



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“Analisi del comportamento viscoelastico del tessuto osseo”

Relatore: Prof. Emanuele Luigi Carniel

Laureanda: Sabrina Bertozzo

Matricola: 2008674

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Data di laurea: 29/09/2023

Abstract

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato fortemente mineralizzato. In una prima parte di tale trattazione ne vengono descritti gli aspetti anatomici e istologici fondamentali. Studiare il comportamento meccanico di questo tessuto ha un importante ruolo nella prevenzione e nel trattamento di fratture legate all'età di alcune malattie. Viene quindi indagato ampiamente il comportamento viscoelastico del tessuto osseo in una seconda parte della trattazione. In conclusione, viene eseguito un approfondimento sull'osteoporosi, la malattia che più frequentemente colpisce le ossa, modificandone le proprietà meccaniche.

Indice

Lista delle tabelle	vi
Introduzione	1
Capitolo 1 – Il tessuto osseo	3
Generalità	3
Le cellule dell'osso.....	5
La sostanza intercellulare	11
Le componenti organiche	11
Le componenti inorganiche	13
Organizzazione architetturale	13
Capitolo 2 – Caratterizzazione meccanica del tessuto osseo	16
Proprietà meccaniche del tessuto osseo compatto.....	16
Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso	18
Capitolo 3 – Viscoelasticità del tessuto osseo	22
La viscoelasticità	22
Prova di creep	22
Prova di stress relaxation.....	23
Prova a velocità di deformazione costante	24
Equazione costitutiva.....	24
Modelli costitutivi per il tessuto osseo	24
Viscoelasticità assiale dell'osso.....	25
Viscoelasticità al taglio dell'osso	28
Modelli per la viscoelasticità del tessuto osseo	29
Capitolo 4 – Viscoelasticità del tessuto osseo: prove sperimentali	31
Prova di creep	31
Introduzione.....	31
Descrizione della prova sperimentale: materiali e metodi.....	33
Risultati e interpretazione	34
Conclusioni.....	38
Prova di stress relaxation.....	39
Introduzione.....	39
Descrizione della prova sperimentale: materiali e metodi.....	39
Risultati e interpretazione	41

Conclusioni	44
Capitolo 5 – Osteoporosi	45
Generalità	45
Cambiamenti nel comportamento meccanico dell'osso con l'osteoporosi	46
Introduzione	46
Materiali e metodi	46
Risultati	47
Discussione e conclusione.....	50
Conclusioni.....	52

Lista delle tabelle

2.1	Modulo elastico del tessuto osseo compatto	18
5.1	Risultati gruppo osteoporotico	47
5.2	Risultati gruppo di controllo	48

Introduzione

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo fortemente mineralizzato. Esso è caratterizzato da un'apprezzabile durezza e una considerevole resistenza meccanica. La seguente trattazione, che vede tale tessuto protagonista, comincia con un approfondimento sugli aspetti anatomici e istologici, sia macroscopici che microscopici, che lo caratterizzano. Innanzitutto, vengono descritte le diverse tipologie cellulari di cui esso è composto: le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. In seguito, vengono presentate la sostanza intercellulare, anche detta matrice del tessuto osseo, e tutte le sue componenti, organiche e inorganiche. Infine, per concludere la prima parte della trattazione, viene esaminata l'organizzazione architettonica di tale tessuto, che svolge un ruolo fondamentale nella determinazione delle sue proprietà meccaniche.

Grazie alle proprietà meccaniche del tessuto osseo, le ossa sono in grado di svolgere il proprio ruolo di sostegno, protezione e movimento per il corpo umano. Quando tali proprietà vengono a mancare, infatti, il benessere dell'individuo è messo a rischio. Per questo motivo, studiare il comportamento meccanico del tessuto osseo è stata una delle più grandi sfide per la biomeccanica negli ultimi decenni. In questa trattazione vengono quindi indagate le proprietà meccaniche dei due diversi tipi di tessuto osseo, quello spugnoso e quello compatto.

Poiché il tessuto osseo può essere considerato un materiale viscoelastico, dopo averne definito le generiche proprietà meccaniche è stato eseguito uno studio della sua viscoelasticità. Innanzitutto, sono stati descritti i generici meccanismi viscoelastici, prestando particolare attenzione alla risposta di un generico materiale viscoelastico sottoposto a diversi tipi di prove. I test in questione esaminati sono stati: prova di creep, prova di stress relaxation, prova a velocità di deformazione costante. Successivamente, è stata fornita l'equazione costitutiva che governa questa tipologia di meccanismi deformativi. Terminata quindi una panoramica generale, è stata trattata nel dettaglio la risposta viscoelastica del tessuto osseo, quando sottoposto sia a sforzo assiale che a sforzo di taglio. Infine, per quanto riguarda il comportamento viscoelastico dell'osso, sono stati proposti due modelli costitutivi principali: il modello KWW e il modello di Debye.

Dal momento che le prove sperimentali sono risultate fondamentali nella definizione di un modello costitutivo per il tessuto osseo, la trattazione prosegue con la descrizione di due prove sperimentali. La prima è una prova di creep eseguita su campioni derivanti da un osso trabecolare umano di un cadavere femminile di 71 anni affetto da osteoporosi. La seconda prova

analizzata, invece, è una prova di stress relaxation eseguita su dei campioni di osso trabecolare prelevati dalle teste femorali di alcuni bovini.

Per concludere, la seguente trattazione termina con lo studio di una delle più frequenti patologie in grado di alterare significativamente il comportamento meccanico del tessuto osseo, ovvero l'osteoporosi. Dopo averne descritto le principali caratteristiche, è stata riportata una prova sperimentale su dei campioni prelevati da donne aventi tale patologia.

Capitolo 1 – Il tessuto osseo

1.1 Generalità

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato nella funzione di sostegno. Esso è parte dei tessuti connettivi sia perché si origina dal mesenchima, il tessuto connettivo embrionale, sia perché è costituito da cellule immerse in una sostanza intercellulare composta da fibre di collagene e sostanza fondamentale anista. Il tessuto osseo si differenzia dagli altri connettivi per la presenza di matrice extracellulare mineralizzata, ovvero per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, dei quali il prevalente è il fosfato di calcio. Grazie alla sua caratteristica composizione e organizzazione istologica, questo tessuto e, di conseguenza, le strutture da esso formate, le ossa, possiedono spiccate proprietà meccaniche, come la durezza e la resistenza alla tensione e alla compressione. Le ossa sono quindi in grado sia di svolgere una funzione di sostegno per il corpo, grazie alle proprietà meccaniche appena citate, sia di permettere ai muscoli di generare i movimenti, grazie alla loro eccezionale architettura. Inoltre, dato l'elevato contenuto in sali minerali di questo tessuto, esso è il principale deposito di ione calcio per l'intero organismo e svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dei livelli plasmatici di questo ione.

Il tessuto osseo è composto per circa il 10-20% di acqua. La sua massa secca è formata per circa il 70% da una sostanza inorganica e per il 30% circa da una sostanza organica, a sua volta composta per circa il 90% da collagene, per il 5% da glicoproteine, per il 2% da lipidi e per il 3% da cellule.

Questo particolare tessuto è solitamente rivestito da due speciali tessuti connettivi: il periostio e l'endostio. Il primo è disposto esternamente, mentre il secondo ricopre le cavità interne delle ossa ed è ricco di vasi e terminazioni nervose.

Si possono distinguere quattro tipologie di cellule del tessuto osseo: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti. I primi tre tipi sono strettamente collegati tra loro poiché derivano da un'unica linea cellulare di origine mesenchimale. Infatti, una volta stimolate opportunamente, le cellule osteoprogenitrici danno origine agli osteoblasti, i quali a loro volta, dopo aver concluso specifici processi, si trasformano in osteociti. L'ultima categoria di cellule invece, gli osteoclasti, fa parte del sistema dei macrofagi e possiede caratteristiche citologiche e funzionali proprie.

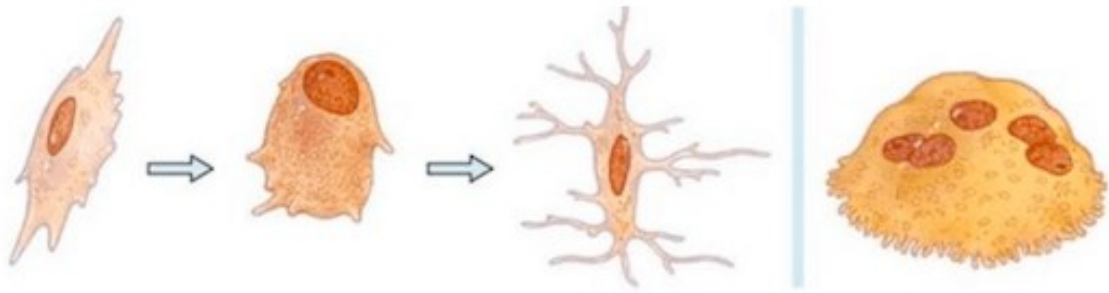


Figura 1.1: Da sinistra verso destra: cellula osteoprogenitrice, osteoblasto, osteocito, osteoclasto. [3]

La sostanza intercellulare in cui sono immerse le varie tipologie di cellule del tessuto osseo ha una composizione caratteristica dei connettivi, ovvero data da due principali elementi: le fibre proteiche e la matrice amorfa. Le prime hanno come componente principale il collagene I e rappresentano la principale causa di resistenza alla tensione del tessuto osseo. Esse inoltre svolgono una funzione di impalcatura tridimensionale per sostenere la matrice mineralizzata. La matrice, invece, viene prima deposta in forma organica per poi subire mineralizzazione, attraverso l'accumulo di grandi concentrazioni di sali minerali. Ad essa è dovuta l'elevata durezza del tessuto osseo.

Analizzando il tessuto osseo dal punto di vista macroscopico, si possono distinguere due varietà di organizzazione: osso compatto e osso spugnoso. Il primo tipo è formato da un materiale compatto e duro di colore avorio e non presenta cavità macroscopicamente evidenti. Si può incontrare questa tipologia di osso nella maggior parte della diafisi di ossa lunghe e nelle pareti di ossa corte o piatte.

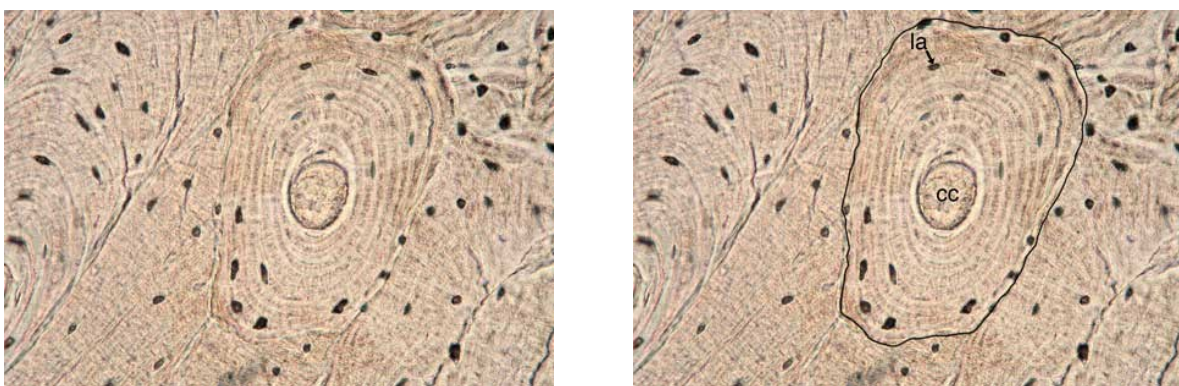


Figura 1.2: Fotografia al microscopio di una porzione di osso compatto. la: lacuna, cc: canale centrale. [4]

L'osso spugnoso appare invece come un materiale poroso formato da sottili lamine, dette trabecole, orientate in modo da intersecarsi tra loro per andare a formare delle cavità, dette cavità midollari, ripiene di midollo osseo ematopoietico. Questa tipologia di osso delimita il

canale midollare e forma gran parte delle ossa corte, la parte centrale delle ossa piatte, chiamata diploe, e la regione centrale delle epifisi delle ossa lunghe.

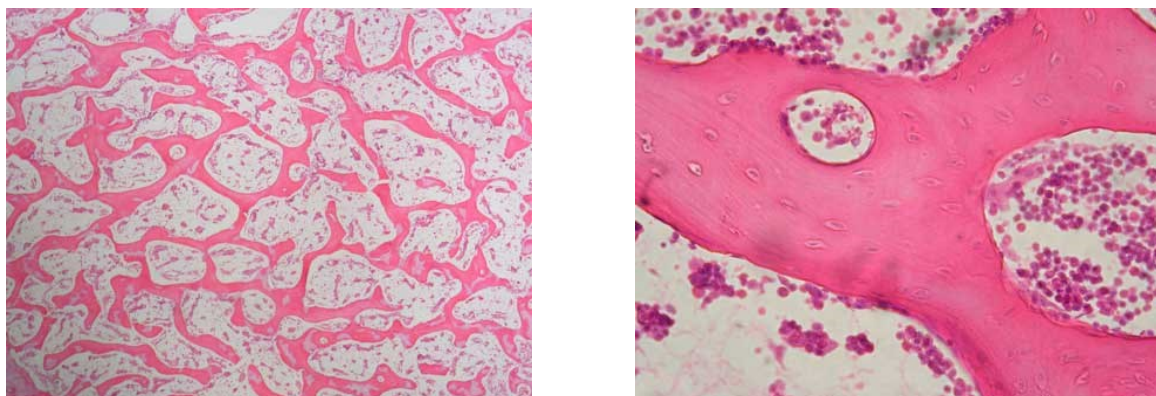


Figura 1.3: Fotografie al microscopio di una porzione di osso spugnoso. [5]

Entrambe le varietà macroscopiche di tessuto osseo si possono ricondurre alla medesima organizzazione strutturale: sono formate da lamelle ossee. Nell'osso compatto esse sono disposte in modo parallelo rispetto all'asse longitudinale dell'osso e, nella regione centrale dell'osso compatto della diafisi, formano gli osteoni, delle strutture irregolarmente cilindriche. Invece, nell'osso spugnoso le lamelle si dispongono parallelamente tra loro per formare le trabecole.

1.2 Le cellule dell'osso

Come anticipato, le cellule del tessuto osseo si distinguono morfologicamente in quattro varietà: le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. Solitamente, durante la formazione del tessuto osseo, dalle cellule mesenchimali avviene la differenziazione in cellule osteoprogenitrici. Queste cellule, dopo aver proliferato, si trasformano in preosteoblasti e successivamente in osteoblasti; essi, in seguito ad aver depositato la matrice ossea, diventano osteociti. Gli osteoclasti, invece, derivano da cellule staminali emapoietiche, i preosteoclasti, e fanno parte della famiglia dei monociti-macrofagi, appartenendo quindi a una linea cellulare diversa rispetto alle altre cellule ossee.

Le cellule osteoprogenitrici, o preosteoblasti, hanno forma fusata e sono leggermente appiattite, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo. Queste cellule si collocano sulla superficie delle trabecole in via di ossificazione e nel connettivo che riveste l'osso e le sue cavità interne: si possono infatti riconoscere nella lamina più interna del periostio, cioè lo strato osteogenico di Ollier, e nell'endostio, lo strato di connettivo lasso che riveste le cavità ossee. Nell'endostio, esse rappresentano le cosiddette cellule allineate, o "lining cells", ovvero osteoblasti quiescenti in grado di formare velocemente nuovo tessuto osseo.

Le osteoprogenitrici sono quindi un gruppo di cellule parzialmente indifferenziate con una notevole capacità proliferativa che si attivano e differenziano all'occorrenza; l'attivazione avviene sia durante l'accrescimento corporeo che durante la vita adulta, come nel corso di rimodellamento dell'osso o riparazione di una frattura.

Gli osteoblasti sono cellule del tessuto osseo dalla forma cuboidale o colonnare, che possiedono un diametro rilevante, compreso tra i 20 e i 30 μm . Il nucleo è rotondeggiante, eucromatico, e contiene un grande nucleolo, il citoplasma è basofilo e presenta al suo interno numerose granulazioni PAS-positive. L'osteoblasto, inoltre, presenta una grande attività dell'enzima fosfatasi alcalina, che si trova principalmente in prossimità della superficie della cellula. Poiché l'osteoblasto mette in atto un'intensa sintesi proteica, esso presenta delle caratteristiche tipiche delle cellule coinvolte in questa attività: REG e apparato di Golgi ben sviluppati, numerosi polisomi e granuli di secrezione, che contengono i precursori delle glicoproteine della matrice ossea. Nella porzione di osteoblasto a contatto con la matrice che si sta mineralizzando si possono notare delle particolari vescicole con un contenuto amorfo o granulare. Queste vescicole, chiamate vescicole calcificanti, hanno la funzione di "nuclei" per l'inizio della mineralizzazione della matrice.

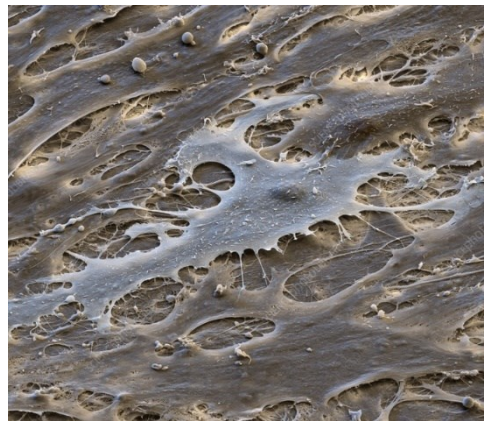


Figura 1.4: Fotografia al microscopio elettronico di un osteoblasto. [6]

Tutte le osservazioni fatte riguardo la morfologia di questa cellula dimostrano come l'osteoblasto sia il principale responsabile della sintesi e della secrezione delle componenti organiche della matrice ossea e della regolazione della sua mineralizzazione. Gli osteoblasti sono quindi solitamente localizzati in prossimità delle superfici ossee in corso di espansione e nel periostio e nell'endostio durante la morfogenesi dell'osso. Durante la sintesi della sostanza ossea, in tali zone, accade che gli osteoblasti si allineino in modo tale da andare a formare un epitelio monostrato, in cui le cellule confinanti sono collegate lateralmente tramite giunzioni simil-occludenti. Questo particolare tipo di organizzazione cellulare rende gli osteoblasti delle cellule polarizzate, ovvero cellule nelle quali è possibile distinguere varie zone della membrana.

Un importante esempio di ciò è dato dalla regione apicale della membrana, zona dalla quale vengono esocitate molecole che vanno a formare la matrice osteoide, una iniziale matrice organica. Dagli osteoblasti si propagano dei processi citoplasmatici che, estendendosi nella matrice osteoide, si connettono mediante giunzioni gap a processi citoplasmatici di altri osteoblasti e osteociti adiacenti, permettendo in questo modo la comunicazione tra tali cellule, anche una volta conclusa la calcificazione della matrice.

La produzione da parte degli osteoblasti della matrice ossea e la sua successiva mineralizzazione avviene secondo un ordine ben preciso: in principio l'osteoblasto depone matrice osteoide dal lato rivolto alla regione dove il mesenchima è maggiormente condensato o su superficie ossea già esistente, successivamente la deposizione avviene da tutti i lati della cellula, in modo che gli osteoblasti si allontanino gli uni dagli altri per via dell'interposizione di sostanza intercellulare. Una volta terminata la produzione di matrice osteoide e iniziato il processo di mineralizzazione di tale matrice, gli osteoblasti interrompono progressivamente la loro attività metabolica, subendo alcune modificazioni, tra cui la scomparsa dei granuli PAS-positivi e la mitigazione della reazione alla fosfatasi alcalina e della basofilia del citoplasma. Infine, essi vengono inclusi nella matrice mineralizzata e avviene la loro trasformazione in osteociti. È importante però precisare che non tutti gli osteoblasti scompaiono durante la mineralizzazione: uno strato di queste cellule si dispone infatti sulla superficie ossea appena formata per comporre una lamina del periostio e le "lining cells" nell'endostio.

Gli osteoblasti, inoltre, contribuiscono, seppur in maniera indiretta, all'attivazione del rimodellamento osseo. Essi, infatti, controllano il differenziamento degli osteoclasti attraverso la sintesi delle citochine RANKL ("Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand), CSF-1 (o M-CSF-1, "Macrophagy-Colony Stimulating Factor-1") e osteoprotegerina (OPG).

Gli osteociti sono le cellule presenti in maggior numero all'interno dell'osso completamente sviluppato: sono circa il 90-95% di tutte le cellule ossee. Essi derivano da osteoblasti rimasti reclusi nella matrice calcificata, all'interno di quelle che vengono chiamate lacune ossee. Esse sono cavità scavate nella matrice mineralizzata la cui forma ricalca quella delle cellule. Queste lacune, in cui risiedono gli osteociti, si possono trovare sia sulla superficie che orientate parallelamente alle fibre di collagene all'interno di una lamella. Le dimensioni di un osteocito dipendono da diversi fattori, tra cui il tipo di tessuto osseo e la sua posizione all'interno della lamella, e in generale possono variare da quelle dell'osteoblasto da cui deriva (circa 20 μm) a circa la metà di questo. Il corpo cellulare dell'osteocito è a forma di lente biconvessa, appiattito, per permettere l'adattamento della cellula alla cavità che la contiene. È fornito di numerosi e sottili prolungamenti citoplasmatici, che sono accolti all'interno di sottili canali scavati dalle

lacune alla matrice ossea chiamati canalicoli ossei. I prolungamenti di un osteocito sono connessi mediante giunzioni serrate con quelli degli osteociti circostanti. L'osteocito, inoltre, presenta un nucleo eterocromatico con un piccolo nucleolo e, comparandolo con un osteoblasto, un citoplasma con minore basofilia e una ridotta estensione del reticolo rugoso e del complesso di Golgi. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata esiste uno spazio occupato da una matrice pericellulare amorfa che non mineralizza, nella quale circola il liquido interstiziale. Attraverso quindi questo tessuto, presente nelle lacune e nei canalicoli ossei, l'acqua e le sostanze utili disciolte sono in grado di raggiungere ogni osteocito, facendo di tale rivestimento proteico un ottimo mezzo di scambio tra il liquido interstiziale e i capillari sanguigni. Metaboliti e molecole segnale possono anche essere scambiate tra osteociti tramite le giunzioni serrate. Esse, infatti, formano un vero e proprio sincizio funzionale per mezzo di elaborate connessioni canalicolari. I prolungamenti degli osteociti raggiungono anche gli spazi midollari dove risiedono i precursori mesenchimali, i precursori degli osteoclasti e i vasi sanguigni, permettendo agli osteociti e a tutte queste strutture di inviare e ricevere messaggi regolatori. Infine, al microscopio elettronico è possibile individuare un ulteriore aspetto fondamentale della struttura di un osteocito, ovvero il ciglio primario, un organulo meccanocettore che svolge diverse funzioni.

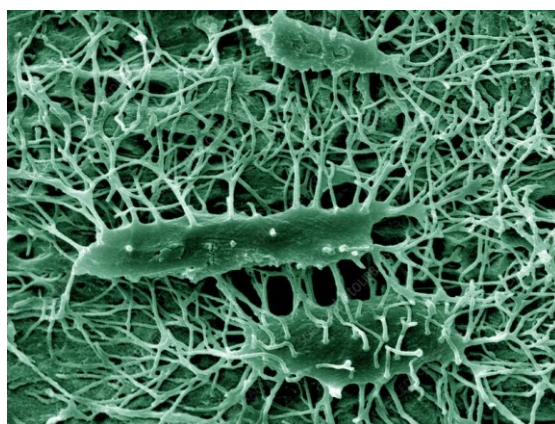


Figura 1.5: Fotografia al microscopio elettronico di un osteocito. [7]

Gli osteociti possono essere considerati cellule multifunzionali, perché svolgono numerose funzioni e secernono diversi tipi di molecole, che influenzano il comportamento di organi e tessuti all'interno del corpo umano anche molto distanti.

Essi sono in primo luogo fondamentali per il mantenimento della massa ossea: quando infatti un osteocito va incontro ad apoptosi, o per via di un evento traumatico, come una frattura, o per invecchiamento, la matrice della zona in cui risiedeva si indebolisce, provocando la formazione di microlesioni. La relazione tra questi due fenomeni è dovuta alla liberazione da parte degli osteociti danneggiati di "corpi apoptotici", i quali probabilmente stimolano gli osteociti vicini

alla secrezione della citochina RANKL. Essa, solitamente prodotta dagli osteoblasti, induce la formazione di nuovi osteoclasti e quindi il riassorbimento della matrice ossea intorno all'osteocito danneggiato. Nel caso in cui, però, il numero di osteociti che vanno incontro ad apoptosi fosse elevato, la conseguente notevole produzione di RANKL causerebbe un riassorbimento di matrice ossea maggiore rispetto alla sua deposizione, determinando un aumento di microlesioni.

La funzione principale degli osteociti è quella di meccanosensori in grado di rilevare le variazioni di carico meccanico. Sono capaci di svolgere questo compito probabilmente grazie al ciglio primario, che è in grado di rilevare tali informazioni misurando le variazioni di flusso del liquido interstiziale causate dal carico meccanico nei canalicoli e nelle lacune ossee. Una volta ricevuto tale stimolo, l'osteocito è in grado di influenzare il rimodellamento osseo, sulla base delle informazioni rilevate, mediante la secrezione di diverse molecole, che possono essere inibitrici o stimolatrici e che possono agire sia sulla linea cellulare osteoblastica che su quella osteoclastica. Tra queste molecole, particolare rilievo ha la sclerostina, una glicoproteina in grado di inibire fortemente la formazione di tessuto osseo. Il carico meccanico, infatti, riduce l'espressione di sclerostina, favorendo la formazione ossea. Contrariamente, un ridotto carico meccanico può invece aumentarne l'espressione, inibendo quindi la produzione di nuovo osso.

Gli osteociti esercitano un controllo sugli osteoclasti, mediante la produzione di RANKL e OPG, come nel caso degli osteoblasti. Per tale motivo, attraverso la produzione di queste citochine e della sclerostina, si può identificare nell'osteocito un fattore determinante nella regolazione di osteoclasti e osteoblasti e, di conseguenza, del rimodellamento osseo.

Infine, un'altra funzione degli osteociti è la regolazione del metabolismo minerale, perché essi sono infatti in grado di rilevare le alterazioni dei livelli di mineralizzazione dell'osso dovute al variare delle necessità minerali dell'organismo. Per rispondere a tali cambiamenti fisiologici, l'osteocito modifica la matrice ossea per il riassorbimento, attivando un processo di produzione o degradazione della matrice stessa. Nel primo caso gli osteociti sono definiti "formativi", mentre nel secondo "riassorbenti". Il processo di degradazione della matrice prende il nome di "osteolisi osteocitaria" e appare favorita dalla riduzione di carico meccanico.

Gli osteoclasti sono le cellule che si possono riscontrare sulle superfici di trabecole ossee in via di riassorbimento. Infatti, fin dai primi studi eseguiti su di esse fu compreso che queste cellule fossero quelle deputate al riassorbimento osseo. Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti polinucleate, del diametro di 20-100 μm , che possono contenere fino a 50 nuclei. Essi sono solitamente accolti in cavità scavate sulla superficie della trabecola ossea, chiamate lacune di

Howship, formate a seguito dell'azione erosiva della cellula stessa sull'osso. Gli osteoclasti presentano un'elevata acidofilia citoplasmatica e una forte positività alla reazione istochimica per la fosfatasi acida, causata dal grande numero di lisosomi presenti. Nel citoplasma sono presenti numerosi mitocondri, complessi di Golgi, pochi elementi di REG, anche se molti poliribosomi liberi. Sulla superficie degli osteoclasti orientata verso l'osso in riassorbimento è visibile un caratteristico orletto arruffato o increspato, costituito da prolungamenti citoplasmatici diversi tra loro per calibro e lunghezza. Nelle fessure tra i prolungamenti sono spesso presenti particelle minerali dovute alla lisi dell'osso e microfibrille di collagene. In corrispondenza dell'orletto si trovano anche l'enzima anidrasi carbonica e diverse pompe a protoni, mentre ai suoi margini c'è una porzione di citoplasma di aspetto astrutturato, detta zona chiara. Questa zona presenta superficie liscia e abbondanti strutture citoscheletriche, tra cui alcuni microfilamenti contrattili, e risulta essere una sorta di cercine periferico all'orletto increspato tramite cui l'osteoblasto è in grado di aderire alla superficie ossea da riassorbire. La zona sigillata, invece, è l'ambiente extracellulare delimitato tra la superficie dell'osso e l'orletto increspato, che permette alle sostanze rilasciate dall'osteoclasto di intervenire sulla matrice ossea senza diffondersi all'intorno. Infine, un'altra zona di particolare rilevanza nell'osteoclasto è la zona delle vescicole chiare, il citoplasma più prossimo all'orletto increspato, chiamato in questo modo per via della presenza di numerosi elementi rotondeggianti delimitati da membrana apparentemente vuoti.



Figura 1.6: Fotografia al microscopio elettronico di un osteoclasto. [8]

Come già riportato, gli osteoclasti non appartengono alla stessa linea cellulare delle cellule osteoprogenitrici e i loro derivati. I precursori degli osteoclasti, i preosteoclasti, sono originari infatti del midollo osseo ematopoietico e sono strettamente legati a una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti si spostano attraverso i vasi sanguigni per raggiungere le sedi in cui deve cominciare il processo di riassorbimento osseo e, una volta raggiunte tali destinazioni, migrano nel tessuto osseo, con cui si fondono, dando vita agli osteoclasti attivi.

Una volta attivati, essi sono quindi in grado di dissolvere la componente minerale e digerire quella organica del tessuto osseo.

La funzione principale degli osteoclasti è quindi quella di svolgere processi mirati al riassorbimento della matrice ossea. Questi processi sono basati sull'azione erosiva di ioni H^+ sui sali minerali e la secrezione di enzimi idrolitici di origine lisosomiale, che vanno a degradare quella che è invece la parte organica della matrice ossea. Il processo di riassorbimento inizia con l'adesione dell'osteoclasto alla matrice bersaglio, tramite dei recettori integrinici. Immediatamente dopo l'adesione, c'è la comparsa della zona bianca, nella quale sono racchiusi i podosomi, delle strutture puntiformi di adesione. Essi isolano l'ambiente da erodere e fungono da strutture di trasmissione di segnali extracellulari che daranno poi il via al processo di riassorbimento. L'inizio del vero e proprio riassorbimento è dato dall'acidificazione del microambiente della zona sigillata mediante il rilascio in questo spazio di ioni H^+ . Questi ioni, dopo essere stati prodotti nel citosol grazie al lavoro di un'anidrasi carbonica II, raggiungono la zona sigillata mediante una pompa protonica posta nella membrana dell'orletto increspato. Successivamente, per via del pH acido che si genera nell'ambiente, l'idrossiapatite si solubilizza, esponendo alla degradazione enzimatica la parte organica della matrice. Gli enzimi coinvolti in questa reazione sono diversi, uno dei quali è una proteasi lisosomiale collagenolitica caratteristica dei soli osteoclasti, la catepsina K. I prodotti della degradazione della parte organica della matrice vengono endocitati dall'osteoclasto per poi essere esocitati dalla superficie opposta della cellula. Come accennato precedentemente, la lacuna di Howship si forma per via dell'azione erosiva dell'osteoclasto. Quando una prima lacuna iniziale è stata formata, l'osteoclasto si distacca dalla matrice, per poi muoversi per moto ameboide verso una zona di osso adiacente su cui eseguire nuovamente un lavoro di tipo erosivo che andrà poi a formare una nuova lacuna. Più osteoclasti attivati contemporaneamente possono arrivare a riassorbire porzioni anche cospicue di osso in un tempo relativamente breve.

1.3 La sostanza intercellulare

Come ogni tessuto connettivo, anche il tessuto osseo è composto da una frazione rilevante di sostanza intercellulare, anche detta matrice del tessuto osseo. Essa è composta sia da una parte organica, formata da fibre proteiche e sostanza fondamentale anista, che da una componente minerale.

1.3.1 Le componenti organiche

La più importante componente organica della matrice è sicuramente il collagene di tipo I, che ne rappresenta circa il 90-95% e ha la funzione di impalcatura basilare per questo tessuto. A differenza degli altri tessuti connettivi, le molecole di tropocollagene del collagene dell'osso stabiliscono un maggior numero di legami crociati. Quando esaminate al microscopio elettronico nei preparati demineralizzati, le microfibrille di collagene presentano la tipica struttura trasversale con una periodicità di 67 nm. Queste vanno poi a formare dei sottili fasci molto ravvicinati con andamento principalmente regolare e parallelo. Oltre alle fibrille di collagene I, tra le componenti organiche della matrice ossea si possono riscontrare anche piccole quantità di collagene di tipo V e alcuni collagene non fibrillari.

Il 5-10% della componente di tipo proteico dell'osso è dato da proteine non collageniche, che formano la sostanza fondamentale anista. Di queste, la minor parte deriva per diffusione dal flusso sanguigno e partecipa alla composizione del fluido interstiziale. Le altre sono principalmente prodotte e secrete dagli osteoblasti e hanno molteplici funzioni, sia metaboliche che meccaniche. Esse possono essere distinte in quattro principali gruppi: proteoglicani, glicoproteine, proteine di adesione e proteine carbossilate.

I proteoglicani, presenti in piccole quantità nella matrice ossea, sono spesso formati da una breve sequenza peptidica a cui sono legate una o due catene di glicosamminoglicani (GAG). I più conosciuti sono il biglicano e la decorina. Il biglicano, o proteoglicano di tipo I (PG-I), è costituito da due molecole di condroitinsolfato unite da un polipeptide e lo si riscontra sia nella matrice mineralizzata che nel tessuto osteoide. La decorina invece, o proteoglicano di tipo II (PG-II), ha una componente proteica simile a quella del biglicano, unita però a una sola molecola di condroitinsolfato e si trova esclusivamente nella matrice mineralizzata.

Le glicoproteine, solitamente fosforilate o solfatate, hanno un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. La glicoproteina più abbondante nel tessuto osseo è l'osteonectina, che forma circa il 3% della matrice organica. Essa è in grado di interagire con diverse componenti dell'osso e il suo compito sembrerebbe quello di incentivare la formazione di fibrille. Un sottogruppo delle glicoproteine è dato dalle proteine di adesione, che svolgono una funzione adesiva per le cellule del tessuto osseo. L'adesione delle cellule è permessa da una particolare sequenza amminoacidica, la sequenza RGD (arginina-glicina-acido aspartico), riconosciuta da diverse integrine poste sulle cellule da far aderire alla matrice. Le più importanti proteine di adesione sono la fibronectina e le sialoproteine. La fibronectina è una molecola che permette l'adesione degli osteoblasti nelle fasi iniziali del differenziamento. Le sialoproteine, o BSP ("bone sialo-proteins"), sono particolari glicoproteine che contengono residui glucidici di acido sialico; tra di esse le più importanti sono l'osteopontina, o BSP-I, e la BSP-II. Nell'osso,

l'osteopontina è fondamentale per l'adesione degli osteoclasti alla matrice e per la polarizzazione della loro membrana, processo necessario affinché queste cellule siano in grado di svolgere l'attività di riassorbimento. La BSP-II ha invece un importante ruolo nella regolazione delle prime fasi di mineralizzazione della matrice, poiché essa è capace di legare e concentrare ioni calcio.

Infine, l'ultima tipologia rilevante di proteine non collageniche è data dalle proteine carbossilate, più specificatamente le proteine contenenti γ -carbossigluttammato (Gla). Queste proteine hanno la capacità di legare ioni calcio grazie alla carbossilazione di alcuni residui di acido glutammico incentivata dall'enzima γ -carbossilasi. Nell'osso sono due le principali proteine Gla prodotte: l'osteocalcina e la proteina Gla della matrice, entrambe in grado di legarsi agli ioni Ca^{2+} dell'idrossiapatite. Esse giocano infatti un ruolo fondamentale della regolazione della mineralizzazione, poiché legandosi agli ioni calcio, li rendono indisponibili per la combinazione con gli ioni fosfati, inibendo così l'accrescimento dei cristalli e, di conseguenza, il processo di mineralizzazione della matrice. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che l'osteocalcina possiede anche una funzione endocrina.

1.3.2 Le componenti inorganiche

Una volta terminato lo sviluppo osseo dell'organismo, gli elementi inorganici o minerali dell'osso rappresentano circa il 65-75% del peso secco dell'osso. La componente minerale del tessuto osseo è composta principalmente cristalli di sali di calcio, cioè fosfato di calcio, carbonato di calcio in minor quantità e tracce di altri sali. Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite, simile all'idrossiapatite, generati dall'impilamento di celle elementari prismatiche e appiattite. Con il microscopio elettronico si può osservare che questi cristalli hanno la forma di aghi lunghi e sottili, lunghi 20-40 nm e spessi 1.5-3 nm.

1.4 Organizzazione architettonica

Le proprietà meccaniche del tessuto osseo dipendono dalle caratteristiche delle sue due componenti, quella minerale e quella organica delle fibre di collagene, e dalla loro integrazione, motivo per cui è necessario studiare l'organizzazione strutturale di queste due componenti per riuscire a comprendere il comportamento meccanico di questo tessuto. La matrice ossea, come già accennato, può essere di tipo compatto o spugnoso ed è organizzata in lamelle.

Nell'osso compatto, le lamelle di matrice mineralizzata si dispongono in maniera concentrica fino a formare delle tipiche strutture cilindriche chiamate osteoni. Alcuni studi sulle lamelle hanno permesso di formulare un modello di organizzazione lamellare basato sull'orientamento

delle fibre di collagene. In particolar modo, in ogni lamella tali fibre risultano disposte parallelamente, ma tra lamelle contigue esse risultano avere orientamento e inclinazione opposti, con una variazione angolare tra lamella e lamella di circa 90° . Questo particolare modello, detto a “compensato”, permette all’osso di aumentare notevolmente la sua resistenza al carico applicato.

Un osteone è formato da 5-20 lamelle di 3-5 μm , ha un diametro di circa 200 μm e una lunghezza che può andare dai 400 μm a qualche millimetro. Ogni cilindro presenta al centro un canale, il canale di Havers, nel quale si trovano vasi e nervi; per questo motivo gli osteoni sono anche chiamati sistemi haversiani. Ai canali di Havers sono collegati altri sottili canali, chiamati canali di Volkmann, con i quali vanno a formare un’unica grande rete continua che attraversa l’osso dall’esterno all’interno.

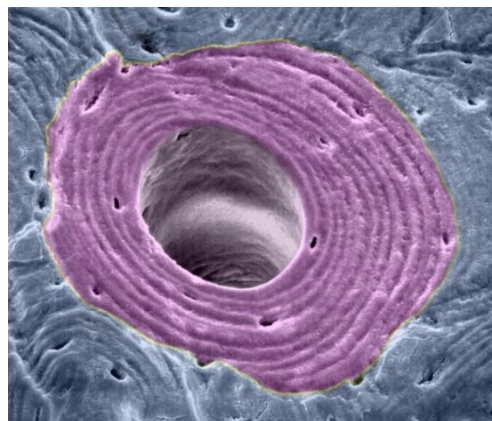


Figura 1.7: Fotografia al microscopio elettronico di un osteone. [9]

Dalle lacune in cui alloggiavano gli osteociti s’irradiano ad angolo retto in ogni direzione i canalicoli ossei, i quali si connettono con quelli delle lacune vicine della stessa lamella e delle lamelle contigue, fino ad arrivare al canale di Havers, formando un unico sistema strettamente connesso.

Ogni osteone è limitato da uno strato spesso 1-2 μm di matrice mineralizzata povera di fibre, la linea cementante, meno rigida rispetto ad altre regioni del sistema haversiano. Nell’osso corticale la sezione non è occupata solamente da osteoni, bensì sono presenti anche delle lamelle parallele formate da resti di essi prodotti dal processo di rimodellamento osseo. Questi residui vanno a costituire il cosiddetto sistema interstiziale o breccia ossea. Infine, sia al di sotto del periostio che dell’endostio sono presenti degli strati di lamelle disposti circolarmente lungo tutta la circonferenza, che rappresentano i sistemi circolari o limitanti, esterno ed interno rispettivamente.

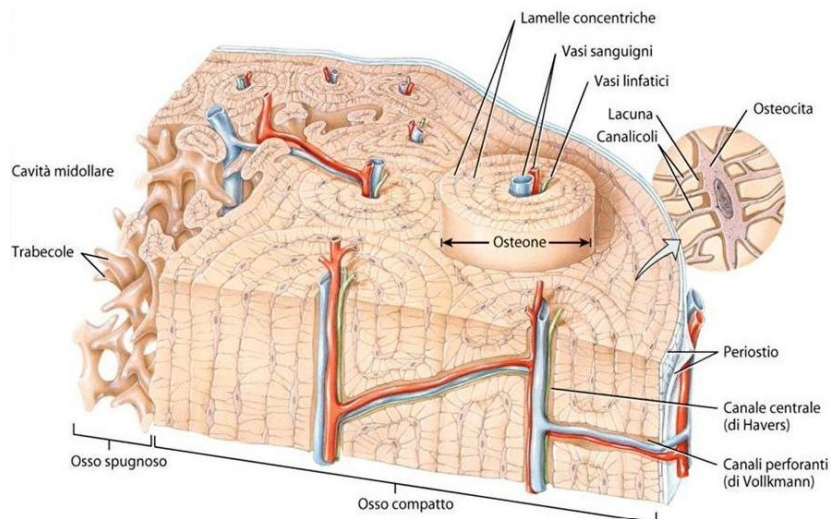


Figura 1.8: Organizzazione architettonica del tessuto osseo compatto. [10]

Nell'osso spugnoso le lamelle sono disposte parallelamente le une a fianco alle altre, formando strutture chiamate trabecole ossee, che hanno uno spessore variabile tra i 150 e i 200 μm . Gli spazi intercomunicanti che si formano tra una trabecola e l'altra contengono midollo osseo vascolarizzato, motivo per il quale le trabecole non sono attraversate da vasi e gli osteoni sono assenti. Le trabecole si dispongono a seconda delle linee di carico; infatti, l'osso spugnoso è in grado di sopportare sollecitazioni che derivano da diverse direzioni.

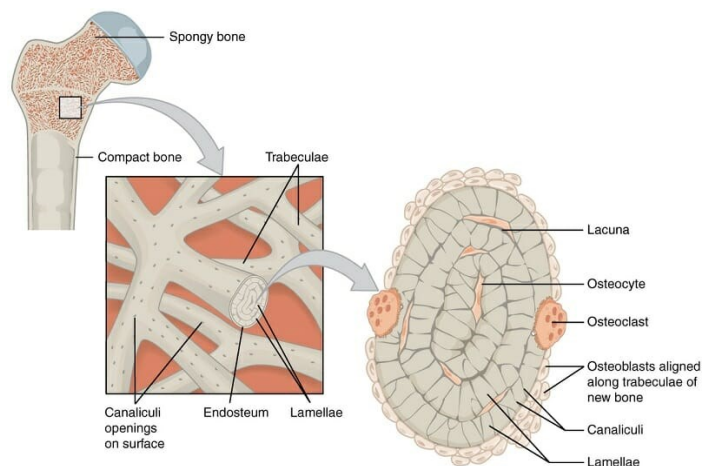


Figura 1.9: Organizzazione architettonica del tessuto osseo spugnoso. [11]

In conclusione, grazie sia alla composizione caratteristica della sua matrice che alla sua organizzazione architettonica, il tessuto osseo possiede notevoli proprietà meccaniche, garantendo la massima resistenza e durezza associate al minimo peso.

Capitolo 2 – Caratterizzazione meccanica del tessuto

OSSEO

Studiare il comportamento meccanico del tessuto osseo e comprendere i meccanismi che lo caratterizzano ha un importante ruolo nella prevenzione e nel trattamento di fratture legate all'età e di alcune malattie, come l'osteoporosi. Poiché le ossa sono caratterizzate da due tipi di tessuto, quello compatto e quello spugnoso, è necessario indagare le proprietà di entrambi con metodi specifici a seconda del tipo. Inoltre, assume particolare rilievo lo studio delle singole unità costituenti il tessuto, le trabecole nel caso dell'osso spugnoso e gli osteoni per l'osso compatto.

2.1 Proprietà meccaniche del tessuto osseo compatto

Per studiare le proprietà meccaniche dell'osso compatto spesso possono essere utilizzate tecniche tradizionali, come test di trazione, compressione e flessione.

Per indagare le proprietà elastiche dell'osso compatto una tecnica efficace è quella ultrasonica. Svolgere un test del genere prevede l'uso di trasduttori piezoelettrici che, dopo essere stati applicati direttamente sulla superficie del campione, sono in grado di trasmettere e ricevere un'onda elastica. Il dato rilevante da cui è possibile dedurre le proprietà elastiche del materiale è la velocità delle onde di taglio e longitudinali. Tale velocità v è infatti correlata al modulo elastico E tramite la relazione: $E = \rho v^2$, dove ρ rappresenta la densità del materiale. Affinché questa relazione sia valida, è necessario che l'onda ultrasonica soddisfi una condizione: la sua lunghezza d'onda deve essere sia maggiore della dimensione trasversale del campione che della dimensione caratteristica della struttura studiata, come il diametro dell'osteone nel caso dell'osso compatto.

Tramite prove di microindentazione è possibile calcolare la microdurezza del tessuto osseo. In particolare, questa prova viene eseguita misurando le dimensioni dell'impronta A lasciata da un indentatore di diamante dopo essere stato premuto contro la superficie del tessuto con un basso carico noto P_{max} . La microdurezza viene quindi calcolata tramite il rapporto tra queste due grandezze: $H = \frac{P_{max}}{A}$.

A differenza di quella di altri materiali come i metalli, la durezza dei tessuti biologici risulta correlata non solamente alle proprietà di snervamento, bensì anche a quelle elastiche. Per questo motivo, comprendere il comportamento elastico tramite esperimenti che prevedono il calcolo

solamente della durezza non è semplice. Le prove di microindentazione hanno quindi dovuto migliorare le proprie tecniche affinché fosse possibile calcolare le proprietà elastiche del tessuto. Inizialmente questa tecnica si basava sul considerare come modello sia il punzone che il semispazio elastici con una curva di scarico lineare elastica; tuttavia, la tecnica fu migliorata per considerare la non linearità della curva di scarico, rendendo questo metodo un prezioso strumento per il calcolo della microdurezza e del modulo elastico. Un esempio dei risultati ottenuti da una prova di microindentazione è mostrato nella seguente figura.

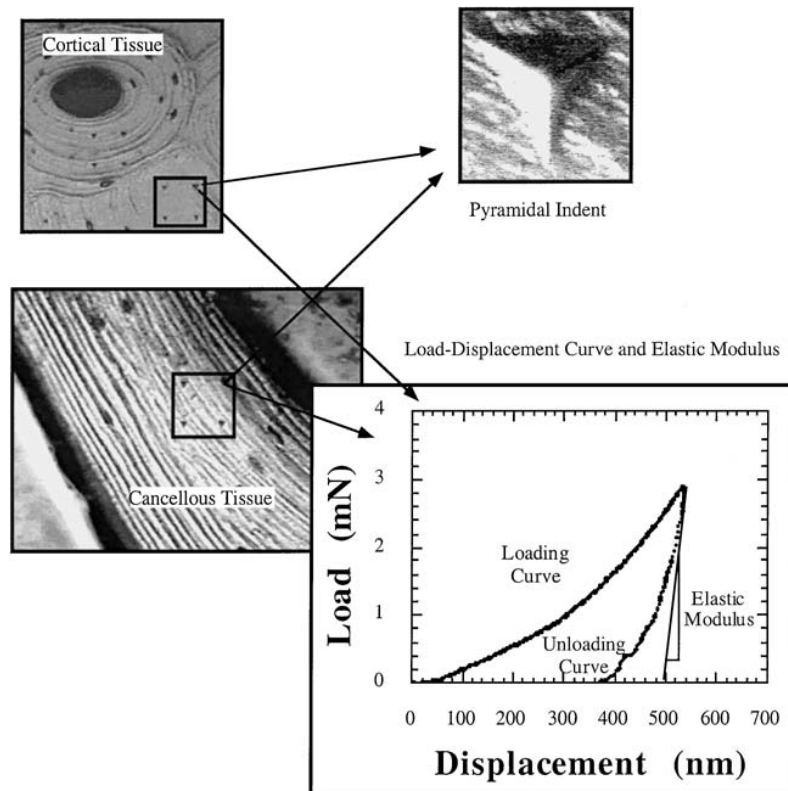


Figura 2.1: Misurazioni del modulo elastico del tessuto osseo tramite nanoindentazione. [12]

La soluzione matematica che ha permesso di migliorare la tecnica di nanoindentazione è stata adattata da Oliver e Pharr e prevede che la rigidità di scarico S sia in relazione con il modulo ridotto E_r tramite la formula:

$$S = \frac{dP}{dh} = \beta \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_r \sqrt{A},$$

dove A rappresenta la proiezione dell'area di contatto, funzione della profondità h , e β è un fattore di forma empirico. Per tenere conto della non rigidità dell'indentatore e del campione, è stata formulata la relazione:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu_s^2)}{E_s} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i},$$

con E_s e ν_s modulo e coefficiente di Poisson del campione di tessuto utilizzato ed E_i e ν_i modulo e coefficiente di Poisson dell'indentatore. Nella formulazione di tale relazione è stato assunto che il campione fosse isotropo e che il coefficiente di Poisson fosse ipotizzato. L'osso corticale presenta, tuttavia, un modulo elastico anisotropo, che perciò cambia a seconda della direzione anatomica considerata, come si può vedere nella seguente tabella.

Modulo elastico (GPa)	Umano	Bovino
Longitudinale	17.4	20.4
Trasversale	9.6	11.7
A flessione	14.8	19.9
Di taglio	3.51	4.14

Tabella 2.1: Modulo elastico del tessuto osseo compatto. [12]

L'osso compatto o corticale può quindi essere in generale descritto in modo piuttosto corretto da una relazione costitutiva ortotropa o trasversalmente isotropa.

Oltre che un'analisi di tipo macroscopico, sono state eseguite molte ricerche cominciate nel 1964 da Ascenzi e Bonucci per indagare le proprietà microscopiche del tessuto osseo, ovvero le proprietà meccaniche degli osteoni. Essi furono in grado di sviluppare una particolare tecnica grazie alla quale fu possibile ottenere dei campioni cilindrici dagli osteoni contenuti in sezioni trasversali di 500 μm . I campioni così ottenuti contenevano il canale di Havers e tutte le lamelle che componevano l'osteone, ad eccezione di quelle più esterne. Successivamente, ai campioni veniva applicato dei carichi incrementali per poi misurarne la deformazione risultante tramite degli estensimetri a microonde. I campioni, in base all'orientamento delle lamelle nell'osteone, potevano essere di tre tipi: longitudinali (L), alternati (A), trasversali (T). Grazie a questo esperimento furono ricavati i moduli elastici delle diverse tipologie di osteone, sottoposte a taglio, tensione e compressione. Rispetto alla visione macroscopica, i moduli calcolati microscopicamente risultano generalmente inferiori.

2.2 Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso

Le proprietà meccaniche dell'osso spugnoso sono molto più difficili da definire rispetto a quelle dell'osso compatto; questa difficoltà deriva soprattutto dalle dimensioni estremamente ridotte dell'unità fondamentale di questo tipo di osso, ovvero le trabecole.

Per dare un valore al modulo elastico dell'osso spugnoso furono utilizzate soprattutto tecniche sperimentali, tra cui: analisi di buckling elastica e anelastica, prova di trazione uniassiale, prova di flessione, tecnica ad ultrasuoni, microindentazione e nanoindentazione.

L'analisi di buckling prevede l'utilizzo dell'equazione di Eulero per il buckling elastico per una trave:

$$\sigma_c = \frac{\pi^2}{K^2} E \left(\frac{L}{r} \right)^2,$$

dove σ_c rappresenta la tensione critica di buckling, K è una costante di condizione al contorno e L/r è il rapporto di snellezza del campione. Misurando quindi σ_c e la geometria del campione tramite l'esperimento è possibile ricavare il modulo elastico E utilizzando questa formula. Runkle e Pugh usando questa tecnica su una trabecola asciutta hanno misurato un modulo pari a 8.69 GPa. Quando però il rapporto L/r è inferiore a 100, si verifica collasso anelastico, che porta a determinare un modulo inferiore a quello reale. Tenendo conto di ciò, dopo aver effettuato un'interpolazione ad un rapporto di snellezza ideale, il modulo elastico del tessuto osseo spugnoso è stato valutato di 11.38 GPa da umido e di 14.13 GPa da asciutto. I problemi legati all'utilizzo di questa tecnica per calcolare il modulo elastico dell'osso spugnoso riguardano la difficoltà nel misurare con precisione le dimensioni delle trabecole non lavorate, che può portare a errori associati significativi. Nonostante le problematiche derivate dall'utilizzo di questa tecnica, è comunque importante evidenziare che il modulo medio risulta essere di circa 11 GPa, molto inferiore rispetto a quello dell'osso compatto, generalmente valutato di 17 GPa.

I test di trazione uniassiale utilizzati sul tessuto osseo spugnoso presentano notevoli difficoltà tecniche dovute alle piccole dimensioni dei campioni. In particolar modo, un corretto allineamento è fondamentale nella prova di trazione, ma ciò è quasi impossibile da garantire per via delle dimensioni e dell'irregolarità della geometria del tessuto. Il valore del modulo riscontrato da Ryan e Williams con questa tecnica fu molto ridotto, di circa 1.0 GPa. Tuttavia, Rho e altri furono in grado di ricavare un modulo pari a 10 GPa.

I test di flessione vengono usati frequentemente per determinare il modulo dell'osso spugnoso, sia per via dell'indipendenza dall'allineamento del campione sia per il fatto che la flessione è un tipo di deformazione fisiologica per la trabecola. Nonostante questi importanti vantaggi, i test di flessione presentano però, come le altre tecniche esaminate fino ad ora, delle problematiche che non possono essere trascurate. Le prime difficoltà consistono nell'anisotropia e nell'eterogeneità del tessuto, che causano inevitabilmente delle distribuzioni di tensioni complesse che rendono l'utilizzo della semplice formula di flessione elastica scorretto. Successivamente, bisogna anche tenere conto dei possibili difetti biologici del campione, come lacune e linee cementanti, che amplificano i disturbi dello stress dovuti alla

concentrazione del carico. Per valutare nelle misurazioni la geometria irregolare delle trabecole, sono stati utilizzati due differenti approcci. Il primo metodo, sviluppato da Mente e Lewis, prevede la valutazione del test eseguito su un campione a trave a sbalzo considerando per il campione un modello a elementi finiti e le condizioni di prova. Il secondo, invece, sviluppato da Kuhn e altri, si basa sulla quantificazione delle proprietà microscopiche del tessuto osseo spugnoso. In particolar modo, questo metodo prevede la microlavorazione del materiale fino ad ottenere dei campioni a trave uniformi che possono essere misurati con precisione. Utilizzando il primo metodo, il modulo elastico medio riportato è di 7.8 GPa, mentre con il secondo esso è risultato circa del 20-30% inferiore a quello dell'osso compatto.

La tecnica ultrasonica può essere impiegata sia a livello macroscopico che a livello microscopico per determinare le proprietà del tessuto osseo spugnoso. In entrambi i casi, per questa tecnica vengono utilizzati ultrasuoni con una frequenza di 2,25 MHz, corrispondente a una lunghezza d'onda di circa 1 mm. Tale lunghezza risulta maggiore delle dimensioni trasversali delle trabecole e minore delle dimensioni del provino continuo. La densità dei campioni macroscopici è stata misurata, mentre per i microcampioni è stata assunta una densità media del tessuto. Infatti, le limitazioni della tecnica ultrasonica nello studio microscopico del tessuto osseo spugnoso sono dovute al fatto che la densità non può essere misurata con precisione. Come con le altre tecniche, i risultati ottenuti mostrano un modulo per il tessuto osseo spugnoso significativamente inferiore a quello per il tessuto osseo compatto.

La tecnica della microindentazione è stata utilizzata per indagare le proprietà meccaniche del tessuto osseo sin dai primi anni '50. Ad esempio, tra le prime persone ad utilizzarla ci fu Weaver, il quale ha riportato che il tessuto spugnoso fosse meno rigido di quello compatto, anche se non ha fornito dati specifici. Con l'avanzare degli anni e dello sviluppo tecnologico, è avvenuto il passaggio dalla microindentazione alla nanoindentazione, che presenta un indenter di dimensioni inferiori ai 2 μm e una risoluzione di rilevamento della profondità dell'ordine dei nm. Per calcolare il modulo elastico del materiale con questa tecnica si usa la curva di scarico-spostamento. Per uno studio delle proprietà a livello microscopico, la nanoindentazione possiede degli enormi vantaggi rispetto ad altre tipologie di prove meccaniche e, per tale motivo, essa è risultata adeguata all'indagine del comportamento meccanico dei materiali biologici, tra cui il tessuto osseo. La tecnica di nanoindentazione è stata utilizzata inizialmente per lo studio dell'osso compatto e ciò ha permesso di ottenere valori di moduli e durezza da confrontare successivamente con i risultati acquisiti per l'osso spugnoso. In particolar modo, le prove sono state eseguite su campioni di femore umani, sia nella diafisi femorale che nel collo femorale. Da questo test, il modulo medio per il tessuto osseo spugnoso è risultato essere pari

a $11.4 \text{ GPa} \pm 5.6 \text{ GPa}$, mentre per le trabecole vertebrali $13.4 \pm 2.0 \text{ GPa}$, nettamente inferiore a quello dell'osso corticale tibiale.

Compreso, grazie agli esperimenti appena citati, che il modulo del tessuto osseo spugnoso risulta generalmente inferiore del 20-30% rispetto a quello del tessuto osseo compatto, risulta necessario indagare le cause di questa notevole differenza. In primo luogo, è plausibile ipotizzare che il modulo risulti correlato alle principali caratteristiche fisiche del tessuto, come densità, porosità, contenuto minerale, orientamento lamellare, lacune e linee cementanti. Tuttavia, Choi e altri sono riusciti a provare che la differenza di modulo esistente tra le due tipologie di osso non potesse essere spiegata dal diverso grado di mineralizzazione, nonostante i loro campioni di osso spugnoso fossero costituiti principalmente da pacchetti trabecolari centrali altamente mineralizzati.

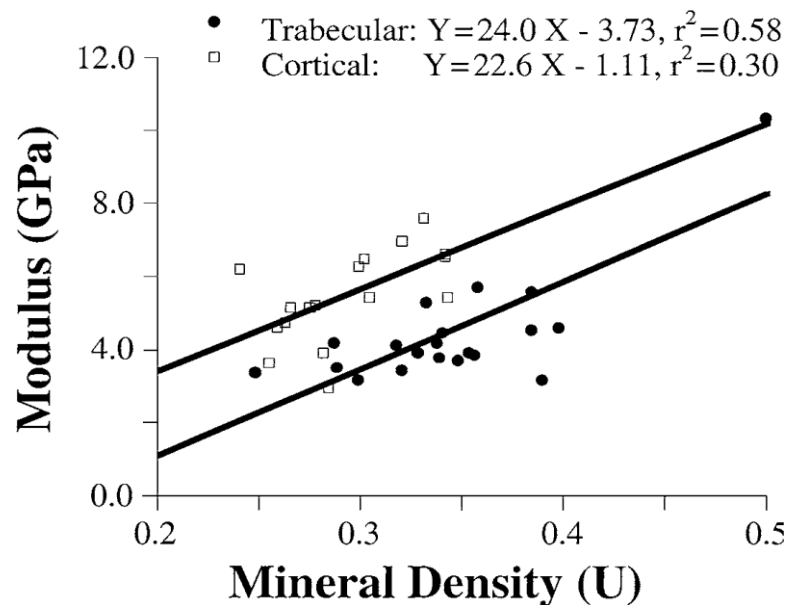


Figura 2.2: Correlazione tra il modulo del tessuto misurato e la densità di minerali nel tessuto, sia per osso spugnoso (trabecular) che per osso compatto (cortical). [12]

Per ogni tipologia di osso esiste dunque una correlazione tra modulo e mineralizzazione e ciò dimostra l'importanza delle differenze microstrutturali tra osso spugnoso e compatto. Infine, poiché il volume delle lacune è molto ridotto, l'organizzazione delle lamelle e delle fibre di collagene risulta essere un fattore determinante per il valore del modulo del tessuto.

Capitolo 3 – Viscoelasticità del tessuto osseo

Tutti i materiali, dopo essere stati sottoposti a tensioni, vanno incontro a deformazione. In base alle sue caratteristiche, ogni materiale presenta un proprio meccanismo di deformazione, caratterizzato da un modello costitutivo. Nel caso del tessuto osseo, il meccanismo che si attiva quando esso è sottoposto a tensione è il meccanismo viscoelastico. Questo tipo di meccanismo è reversibile, dissipativo e tempo-dipendente. Per comprendere perciò il comportamento meccanico di questo tessuto è necessario andare prima ad indagare le definizioni e le equazioni principali che caratterizzano la risposta viscoelastica.

3.1 La viscoelasticità

Per piccole deformazioni, i materiali solidi sono spesso descritti dalla legge di Hooke sull'elasticità lineare che, in una dimensione, è descritta dalla relazione: $\sigma = E\varepsilon$, dove σ è lo stress, ε la deformazione e E il modulo di Young. Nella realtà però tutti i materiali si discostano dalla legge di Hooke e una di queste deviazioni dal comportamento lineare è proprio la viscoelasticità. Infatti, nei materiali viscoelastici, la relazione tra tensione e deformazione dipende anche dal tempo. Sottoponendo un campione di materiale viscoelastico a prove meccaniche di diverso tipo, si ottengono i seguenti risultati:

- se si svolge una prova di creep, ovvero una prova in cui lo stress viene mantenuto costante, la deformazione aumenta nel tempo;
- se viene eseguita una prova di stress relaxation, cioè la deformazione viene mantenuta costante, lo stress diminuisce nel tempo;
- se a rimanere costante è invece la velocità di deformazione, la rigidità effettiva del materiale dipende da essa;
- applicando un carico ciclico si verifica il fenomeno dell'isteresi, ovvero la presenza di un angolo di sfasamento tra stress e deformazione, che rappresenta una dissipazione di energia.

3.1.1 Prova di creep

Il creep è la deformazione lenta e progressiva di un materiale sottoposto a una tensione costante σ_0 . Le prove di creep hanno la funzione di quantificare il comportamento viscoelastico dei materiali e ciò può essere fatto definendo la funzione di deformabilità per scorrimento plastico, $J(t)$, data dal rapporto tra la deformazione in funzione del tempo $\varepsilon(t)$ e lo stress costante σ_0 :

$$J(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma_0}$$

Si parla di elasticità lineare quando la funzione di deformabilità è indipendente dal valore dello stress costante applicato.

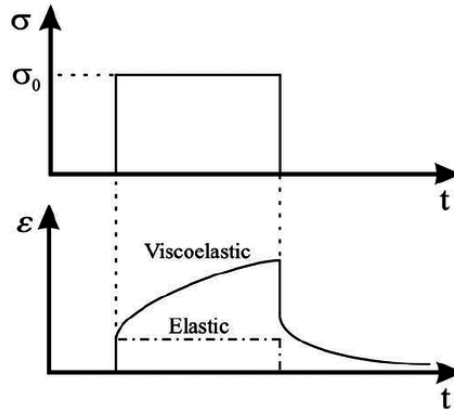


Figura 3.1: Grafici di tensione e deformazione in funzione del tempo durante una prova di creep. [13]

3.1.2 Prova di stress relaxation

Le prove di stress relaxation prevedono una graduale diminuzione dello stress, un “rilassamento”, in seguito al mantenimento di una deformazione costante nel materiale. Il modulo di rilassamento $E(t)$ è definito come il rapporto tra lo stress in funzione del tempo $\sigma(t)$ e il livello di deformazione ε_0 .

$$E(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon_0}$$

Nei materiali lineari, $E(t)$ è indipendente dal livello di deformazione, perciò dipende solo dal tempo.

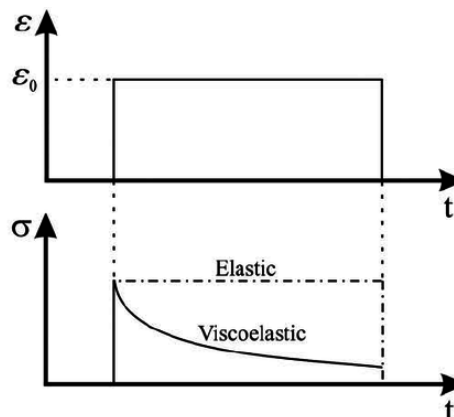


Figura 3.2: Grafici di deformazione e tensione in funzione del tempo durante una prova di stress relaxation. [13]

Il fattore di smorzamento, anche chiamato damping, è rappresentato dalla fase δ tra la tensione e la deformazione prodotta in risposta alla tensione $\sigma(t)$, la quale varia in maniera sinusoidale nel tempo secondo la relazione

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(2\pi\nu t),$$

con ν frequenza. In particolar modo, per studiare il comportamento viscoelastico di un materiale, piuttosto che δ , si utilizza solitamente la tangente della fase, $\tan \delta$.

3.1.3 Prova a velocità di deformazione costante

Le prove a velocità di deformazione costante sono solitamente utilizzate per indagare la resistenza di un materiale; tuttavia, possono anche metterne in risalto le proprietà viscoelastiche. L'esperimento inizia con il materiale non deformato e, successivamente, viene applicata una deformazione che aumenta linearmente nel tempo, finché il materiale non va incontro a rottura. Nel caso di un materiale viscoelastico lineare vale:

$$\frac{d\sigma(t)}{dt} = \frac{d\varepsilon(t)}{dt} E(t).$$

La pendenza della curva tensione-deformazione risulta quindi tanto più elevata quanto maggiore è la velocità di deformazione. Il modulo di Young $E(t)$ diminuisce con il tempo, di conseguenza la curva decresce all'aumentare della deformazione. La curva che ne risulta è perciò non lineare e concava verso il basso.

3.1.4 Equazione costitutiva

L'equazione costitutiva che descrive la viscoelasticità lineare è data dall'integrale di sovrapposizione di Boltzmann:

$$\sigma_{ij}(t) = \int_0^t C_{ijkl}(t - \tau) \frac{d\varepsilon_{kl}}{d\tau} d\tau,$$

dove gli indici i e j assumono valori da 1 a 3 e gli indici k e l seguono la convenzione di sommatoria di Einstein. Ogni componente del tensore costitutivo C può avere sia un valore diverso che una diversa dipendenza dal tempo; tuttavia, se si vanno a considerare le simmetrie dei tensori di deformazione e tensione, le componenti indipendenti passano da 81 a 36.

3.2 Modelli costitutivi per il tessuto osseo

Comprendere il comportamento meccanico del tessuto osseo per fini ingegneristici è stato uno dei compiti più importanti della biomeccanica. Per arrivare ad ottenere risultati realistici è necessario svolgere sia simulazioni numeriche che test sperimentali. Attraverso questi metodi

si può quindi arrivare alla formulazione di un “modello matematico”: un’equazione in grado di descrivere la relazione esistente tra tensione e deformazione, anche detta equazione costitutiva. È necessario però specificare che nella formulazione di tale modello sono state messe in atto diverse semplificazioni; alcune proprietà e fenomeni caratteristici dell’osso possono infatti essere stati trascurati o considerati solo parzialmente.

3.2.1 Viscoelasticità assiale dell’osso

Per indagare la viscoelasticità assiale dell’osso furono eseguite le seguenti prove: prove di creep, prove di stress relaxation, prove di tipo sinusoidale dinamico, prove a velocità di deformazione costante e prove ultrasoniche. Esse verranno discusse in ordine in seguito.

Per quanto riguarda le proprietà assiali dell’osso, il primo lavoro svolto da citare è sicuramente quello di Currey, nel 1965. Egli svolse una prova di creep in flessione, ottenendo un grafico che mostra un aumento della pendenza con il logaritmo del tempo.

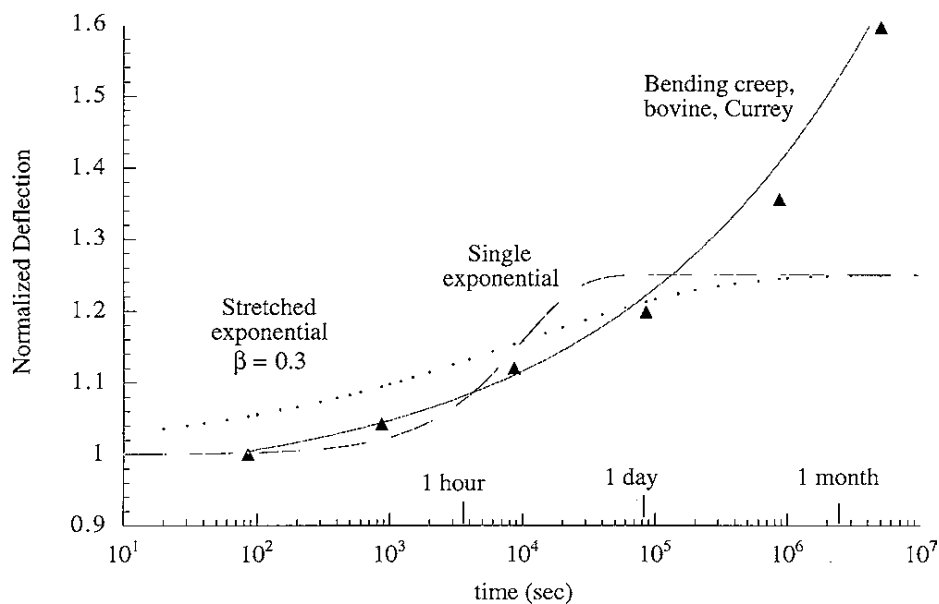


Figura 3.3: Deformazione di creep in funzione del tempo in un osso bovino (triangoli), modello singolo esponenziale (linea tratteggiata), modello KWW con $\beta=0.3$ (puntini). [12]

Tale aumento permette di dedurre che a frequenze efficaci progressivamente più basse risulta un aumento anche di $\tan \delta$.

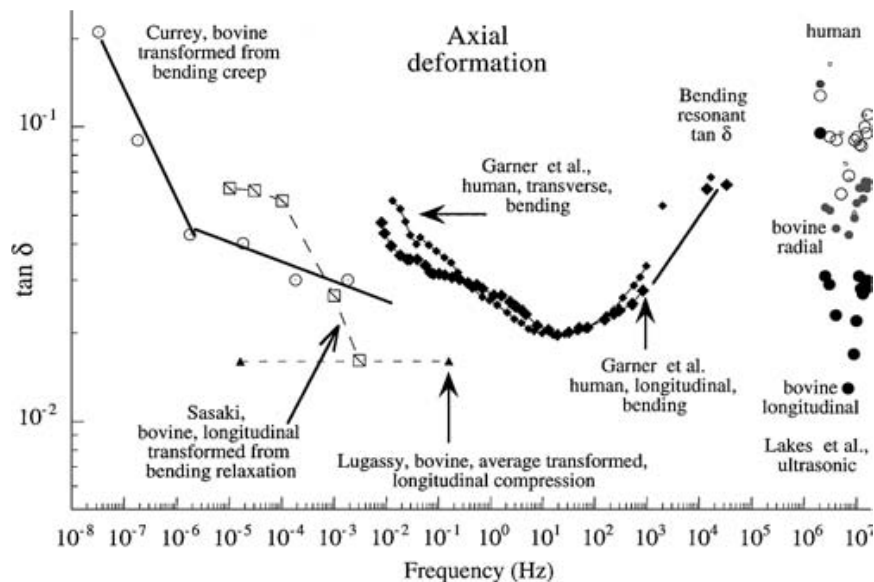


Figura 3.4: $\tan \delta$ nell'osso sottoposto a deformazione assiale. Sono riportati con diverse linee i risultati ottenuti da diversi autori. [12]

Currey fece anche diversi esperimenti con prove di creep di durata diversa. Egli notò che, se il carico da creep viene mantenuto per 10 giorni, la deformazione risultante è del 33% maggiore di quella iniziale. Invece, per un tempo di carico pari a 55 giorni, la deformazione risulta aumentata del 53%. Inoltre, nel primo caso la deformazione viene recuperata quasi totalmente dopo la rimozione del carico, mentre nel secondo essa viene recuperata solo dopo 234 giorni. La deformazione causata da un carico non elevato risulta quindi viscoelastica recuperabile. Eseguendo prove su diversi campioni, sia asciutti che bagnati, Currey notò anche che l'asciugatura dell'osso rallenta, seppur non elimina, la sua risposta al creep. Infine, egli studiò anche l'effetto della temperatura su questo tipo di prove. I risultati indicarono che, tra i 3 e i 49°C, l'osso presentava una riduzione della rigidità iniziale dello 0,4%/°C.

Nelle prove di stress relaxation assiali, alcuni importanti risultati furono forniti da Lugassy e Korostoff, per poi essere interpretati da Lakes e Katz. In particolare, essi scoprirono come il rilassamento fosse maggiore per la compressione assiale rispetto alla compressione longitudinale. Sasaki e altri, invece, fecero una comparazione tra il rilassamento per torsione e quello per flessione, possibile per lo stesso tipo di osso. I risultati indicarono che il modulo effettivo durante il rilassamento subiva un cambiamento del 40% nel caso della flessione e del 30% nel caso della torsione. Questi risultati furono adattati applicando sia il modello KWW che il modello Debye, che verranno discussi in seguito.

Alcuni esperimenti di tipo sinusoidale dinamico furono condotti da Garner e altri sull'osso compatto umano in flessione a temperatura ambiente (22°C), ottenendo misure dirette di $\tan \delta$.

McElhane, invece, valutò $\tan \sigma$ attraverso la formulazione di curve stress-deformazione a velocità di deformazione costante da 0,002 a 1500/s. Tuttavia, i risultati da lui ottenuti presentavano delle discrepanze di circa un ordine di grandezza con quelli ottenuti da altri autori. Secondo Lakes e Katz, esse erano da attribuire a un comportamento di tipo viscoelastico non lineare del tessuto non preso in considerazione.

Infine, Lakes e altri utilizzarono delle frequenze ultrasoniche sul tessuto, ottenendo un'attenuazione in funzione della frequenza, in un range che va da meno di 1 a 16 MHz. I valori di $\tan \sigma$ ricavati dall'attenuazione dimostrano che l'osso umano ha un damping maggiore rispetto a quello bovino. Inoltre, capirono che il valore di $\tan \delta$, era maggiore nella direzione radiale rispetto a quella longitudinale. È importante specificare che la velocità delle onde ultrasoniche utilizzate per questo tipo di prove non dipende dal modulo di Young E , bensì dal modulo tensoriale. Per la direzione 1, la velocità dipende quindi da C_{1111} , ovvero la componente del tensore costitutivo dovuta a una tensione nella direzione x (o 1) quando la deformazione mantenuta a zero nelle direzioni y e z . Per materiali elastici isotropi, vale che:

$$C_{1111} = E \frac{1 - \nu}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)}$$

La velocità longitudinale v dell'onda nella direzione 1 è quindi data da:

$$v = \sqrt{C_{1111}/\rho},$$

che, per un materiale isotropo, può essere riscritta come:

$$v = \sqrt{\left(B + \frac{4}{3}G\right)/\rho},$$

con B modulo di comprimibilità e G modulo di taglio. Per i materiali anisotropi come l'osso, la relazione tra C_{1111} e le costanti ingegneristiche è molto più complicata; tuttavia, per i materiali viscoelastici, tutti i parametri del materiale possono essere interpretati con funzioni complesse della frequenza. L'attenuazione delle onde longitudinali dipende da $\tan \delta$ ricavata dalla componente di C corrispondente; tuttavia, potrebbe non essere la stessa $\tan \delta$ corrispondente al modulo di Young.

Dopo un confronto tra i risultati ottenuti dalle varie prove assiali, si può concludere che $\tan \delta$ per la deformazione assiale raggiunge un minimo in corrispondenza delle frequenze che predominano nelle attività normali, con qualche possibile variazione dovuta alla variabilità biologica.

3.2.2 Viscoelasticità al taglio dell'osso

Come per lo sforzo assiale, anche i risultati dello sforzo da taglio sono stati ottenuti tramite molteplici esperimenti di diversi autori. Le prove eseguite furono: prove di stress relaxation, prove di creep, misurazioni dinamiche dirette, prove ultrasoniche. Anch'esse verranno discusse in ordine in seguito.

Innanzitutto, per quanto riguarda le prove di stress relaxation, Lakes e altri hanno esposto i risultati ricavati da un test torsionale svolto per un tempo che varia da 1 a 10^5 secondi, sia per osso umano che bovino. Sasaki e altri, invece, hanno svolto uno studio simile sulle ossa bovine, interpretando però i risultati con un modello di tipo KWW. In questo modo hanno compreso che $\tan \delta$ si presenta sottoforma di un picco che per frequenze superiori al picco stesso risulta essere proporzionale a $\nu^{-\beta}$.

Nelle prove di creep invece, le curve risultanti dalle prove di tipo torsionale sono risultate essere molto simili a quelle riscontrate durante il creep flessionale da Currey. Infatti, anche nelle curve di creep torsionale si può notare un alto valore di $\tan \delta$ in corrispondenza di frequenza effettive molto basse.

Misurazioni dinamiche dirette di $\tan \delta$ furono eseguite sia da Lakes che da Garner, i quali ottennero un modulo di taglio per il tessuto osseo pari a 4.15 GPa per il primo e 3.42 GPa per il secondo. I risultati di Garner furono ottenuti a temperatura ambiente e con uno strumento in grado di eseguire sia misurazioni da sforzo torsionale che da sforzo flessionale sullo stesso campione.

Anche per misurazioni di sforzo da taglio sono state eseguite delle prove che hanno fatto uso di tecniche ultrasoniche. In particolar modo, per i materiali isotropi, la velocità delle onde di taglio è:

$$v = \sqrt{G/\rho},$$

con G modulo di taglio. L'attenuazione del materiale risulta essere proporzionale a $\tan \delta$.

I risultati degli esperimenti appena citati sono riassunti nella seguente immagine.

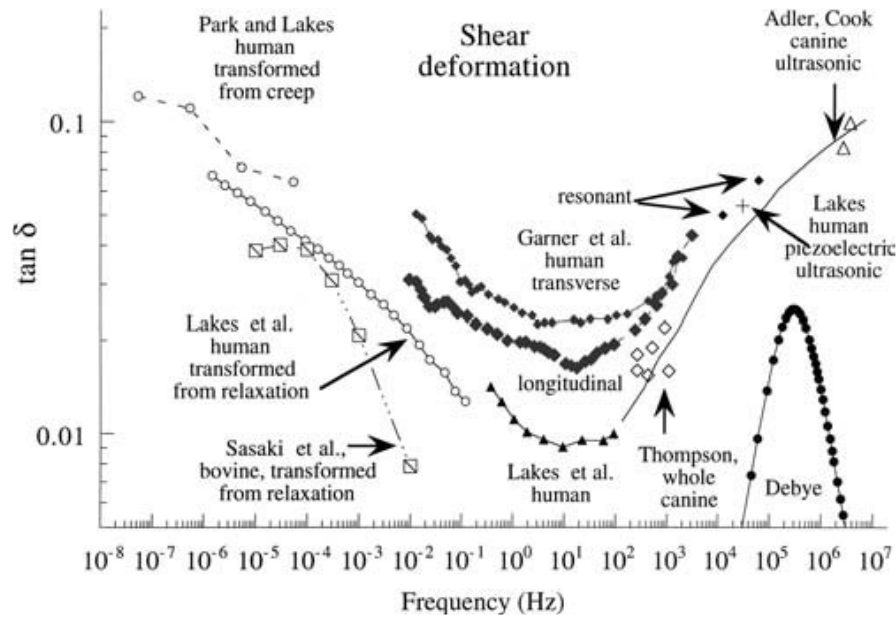


Figura 3.5: $\tan \delta$ nell'osso sottoposto a sforzo di taglio. Sono riportati con diverse linee i risultati ottenuti da diversi autori. [12]

Complessivamente, si può affermare, grazie ai risultati ottenuti da questi esperimenti, che $\tan \delta$ raggiunge un minimo a frequenze caratteristiche delle attività normali, come nel caso della deformazione assiale.

3.2.3 Modelli per la viscoelasticità del tessuto osseo

Il primo dei modelli costitutivi necessari a indagare le proprietà viscoelastiche del tessuto osseo è il modello KWW, ovvero il modello formulato da Kohlrausch, Williams e Watts. L'equazione costitutiva è data da:

$$E(t) = (E_0 - E_\infty)e^{-(t/\tau_r)^\beta} + E_\infty,$$

dove $0 < \beta \leq 1$, E_0 ed E_∞ sono costanti, t è il tempo e τ_r è il tempo caratteristico di rilassamento.

Il modello di Debye per il rilassamento è invece dato da:

$$E(t) = E_2 + E_1 e^{-t/\tau_r},$$

con τ_r il tempo caratteristico di rilassamento. Per il creep, l'equazione costitutiva del modello di Debye è:

$$J(t) = J_2 - J_1 e^{-t/\tau_c},$$

con τ_c tempo di ritardo.

Il picco di $\tan \delta$ nel modello di Debye è correlato alla frequenza secondo la relazione:

$$\tan \delta(w) = \frac{\Delta}{\sqrt{1 + \Delta}} \frac{w\tau_m}{1 + w^2\tau_m^2},$$

dove $\tau_m = \tau_r \sqrt{1 + \Delta}$ è una costante di tempo, $w = 2\pi v$ è a frequenza angolare e v la frequenza. Δ rappresenta invece la “forza di rilassamento”, che viene definita come il rapporto tra il cambiamento della rigidità durante il rilassamento e la rigidità a lungo termine. Nel caso di un damping basso, l'altezza del picco è data da $\tan \delta \approx \Delta/2$.

Come si può notare dalla figura 3.3, il modello di Debye (singolo esponenziale) presenta una dipendenza dal tempo su scala logaritmica più brusca di quella dei materiali reali come l'osso. Per questo motivo, il modello di Debye può essere utilizzato come parte di un modello costitutivo per il tessuto osseo, ma da solo risulta insufficiente per descriverne completamente il comportamento viscoelastico.

Nel modello di tipo spettrale, la funzione del modulo di rilassamento $E(t)$ viene scomposta in una distribuzione di esponenziali:

$$E(t) - E_\infty = \int_{-\infty}^{\infty} H(\tau) e^{-t/\tau} d \ln \tau = \int_0^{\infty} \frac{H(\tau)}{\tau} e^{-t/\tau} d\tau,$$

dove $H(\tau)$ è una funzione di distribuzione chiamata spettro di rilassamento. Inoltre, E_∞ rappresenta il modulo di equilibrio, ovvero la rigidità del materiale dopo un tempo infinito di rilassamento. Lo spettro rimane costante su uno specifico intervallo di valori, mentre si annulla al di fuori di esso.

Capitolo 4 – Viscoelasticità del tessuto osseo: prove sperimentali

Come è già stato accennato nei capitoli precedenti, per comprendere il comportamento meccanico del tessuto osseo è stato necessario l'utilizzo di diverse prove sperimentali. Molte di esse sono già state citate brevemente durante la descrizione del percorso che ha portato alla formulazione di un modello meccanico per l'osso; tuttavia, almeno un paio di test meritano una trattazione più approfondita.

In seguito, verranno riportati due esempi di alcune delle prove più importanti per la caratterizzazione del comportamento viscoelastico del tessuto osseo, ovvero la prova di creep e la prova di stress relaxation.

4.1 Prova di creep

4.1.1 Introduzione

Il creep è la deformazione che si presenta in un materiale quando esso viene sottoposto ad una tensione costante. Se il carico, che causa la tensione, viene applicato per un tempo prolungato il materiale può incorrere in danni permanenti.

Il fenomeno di creep può essere suddiviso in 3 fasi: primaria, secondaria e terziaria. Il creep primario si presenta nel breve periodo di tempo iniziale, quando il tasso di creep ($d\varepsilon/dt$) diminuisce e si presenta qualche tipo di rilassamento nel materiale. Il secondario è il regime di durata maggiore e presenta un tasso di creep stazionario. Infine, il creep terziario è caratterizzato da un tasso di creep accelerato e un accumulo di danni in aumento, che può portare alla rottura del materiale nel caso il carico fosse mantenuto. Nel caso in cui la prova di creep fosse interrotta, mediante la rimozione del carico, durante la seconda fase, il materiale risulta in grado di recuperare parzialmente la deformazione tramite meccanismi elastici e viscoelastici.

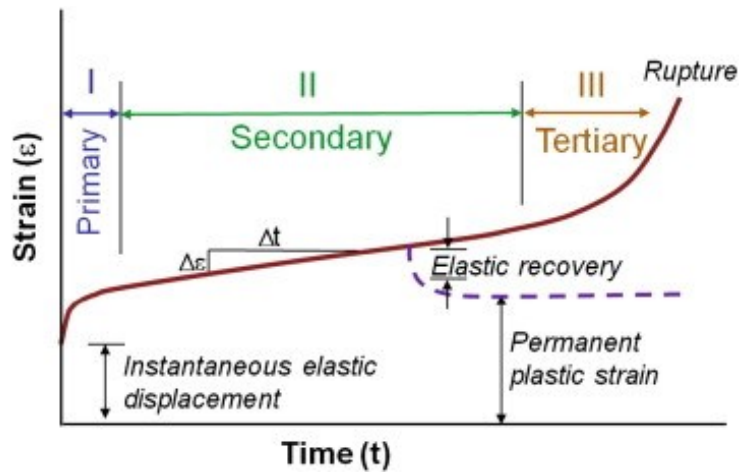


Figura 4.1: Rappresentazione schematica delle tre fasi del creep. [14]

Essendo un materiale con una microstruttura complessa e un'elevata variabilità biologica, l'osso presenta un fenomeno di creep molto complesso, che varia in base sia al tipo di carico che alle proprietà meccaniche locali. Un importante esempio dei danni causati da questo tipo di deformazione nell'osso è dato dalla diminuzione di statura negli individui anziani a causa di fenomeni di schiacciamento delle vertebre dovuti al creep.

Una parte fondamentale nelle prove di creep è la microtomografia computerizzata (μ CT), ovvero un metodo di imaging che è in grado di valutare la struttura dell'osso trabecolare. Infatti, i parametri strutturali che tale tecnica permette di misurare sono correlati in maniera significativa con le proprietà meccaniche possedute dall'osso spugnoso in varie regioni anatomiche. Questa tecnica è utilizzata, oltre che con le prove di creep, anche in combinazione con l'analisi della composizione del materiale perché, in questo modo, diventa un potente strumento per valutare la qualità dell'osso e la probabilità di frattura.

Il test di creep riportato in seguito è stato eseguito su dei campioni di osso spugnoso umano prelevati dalla tibia prossimale di un cadavere di 71 anni affetto da osteoporosi.

Nell'osso spugnoso bovino, la relazione tra tasso di creep e tensione è:

$$\left(\frac{d\varepsilon}{dt}\right) \sim A \left(\frac{\sigma_{creep}}{E_0}\right)^{18},$$

dove il rapporto tra la tensione di creep applicata e la rigidità iniziale fornisce lo stress normalizzato e A rappresenta un parametro di adattamento. Un'altra importante relazione che è stata determinata è:

$$\left(\frac{d\varepsilon}{dt}\right) \sim B(\sigma_{creep})^{11}(\rho)^{-17},$$

con B parametro di adattamento e ρ densità. Grazie a queste due equazioni è facile comprendere come il carico applicato e la microstruttura dell'osso spugnoso siano due parametri fondamentali per la determinazione del creep.

4.1.2 Descrizione della prova sperimentale: materiali e metodi

I campioni utilizzati per la prova sono stati prelevati da un osso trabecolare umano di un cadavere femminile di 71 anni affetto da osteoporosi e deceduto da circa 10 mesi. Il primo step della preparazione del campione è stato il taglio con una sega elettrica manuale di una fetta spessa 10 mm della parte superiore della tibia prossimale. Successivamente, dalla fetta sono stati ricavati 17 campione mediante l'utilizzo di una sega a diamante a bassa velocità. Ogni campione è risultato rettangolare parallelepipedo e di dimensioni 5 mm x 5 mm x 10 mm. Terminata la fase di taglio, i campioni sono stati misurati e pesati in condizioni umide, includendo perciò il midollo osseo, per calcolarne la densità.

Terminata la preparazione dei campioni, è stato eseguito il test di creep. Inizialmente, tutti i campioni sono stati sottoposti a un ciclo di preconditionamento fino al raggiungimento dell'1% di deformazione compressiva a una velocità di deformazione di $10^{-3}/s$, tramite l'utilizzo di una macchina dotata di una cella di carico da 500 N. Questo processo viene eseguito con il fine di determinare il modulo elastico iniziale E_0 e la tensione di creep su ciascun campione, poiché varia con le diverse densità. Un deflettometro esterno è stato utilizzato per misurare il piccolo spostamento, in modo da eliminare i possibili errori dovuti alla conformità della macchina. Nel fissaggio delle estremità del campione a contatto con le piastre non sono stati presi particolari accorgimenti; perciò, le deformazioni misurate possono risultare superiori a quelle rilevate sui campioni con tappi. I campioni sono quindi stati sottoposti a compressione a una velocità di deformazione più lenta ($10^{-6}/s$), per ottenere dati più precisi, fino al livello di stress prestabilito. Successivamente, sono stati mantenuti a stress costante prestabilito per 2 ore per poi essere immediatamente scaricati. Durante lo svolgimento di tutti i test, i campioni sono stati immersi in una soluzione contenente inibitori di proteinasi a $37^{\circ}C$. In questo modo, gli autori sono stati in grado di registrare il dato ricercato, ovvero la deformazione in funzione del tempo.

Due dei 17 campioni iniziali sono stati scansionati, sia prima che dopo il test di creep, utilizzando un micro-tomografo computerizzato (μCT), facendo in modo che rimanessero umidi. Per scannerizzarli sono stati utilizzati voxel isotropici di $36 \mu m$ e sono state applicate una tensione elettrica di 70 kV e una corrente di $200 \mu A$, utilizzando un filtro in alluminio da 0,5 mm. Attraverso l'utilizzo di diversi software, le immagini sono state poi elaborate.

Terminata anche la fase di scansione, è stata eseguita l'analisi delle immagini raccolte, regolando opacità, quantità di ombra e illuminazione affinché la struttura dei campioni fosse ben visibile. Alcuni dei parametri raccolti grazie a questo procedimento sono: lo spessore delle singole trabecole (TbTh), la distanza tra le trabecole (TbS), la densità di connessione (ConnD, fornisce informazioni sulla connessione tra trabecole), lo structure model index (SMI, fornisce informazioni sulla forma relativa delle trabecole), il grado di anisotropia (DA), la porosità totale. Tutti questi parametri ottenuti prima e dopo il test sono stati utilizzati per ottenere importanti informazioni riguardo i meccanismi di deformazione.

Successivamente, le immagini ottenute dai campioni selezionati sono state convertite in modelli tridimensionali grazie a degli specifici software, in modo da mostrare lo spostamento del volume osseo, ovvero la deformazione, avvenuto durante la prova di creep.

4.1.3 Risultati e interpretazione

I risultati ottenuti da questa prova sono mostrati nella figura 4.2.

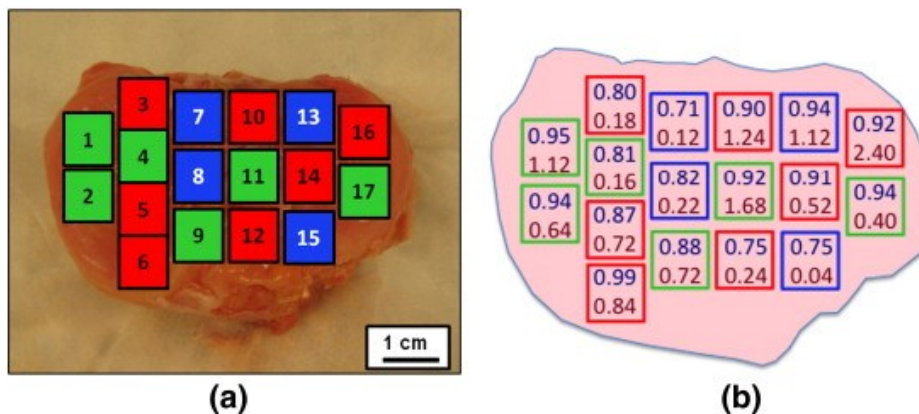


Figura 4.2: (a) Mappa dei campioni per la tibia prossimale. Ai campioni verdi corrisponde una curva di creep completa, i campioni rossi si sono fratturati prematuramente durante il carico iniziale, e i campioni blu hanno subito una deformazione anormalmente elevata. (b) Variazione della densità e della tensione di creep (misurato all'1% di deformazione) per i campioni. Il numero in alto si riferisce alla densità (g/cm^3); il numero in basso si riferisce alla tensione di creep, σ_{creep} (MPa). [14]

Come si può notare, la densità dei campioni varia da $0,71 \text{ g/cm}^3$ a $0,95 \text{ g/cm}^3$, per una media di $0,87 \text{ g/cm}^3 \pm 0,08 \text{ g/cm}^3$, risultato concorde con valori di densità riscontrati da altri autori sullo stesso tipo di osso. Grazie a queste mappe, è facile notare come ci sia un'elevata variabilità delle proprietà, e quindi delle prestazioni meccaniche, all'interno della stessa sezione trasversale di osso. La tensione di creep applicata σ_{creep} , invece, è un importante parametro perché permette di prevedere possibili aree di rottura.

La figura seguente mostra la dipendenza di σ_{creep} e di E_0 dalla densità nei campioni con curva di creep completa (verdi).

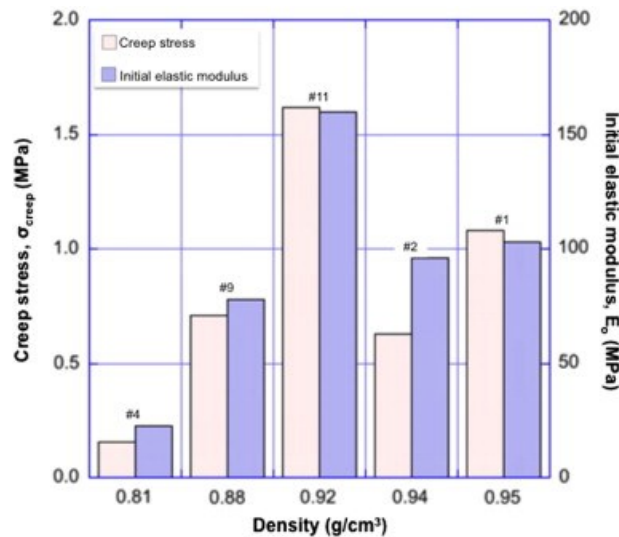


Figura 4.3: Grafico che mostra la dipendenza dello stress di creep e del modulo iniziale elastico dalla densità. [14]

Si può comprendere dal grafico che, generalmente, σ_{creep} e E_0 risultano più elevati per campioni con densità maggiore, anche se il campione #11 risulta un'eccezione a tale schema. Inoltre, campioni con lo stesso valore di densità, ma posizionati in regioni diverse, hanno mostrato tensioni di creep differenti (#2, #13, #17). Grazie a questi due risultati, si può già comprendere come la densità non sia l'unico parametro da cui dipende la risposta meccanica del tessuto. Altri parametri rilevanti in questo contesto sono infatti quelli misurati mediante il procedimento di analisi delle immagini raccolte tramite μ CT, già citati nel capitolo 4.1.2.

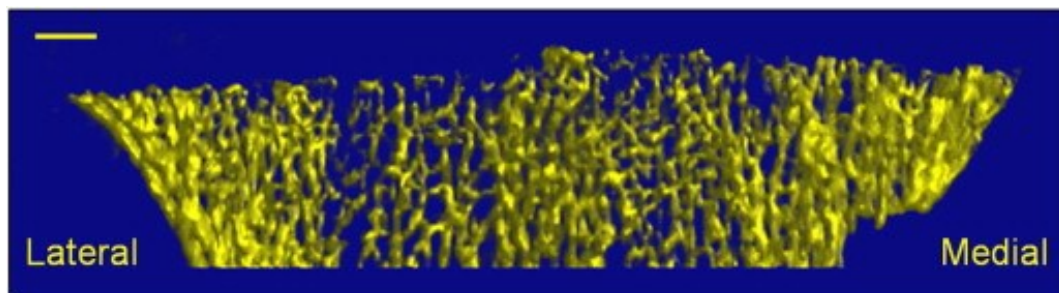


Figura 4.4: Immagine μ CT dell'intera sezione di tibia. [14]

Nella figura precedente si può notare come l'orientamento prevalente delle trabecole sia quello verticale, allineate nella parte centrale della fetta e leggermente curvate verso i lati mediale e laterale.

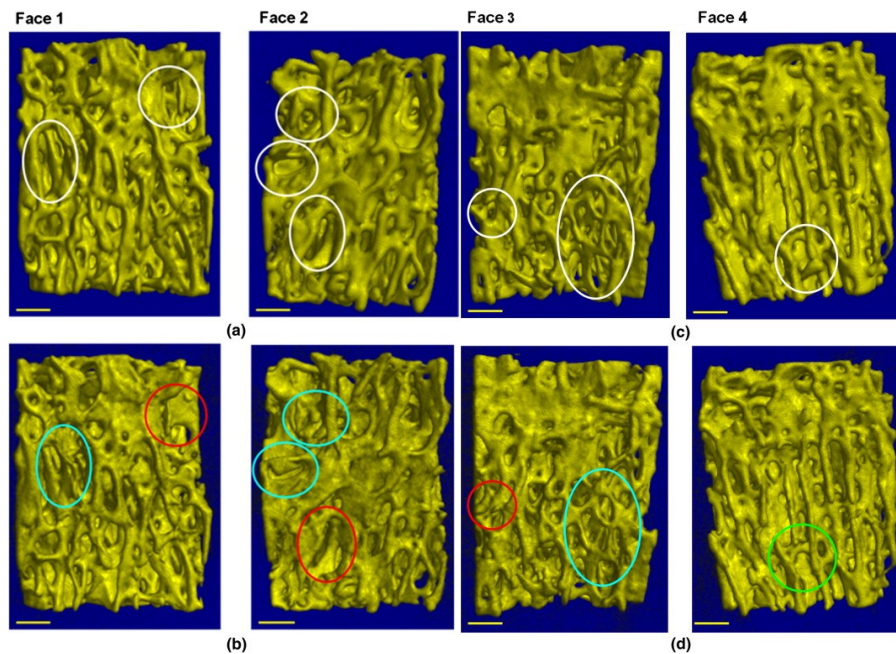


Figura 4.5: Immagini μ CT del campione #9. [14]

Nella figura 4.5, invece, vengono analizzate le 4 facce del campione #9, prima (a, c) e dopo (b, d) la prova di creep. Si possono osservare delle flessioni (azzurre), una frattura (verde) e degli spostamenti parziali delle trabecole (rossi). Si può inoltre notare come le deformazioni maggiori siano avvenute in corrispondenza delle zone a maggiore porosità o nei perimetri delle cavità. Questi risultati dimostrano come la μ CT sia uno strumento con un'efficacia immediata nella visualizzazione delle deformazioni e dei danni causati dal creep.

Un'altra tecnica utile a visualizzare la deformazione avvenuta con il creep è quella di sovrapporre le immagini μ CT pre- e post-creep. Un esempio di ciò è dato dalla figura seguente.

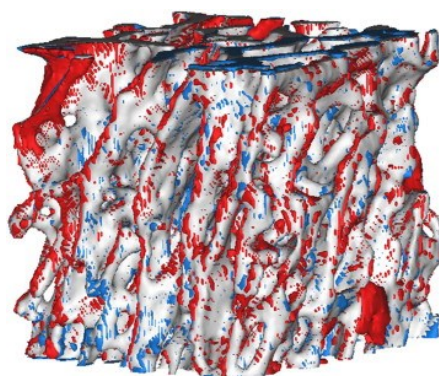


Figura 4.6: Modello 3D ricostruito da immagini μ CT che compara i volumi pre- e post-carico del campione #17. [14]

La parte dell'immagine colorata di blu è il volume che si evidenzia solamente dopo aver eseguito la prova, mentre la parte in rosso rappresenta il volume del campione presente

nell'immagine pre-carico, ma non in quella post-carico. Il volume bianco è quindi l'intersezione delle due immagini.

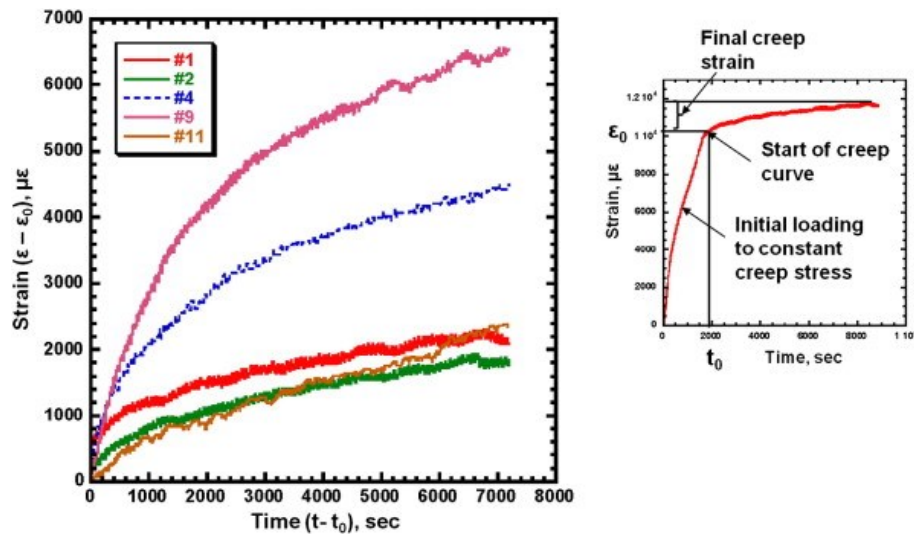


Figura 4.7: Curve di creep di diversi campioni. [14]

Nella figura 4.7 si possono invece osservare le curve di creep risultanti dai test su diversi campioni. In questo grafico, la deformazione di creep, data da $\varepsilon(t) - \varepsilon_0$, è descritta in funzione del tempo di creep, $t - t_0$. Il tasso di creep medio, cioè la pendenza stimata della regione lineare di stato stazionario, si è rivelato essere tra $0.15 \mu\text{e}/\text{s}$ e $0.38 \mu\text{e}/\text{s}$, per una media di $0.26 \pm 0.09 \mu\text{e}/\text{s}$, valore coerente con quelli riscontrati da altri autori. La coppia di campioni #1 e #2 e la coppia #4 e #11 risultano avere tassi simili, rispettivamente $\sim 0,15 \mu\text{e}/\text{s}$ e $\sim 0,26 \mu\text{e}/\text{s}$, e ciò è probabilmente dovuto al fatto che provengono da regioni simili e quindi hanno struttura trabecolare interna affine. Il tasso di creep inferiore per la prima coppia di campioni può essere legato alla loro regione di provenienza, ovvero il perimetro della sezione di tibia. Esso, infatti, è probabilmente stato meno influenzato dall'osteoporosi rispetto alla regione interna, da dove invece provengono i campioni #4 e #11. Infine, eseguendo il confronto tra queste due coppie di campioni, si può comprendere come il tasso di creep sia anche influenzato dalla densità: a densità maggiore, generalmente, corrisponde tasso di creep inferiore.

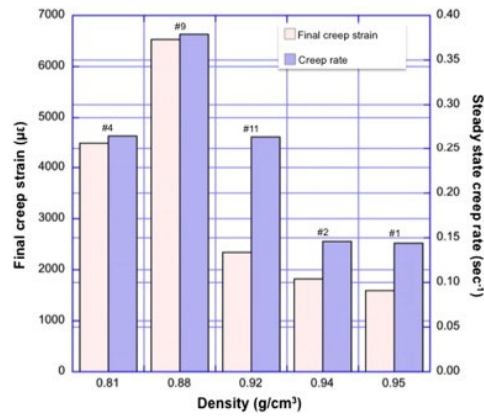


Figura 4.8: Grafico che illustra la dipendenza dalla densità della deformazione di creep finale (calcolata dopo due ore, $\epsilon_f = \epsilon_{2hr} - \epsilon_0$) e del tasso di creep in stato stazionario. [14]

Infine, gli ultimi dati esaminati sono i parametri morfologici pre- e post-carico, ovvero TbTh, TbS, ConnD, SMI, DA e porosità totale, calcolati grazie all'utilizzo delle scansioni μ CT. Le variazioni percentuali riscontrate sono state riassunte nel seguente grafico.

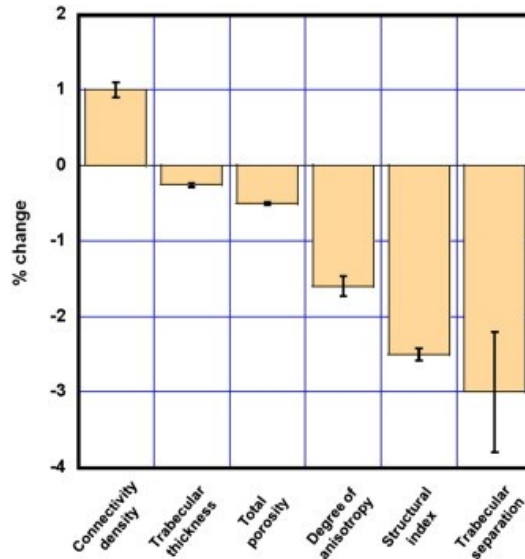


Figura 4.9: Cambio percentuale dei parametri morfologici prima e dopo l'esecuzione della prova. [14]

4.1.4 Conclusioni

L'analisi del comportamento di creep compressivo dell'osso trabecolare umano di una tibia prossimale di un cadavere femminile di 71 anni con osteoporosi, tramite una prova di compressione durata due ore e l'utilizzo della tomografia computerizzata microscopica, ha prodotto diversi risultati:

- La densità lungo la tibia variava da 0,71 a 0,95 g/cm³;
- Il modulo elastico iniziale e lo sforzo all'1% di deformazione aumentavano con l'aumentare della densità.

- I tassi di creep in stato stazionario variavano da $0.15 \mu\epsilon/s$ a $0.38 \mu\epsilon/s$, con una media di $0.26 \pm 0.09 \mu\epsilon/s$;
- Il tasso di creep è risultato maggiore nelle regioni interne (con una densità più bassa) della tibia rispetto alle regioni periferiche (con una densità maggiore);
- La tomografia computerizzata microscopica può essere impiegata per documentare con precisione la posizione e il tipo di danni da creep;
- L'analisi quantitativa dei risultati della tomografia computerizzata microscopica indica tendenze generali per diversi parametri prima e dopo i test di creep; la separazione trabecolare e l'indice strutturale sono risultati essere gli indicatori per valutare la deformazione da creep;
- La modalità principale di deformazione era la piegatura delle trabecole.

4.2 Prova di stress relaxation

4.2.1 Introduzione

Negli ultimi anni, la viscoelasticità dell'osso è stata oggetto di diversi studi, molti dei quali si sono serviti di test di stress relaxation, o prove di rilassamento dello stress. Riguardo questo particolare tipo di prove, è importante ricordare che:

- La prova di stress relaxation consiste nell'applicazione di una deformazione costante al materiale;
- Il processo di rilassamento può essere suddiviso in due fasi, una rilevante per il comportamento a breve termine del materiale e l'altra per le sue dinamiche a lungo termine;
- Il processo a breve termine è probabilmente isotropo, mentre il secondo è influenzato dall'orientamento della deformazione applicata.

Per andare a comprendere i meccanismi alla base di questa tipologia di prova, verrà preso ad esempio uno studio eseguito su un osso trabecolare bovino. La prova è stata eseguita sia per compressione che per flessione.

4.2.2 Descrizione della prova sperimentale: materiali e metodi

I test sono stati eseguiti su dei campioni di osso trabecolare prelevati dalle teste femorali di alcuni bovini. Gli animali da cui sono stati eseguiti i prelievi sono 11, ognuno dei quali è stato identificato con una propria etichetta numerata.

Le teste dei femori bovini sono state tagliate, grazie all'aiuto di una matrice, lungo il piano perpendicolare all'asse del collo femorale. I campioni che sono stati ricavati da questo processo

erano di due tipi: cilindrici, di altezza 20 mm e diametro 10 mm, o a forma di trave, con una sezione trasversale 5 x 5 mm e lunghezza 40 mm. Per ogni femore sono stati ottenuti solo uno o due campioni, per un totale di 42, 21 campioni cilindrici e 21 campioni a trave. Successivamente, è stato rimosso il midollo osseo da tutti i campioni attraverso l'immersione in una soluzione di acqua e cloruro, seguita da tre pulizie ultrasoniche in acqua demineralizzata per 5 minuti e un'essiccazione all'aria di 2 minuti. Ultimata la preparazione, i campioni sono stati conservati a una temperatura di -24°C, per poi essere scongelati almeno un'ora prima dell'inizio dei test.

Le prove di rilassamento dello stress sono state eseguite con una macchina avente una cella di carico di 1000 kN, equipaggiata in modo tale che umidità e temperatura del campione potessero essere controllate durante l'intera durata del test.

Sui campioni cilindrici sono stati eseguiti test di compressione, mentre su quelli a trave sono stati eseguiti test di flessione. Per facilitare la procedura di analisi è stata introdotta una notazione, secondo la quale con P si indica la forza assiale nel test di compressione e con M il momento di flessione nel test flessionale.

I campioni cilindrici sono stati preconditionati meccanicamente attraverso l'esecuzione di 10 cicli di carico tra 0 e 72 N. I campioni preconditionati sono quindi stati sottoposti alla prova di stress relaxation. La prova prevedeva l'applicazione di una deformazione di compressione a velocità costante di 0.9 mm/mm min⁻¹, fino al raggiungimento di un carico prefissato. A quel punto, la deformazione applicata ai campioni è stata mantenuta costante diminuendo il carico per un periodo di 600 s. Undici campioni sono stati sottoposti alla prova per 5 valori diversi di forza interna ($P_0 = 120, 240, 360, 480$ e 600 N), per un totale di 55 test.

I campioni a trave sono stati sottoposti a un test di flessione a tre punti, basato su due supporti con una campata di 15 mm. Il preconditionamento meccanico in questo caso è stato eseguito in modo che il momento di flessione nella sezione di mezza campata variasse da 0 a 180 N mm. Finito il preconditionamento, la prova di stress relaxation è stata attuata caricando i campioni a una velocità costante di 2 mm/mm min⁻¹, fino al raggiungimento di un valore di M prestabilito. La deflessione è stata quindi mantenuta costante per un periodo di 600 s, registrando la diminuzione del momento interno. A questo test sono stati sottoposti 13 campioni a trave per quattro diversi valori di momento preimpostato ($M_0 = 37.5, 75, 112.5$ e 150 N mm), per un totale di 52 prove.

Durante l'intera durata degli esperimenti, i campioni sono stati mantenuti immersi in una soluzione fisiologica a 37 ± 1 °C.

Per i solidi viscoelastici come l'osso, è possibile descrivere l'andamento della forza interna P o del momento interno M in funzione del tempo trascorso dall'inizio del test e del carico iniziale, e quindi di P_0 o M_0 .

Con P_Y e M_Y i valori, rispettivamente, della forza e del momento interni al limite del dominio elastico, possiamo definire S , una variabile generalizzata di stress, come:

- $S(S_e, t) = \frac{P(P_0, t)}{P_Y}$, per i test di compressione;
- $S(S_e, t) = \frac{M(M_0, t)}{M_Y}$, per i test di flessione.

In queste formule, S_e rappresenta lo stress elastico generalizzato. Normalizzando la funzione $S(S_e, t)$ rispetto a S_e , ottengo la funzione di rilassamento ridotta G :

$$G(S_e, t) = \frac{S(S_e, t)}{S_e},$$

che descrive la frazione di stress iniziale generalizzato che viene assorbita dal campione al tempo t .

Da tale funzione possiamo ricavare due importanti parametri:

- il tasso di rilassamento iniziale, ovvero la pendenza della curva di rilassamento ridotta al tempo $t = 0$: $\dot{G}(S_e) = \frac{1}{S_e} \cdot \left. \frac{dG(S_e, t)}{dt} \right|_{t=0}$;
- il valore costante di rilassamento, cioè il valore asintotico raggiunto alla fine del processo di rilassamento: $G_\infty(S_e) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{S(S_e, t)}{S_e}$.

4.2.3 Risultati e interpretazione

Esempi delle curve di rilassamento dell'osso trabecolare bovino ottenute dai test sono rappresentati nei seguenti grafici.

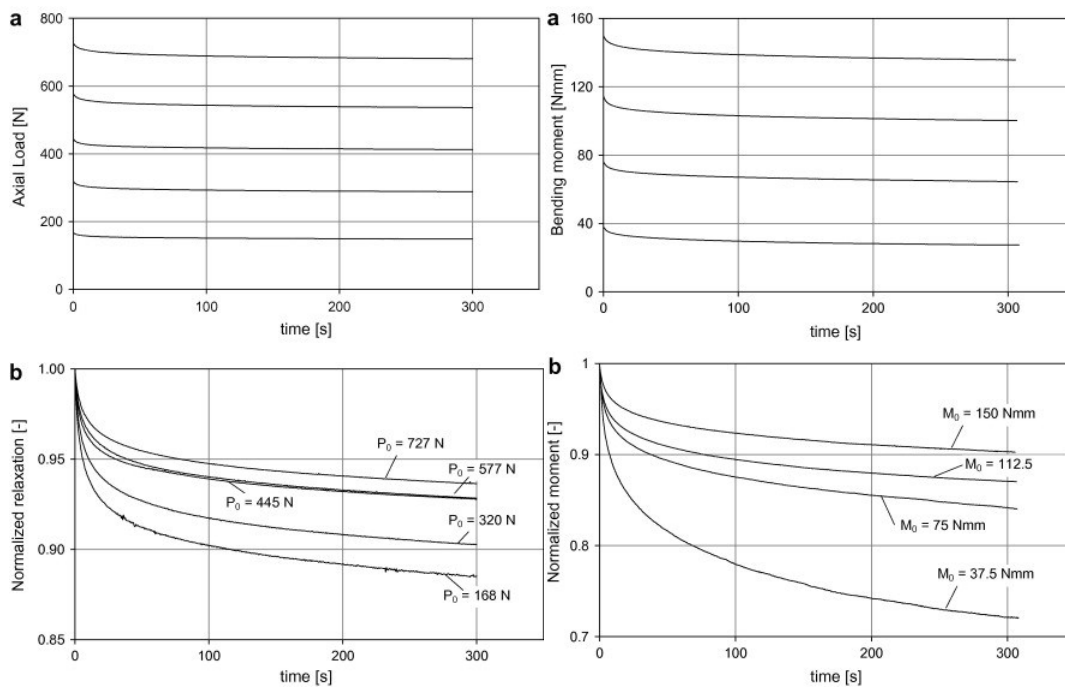


Figura 4.10: a) Curve di rilassamento a diversi valori di P_0 nel test di compressione (grafico a sinistra) e a diversi valori di M_0 nel test di flessione (grafico a destra). b) Curve di rilassamento dopo la normalizzazione rispetto a P_0 (grafico a sinistra) e dopo la normalizzazione rispetto a M_0 (grafico a destra). [15]

Confrontando la parte destra (prova di flessione) e la parte sinistra (prova di compressione) della figura 4.10, si può notare come le due tipologie di test abbiano risposte simili al rilassamento: sotto l'applicazione di una deformazione costante, sia la forza interna che il momento hanno mostrato una diminuzione continua dal valore iniziale, fino al raggiungimento di un valore di regime stabile entro 300 secondi dall'inizio del test, poiché la successiva diminuzione del valore da 300 a 600 s non è risultata significativa.

Per quanto riguarda i test di compressione, come si può notare dalla figura 4.10, le curve di rilassamento che mostrano la diminuzione di P , una volta normalizzate rispetto a P_0 , non coincidono. Questo accade poiché l'influenza della variabile elastica diventa significativa quando vengono comparati valori elevati con valori bassi di stress: quando lo stress iniziale diminuisce, il tasso di rilassamento iniziale $\dot{G}(S_e)$ aumenta, mentre il valore costante di rilassamento $G_\infty(S_e)$ diminuisce.

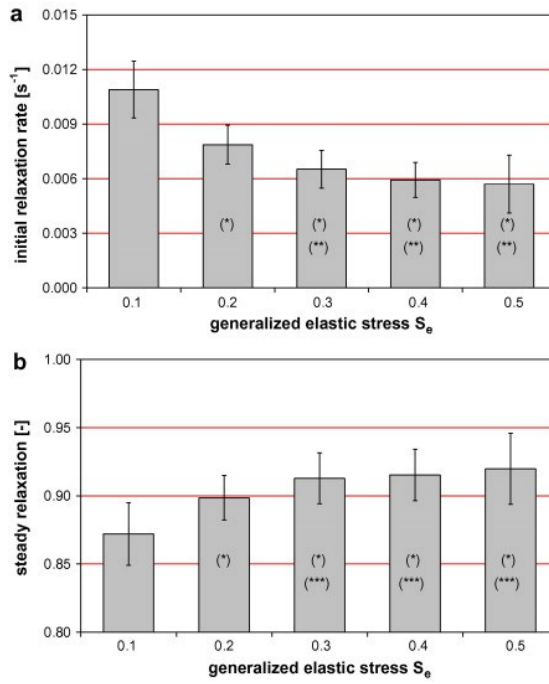


Figura 4.11: Valore medio \pm standard deviation di a) $\dot{G}(S_e)$, b) $G_\infty(S_e)$ in base ai diversi valori di S_e nei test di compressione. [15]

Come già accennato, le curve ottenute dai test di flessione mostrano una tendenza simile a quelle ottenute dai test di compressione. Infatti, anch'esse, una volta normalizzate, in questo caso rispetto a M_0 , divergono. Anche in questo caso, la divergenza è da attribuire alla dipendenza da S_e a livelli bassi.

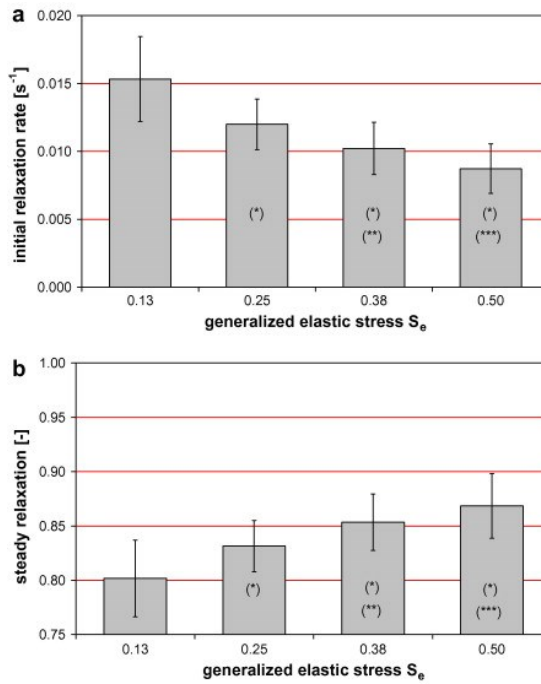


Figura 4.11: Valore medio \pm standard deviation di a) $\dot{G}(S_e)$, b) $G_\infty(S_e)$ in base ai diversi valori di S_e nei test di tensione. [15]

A causa delle discrepanze appena viste nei risultati sia dei test di compressione che di quelli di flessione causate da dall'influenza del valore di stress iniziale S_e , è stata sviluppata una nuova espressione matematica per la funzione di rilassamento ridotta, coerente con i dati sperimentali:

$$G(S_e, t) = A_0(S_e) + A_1(S_e) \exp\left(-\frac{t}{\tau_1(S_e)}\right) + A_2(S_e) \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right).$$

τ_1 e τ_2 rappresentano i tempi caratteristici delle due fasi di rilassamento, A_1 e A_2 sono i pesi di tali processi e A_0 è il valore di rilassamento asintotico. Inoltre, per soddisfare la condizione che al tempo $t = 0$ lo stress coincida con il valore elastico, è stato imposto che:

$$G(S_e, 0) = A_0(S_e) + A_1(S_e) + A_2(S_e) = 1.$$

Le curve sono state quindi adattate mediante l'utilizzo di questa nuova equazione. Un buon adattamento è stato riscontrato per $\tau_2 = 95$ s costante, qualunque fosse il campione e il valore di S_e . τ_1 , invece, è risultato essere dipendente da S_e :

$$\tau_1(S_e) = \alpha \cdot \exp(\beta S_e),$$

con α e β parametri del materiale che sono stati identificati per ciascun campione.

4.2.4 Conclusioni

Nello studio è stato investigato il comportamento viscoelastico dell'osso trabecolare sia in condizioni di compressione che in condizioni di flessione. Dopo aver definito una tensione generalizzata S_e , sono stati eseguiti diversi test che hanno prodotto i seguenti risultati:

- il comportamento viscoelastico dell'osso trabecolare è non lineare rispetto alla variabile elastica, poiché l'entità del rilassamento ha influenzato la tensione iniziale;
- ciascun meccanismo di rilassamento è modellato da una funzione esponenziale con un proprio tempo caratteristico, τ_1 e τ_2 ;
- la curva di rilassamento raggiungeva un valore asintotico costante in circa 300 s;
- il tempo caratteristico τ_2 può essere supposto costante, mentre il tempo τ_1 risulta essere influenzato dalla tensione iniziale.

Capitolo 5 – Osteoporosi

Come è già stato accennato precedentemente, esistono diverse patologie che interessano il sistema scheletrico che possono causare un cambiamento notevole nelle proprietà meccaniche del tessuto osseo. Di fronte ad un alterato comportamento meccanico delle ossa, si può incorrere in diverse problematiche, come un aumentato rischio di frattura o rottura e, in generale, un abbassamento della qualità di vita dell'individuo. Una delle patologie più frequenti in questo ambito è l'osteoporosi.

5.1 Generalità

La patologia ossea più frequente è l'osteoporosi. Questa malattia è caratterizzata da una riduzione della massa ossea e da alterazioni dell'architettura trabecolare tali da determinare una diminuzione della resistenza dell'osso e, di conseguenza, un aumentato rischio di frattura. Tali alterazioni sono determinate da uno sbilanciamento nel processo di rimodellamento osseo: il processo di riassorbimento osseo è eccessivo e non riesce a venire compensato da nuova deposizione di minerale. Non è ancora stata identificata una vera e propria causa dell'osteoporosi, tuttavia esistono diversi fattori di rischio, tra cui: sesso femminile, menopausa precoce, invecchiamento, fattori genetici, carenza alimentare di calcio, alterazioni ormonali e dello stile di vita (alcol, fumo, inattività fisica).

L'osteoporosi viene solitamente distinta in due gruppi: osteoporosi primitiva e osteoporosi secondaria. La prima comprende l'osteoporosi idiopatica e l'osteoporosi involutiva. La seconda, invece, può essere causata da farmaci o da malattie di vario genere che possono determinare una riduzione della resistenza scheletrica; in questo particolare caso, se viene correttamente diagnosticata, la malattia può essere trattata con un'apposita terapia.

La diagnosi di questa malattia è eseguita principalmente tramite la densitometria ossea, che misura la densità dell'osso a livello dell'anca e della colonna vertebrale. Ad essa spesso si associano anche altri tipi di analisi, come quelle delle urine e del sangue, da cui si possono ricavare altri importanti dati sulla salute dell'osso.

Attualmente non esistono delle vere cure per l'osteoporosi, tuttavia esistono alcuni possibili trattamenti, che includono l'assunzione di calcio, vitamina D e bifosfonati, dei farmaci in grado di inibire il riassorbimento osseo.

5.2 Cambiamenti nel comportamento meccanico dell'osso con l'osteoporosi

Le particolari proprietà meccaniche dell'osso rispecchiano la necessità di fornire contemporaneamente resistenza e un design leggero, rigidità ed elasticità, la capacità di resistere alla deformazione e di assorbire energia. Tutto ciò è reso possibile dalla complessità della composizione e della microstruttura dell'osso, nonché dal rimodellamento continuo che caratterizza questo tipo di tessuto. L'invecchiamento e altri fattori possono influenzare queste componenti, fino ad arrivare ad una diminuzione della resistenza ossea e della tenacità alla frattura. Le fratture da osteoporosi sono quindi il risultato macroscopico di una successione di molteplici eventi nano- e microstrutturali.

Per andare a comprendere quanto effettivamente questa patologia influenzi negativamente le proprietà meccaniche dell'osso, verrà riportato in seguito un test eseguito su dei campioni da essa interessati.

5.2.1 Introduzione

Molti studi, alcuni dei quali sono stati riportati nei capitoli precedenti, si sono occupati di definire le proprietà meccaniche dell'osso sano, ma relativamente pochi sono stati quelli che hanno descritto come la malattia modifica tali proprietà.

Innanzitutto, è necessario fare una distinzione tra la struttura macroscopica delle ossa e l'osso inteso come materiale. I cambiamenti macroscopici nella struttura delle ossa dovuti all'osteoporosi sono ben noti. Infatti, successivamente, verranno indagate le proprietà dell'osso inteso come materiale. In particolar modo, verranno studiati i cambiamenti nel contenuto minerale e nella porosità dell'osso e la loro correlazione con l'osteoporosi.

5.2.2 Materiali e metodi

I soggetti dello studio sono state undici donne, le quali avevano tutte riportato fratture nel collo del femore a causa dell'osteoporosi. Da ogni individuo è stata prelevata una sezione di 15 cm dal femore non fratturato entro 24 ore dalla morte. Ogni campione prelevato è stato sigillato e conservato a una temperatura di -20°C . È stato inoltre creato un gruppo di campioni prelevati da undici donne morte senza fratture come confronto. L'età media del gruppo di donne affette da osteoporosi è 81 anni, mentre quella del gruppo di controllo è 79 anni.

Una volta scongelati i campioni, essi sono stati fissati in una morsa e tagliate con una sega a nastro, fino ad ottenere delle strisce di osso parallele all'asse lungo. Successivamente, le strisce

sono state rifinite utilizzando uno strumento di taglio con un raggio di 0.5 mm, un angolo di inclinazione di 45 gradi e una velocità di taglio di 1800 giri al minuto. Infine, la superficie è stata leggermente levigata al fine di renderla liscia e senza imperfezioni. Durante tutto il processo di lavorazione i campioni sono stati mantenuti umidi. Il numero di campioni ottenuti da ogni sezione è variato da 1 a 4.

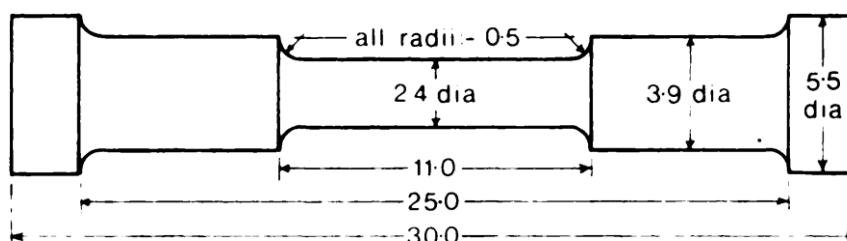


Figura 5.1: Dimensioni in mm dei campioni ossei dopo la rifinitura. La spalla esterna è stata utilizzata per la presa, quella interna per ancorare l'estensimetro e la vite è la parte che è andata incontro a rottura. [18]

Terminata la preparazione dei campioni, è stato eseguito il test a una temperatura di 20°C. Ogni campione è stato fissato in una macchina per il test idraulico servo-controllato e un estensimetro è stato ancorato ad esso. Il campione è stato perciò testato in trazione fino alla rottura. Al termine di ogni test sono stati misurati il diametro del campione nel punto di rottura e il diametro medio. Infine, dopo aver scomposto il campione in sezioni, sono state realizzate microradiografie ed è stato determinato il contenuto minerale tramite densitometria.

5.2.3 Risultati

I risultati ottenuti dai vari test sono riportati nelle seguenti tabelle.

Età	N° di campioni testati	MOD (MN·m ⁻²)	UTS (MN·m ⁻²)	CAV (%)	MIN (%)	YS (MN·m ⁻²)	Settimane dalla frattura alla morte
84	2	5 684	67.6	44.7	64.6750	48.8	1
79	1	3 975	12.9	41.9	64.6750	12.9	2
89	2	11 889	96.3	34.5	64.0250	68.8	6
77	4	13 804	116.2	22.7	64.6750	106.1	6
84	3	15 237	118.1	12.1	67.3830	100.5	4
82	3	13 869	105.2	22.4	64.7830	72.5	3
82	4	18 340	128.2	18.1	66.1380	108.3	2

70	3	10 352	104.0	24.8	65.1080	87.8	1
69	2	13 190	128.5	14.7	62.563	82.9	2
91	3	11 934	97.8	28.0	68.3580	82.4	5
88	3	8 816	71.3	33.0	69.550	57.9	2
Media		11 554*	95.1*	27.0*	65.6300*	75.8	
SD		4 169	33.8	10.6	2.0460	28.5	

Tabella 5.1: Risultati degli 11 individui affetti da osteoporosi. [18]

Età	N° di campioni testati	MOD (MN·m⁻²)	UTS (MN·m⁻²)	CAV (%)	MIN (%)	YS (MN·m⁻²)
86	2	19 427	110.5	14.3	65.6500	76.8
74	3	15 969	125.4	15.4	62.1830	91.9
81	3	15 383	104.9	20.5	63.5920	75.3
75	4	16 737	128.0	10.9	64.3500	77.3
67	4	12 787	136.2	11.3	62.8063	99.4
77	2	16 978	116.6	22.9	64.8380	71.6
75	2	17 133	107.0	18.0	65.3250	92.6
72	1	17 601	144.4	16.1	63.5380	101.5
83	2	12 694	81.9	22.6	64.0250	57.8
87	3	13 799	107.3	10.4	65.2470	68.8
78	3	14 039	124.4	16.9	65.9750	76.1
Media		15 686	117.0	16.3	64.3210	80.8
SD		2 153	17.3	4.5	1.2140	13.7

Tabella 5.2: Risultati degli 11 individui sani. [18]

Nelle tabelle precedenti sono mostrati, in ordine, i seguenti dati: età dell'individuo, numero di campioni testati, modulo elastico (MOD), resistenza ultima alla trazione (UTS), area delle cavità come percentuale dell'area trasversale del campione (CAV), contenuto minerale espresso come percentuale della densità di calcite (MIN), tensione di snervamento (YS) e, nel caso dei pazienti affetti dalla patologia, le settimane trascorse dalla frattura alla morte. Per quattro di queste caratteristiche, la media del gruppo malato e la media del gruppo sano sono risultate significativamente differenti e sono state indicate nella tabella 5.1 con un asterisco.

Si può notare dalle tabelle come i campioni osteoporotici risultassero avere una superficie occupata da cavità significativamente maggiore, del 27% rispetto al 16,3% dell'osso normale. Inoltre, si è riscontrato un aumento del contenuto minerale nell'osso osteoporotico che, seppur piccolo, risulta significativo. Grazie a tutti i dati di natura meccanica raccolti, è stato possibile costruire le curve di tensione-deformazione.

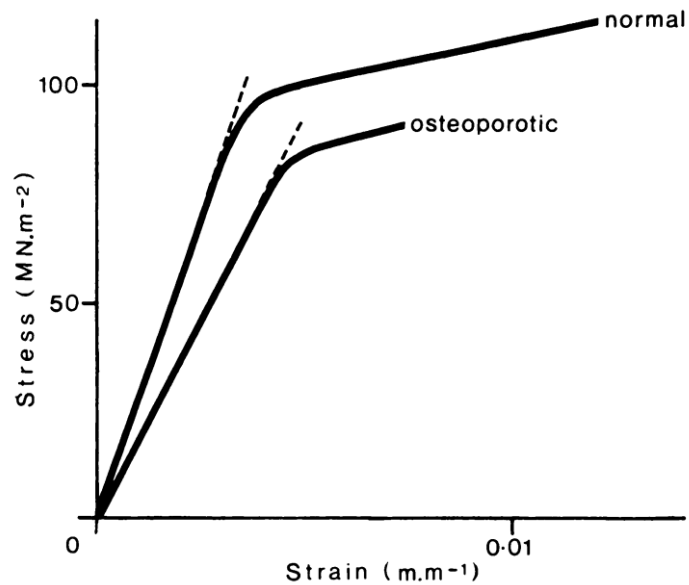


Figura 5.2: Curve tensione-deformazione per osso normale e osso osteoporotico. [18]

Successivamente, questi dati sono stati analizzati per valutare gli effetti dei cambiamenti nell'area di cavità e nel contenuto minerale sulle proprietà meccaniche. L'analisi ha reso chiaro che la resistenza ultima e il modulo di elasticità cambiano al variare dell'area della cavità, mentre le altre proprietà meccaniche risultano essere indipendenti da tale fattore. Infatti, all'aumentare della superficie interessata da cavità, rigidità e resistenza dell'osso osteoporotico diminuiscono.

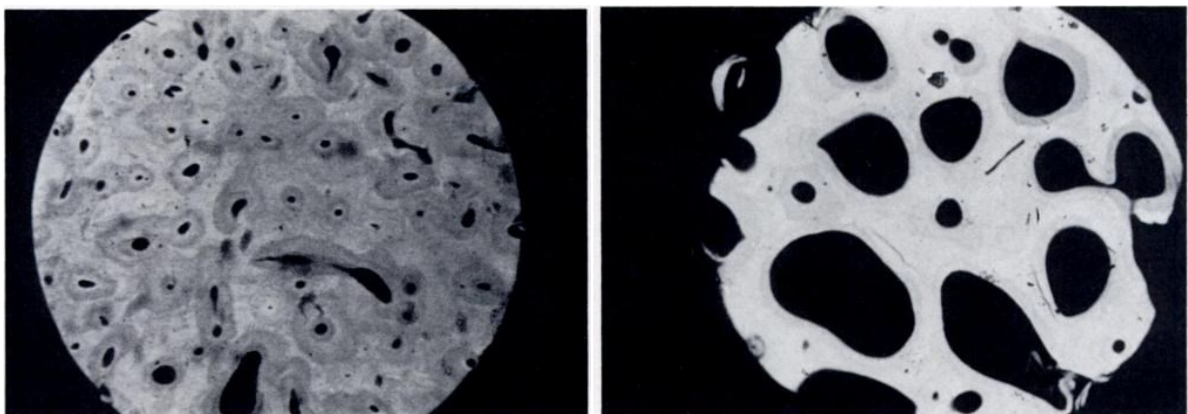


Figura 5.3: Microradiografie di osso normale (sinistra) e di osso osteoporotico (sinistra). [18]

L'aumento del contenuto minerale, invece, non è risultato essere un fattore determinante nelle variazioni delle proprietà meccaniche.

5.2.4 Discussione e conclusione

I campioni testati nello studio sono stati prelevati da donne a cui è stata diagnosticata osteoporosi al momento dell'autopsia. Nonostante non sia stata fatta nessuna diagnosi sui campioni di controllo, è possibile che alcuni di essi fossero comunque osteoporotici per via della alta incidenza dell'osteoporosi sulla popolazione generale. Tuttavia, questi possibili casi andrebbero identificati come appartenenti a un estremo dello spettro normale.

La porosità dell'osso normale era stata stimata da altri studi tra il 13 e 18%. Il valore di porosità ottenuto dal gruppo di controllo è risultato essere del 16.3%, quindi perfettamente in linea con quei valori. Presumendo una stretta relazione tra porosità ossea e area di cavità, il valore riscontrato per il gruppo osteoporotico, cioè del 27.0%, riflette chiaramente l'ingrandimento dei canali di Havers, tipico di questa patologia.

Per quanto riguarda il contenuto minerale, precedenti studi avevano indicato come esso rimanesse inalterato in condizioni di osteoporosi; tuttavia, come già accennato, i dati ottenuti da questo studio hanno mostrato un lieve aumento in tale campo. Questo risultato può essere spiegato andando ad esaminare i processi mediante i quali la sostanza ossea viene persa quando si va incontro ad osteoporosi. Gli osteoni, infatti, hanno un contenuto minerale inferiore all'osso interstiziale e nelle microradiografie appaiono più scuri. Come si può notare dalla figura 5.3, il numero di osteoni presenti in caso di osteoporosi è nettamente inferiore a quello nell'osso sano, poiché essi sono stati in gran parte erosi dai canali vascolari espansi. Di conseguenza, poiché gli osteoni abbassano il contenuto minerale all'interno dell'osso, il cambiamento architetturale che avviene con la patologia, che ne riduce significativamente il numero, provoca un leggero aumento di tale fattore. Probabilmente questa variazione non era mai stata presa in considerazione per via dell'entità ridotta dell'aumento, che faceva rientrare ancora il valore nell'intervallo considerato normale.

I campioni osteoporotici provenivano da individui che, prima della morte, erano stati a letto per periodi variabili da una a sei settimane. Poiché, al momento dell'autopsia, risulta impossibile distinguere l'osteoporosi senile da quella da disuso, entrambi i fattori possono essere stati cause determinanti della patologia. Per riuscire a separare questi due fattori, è stata calcolata la correlazione tra la durata del periodo di immobilità di ciascun paziente e le proprietà meccaniche. Nonostante fosse già noto il legame tra la quantità di perdita ossea e la durata dell'immobilità, i risultati ottenuti non furono soddisfacenti. Il fallimento nel riscontro di tale

correlazione è probabilmente dovuto al fatto che la perdita ossea prolungata dovuta all'osteoporosi senile superava di gran lunga l'effetto dell'immobilità.

In conclusione, i risultati ottenuti sono stati:

- la bassa resistenza e rigidità dell'osso osteoporotico sono dovute all'aumento dell'area di cavità, una caratteristica tipica della malattia;
- il contenuto minerale del materiale osseo è leggermente superiore a quello dell'osso normale e questo aumento è dovuto alla rimozione dell'osso di Havers a bassa densità mentre i canali vascolari si espandono;
- una correlazione tra immobilità e perdita ossea esiste, ma non è stato possibile riscontrarla.

Conclusioni

Il tessuto osseo è risultato essere profondamente influenzato nel comportamento meccanico dalle unità elementari che lo compongono: gli osteoni, nel caso dell'osso compatto, e le trabecole, nel caso dell'osso spugnoso. Infatti, andando a confrontare le due differenti tipologie di tessuto osseo, emergono diverse differenze. Una di esse, fondamentale nella caratterizzazione della risposta meccanica, è il modulo elastico. Il suo valore medio, calcolato tramite l'esecuzione di diversi tipi di prove, è risultato essere di circa 17 GPa per l'osso compatto e di circa 1 GPa, nettamente inferiore, per l'osso spugnoso. Il fattore che in maggior parte determina una tale differenza è la molto maggiore porosità del tessuto trabecolare.

Nello studio delle proprietà viscoelastiche dell'osso, sono risultati utili due principali modelli costitutivi: il modello KWW, formulato da Kohlrausch, Williams e Watts, e il modello Debye. Il parametro principale utilizzato per confrontare i risultati delle diverse prove è stato $\tan \delta$, ovvero la tangente del fattore di smorzamento. Esso è risultato raggiungere un minimo in corrispondenza delle frequenze che caratterizzano le normali attività dell'osso, sia nel caso di deformazione assiale che in quello di deformazione da taglio.

Nella trattazione sono state esaminate accuratamente due prove sperimentali, una di creep e l'altra di stress relaxation. La prova di creep, eseguita su campioni prelevati da un cadavere affetto da osteoporosi, ha dimostrato come esista una correlazione tra la densità del tessuto e il tasso di creep. Essi sono risultati essere inversamente proporzionali: dove la densità era minore all'interno del campione, il tasso di creep era maggiore, e viceversa. Inoltre, questo studio ha portato alla luce la notevole rilevanza che può acquisire la tomografia computerizzata negli studi riguardanti il comportamento meccanico dei tessuti biologici.

La prova di stress relaxation è stata eseguita su campioni di osso trabecolare prelevati dalle teste femorali di alcuni bovini. Da questo test è emerso che il comportamento viscoelastico dell'osso trabecolare è fortemente dipendente dal valore di tensione iniziale e , per questo motivo, non lineare. La fase di rilassamento dello stress si può dividere in due parti, con τ_1 e τ_2 tempi caratteristici. È emerso che il primo di essi può essere supposto costante, mentre il secondo, come già accennato, è risultato essere dipendente dal valore di tensione iniziale. Infine, è stato compreso che la curva di rilassamento raggiunge un valore asintotico costante dopo un tempo di circa 300 s.

In conclusione, è stato fatto uno studio sull'osteoporosi. Essa è una malattia altamente destabilizzante per le proprietà meccaniche del tessuto osseo e attualmente non esiste una cura

ma solo alcuni trattamenti. Eseguendo poi dei test di trazione fino a rottura su due gruppi diversi di campioni, uno osteoporotico è uno di controllo, sono stati raccolti molti dati rilevanti. Uno dei maggiori risultati ottenuti da questo esperimento è stata la conferma di una minore resistenza e rigidità dell'osso affetto dalla patologia. Inoltre, è stata riscontrata una correlazione tra la diminuzione del livello di questi due valori e l'aumento che si presenta in seguito alla malattia dell'area interessata da cavità nei campioni. Infine, l'osso osteoporotico è risultato avere un contenuto minerale leggermente superiore a quello sano, poiché l'osso di Havers a minore densità è presente in minore quantità.

Bibliografia

- [1] Valerio Monesi. (2018). *Istologia* (7th ed.). Piccin Nuova Libreria
- [2] Bani, D., & Pieraccini, V. L. G. (2007). Il tessuto osseo. *Appunti del corso di Istologia. Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina legale, Università degli studi di Firenze.*
- [3] (2023). Chimica-Online.it. <https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/cellule-ossee.png>
- [4] *Compact bone*. (n.d.). Eugraph.com.
<https://eugraph.com/histology/crtbone/compbon.html>
- [5] *Spongy bone*. (2019). Eugraph.com.
<https://eugraph.com/histology/crtbone/spongbo.html>
- [6] LIBRARY, E. O. S. P. (n.d.). *Osteoblast cells, SEM - Stock Image - C057/8525*. Science Photo Library. <https://www.sciencephoto.com/media/1299709/view>
- [7] LIBRARY, K. M. O. A. P. (n.d.). *Osteocyte bone cells, SEM - Stock Image - C036/9603*. Science Photo Library.
<https://www.sciencephoto.com/media/873252/view/osteocyte-bone-cells-sem>
- [8] LIBRARY, E. O. S. P. (n.d.-b). *Osteoclast cell, SEM - Stock Image - C057/8529*. Science Photo Library. <https://www.sciencephoto.com/media/1299713/view>
- [9] *Osteon or Haversian System and Its Significance | Bone and Spine*. (2019, June 24).
<https://boneandspine.com/osteon/>
- [10] Minniti, M. (2022, December 20). *Il tessuto osseo*. Microbiologia Italia.
<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/il-tessuto-osseo/>
- [11] BD Editors. (2019, October 4). *Spongy Bone (Cancellous Bone): Definition & Function | Biology Dictionary*. Biology Dictionary.
<https://biologydictionary.net/spongy-bone/>
- [12] Cowin, S. C. (1989). *Bone Mechanics*. CRC Press.

- [13] Misra, S., Ramesh, K. T., & Okamura, A. M. (2008). Modeling of Tool-Tissue Interactions for Computer-Based Surgical Simulation: A Literature Review. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 17(5), 463–491.
<https://doi.org/10.1162/pres.17.5.463>
- [14] Novitskaya, E., Zin, C., Chang, N., Cory, E., Chen, P., D’Lima, D., Sah, R. L., & McKittrick, J. (2014). Creep of trabecular bone from the human proximal tibia. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 219–227.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.057>
- [15] Virginio Quaglini, Valentina La Russa, & Stefano Corneo. (2009). Nonlinear stress relaxation of trabecular bone. *Mechanics Research Communications*, 36(3), 275–283.
<https://doi.org/10.1016/j.mechrescom.2008.10.012>
- [16] Mohammadi, S. (2023). *Multiscale Biomechanics*. John Wiley & Sons.
- [17] Dogà, G., Michieli, R., & Rossini, M. (2017). Osteoporosi.
- [18] Dickenson, R., Hutton, W., & Stott. (1981). The mechanical properties of bone in osteoporosis. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 63-B(2), 233–238. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.63b2.7217148>

Ringraziamenti

Per prima cosa, vorrei ringraziare il mio relatore, che mi ha guidato nella stesura dell'elaborato.

Ringrazio i miei genitori, per avermi supportato durante questo percorso.

Ringrazio tutti i miei amici, per essermi sempre stati accanto.

Un ringraziamento particolare va a Serena, Arianna, Martina, Anna, Sara, Martina e Arianna, per essere le migliori amiche che potessi mai incontrare.

Infine, dedico questa tesi a me stessa, per aver superato ogni ostacolo.