4.28 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 5:1 per una pressione applicata di $P = 0.1$ MPa.

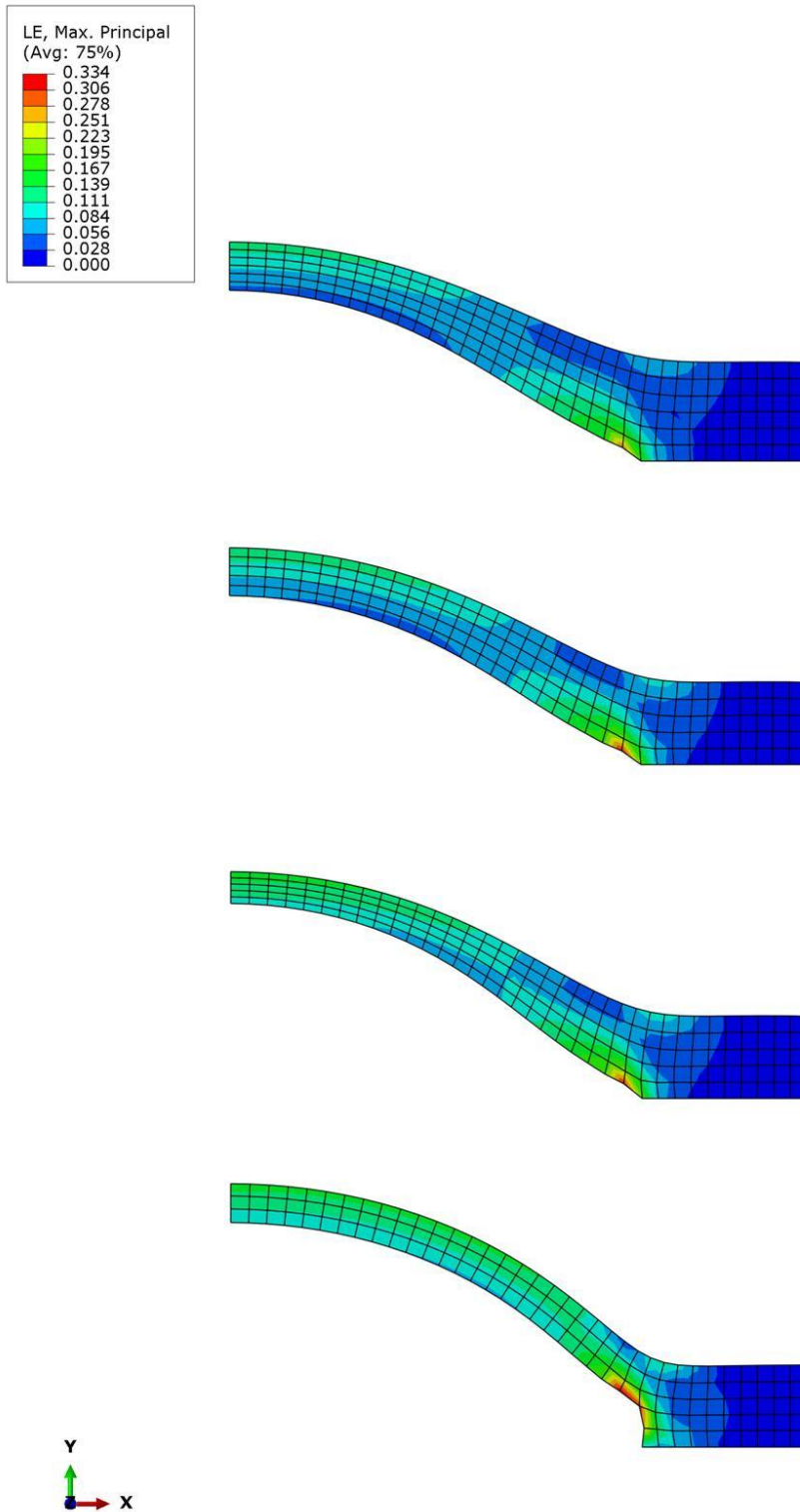


Fig. 4.29 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 5:1 per una pressione applicata di $P = 0.105$ MPa.

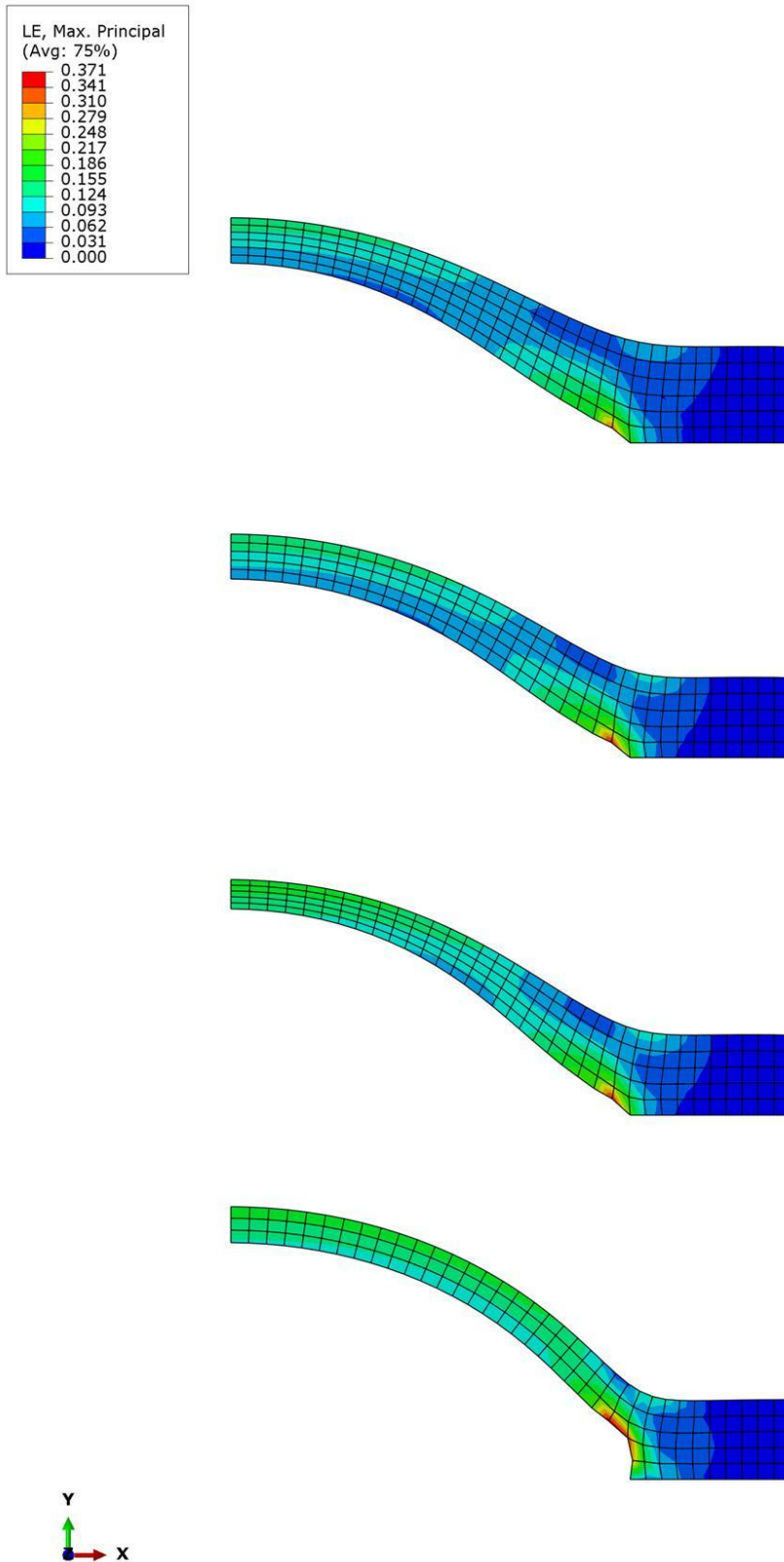


Fig. 4.30 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 5:1 per una pressione applicata di $P = 0.125$ MPa.

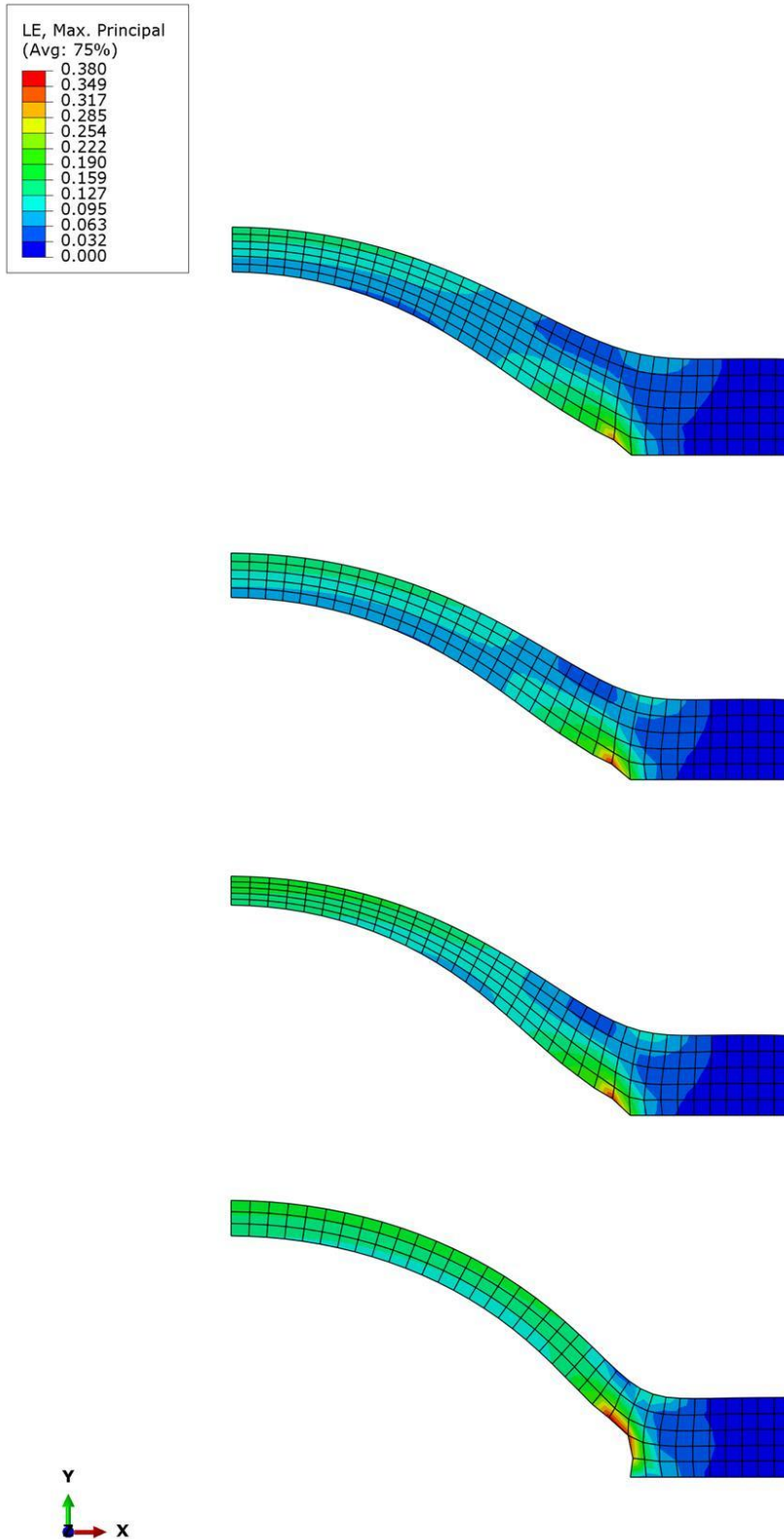


Fig. 4.31 Deformazione logaritmica massima principale per il PDMS 5:1 per una pressione applicata di $P = 0.13$ MPa.

Dalle immagini si può notare che le deformazioni principali massime si concentrano in particolar modo nella zona in cui la membrana è vincolata.

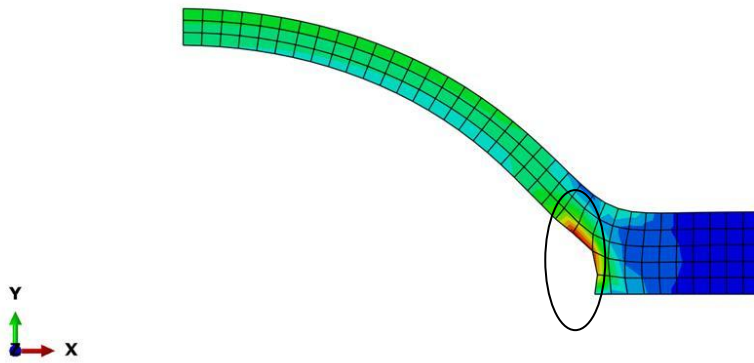


Fig. 4.32 E' evidenziata la zona in cui si presenta la massima deformazione principale, per la quarta membrana.

Questa zona però non è di interesse pratico in quanto non vi sono seminate le cellule; qui è importante solo che il materiale resista alla deformazione senza rompersi. Più importanza ha invece la superficie della membrana, dove verranno seminate le cellule. Qui la deformazione si concentra in modo prevalente al centro della membrana per tutti i campioni testati. In particolare per la quarta membrana si può notare che la deformazione ottenuta è uniforme su quasi tutta la lunghezza della membrana.

Di seguito riportiamo i grafici delle deformate, confrontando le varie membrane relativamente agli spostamenti lungo Y per le pressioni trovate.

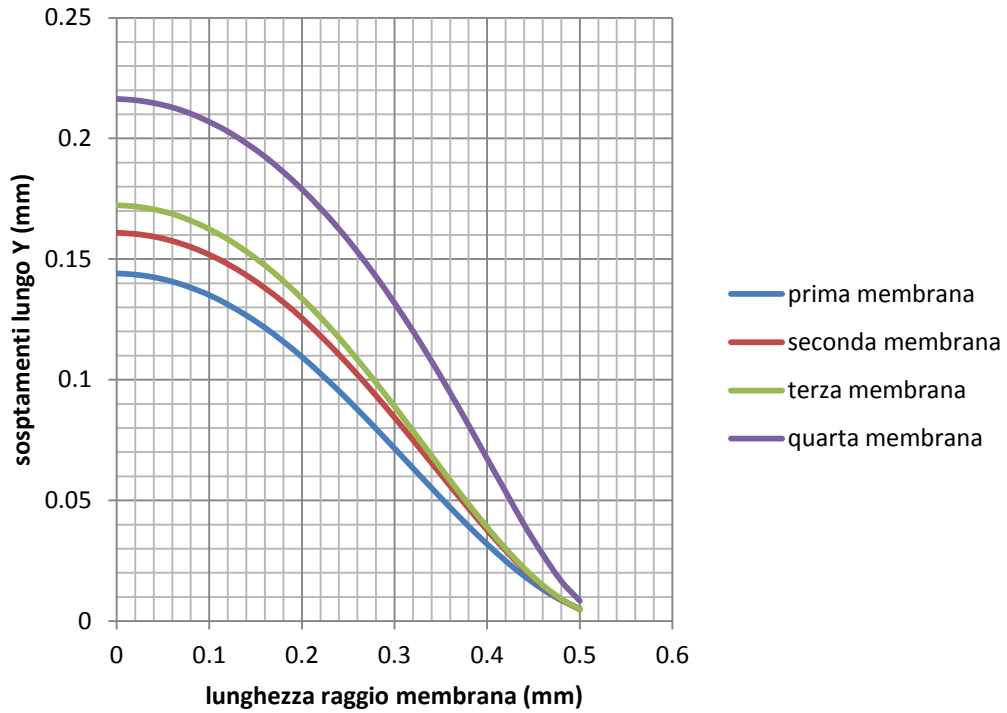


Fig. 4.33 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 10:1 con una pressione applicata di $P = 0.056$ MPa.

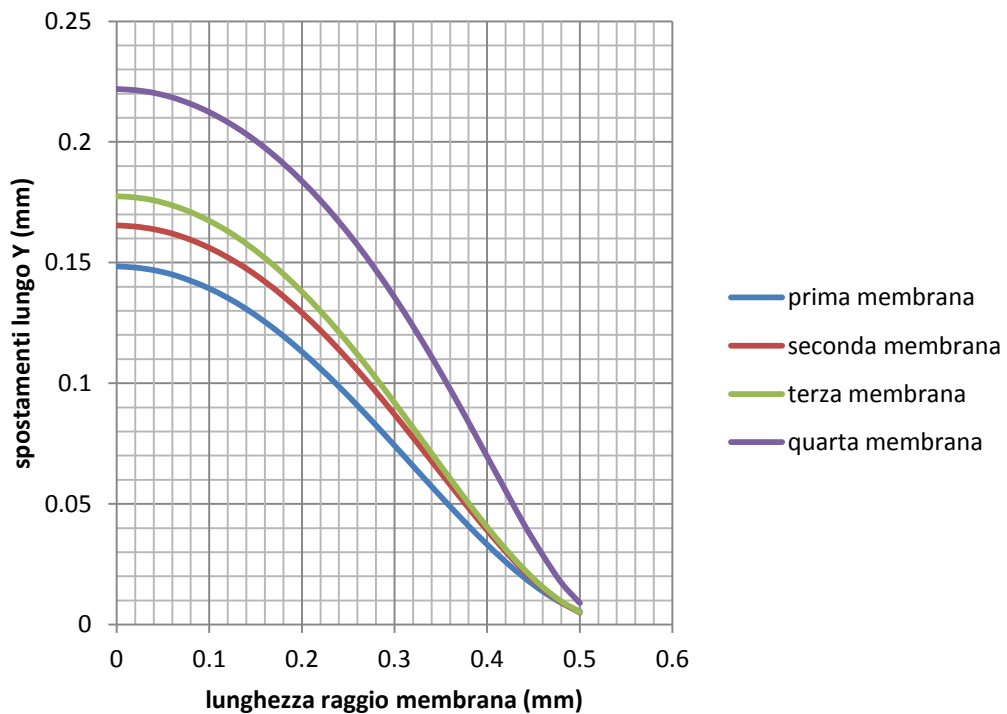


Fig. 4.34 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 10:1 con una pressione applicata di $P = 0.059$ MPa.

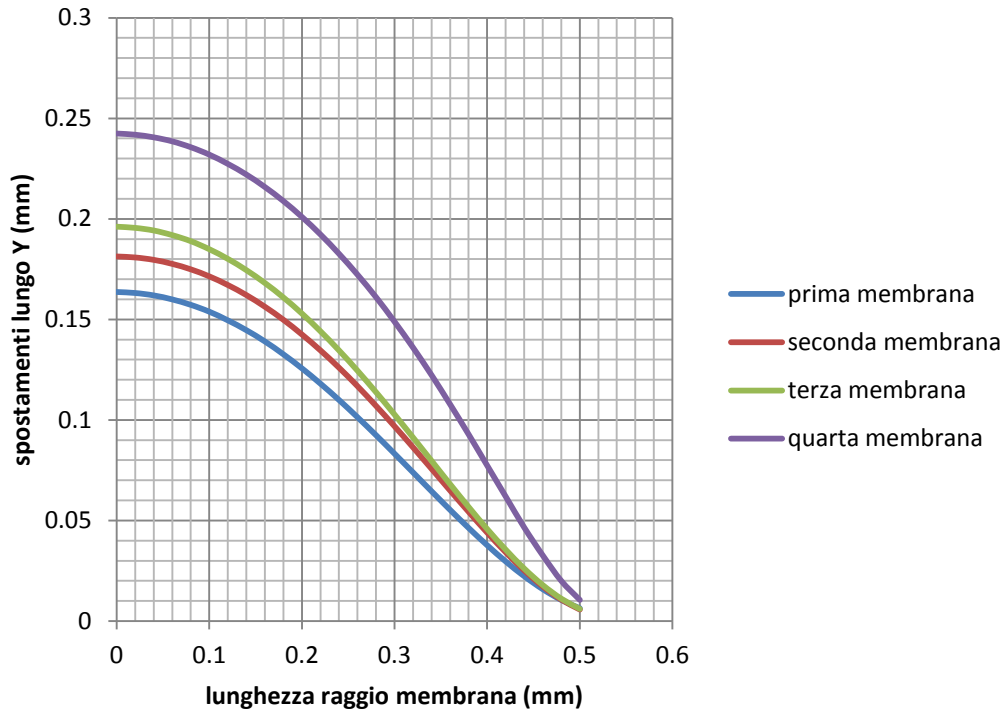


Fig. 4.35 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 10:1 con una pressione applicata di $P = 0.07$ MPa.

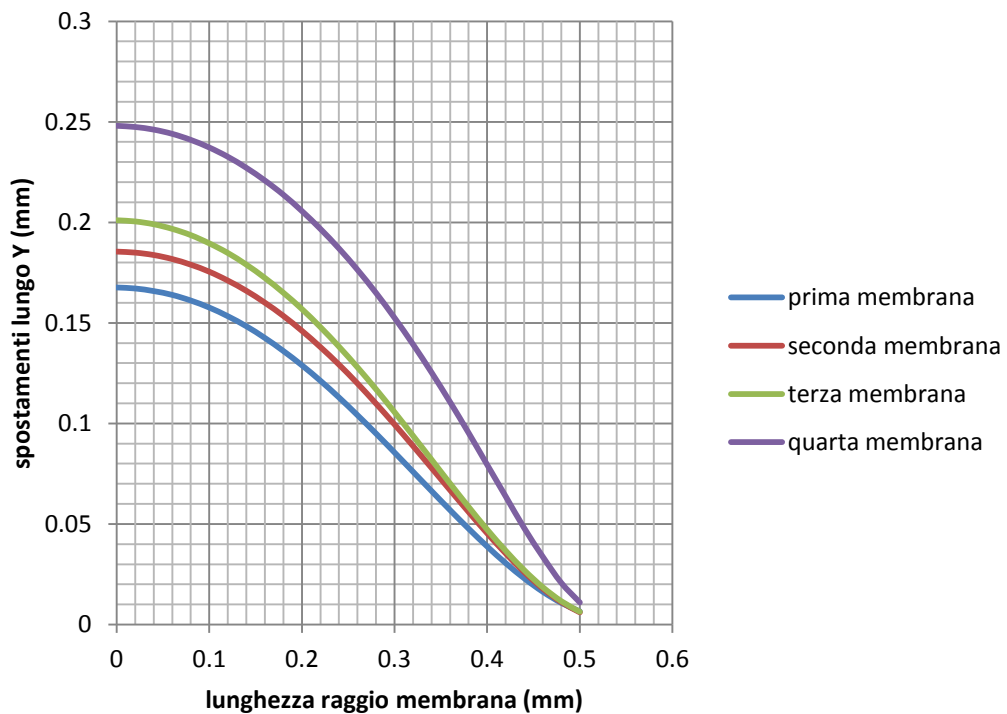


Fig. 4.36 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 10:1 con una pressione applicata di $P = 0.073$ MPa.

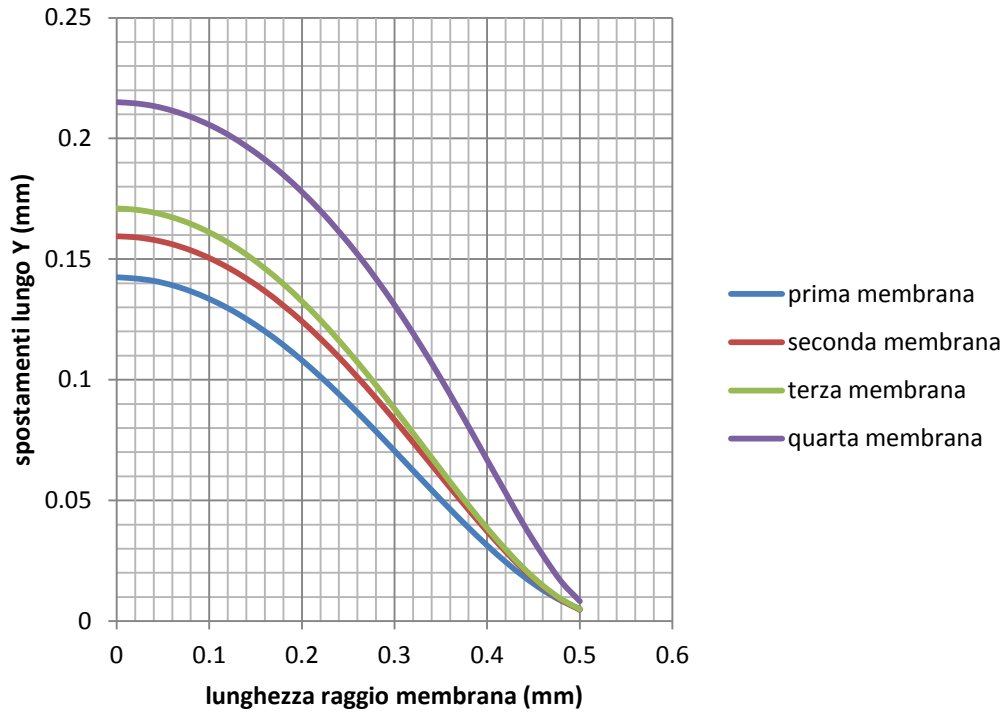


Fig. 4.37 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 5:1 con una pressione applicata di $P = 0.1$ MPa.

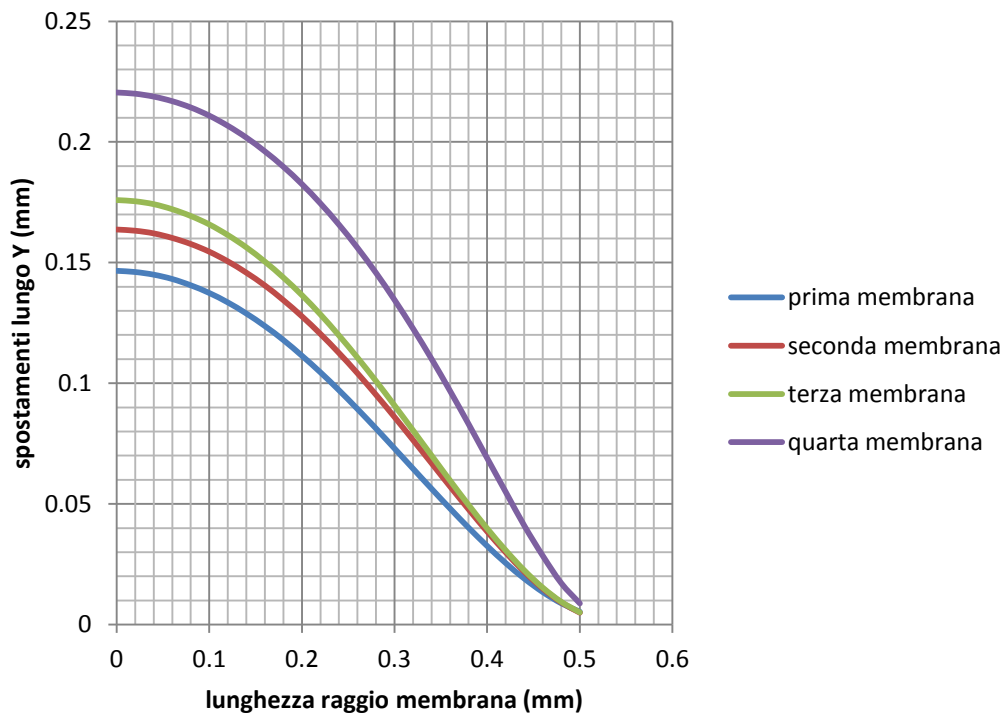


Fig. 4.38 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 5:1 con una pressione applicata di $P = 0.105$ MPa.

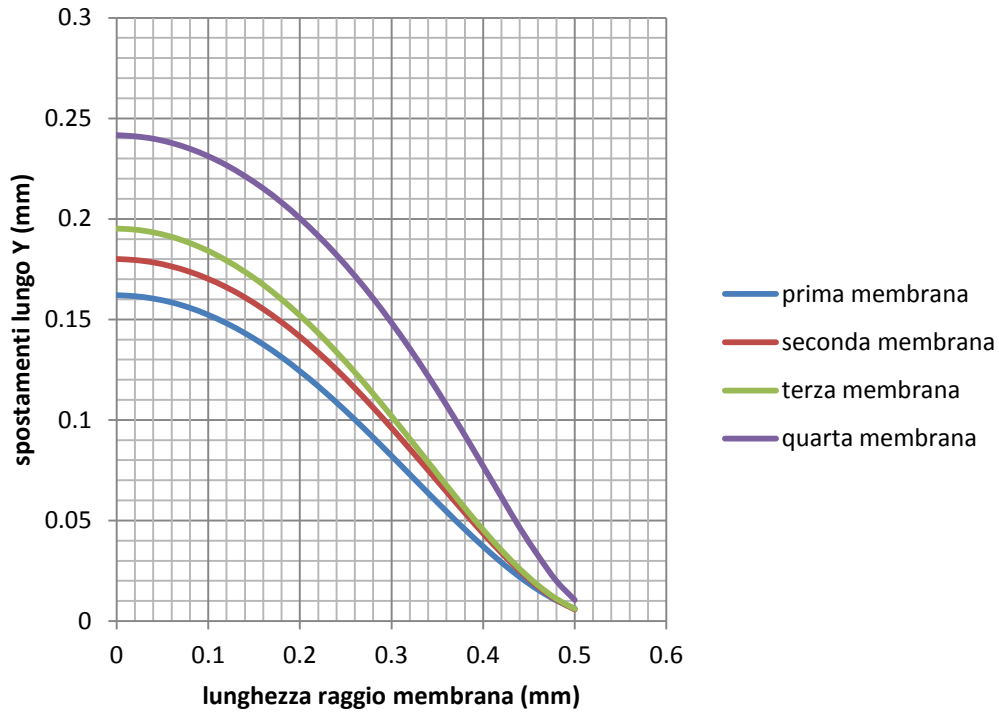


Fig. 4.39 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 5:1 con una pressione applicata di $P = 0.125$ MPa.

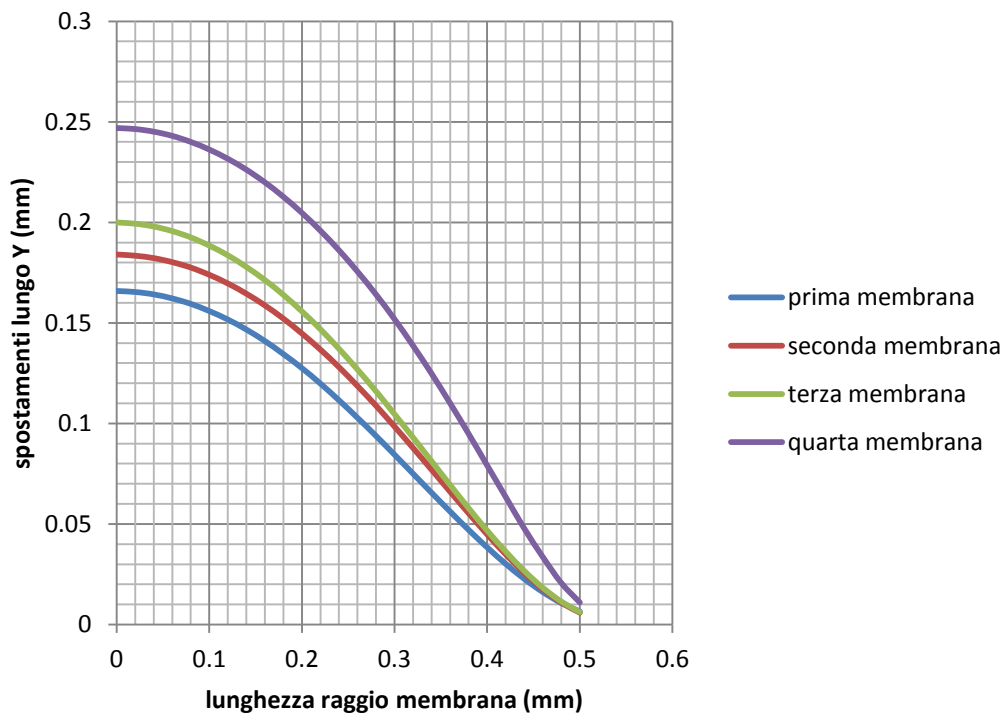


Fig. 4.40 Deformate delle membrane con riferimento agli spostamenti lungo Y per il PDMS 5:1 con una pressione applicata di $P = 0.13$ MPa.

4.7 TEST DI TRAZIONE MONOASSIALE

Di seguito analizzeremo scaffolds sottoposti a test di trazione monoassiale. L'obiettivo è sempre quello di andare a valutare le tensioni e deformazioni che si sviluppano nelle membrane su cui vanno seminate le cellule.

La configurazione del test è la seguente.

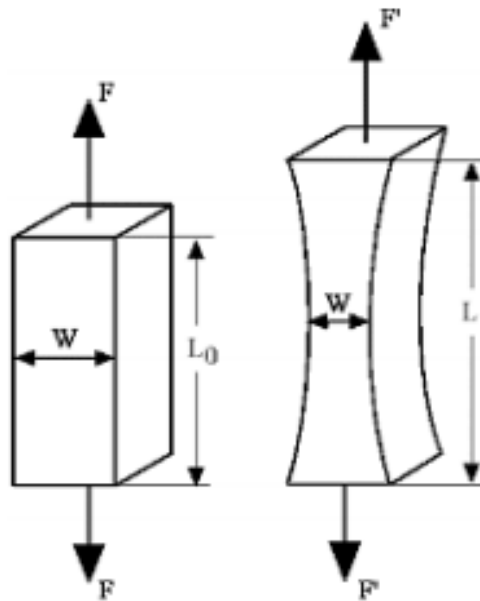


Fig. 4.41 Quando si allunga un campione, questo nella direzione perpendicolare alla trazione si restringe per effetto del modulo di Poisson che esprime il rapporto tra deformazione trasversale e deformazione longitudinale.

Le membrane in questo caso sono incollate ad una intelaiatura, che ci permette di applicare la sollecitazione meccanica. L'obiettivo di questa simulazione è rivolto all'analisi dell'insorgere di tensioni e deformazioni sulle membrane a seguito di un allungamento del supporto del 15% della sua lunghezza. Si è cercato di riportare di seguito dove le membrane presentano le deformazioni maggiori, a seconda anche della configurazione del test come vedremo nel seguito. Si è poi passata ad un raffinamento della simulazione, introducendo l'azione delle pinze che tengono e deformano il campione.

Il substrato è stato sottoposto ad un allungamento per determinare le risposte meccaniche, valutando gli spostamenti, le deformazioni e le tensioni risultanti.

La nostra attenzione si è concentrata prevalentemente sulle membrane, poiché su queste vengono seminate le cellule. L'analisi della deformazione è necessaria per fornire dati quantitativi che permetteranno di studiare il fenomeno di meccanotrasduzione delle cellule

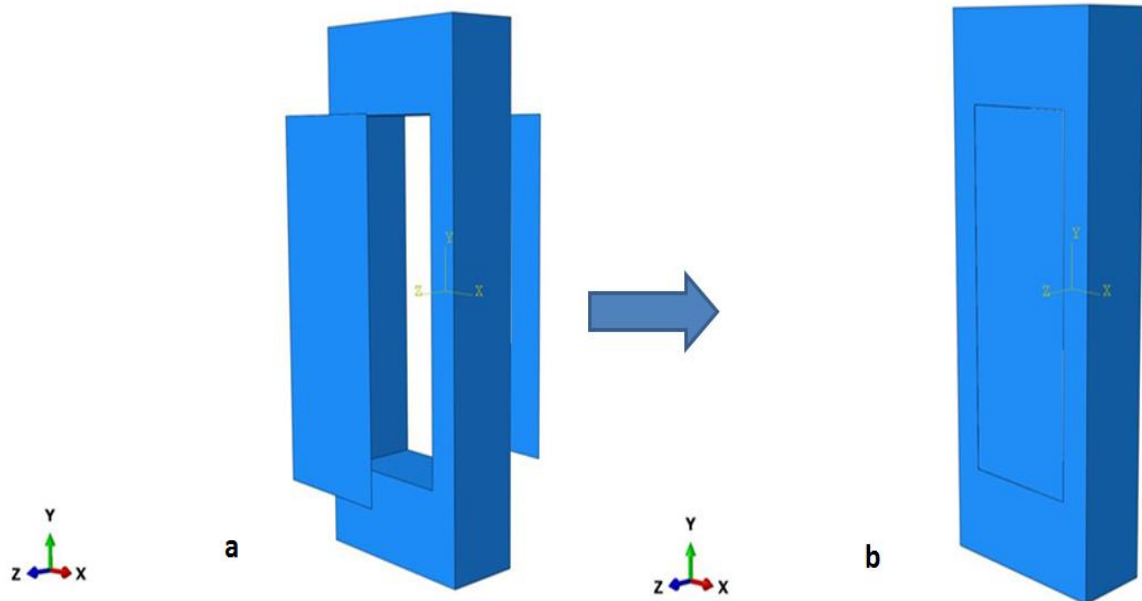


Fig. 4.42 Modello (a) nelle sue componenti, (b) assemblato con la sovrapposizione delle membrane all'intelaiatura.

4.7.1 GEOMETRIA E COSTRUZIONE DEL MODELLO

Il modello è costituito dalle seguenti parti:

- l'intelaiatura;
- la membrana superiore;
- la membrana inferiore.

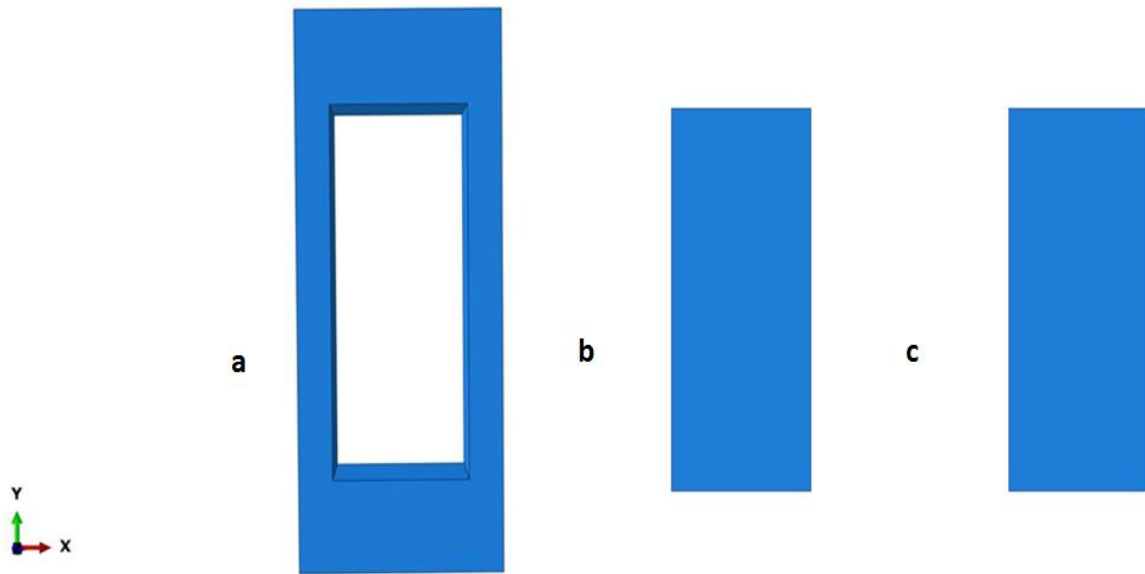


Fig. 4.43 Le tre parti che compongono il modello: **(a)** l'intelaiatura, **(b)** la membrana superiore, **(c)** la membrana inferiore.

Abbiamo scelto di utilizzare, come nel caso precedente, per le lunghezze i millimetri [mm] e per le forze i newton [N]. Di conseguenza l'unità di misura relativa alle tensioni risulta il megapascal [MPa].

Fatte queste considerazioni, si è passati alla costruzione della geometria del modello con le dimensioni richieste. L'intelaiatura ha una lunghezza pari a 30 mm, larghezza pari a 12 mm e spessore di 5 mm; cava al centro. Le membrane hanno una lunghezza pari a 20 mm, una larghezza pari a 8 mm, che coincidono esattamente con le dimensioni dell'incavo nell'intelaiatura, e uno spessore pari a 0.02 mm.

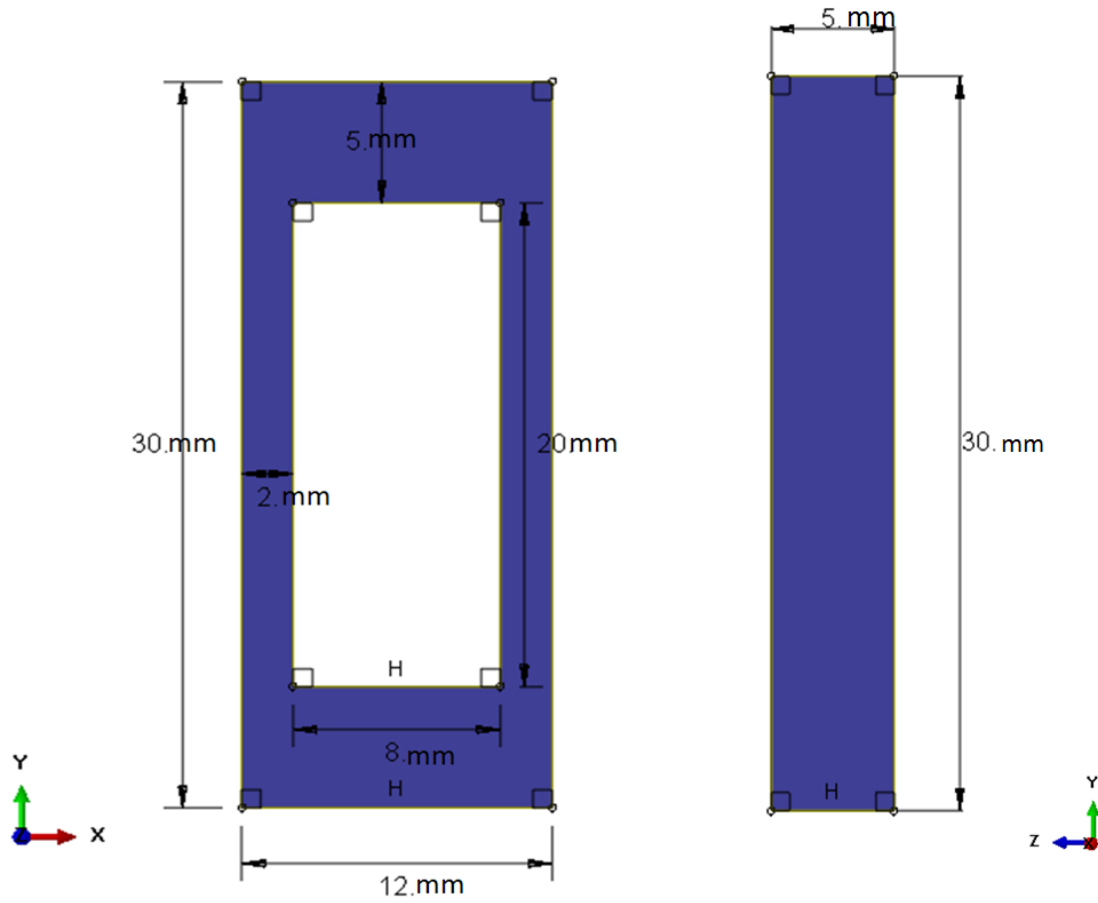


Fig. 4.44 (a) Geometria dell'intelaiatura.

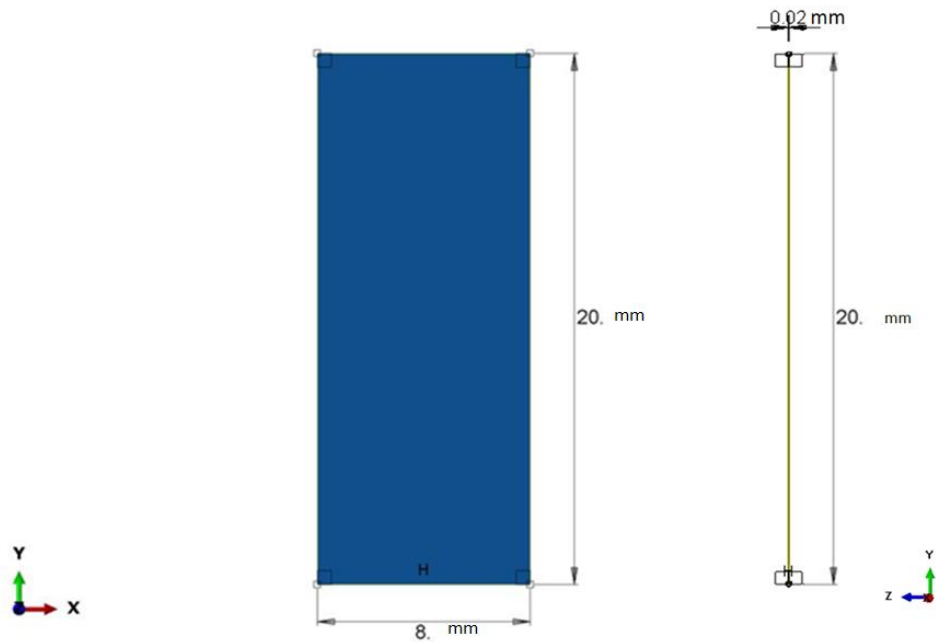


Fig. 4.44 (b) Geometria della membrana superiore e inferiore

Non è stato possibile però creare l'intelaiatura come un unico solido, si è dovuto quindi ridisegnare la struttura dell'intelaiatura come un insieme di solidi assemblati, come mostra la seguente figura.

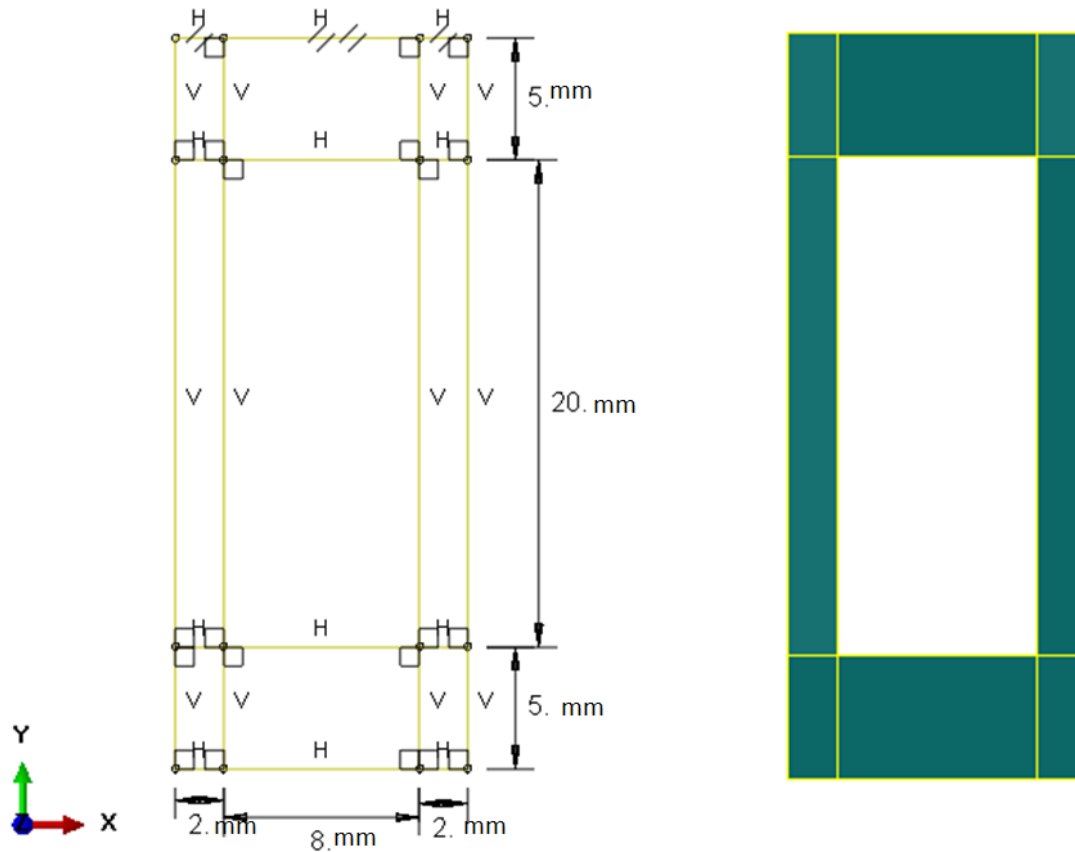


Fig. 4.45 Come è stata costruita l'intelaiatura, considerata come un insieme di solidi assemblati.

Il tutto è stato poi assemblato in modo opportuno, facendo combaciare le membrane all'intelaiatura.

4.7.2 DEFINIZIONE DEL MATERIALE

Si è passato poi alla definizione delle caratteristiche del materiale con cui è stato costruito lo scaffold. Il materiale utilizzato anche in questa simulazione è il PDMS 10:1.

4.7.3 CONDIZIONI DI VINCOLO E ALLUNGAMENTO IMPOSTO

In questo paragrafo viene spiegato come sono state applicate le condizioni di vincolo e gli allungamenti imposti. Si è deciso di effettuare tre prove diverse con differenti condizioni di vincolo.

- Nella prima simulazione si è supposto un vincolo ideale, in quanto solo la faccia dell'intelaiatura è stata vincolata come mostra la seguente figura.

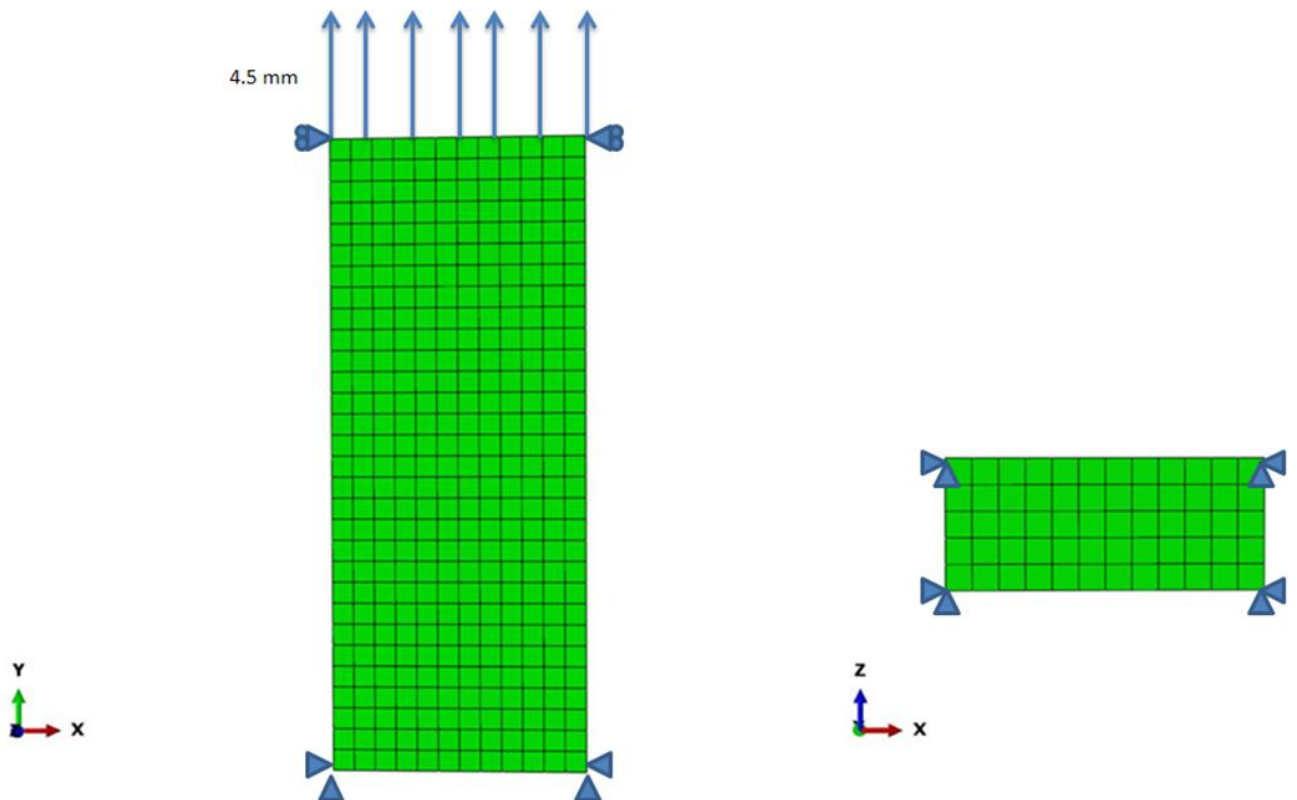


Fig. 4.46 Condizioni di vincolo e allungamento imposto nel caso della prima simulazione, in cui si considera la situazione ideale di vincoli sui bordi.

- Nella seconda simulazione si è supposto che una pinza tenesse il modellino da entrambe le parti, ed è stata vincolata quindi una regione dell'intelaiatura (precisamente si è vincolata una regione di scaffold pari a 2.5 mm) come mostra la seguente figura.

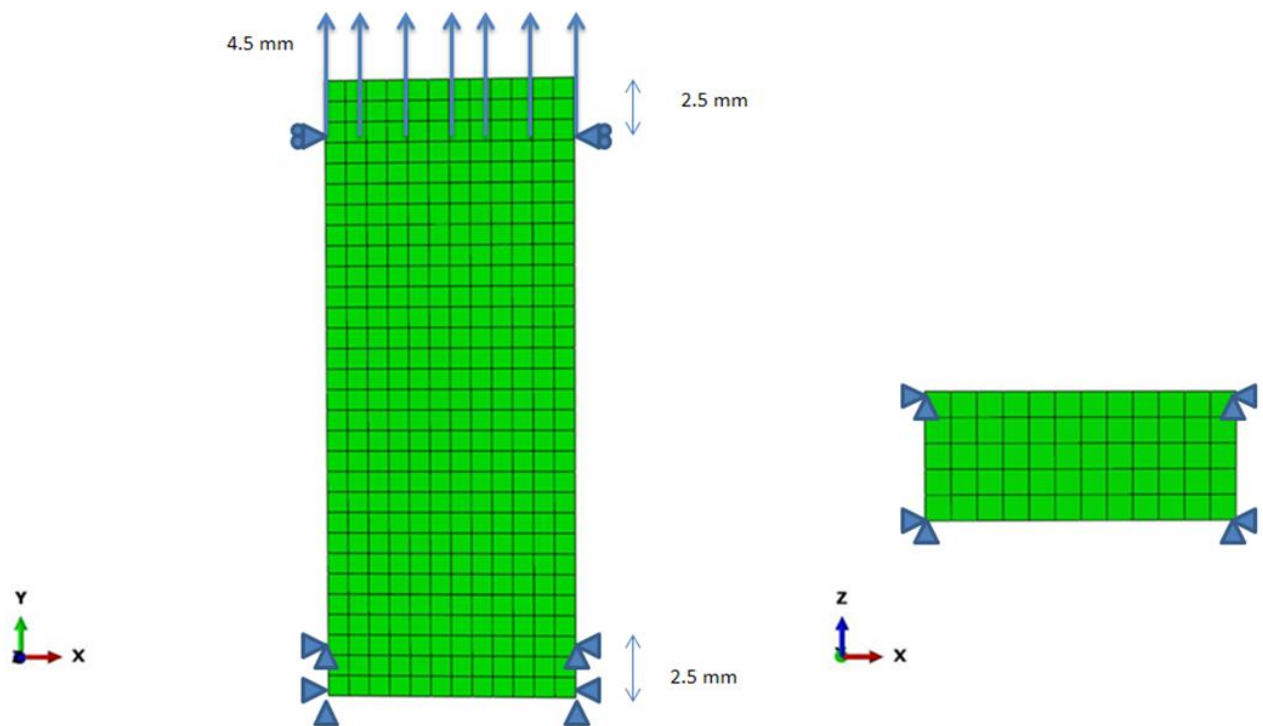


Fig. 4.47 Condizioni di vincolo e allungamento imposto nel caso della seconda simulazione, in cui si considera la situazione più reale della presenza delle pinze alle estremità dello scaffold che permettono di applicare la sollecitazione imposta.

- Nella terza simulazione si è supposto che una pinza tenesse il modellino da entrambe le parti, ed è stata vincolata quindi una regione dell'intelaiatura (precisamente si è vincolata una regione di scaffold pari a 5 mm) come mostra la seguente figura.

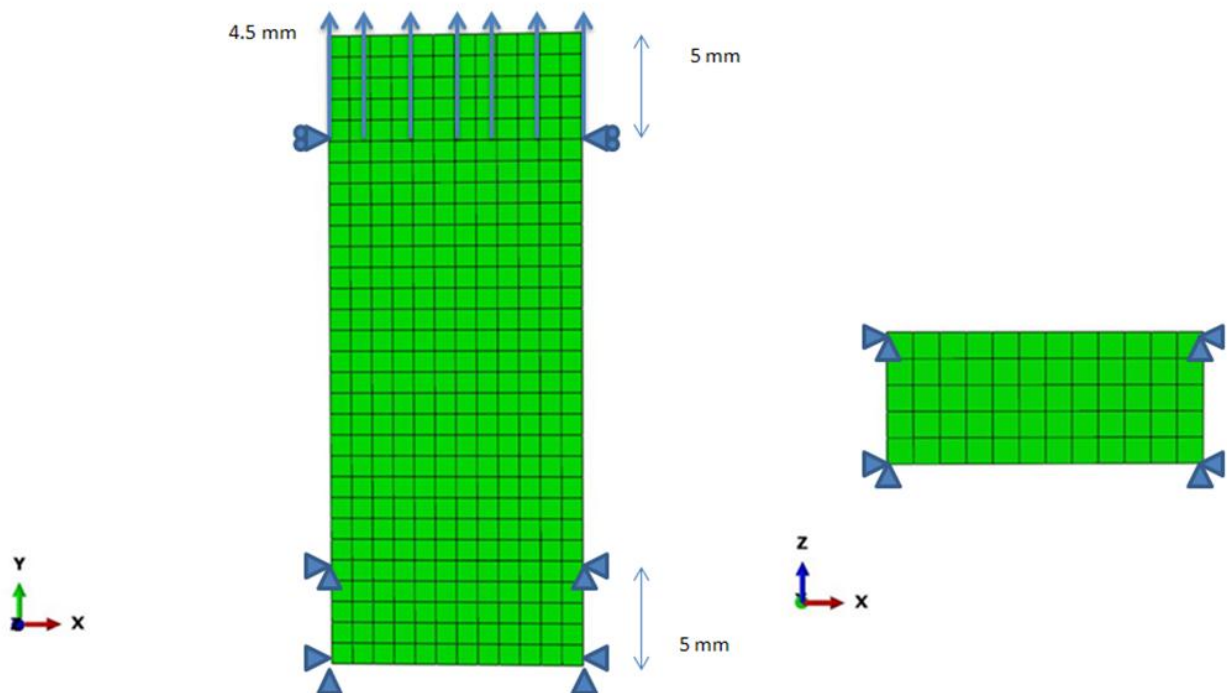


Fig. 4.48 Condizioni di vincolo e allungamento imposto nel caso della terza simulazione, in cui si considera la situazione più reale della presenza delle pinze alle estremità dello scaffold, in questo caso la regione vincolata risulta maggiore rispetto alla seconda prova.

L'allungamento imposto del 15%, della lunghezza maggiore dello scaffold, invece è stata applicata dalla parte opposta del vincolo in tutte e tre le prove, come mostrano le figure precedenti.

4.7.4 DEFINIZIONE DEL MODELLO COSTITUTIVO

Per questo caso abbiamo scelto di utilizzare il modello costitutivo neo-Hookean, perché era sufficiente per spiegare e mostrare in modo corretto il comportamento del modello sottoposto alla sollecitazione. Infatti per l'applicazione dell'allungamento imposto del 15% della lunghezza dello scaffold, il materiale è ancora in regime lineare. Inoltre questo modello costitutivo ha una formulazione semplice e non necessita di numerosi parametri per la definizione della legge costitutiva. La seguente tabella mostra come è stato costruito il modello e i parametri inseriti.

Tabella 4.10 Definizione del modello costitutivo per il PDMS 10:1.

MATERIALE: PDMS (polidimetilsilossano)

Modello costitutivo	iperelastico
Comprimibilità	incomprimibile
Energia potenziale di deformazione	Neo-Hookeano
Ordine del polinomio	1
Risposta elastica	istantanea
Coefficiente C10	0.4166

4.7.5 MESH E SCELTA DEGLI ELEMENTI UTILIZZATI

Nella nostra simulazione, data la geometria del modello e le caratteristiche del materiale, si sono scelti due tipi di elementi finiti:

- elementi strutturali per le membrane;
- elementi solidi continui per l'intelaiatura

Partiamo dagli elementi solidi continui. Per la definizione della geometria dello scaffold e per le proprietà del materiale abbiamo scelto di utilizzare per la discretizzazione dell'intelaiatura gli elementi C3D8H; cioè elementi esaedrici 3D di primo ordine con integrazione completa e ibridi; gli stessi utilizzati anche nel test a trazione monoassiale e biassiale.

Per quanto riguarda gli elementi utilizzati nelle membrane si può scegliere tra elementi membrana ed elementi shell. La sostanziale differenza che intercorre tra elementi membrana e elementi shell è che questi ultimi sono caratterizzati anche da un comportamento flessionale e non solo da uno stato di tensione piano come le membrane. A seguito di queste considerazioni per il nostro modello è stato più conveniente utilizzare elementi S4R; cioè elementi shell quadrilateri, di primo ordine con integrazione ridotta e regolari.

A questo punto scelti gli elementi da utilizzare per la discretizzazione del modello, si è dovuto ragionare sulla finezza della mesh e della conseguente accuratezza della soluzione. La mesh è stata progressivamente raffinata, al fine di avere il risultato più accurato possibile, fino a un limite oltre il quale il tempo computazionale richiesto dall'algoritmo era eccessivamente alto. Terminata la discretizzazione del modello, si è dovuto ulteriormente intervenire sulla mesh per un problema dovuto a come era stato costruito il modello. Poiché come possiamo vedere nella figura 4.48 la geometria è stata costruita come un assemblaggio di solidi, si è dovuto intervenire sulla mesh con un comando: *l'equivalencing*, al fine di rendere congrua la discretizzazione tra i vari solidi.

L'*equivalencing* infatti è il processo di riduzione di tutti i nodi che coesistono in un punto in un singolo nodo.

Per impostazione predefinita, un cerchio rosso evidenziato è disegnato su ogni nodo mantenuto, causando la cancellazione dei nodi vicini. Per esempio, se i nodi 2 e 3 sono soppressi a causa della loro vicinanza al nodo 1, allora un cerchio viene disegnato sopra il nodo 1. La rimozione di un nodo causato dal comando *equivalencing* comporta che tutte le occorrenze di quel nodo nella definizione FEM vengono sostituite con il nodo superstite, che di solito è il nodo coincidente con l'ID più basso. Il nodo superstite resta associato con qualunque ente geometrico è stato associato prima del comando di *equivalencing*.

L'effetto sui gruppi è additivo, ad esempio, se *equivalencing* rimuove un nodo che appartiene al gruppo 1, a favore di un nodo restante che appartiene al gruppo 2, allora il nodo è associato a entrambi i gruppi.

La selezione del nodo da tenere in un insieme di nodi coincidenti è guidato da due principi:

- viene mantenuto il nodo con l'ID più basso;
- l'equivalencing non deve mai provocare un collasso del bordo dell'elemento, o la rimozione di un'equazione MPC, o una lunghezza dell'elemento pari a zero.

L'equivalencing può essere ritardato fino al completamento del modello, ma è generalmente raccomandato che l'equivalencing sia eseguito prima dell'applicazione dei carichi e delle condizioni al contorno. Deve essere sempre eseguito anche prima della ottimizzazione della connettività dell'elemento. Il comando equivalencing può essere applicato più di una volta al modello o a qualsiasi parte del modello.

4.7.6 RISULTATI E CONCLUSIONI

In questo paragrafo analizziamo i risultati ottenuti dalle simulazioni, con qualche considerazione.

Per prima cosa si nota subito che l'allungamento imposto allo scaffold comporta un restringimento al centro sia nella direzione X sia nella direzione Z, come si può notare dalla seguente figura. Il restringimento al centro a causa dell'allungamento è una conseguenza del coefficiente di Poisson. Infatti il coefficiente di Poisson definisce il grado in cui il materiale si restringe o si dilata trasversalmente a seguito di un allungamento monodirezionale longitudinale.

Come abbiamo detto in precedenza assumiamo che il materiale di cui è costituito il substrato sia incomprimibile, ovvero non è possibile ridurre il suo volume applicando una sollecitazione meccanica al materiale. I materiali incomprimibili hanno un coefficiente di Poisson pari a 0.5. A seguito di questa in comprimibilità il materiale dopo l'allungamento mostra dei restringimenti al centro sia in direzione X sia in direzione Z.

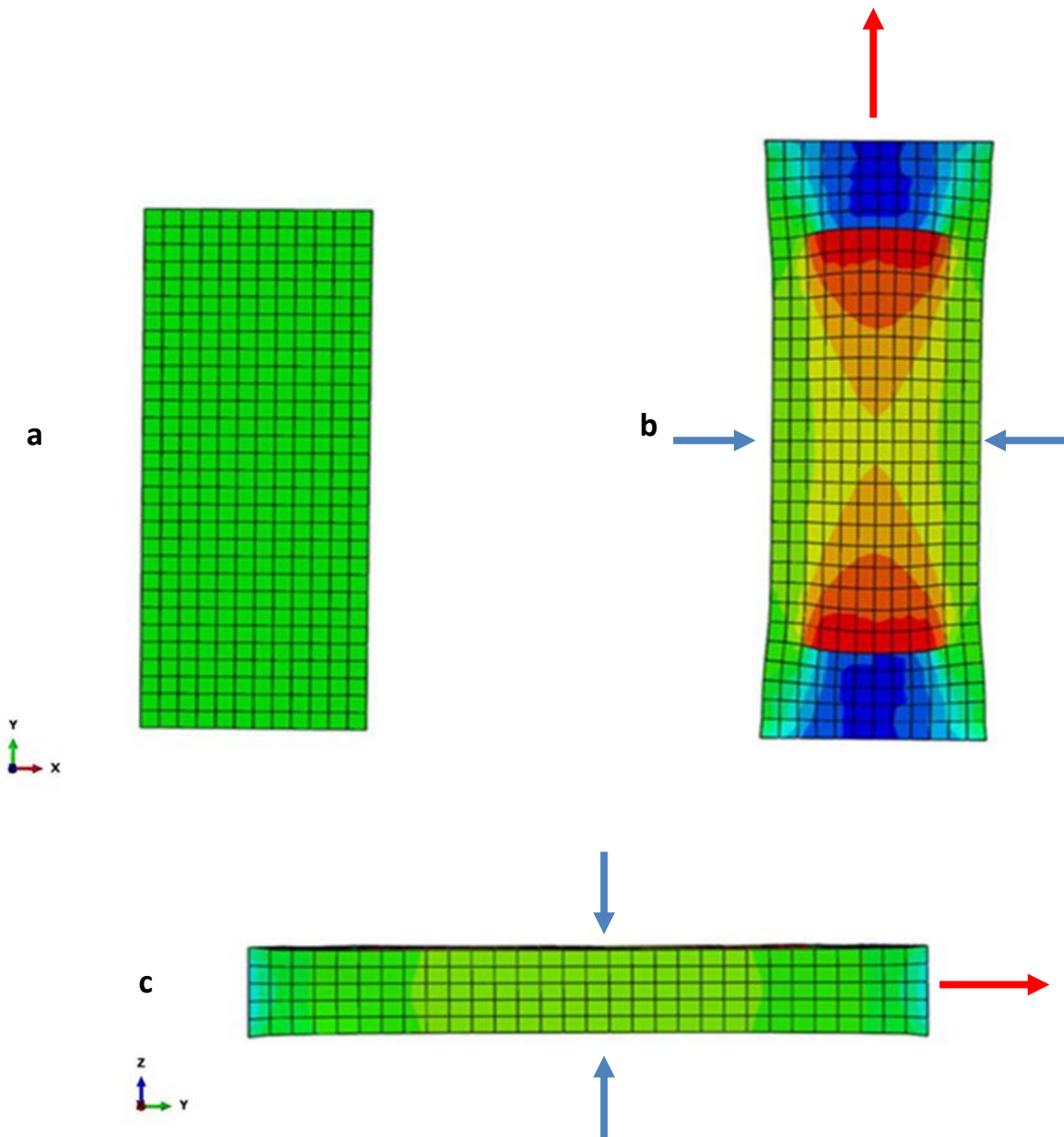


Fig. 4.49 Mostra (a) la configurazione indeformata dello scaffold, (b) la configurazione deformata, dove la freccia rossa mostra l'allungamento imposto lungo la direzione Y, mentre le frecce azzurre mostrano che lo scaffold a seguito dell'allungamento imposto subisce un restringimento nel mezzo lungo la direzione X, (c) altra vista della configurazione deformata, dove la freccia rossa mostra sempre l'allungamento imposto, mentre le frecce azzurre mostrano il restringimento del supporto stavolta lungo la direzione Z.

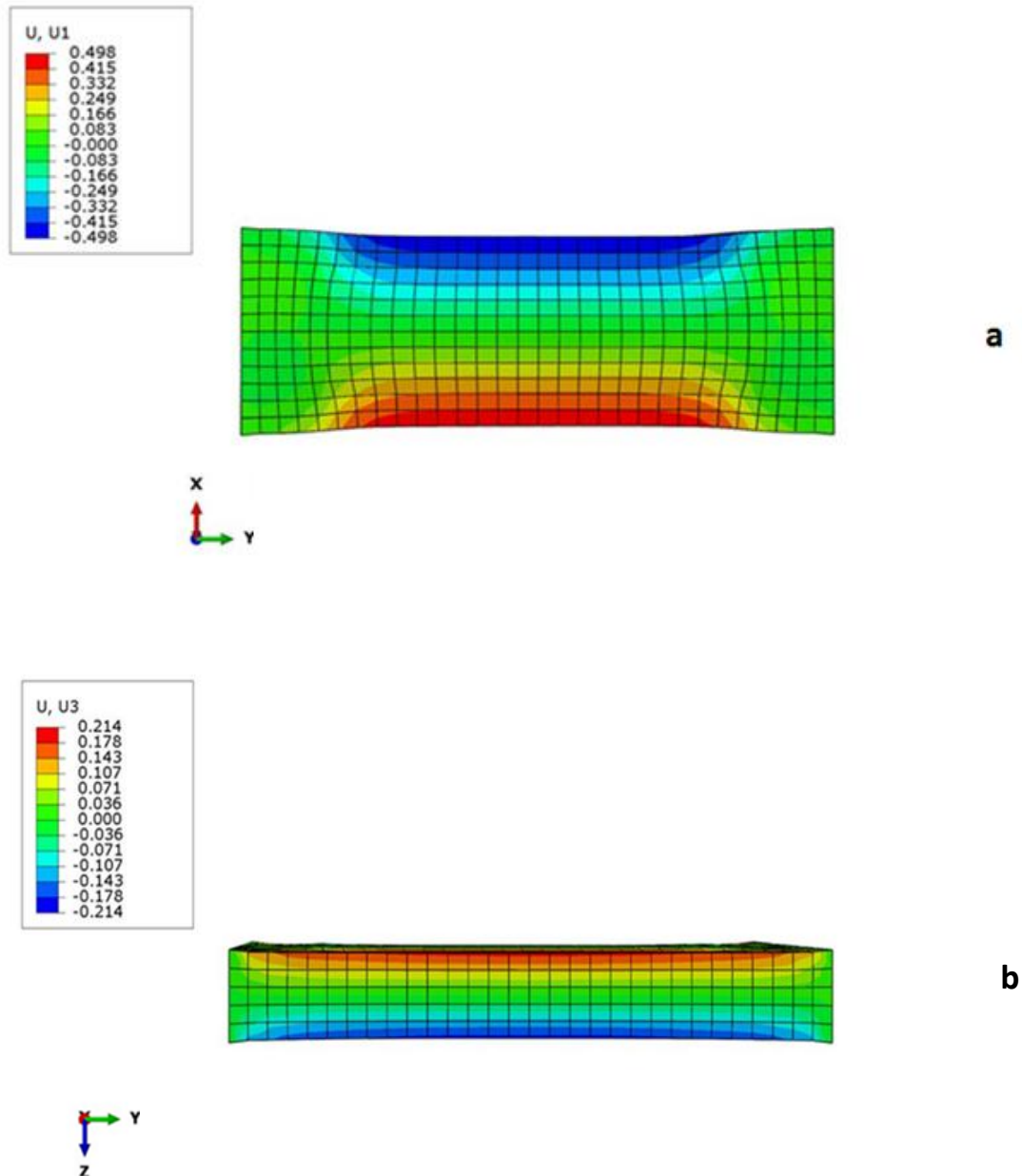


Fig. 4.50 Contour plot della prima simulazione (a) spostamenti lungo X per il modello completo da una visuale dall'alto, (b) spostamenti lungo Z per il modello completo da una vista di fianco.

Inoltre analizzando le tre configurazioni della simulazione possiamo notare che mentre la contrazione del supporto lungo X diminuisce dalla prima alla terza simulazione, la contrazione lungo Z invece è aumentata dalla prima alla terza simulazione. Questo probabilmente è dovuto alla diversa configurazione dei vincoli nelle tre simulazioni.

Poiché la prima simulazione è fortemente idealizzata, teniamo in considerazione soprattutto la seconda e la terza simulazione.

Per quanto riguarda le tensioni possiamo dire ad una prima analisi che si concentrano prevalentemente nei lati delle membrane, al confine con l'intelaiatura. Andando ad analizzare in maniera più specifica le tensioni longitudinali per la seconda e la terza simulazione, possiamo notare che mentre le tensioni nella seconda simulazione si concentrano in prevalenza sugli angoli della membrana, come mostra la seguente figura, nella terza simulazione le tensioni si concentrano prevalentemente nel mezzo della membrana.

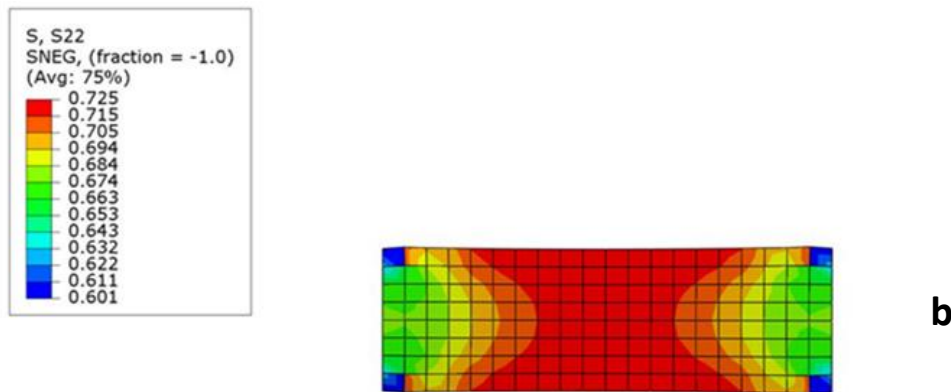
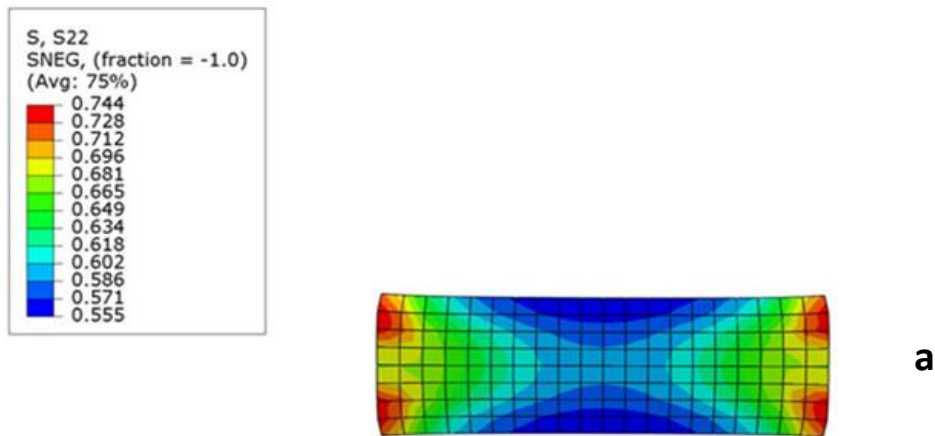


Fig. 4.51 Contour plot delle: (a) tensioni longitudinali della membrana nella seconda simulazione, (b) tensioni longitudinali della membrana nella terza simulazione.

I seguenti grafici ci mostreranno meglio il confronto dell'andamento delle tensioni tra la seconda e la terza simulazione per un elemento preso agli angoli della membrana e per un elemento preso al centro della membrana

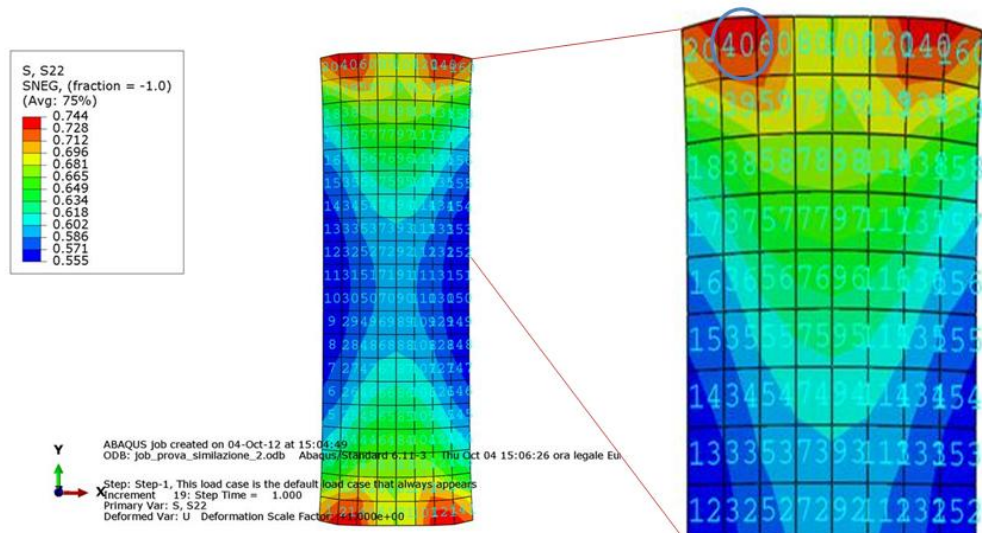


Fig. 4.52 Mostra l'elemento finito preso in considerazione per il seguente grafico.

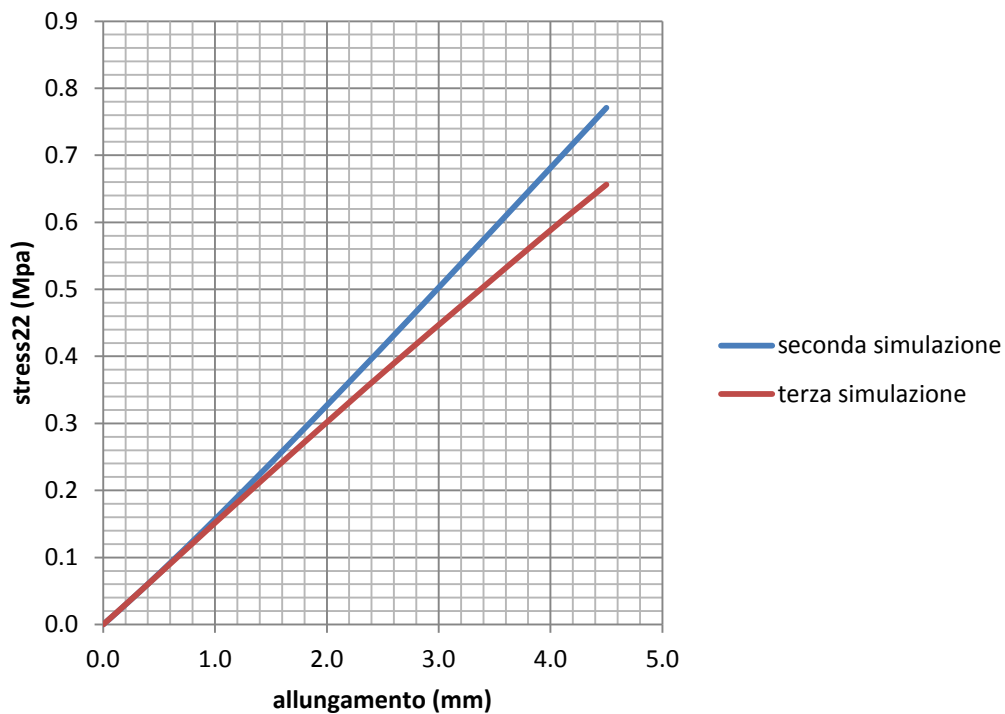


Fig. 4.53 Andamento delle tensioni longitudinali per le due simulazioni, per un elemento finito preso negli angoli della membrana.

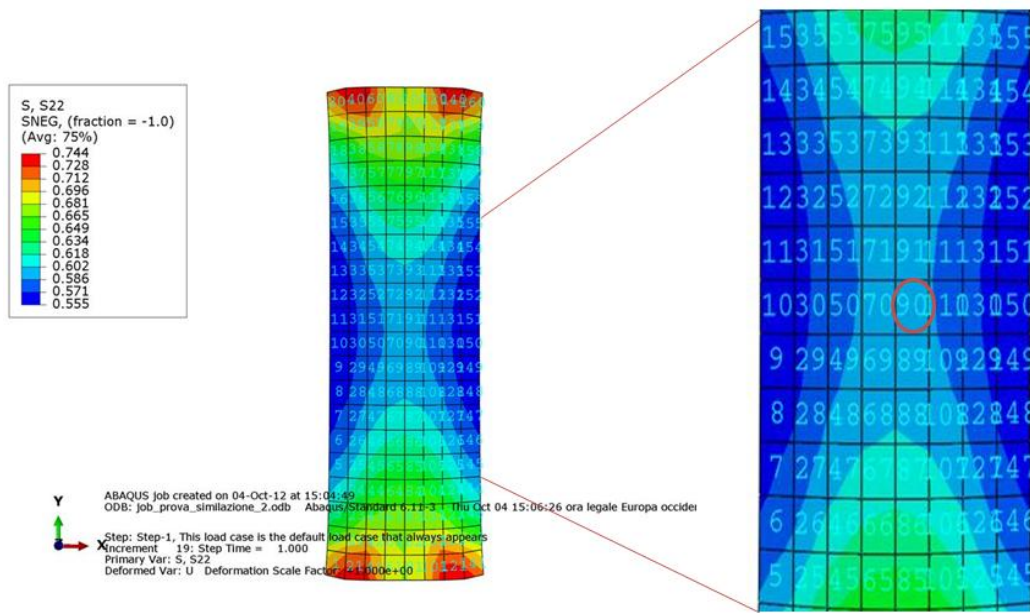


Fig. 4.54 Mostra l'elemento finito preso in considerazione per il seguente grafico.

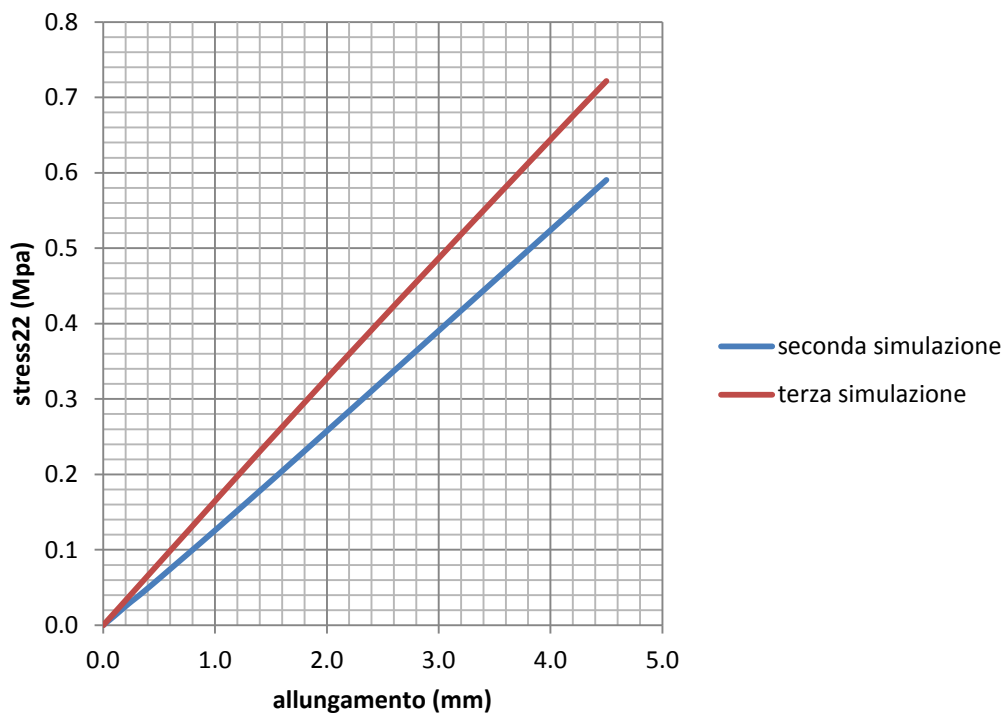


Fig. 4.55 Andamento delle tensioni longitudinale per le due simulazioni, per un elemento finito preso al centro della membrana.

Si può concludere che nella terza simulazione, poiché la porzione di scaffold che si può deformare è minore, le tensioni risultano maggiori. Però nella seconda simulazione le tensioni longitudinali della membrana agli angoli aumentano fino a un valore maggiore rispetto a quello ottenuto nella terza simulazione. Anche questo risultato è dovuto probabilmente alla differente configurazione dei vincoli.

Per quanto riguarda le deformazioni longitudinali sulla membrana, ci interessa rilevare le deformazioni al centro della membrana dove verranno seminate le cellule da coltura. Anche in questo caso hanno una maggior importanza i risultati ottenuti nella seconda e nella terza simulazione, che sono le prove più realistiche. Sempre per il motivo che nella terza simulazione la porzione di scaffold che può deformarsi è minore, e l'allungamento imposto è lo stesso, le deformazioni risulteranno maggiori in questa simulazione, come mostra il grafico in basso. Il livello deformativo è i circa il 20% per un allungamento imposto del 15%.

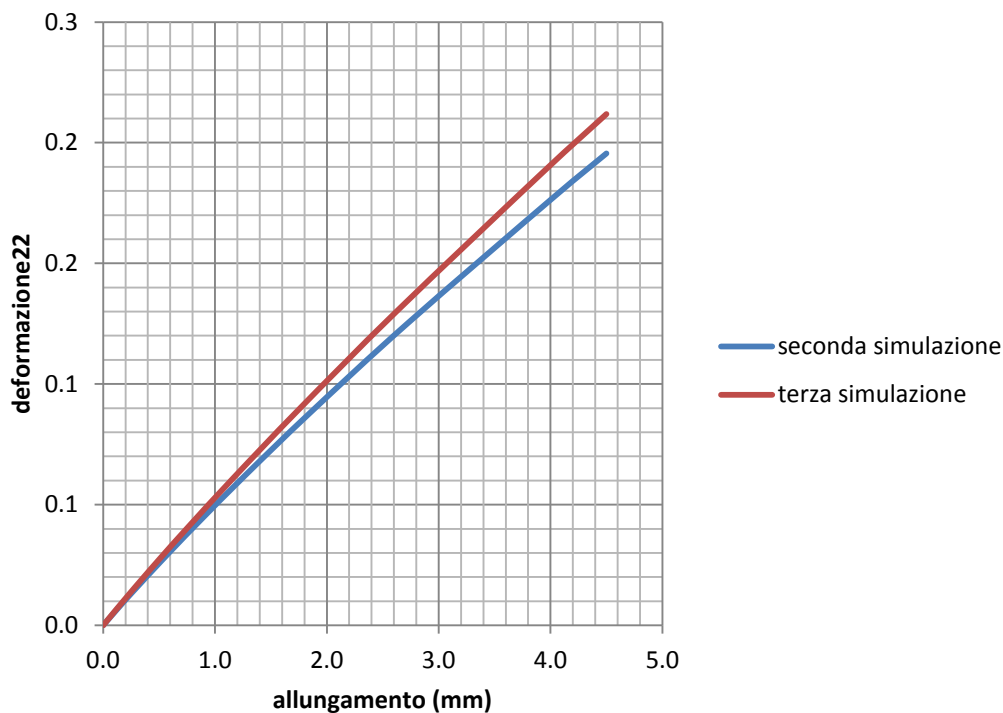


Fig. 4.56 Andamento delle deformazioni longitudinali della membrana di un elemento finito preso al centro della membrana stessa.

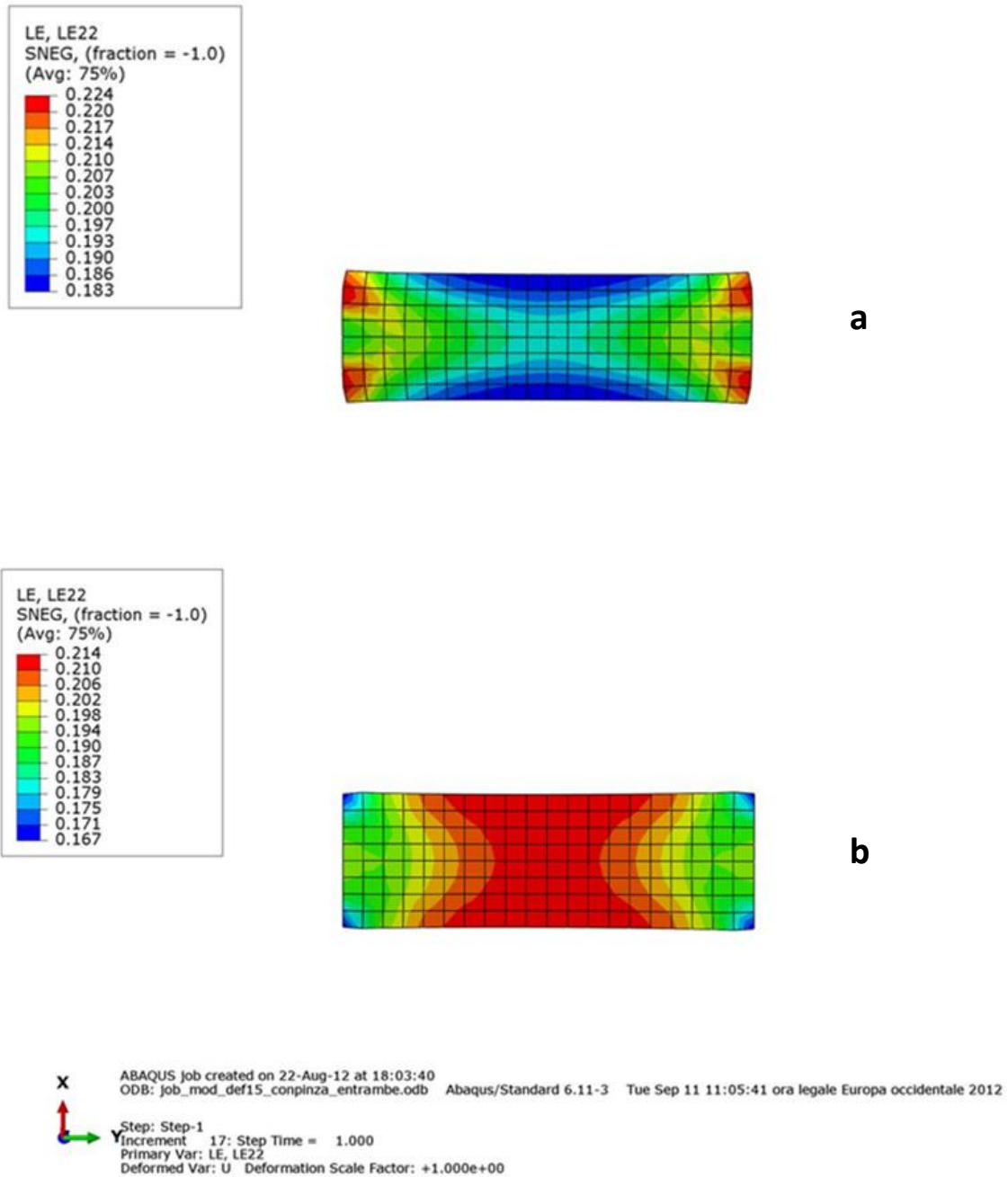


Fig. 4.57 Deformazioni longitudinali per le membrane **(a)** nella seconda simulazione, si può notare che si concentrano negli angoli delle membrane, come le tensioni; **(b)** nella terza simulazione, si concentrano maggiormente nel mezzo della membrana.

Fatta questa analisi ci è interessato aumentare la realtà della simulazione introducendo l'effetto provocato dallo schiacciamento delle pinze. Abbiamo preso come modello la seconda simulazione e abbiamo aggiunto la condizione di vincolo (dovuto allo schiacciamento delle

pinze), prima con uno schiacciamento del 10% dello spessore del substrato, poi del 15% e infine del 20%. È stato interessante analizzare in questo caso le reazioni vincolari del substrato. In particolare ci interessano quelle lungo la direzione Y e Z del substrato. Si può notare innanzitutto che le reazioni vincolari longitudinali maggiori si hanno nelle zone dove si appoggiano gli angoli delle pinze, mentre per la reazione vincolare lungo Z (spessore del substrato) i valori maggiori sono presenti nella zona dove si poggia il centro della pinza.

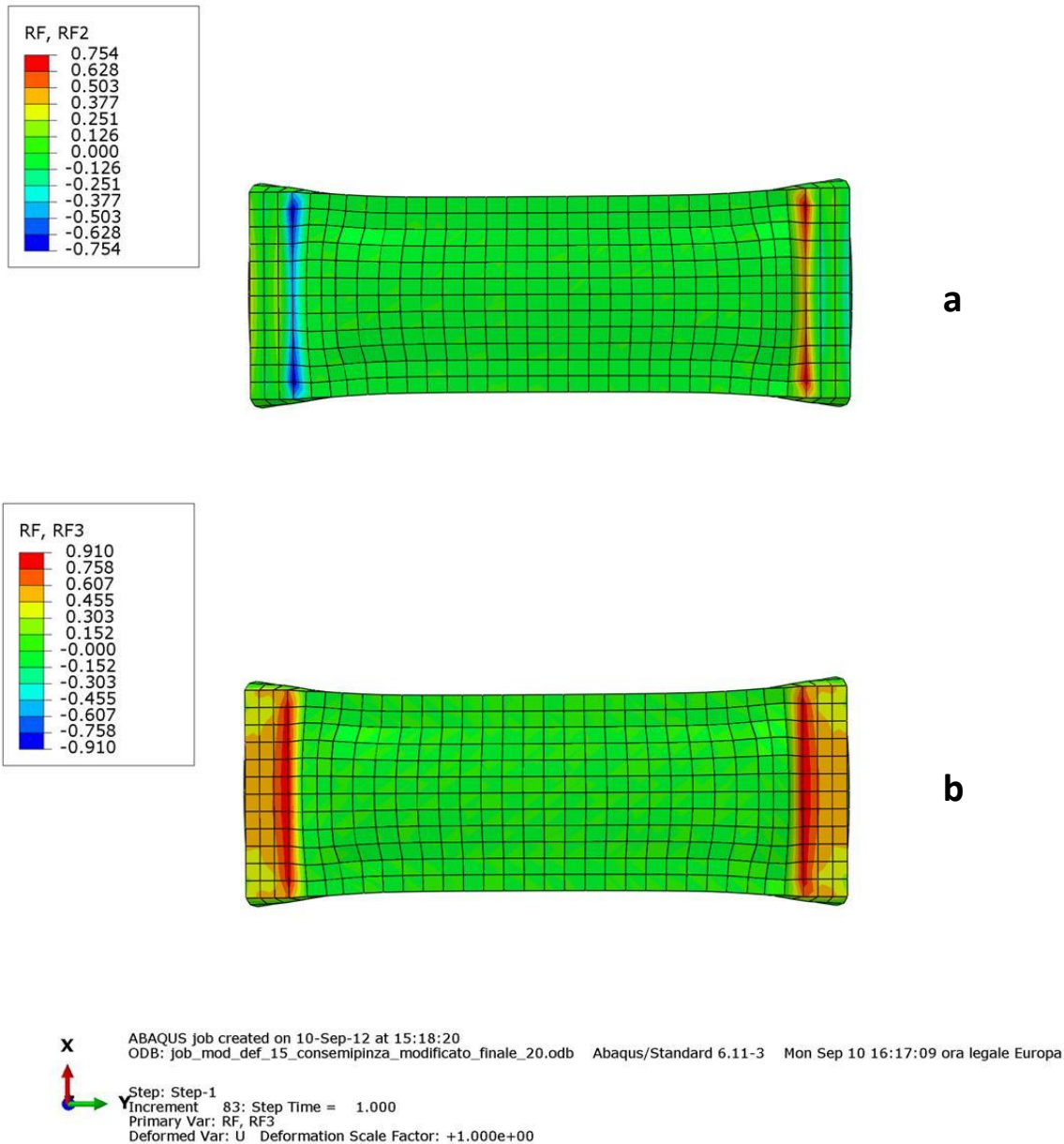


Fig. 4.58 (a) reazioni vincolari lungo la direzione longitudinale Y (con uno schiacciamento del 20%), (b) reazioni vincolari lungo Z (con uno schiacciamento del 20%).

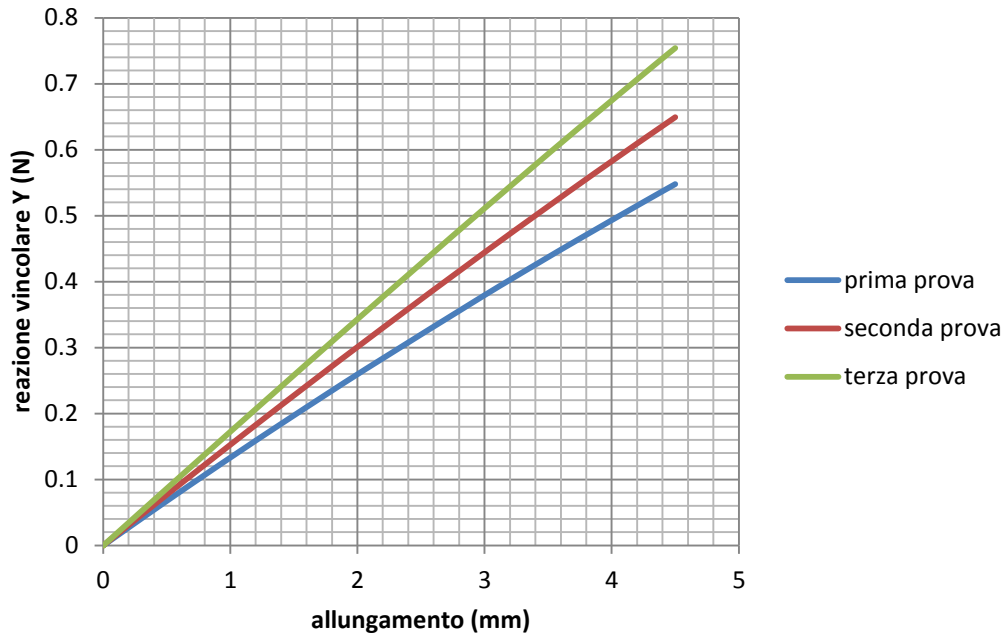


Fig. 4.59 Andamento della reazione vincolare longitudinale e il confronto tra le tre prove (prima prova: schiacciamento del 10%; seconda prova: schiacciamento del 15%; terza prova: schiacciamento del 20%).

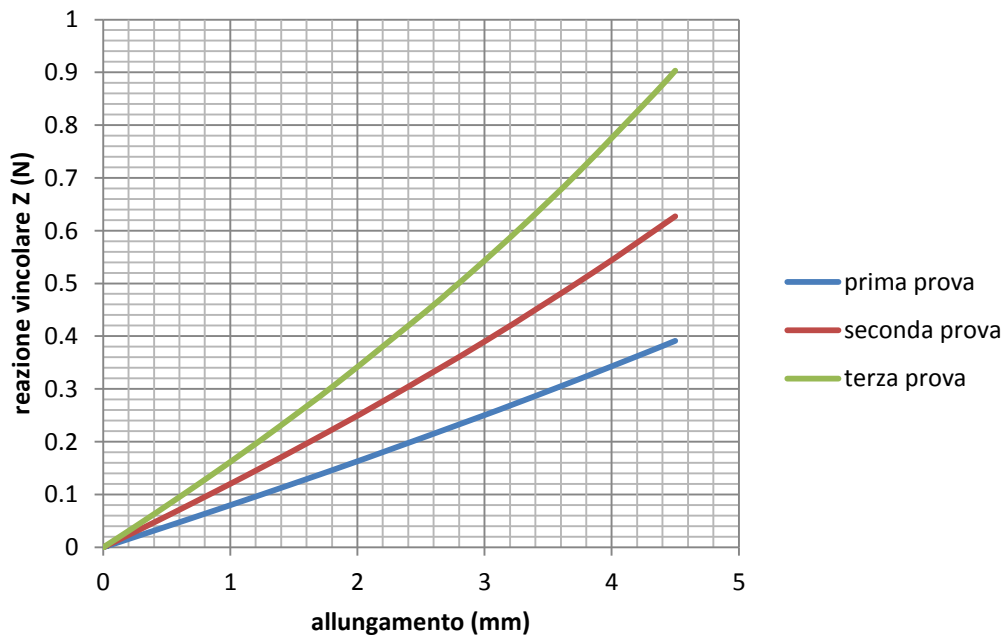


Fig. 4.60 Andamento delle reazioni vincolari lungo Z e il confronto tra le tre prove (prima prova: schiacciamento del 10%; seconda prova: schiacciamento del 15%; terza prova: schiacciamento del 20%).

Poiché si può controllare la forza che le pinze applicano al substrato, è importante andare ad analizzare i risultati delle reazioni vincolari sopra riportate. L'obiettivo è quello di poter applicare in modo appropriato l'allungamento del provino, senza scivolamenti dello scaffold, e tale che la forza di pressione applicata dalle pinze non comprometta il substrato.

CONCLUSIONI

L'analisi numerica è stata utilizzata in questa tesi con l'obiettivo di valutare il comportamento meccanico di substrati elastomerici per fornire informazioni utili per lo studio del fenomeno di meccanotrasduzione delle cellule muscolari.

La meccanotrasduzione è un meccanismo mediante il quale le cellule convertono segnali meccanici in risposte di tipo biochimico. Per studiare il fenomeno della meccanotrasduzione bisogna quindi applicare stimoli meccanici alle cellule di interesse, ma questo non è possibile direttamente, ma attraverso l'utilizzo di membrane che servono da substrati.

I substrati analizzati in questa tesi sono stati realizzati con un materiale polimerico, il PDMS (polidimetilsilossano), un silicone utilizzato in grande misura nella bioingegneria, grazie alle sue ottime proprietà, tra cui la più importante è la biocompatibilità.

La biocompatibilità infatti risulta essere una caratteristica essenziale per materiali che devono entrare in contatto con le cellule, e stabilisce che i materiali utilizzati non devono interagire in modo dannoso con gli organismi viventi.

Le membrane di PDMS studiate in questa tesi hanno una dimensione che varia in un range di pochi millimetri. Le dimensioni ridotte possono quindi rappresentare un problema per quel che riguarda la determinazione delle caratteristiche meccaniche. È infatti difficile determinare in maniera sperimentale e analitica le tensioni e deformazioni risultanti da una sollecitazione di questi substrati, oltre a essere molto costoso in termini di tempo e denaro.

Lo studio si è avvalso quindi dell'analisi numerica, in particolare metodi FEM, uno strumento molto potente oggi utilizzato in molti ambiti ingegneristici. L'analisi numerica permette di creare modelli della realtà senza riprodurre fisicamente in laboratorio il fenomeno di interesse, con un conseguente risparmio in termini di tempo e di costi.

I modelli utilizzati in questa tesi hanno permesso di studiare le membrane elastomeriche e il loro comportamento con buona accuratezza.

In futuro un perfezionamento di questi modelli potrebbe permettere uno studio più preciso del comportamento dei substrati. Ad esempio il modello costitutivo del PDMS può essere migliorato tenendo in considerazione il comportamento viscoelastico, non considerato in questa tesi.

Bisogna comunque sempre considerare che le simulazioni partono dall'idealizzazione di un sistema reale che si vuole analizzare. Di conseguenza vengono introdotte alcune ipotesi, come sulla geometria, sul carico e sul materiale, che possono compromettere la veridicità dei risultati ottenuti dalle simulazioni che si stanno effettuando. Sono sempre da tenere in considerazione le approssimazioni effettuate e il contesto in cui vengono formulate.

In questa tesi sono stati simulati due test: un test di gonfiamento e un test a trazione monoassiale.

Nel test a gonfiamento si è dimostrata l'importanza del materiale e della geometria con cui queste membrane vengono costruite e in particolare, l'influenza che hanno sulla risposta del modello.

L'interesse si è soffermato in particolar modo sulla superficie della membrana, dove vengono seminate le cellule.

Di seguito l'interesse si è rivolto nell'analisi delle condizioni sperimentali per produrre specifici livelli deformativi nelle membrane. Si è riscontrato che i livelli deformativi maggiori si sono concentrati nel mezzo.

Infine nel test a trazione monoassiale abbiamo analizzato deformazioni e tensioni a seguito di un allungamento imposto. Abbiamo dimostrato che a seconda dell'imposizione dei vincoli la concentrazione di tensioni e deformazioni cambia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Quarteroni A. “Simulazioni numeriche” Enciclopedia della Scienza e della tecnica.
- [2] Rizzi E. “Alcune nozioni fondamentali sul metodo degli elementi finiti in meccanica dei solidi” 2003.
- [3] Nori A., Yim E. K. F., Chen S., Leong K. W. “38 - Cell-Substrate Interactions” Principles of Regenerative Medicine, 2008, Pages 666-685.
- [4] Kawamoto N., Mori H., Terano M., Yui N. “Blood compatibility of polypropylene surfaces in relation to the crystalline-amorphous microstructure.” J Biomater Sci Polym Ed. 1997; 8 (11): 859-77.
- [5] Ishaug-Riley S. L., Okun L. E., Prado G., Applegate M. A., Ratcliffe A. “Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films” Biomaterials, Volume 20, Issues 23–24, December 1999, Pages 2245-2256.
- [6] Washburn N. R., Yamada K. M., Simon C. G. Jr., Kennedy S. B., Amis E. J. “High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation” Biomaterials, Volume 25, Issues 7–8, March–April 2004, Pages 1215-1224.
- [7] Zingg W., Neumann A. W., et al. “Effect of surface roughness on platelet adhesion under static and under flow conditions” Can J Surg 25: 16-19 (1982)
- [8] Anselme K., Davidson P., Popa A.M., Giazson M., Liley M., Ploux L. “The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale” Acta Biomaterialia, Volume 6, Issue 10, October 2010, Pages 3824-3846
- [9] Sniadecki N. J., Desai R. A., Ruiz S. A., Chen C. S. “Nanotechnology for cell-substrate interactions” University of Pennsylvania ScholarlyCommons 1-1-2006

- [10] Curtis A. S., Casey B., Gallagher J. O., Pasqui D., Wood M. A., Wilkinson C. D. "Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?" *Biophys Chem.* 2001 Dec 25;94(3):275-83.
- [11] Leipzig N. D., Shoichet M. S. "The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior" *Biomaterials*, Volume 30, Issue 36, December 2009, Pages 6867-6878
- [12] Jansen E. J. P., Sladek R. E. J., Bahar H., Yaffe A., Gijbels M. J., Kuijjer R., Bulstra S. K., Guldemond N. A., Binderman I., Koole L. H. "Hydrophobicity as a design criterion for polymer scaffolds in bone tissue engineering" *Biomaterials*, Volume 26, Issue 21, July 2005, Pages 4423-4431
- [13] Brodbeck W. G., Voskerician G., Ziats N. P., Nakayama Y., Matsuda T., Anderson J. M. "In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry." *J Biomed Mater Res A.* 2003 Feb 1;64(2):320-9.
- [14] Wong H. C., Tang W. C. "Finite element analysis of the effects of focal adhesion mechanical properties and substrate stiffness on cell migration" *Journal of Biomechanics*, Volume 44, Issue 6, 7 April 2011, Pages 1046-1050
- [15] McGarry J. P., Murphy B. P., McHugh P. E. "Computational mechanics modelling of cell-substrate contact during cyclic substrate deformation" *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, Volume 53, Issue 12, December 2005, Pages 2597-2637
- [16] Wang J. H. C., Goldschmidt-Clermont P., Wille J., Yin F. C. P. "Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching" *Journal of Biomechanics*, Volume 34, Issue 12, December 2001, Pages 1563-1572
- [17] Xu X. P., Needleman A. "Void nucleation by inclusion debonding in a crystal matrix" 1993 *Modelling Simul. Mater. Sci. Eng.* 1 111
- [18] Neidlinger-Wilke C., Grood E. S., Wang J. H. C., Brand R. A., Claes L. "Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates." *J Orthop Res.* 2001 Mar;19(2):286-93.

- [19] Kim T. K., Kim J. K., Jeong O. C. "Measurement of nonlinear mechanical properties of PDMS elastomer" *Microelectronic Engineering*, Volume 88, Issue 8, August 2011, Pages 1982-1985
- [20] Teodori L., Ambrosio L. "La fabbrica dei tessuti umani: il futuro bussava alle porte"
- [21] Huttmacher D. W. "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissue: state of the art and future perspectives." *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 12, No. 1, pp. 107-124 (2001).
- [22] Dal Dosso F. "Bioprinting: metodi, applicazioni, prospettive" Anno 2009/2010.
- [23] Di Bello C. "Biomateriali – introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico" Pàtron Ed. 2004
- [24] Jun S., Hong Y., Imamura H., Ha B. Y., Bechhoefer J., Chen P. "Self-assembly of the ionic peptide EAK-16: the effect of charge distributions on self-assembly." *Biophysical Journal* 2004; 87: 1249.
- [25] Wang Z. "Polydimethylsiloxane Mechanical Properties Measured by Macroscopic Compression and Nanoindentation Techniques" University of South Florida Scholar Commons 1-1-2011.
- [26] Miao L., Jianren S., Quanfang C. "Influences of heating temperature on mechanical properties of polydimethylsiloxane" *Sensors and Actuators A: Physical*, Volume 151, Issue 1, 8 April 2009, Pages 42-45
- [27] Abaqus 6.11 Analysis User's Manual vol.3
- [28] Nunes L. C. S. "Shear modulus estimation of the polymer polydimethylsiloxane (PDMS) using digital image correlation" *Materials & Design*, Volume 31, Issue 1, January 2010, Pages 583-588
- [29] Brown X. Q., Ookawa K., Wong J. Y. "Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response" *Biomaterials*, Volume 26, Issue 16, June 2005, Pages 3123-3129

[30] Wang H. B., Dembo M., Wang Y. L. "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Nov;279(5):C1345-50.

[31] Zaccaria D. "Assunzioni costitutive" 2005

[32] http://www.dmf.unisalento.it/~panareo/Dispense_di_Fisica/Secondo%20principio.pdf

[33] climeg.poliba.it/mod/resource/view.php?id=1657

[34] Abaqus 6.11 Analysis User's Manual vol.4

[35] Abaqus 6.11 Analysis User's Manual vol.2