

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

II FACOLTA' DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Sviluppo di un protocollo per la
caratterizzazione meccanica di
tessuto osseo trabecolare
finalizzata alla validazione di un
modello numerico**

Tesi in

Meccanica dei Tessuti Biologici

Relatore

Prof. Ing. Luca Cristofolini

Presentata da

Luigi Falco

Correlatori

Ing. Massimiliano Baleani

Dott. Martino Pani

Sessione III

Anno Accademico 2011/2012

*Vorrei essere libero, libero come un uomo.
Come l'uomo più evoluto che si innalza con la propria intelligenza
e che sfida la natura con la forza incontrastata della scienza,
con addosso l'entusiasmo di spaziare senza limiti nel cosmo
e convinto che la forza del pensiero sia la sola libertà.*

Da "La libertà"

Tratta da "Dialogo tra un impegnato e un non so"

Giorgio Gaber(1972)

INDICE

OBIETTIVI	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE E RAZIONALE DEL MODELLO SPERIMENTALE	7
1.1 LO SCHELETRO UMANO	7
1.2 FISIOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO	9
1.2.1 Composizione dell'osso	9
1.2.2 Cellule dell'osso	10
1.2.2.1 Cellule osteoprogenitrici	10
1.2.2.2 Gli osteoclasti	10
1.2.2.3 Gli osteoblasti	10
1.2.2.4 Gli osteociti	11
1.2.2.5 Le cellule di rivestimento	12
1.2.3 Strutture del tessuto osseo	13
1.2.3.1 L'osso corticale	15
1.2.3.2 L'osso trabecolare	17

1.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEL TESSUTO OSSEO	
TRABECOLARE: STATO DELL'ARTE	19
1.3.1 Conservazione ed idratazione dei provini .	21
1.3.2 Temperatura e velocità di deformazione ...	22
1.3.3 Tecniche di compressione	23
1.3.4 Dimensioni e geometria del provino	26
CAPITOLO2: MATERIALI E METODI	29
2.1 INTRODUZIONE ALLE TECNICHE DI ANALISI E MISURA	
UTILIZZATE NEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE	29
2.1.1 Sistemi di allineamento e fissaggio	32
2.1.2 Scansione mediante microtomografia	
computerizzata (μ CT)	35
2.1.2.1 Digitalizzazione della struttura	
trabecolare	36
2.1.3 Realizzazione del modello μ FEM	39
2.1.4 Sistemi di misura delle deformazioni	41
2.1.4.1 Misura mediante sistema	
meccanico	41
2.1.4.2 Misura mediante tecnica di	
correlazione di immagini	43
2.1.4.3 Calibrazione del DIC	45
2.1.4.4 Principio di funzionamento del DIC .	50
2.2 DEFINIZIONE DEL SISTEMA DI RIFERIMENTO	51
2.3 DEFINIZIONE DELLA PROCEDURA OPERATIVA	53
2.3.1 Registrazione dei dati DIC	55
2.4 PROVINI	59
2.5 PREPARAZIONE DEI PROVINI	61
2.5.1 Estrazione dei provini	61

2.5.2 Allineamento dei provini	63
2.5.3 Applicazione dei riferimenti	64
2.5.4 Montaggio in macchina	65
2.5.5 Riferimento per la registrazione della misura meccanica di deformazione	67
2.5.6 Realizzazione del <i>pattern</i> DIC	69
2.6 ESECUZIONE DELLE PROVE	71
2.6.1 Prove preliminari	72
2.6.1.1 Verifica dell'effetto della vernice sul provino	72
2.6.1.2 Analisi delle prestazioni del sistema DIC	73
2.6.2 Prove finalizzate alla validazione del modello numerico	74
2.7 ANALISI DEI DATI	77
2.7.1 Calcolo del modulo elastico dalla curva di carico	78
2.7.2 Analisi dell'effetto della vernice sul provino	81
2.7.3 Analisi delle prestazioni del sistema di correlazione di immagini	82
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONI	85
3.1 PROVE PRELIMINARI	85
3.1.1 Effetto della vernice sul comportamento meccanico del provino	87
3.1.2 Prestazioni del sistema di correlazione di immagini	89

3.2 PROVE FINALIZZATE ALLA VALIDAZIONE DEL MODELLO	
NUMERICO	91
3.2.1 Misure mediante estensometro	92
3.2.2 Misure mediante DIC	97
CAPITOLO4: CONCLUSIONI	101
4.1 CONCLUSIONI	101
4.2 SVILUPPI FUTURI	103
BIBLIOGRAFIA	105
RINGRAZIAMENTI	111

OBIETTIVI

Il presente elaborato descrive l'attività di tesi svolta presso il Laboratorio di Tecnologia Medica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. Le attività che hanno luogo all'interno di questa struttura sono principalmente volte allo studio ed alla caratterizzazione di biomateriali artificiali, nonché di tessuti biologici dell'apparato muscolo-scheletrico.

Il mio lavoro si inserisce nel contesto della caratterizzazione meccanica di tessuto osseo trabecolare. L'obiettivo principale è stato quello di sviluppare un protocollo di misura che fosse completamente volto alla validazione di un modello numerico del tessuto osseo, ovvero della predizione delle caratteristiche meccaniche del tessuto a partire da immagini ottenute da una micro scansione computerizzata (μ CT). Occorre sottolineare che questo tipo di approccio è il punto fondamentale nonché l'idea alla base di tutto il lavoro svolto. La letteratura è infatti ricca di studi relativi alla caratterizzazione di questo tipo di tessuto. Il passo in avanti è appunto il tentativo di ottenere un modello agli Elementi Finiti su scala microscopica (μ FEM) dell'osso trabecolare con alle spalle una solida metodica di validazione sperimentale.

In quest'ottica, ho innanzitutto riprogettato il modello sperimentale necessario al trasferimento del carico sul provino da testare, a partire da un modello già esistente presso il Laboratorio, al fine di migliorarne le prestazioni, sia in termini di affidabilità della misura, che di praticità nell'utilizzo. In seguito mi sono dedicato alla messa a punto

del protocollo per ottenere le misure per la validazione del modello numerico, affrontando e risolvendo tutte le problematiche legate alla registrazione delle misure sperimentali sul modello numerico, punto fondamentale per la validazione del modello μ FEM. Questa seconda parte del lavoro ha seguito due approcci, distinti in relazione alla tecnica di misura delle deformazioni adottata: meccanica, per mezzo di estensometro fissato direttamente sul provino, e ottica, per mezzo di dispositivo basato sulla tecnica di correlazione di immagini. Come verrà descritto in seguito, questa seconda tecnica di misura permette di ottenere una mappa di spostamento della superficie del provino posto in compressione, con il potenziale vantaggio di ricavare da questa una descrizione completa della mappa di spostamenti superficiali, anziché misurarne la sola componente assiale lungo una generatrice, come in una prova estensometrica tradizionale.

L'implementazione del protocollo di misura ha posto numerose problematiche, correlate alla necessità di eseguire misure accurate di piccoli spostamenti, dell'ordine delle decine di micrometri, alla necessità di poter identificare spazialmente i punti in cui si eseguivano le misure, con errori dell'ordine del decimo di millimetro, e alla difficoltà oggettiva nell'eseguire misure su provini di dimensioni ridotte, dell'ordine di grandezza del centimetro. A questo si aggiungono tutte le problematiche affrontate per riuscire ad eseguire la misura degli spostamenti mediante la tecnica di correlazione di immagini al tessuto osseo, tecnica che necessita della realizzazione di uno specifico motivo stocastico ad alto contrasto (**pattern**) sulla superficie di un materiale che deve essere mantenuto idratato.

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE E RAZIONALE DEL MODELLO SPERIMENTALE

1.1 LO SCHELETRO UMANO

L'apparato scheletrico (Figura 1.1) comprende le singole ossa ed il tessuto molle che le connette (Cowin 2001; Williams 1995). Il componente principale è l'osso, che differisce dal tessuto molle (cartilagine, legamenti e tendini) sia per

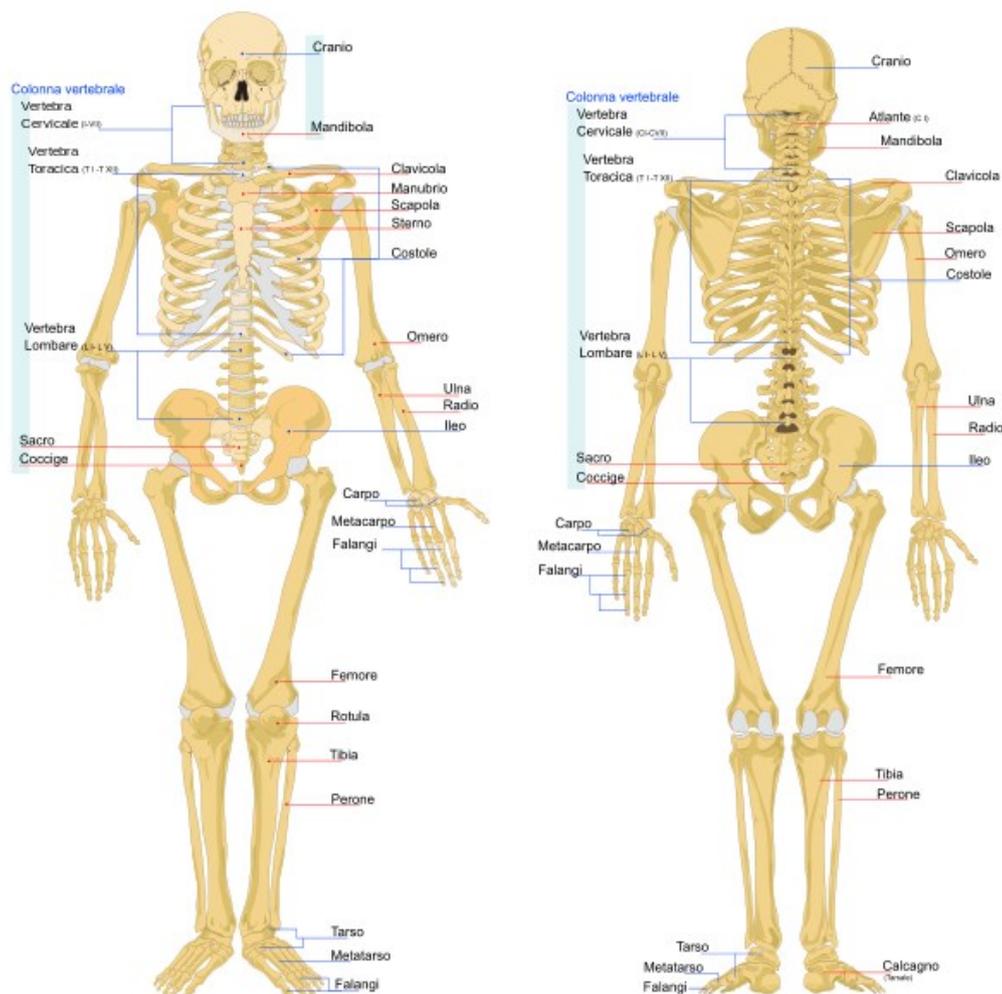


Figura 1.1 - Lo scheletro umano.

rigidità che durezza. L'osso ha importanza sia biomeccanica che metabolica. Infatti, il tessuto osseo svolge tre funzioni principali: supporto, protezione e omeostasi dello ione calcio. Lo scheletro assicura il mantenimento della postura, la trasmissione delle forze muscolari per la generazione del movimento e la protezione dei tessuti molli di cranio, torace e cavità pelvica da urti e compressioni. Inoltre il contenuto minerale delle ossa funge da costante riserva di ioni, particolarmente del calcio, entrando quindi in gioco nella regolazione della composizione del fluido extracellulare. Il tessuto osseo è un materiale dalle spiccate capacità auto-riparanti ed è in grado di adattare peso specifico, forma e caratteristiche strutturali durante la vita in funzione delle necessità meccaniche.

Andando a considerare la loro forma, le ossa possono essere raggruppate in differenti famiglie (Williams, 1995):

- Ossa lunghe (es. femore, tibia, omero);
- Ossa corte (es. carpi, tarsi);
- Ossa piatte (es. volta cranica, scapole);
- Ossa irregolari (ogni elemento non facilmente assegnabile ad una delle categorie precedenti, es. vertebre).

Un esempio tipico della morfologia delle ossa lunghe è il femore (Figura 1.1), questo consiste di una parte centrale quasi cilindrica, detta diafisi, e due parti terminali più larghe ed arrotondate, dette epifisi, oltre ad una zona di transizione conica, detta metafisi, che connette appunto diafisi ed epifisi.

1.2 FISIOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tipo particolare di tessuto connettivo di sostegno, che si distingue per l'ingente quantità di materiale inorganico e, quindi, per le caratteristiche di durezza e resistenza meccanica. A questa parte non vitale si affiancano una varietà di elementi cellulari ed altre strutture per la protezione ed alimentazione del tessuto osseo.

1.1.2 Composizione dell'osso

L'osso consiste approssimativamente per il 65% di minerali e per il 35% di matrice organica, cellule e acqua. Il minerale osseo, che forma piccoli cristalli e si deposita tra le fibre di collagene, è prevalentemente idrossiapatite non stechiometrica ($\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), contenente carbonati, citrati, fluoruri e stronzio. La matrice organica consiste per il 90% di collagene e per il restante 10% di proteine non collaginee. Dal punto di vista meccanico, il tessuto osseo è paragonabile ad un materiale composito: la componente organica è responsabile di tenacità ed elasticità, mentre quella inorganica irrigidisce e rafforza l'osso (Cowin, 2001).

1.2.2 Cellule dell'osso

Le cellule ossee vengono raggruppate solitamente come segue (Cowin, 2001; Malluche and Faugere, 1986; Weiss, 1990):

- osteoprogenitrici;
- osteoclasti;
- osteoblasti;
- osteociti;
- cellule di rivestimento.

1.2.2.1 Cellule osteoprogenitrici. Queste sono cellule che hanno capacità di promuovere la differenziazione e specializzazione in cellule ossee mature. Si trovano solitamente vicino alle superfici ossee (Weiss, 1990).

1.2.2.2 Gli osteoclasti. Sono cellule in grado di riassorbire tessuto osseo, possono presentare da uno fino a oltre 50 nuclei ed avere diametri che spaziano tra 20 μm e 100 μm . Il loro ruolo è, come detto, quello di riassorbire osso e lo esplicano dissolvendo sia la matrice organica che quella inorganica grazie ad enzimi da essi prodotti. Il segnale per la scelta del sito di azione da parte della cellula è ancora sconosciuto. Ormoni come la calcitonina ed estrogeni sono tipicamente utilizzati per inibire il processo di riassorbimento.

1.2.2.3 Gli osteoblasti. Sono cellule di deposizione di tessuto osseo in grado di sintetizzare e secernere la matrice ossea non mineralizzata (**osteoidi**). Queste sembrano partecipare al processo di deposizione e riassorbimento regolando al contempo il flusso di calcio fosfato da e verso le ossa. Gli osteoblasti appaiono come uno strato di cellule contigue che, nel loro stato di attivazione, si presentano di

forma cuboidale (da 15 a 30 μm di dimensione). La formazione di nuovo osso avviene in due stadi distinti: la formazione della matrice e la sua mineralizzazione, denotata dalla deposizione di cristalli di idrossiapatite. Il ciclo vitale di queste cellule si può schematizzare come segue (Cowin, 2001; Malluche and Fauger, 1986; Weiss, 1990):

- nascita da cellula progenitrice;
- differenziazione da cellula staminale a osteoblasta e partecipazione nelle unità di deposizione e calcificazione;
- regressione ad uno stato pre-osteoblasta, trasformazione in cellule di rivestimento o in osteociti, oppure l'apoptosi.

Lo sviluppo di osteoblasti ed osteoclasti è strettamente legato da una base molecolare comune. Entrambe derivano da cellule precursori comuni originate nel midollo osseo (osteoblasti da cellule mesenchimali multipotenti, mentre gli osteoclasti da cellule ematopoietiche) ed inoltre la differenziazione in osteoblasti è un prerequisito per lo sviluppo di osteoclasti (Cowin, 2001).

1.2.2.4 Gli osteociti. Sono osteoblasti rimasti intrappolati nelle lacune durante il processo di formazione ossea e differenziatisi appunto in osteociti (Figura 1.2). Nelle ossa mature questa tipologia cellulare è la più abbondante. Possono essere trovati in numero anche dieci volte superiore agli osteoblasti nell'osso umano. Il corpo cellulare di un osteocita maturo è di forma approssimativamente ellissoidale, con

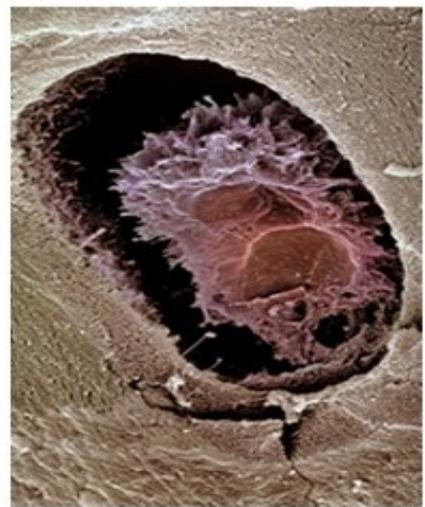


Figura 1.2 - Osteocita

l'asse principale (25 μm) parallelo alle lamelle che lo circondano. Gli osteociti sono pertanto considerati le cellule meglio collocate per fungere da sensore meccanico di intensità e distribuzione di deformazione. Si pensa infatti che esse

rispondano sia a variazioni della deformazione meccanica che al flusso di fluido che, sempre per *stress* meccanico, scorre sulla loro parete cellulare. Tramite questi meccanismi sembrerebbero in grado di fornire un segnale di trasduzione di questa informazione che, attraverso i canalicoli e le *gap-junctions*, viene propagata innescando l'opportuna reazione a livello di sistema. Gli osteociti inoltre svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi omeostatici, morfogenetici e di ristrutturazione della massa e dell'architettura ossea (Cowin, 2001).

1.2.2.5 Le cellule di rivestimento. Si crede siano derivate da osteoblasti divenuti inattivi o da precursori di quest'ultimi che hanno cessato la loro attività e risultano quindi appiattiti fuori dalla superficie ossea. Vanno quindi ad occupare la maggior parte della superficie dell'osso nell'adulto. La loro funzione principale è quella di evitare che il fluido extracellulare si mescoli, attraverso i canalicoli, con i fluidi presenti all'interno dell'osso. Queste sono implicate nel riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti, digeriscono la superficie dell'osteoido permettendo l'accesso degli osteoclasti stessi al tessuto mineralizzato. Inoltre è stato postulato che l'organizzazione della rete tridimensionale composta da cellule di rivestimento ed osteociti sia sensibile alla forma dell'osso e quindi, insieme alla reazione alla tensione e deformazione meccanica, sia in grado di promuovere il processo di deposizione/riassorbimento di osso sulla superficie dello stesso.

1.2.3 Strutture del tessuto osseo

L'osso dei mammiferi può essere di due tipologie principali: **non lamellare** e **lamellare**. Negli embrioni in sviluppo il tessuto è del primo tipo, è cioè una matrice di fibre non strutturate regolarmente, in cui le cellule sono disposte approssimativamente a caso. Questo può essere visto come un materiale provvisorio che verrà riassorbito e sostituito da osso lamellare durante lo sviluppo infantile. L'osso, negli adulti, è formato dalle lamelle. Queste sono foglietti, con spessore compreso tra 3 μm e 7 μm , in cui le fibre di collagene corrono parallele (Cowin, 2001). La lamella è l'unità elementare delle ossa che compongono lo scheletro umano e dalla cui diversa organizzazione originano i diversi tipi di tessuto osseo ivi presenti.

L'osso, negli adulti, è totalmente composto di lamelle, organizzate in due diverse strutture (Cowin, 2001), l'**osso corticale** o compatto e l'**osso trabecolare** o spugnoso (Figura 1.3). Il corticale è un materiale solido e compatto, fatta eccezione per la presenza di microscopici canali necessari

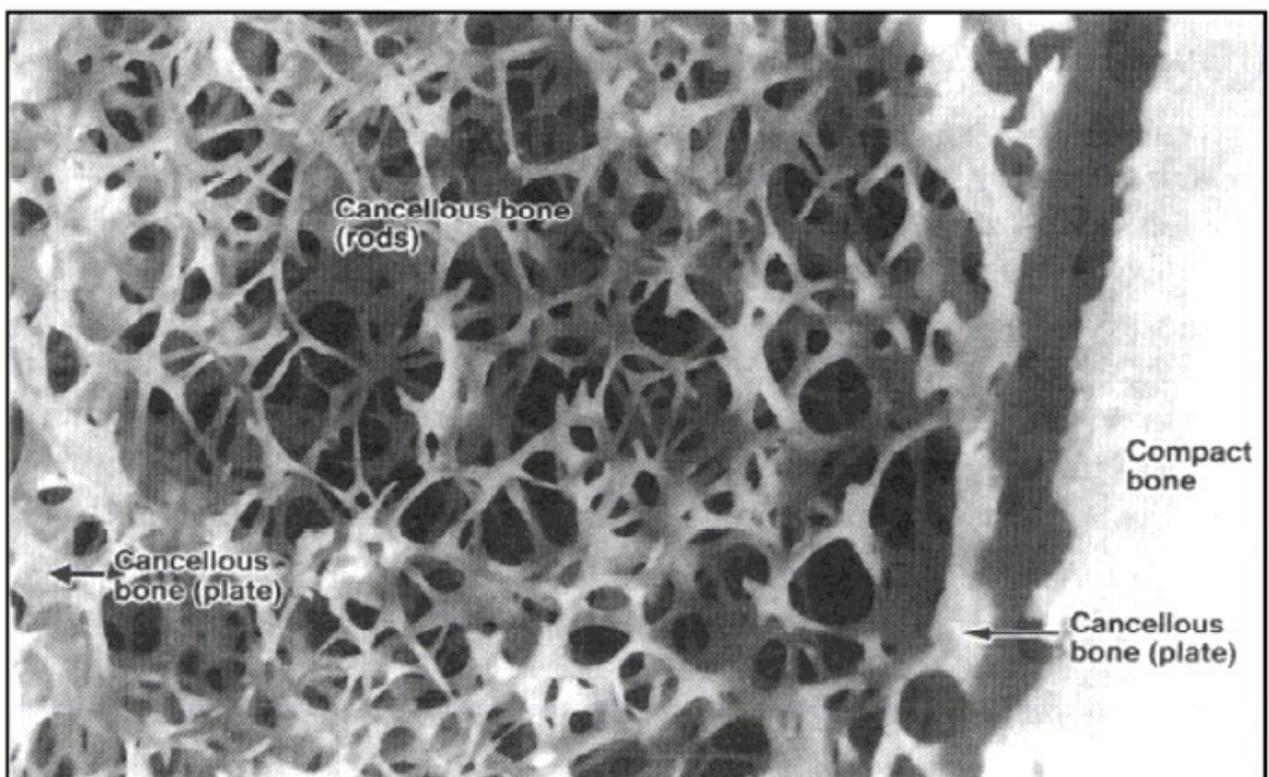


Figura 1.3 - Osso corticale e trabecolare (tratta da Weiss, 1988)

alla vascolarizzazione. Approssimativamente l'80% in peso della massa dello scheletro è costituito da osso corticale. Questo forma il guscio esterno di tutte le ossa, quale attore principale per le funzioni di supporto e protezione dello scheletro. Il restante 20% della massa scheletrica è osso trabecolare, un reticolo di aste o steli interconnessi, che possono assumere in alcuni punti l'aspetto di piastre eventualmente forate, che raggiungono spessori tra 50 μm e 300 μm e prendono il nome di **trabecole**. Questo tipo di struttura costituisce l'interno di ossa piatte e tozze. In quelle lunghe invece la diafisi è composta principalmente da corticale, al contrario nelle epifisi e nelle metafisi la composizione è prevalentemente di trabecolare con uno strato molto sottile di osso corticale a rivestirle. Il tessuto trabecolare è meno rigido e meno resistente del corticale a causa della sua discontinuità, di conseguenza contribuisce in minor misura alla rigidità dell'osso. Inoltre si osserva una maggiore variabilità delle sue caratteristiche meccaniche, rispetto al corticale, rapportabili alla maggiore variabilità strutturale del tessuto spugnoso stesso. Comunque questo svolge diversi importanti ruoli:

- irrigidisce la struttura dell'osso connettendo i due gusci di corticale;
- sostiene il guscio di corticale e distribuisce i carichi;
- previene il fenomeno dell'instabilità elastica nelle ossa lunghe.

Il tessuto osseo presenta due superfici principali: il **periostio** e l'**endostio**. Il periostio forma un foglio che riveste la superficie esterna delle ossa, fatta eccezione per le superfici articolari (ricoperte di cartilagine) e i punti in cui si inseriscono tendini e legamenti muscolari, e permette l'alimentazione dell'osso sottostante, mediante numerosi piccoli vasi, oltre a proteggerlo da lesioni di natura traumatica. Può essere suddiviso in due strati: uno

interno, osteogenico, ed uno esterno, fibroso. Lo strato più interno del periostio, riccamente vascolarizzato, è popolato da numerose cellule osteoblastiche ed osteoprogenitrici, deputate alla produzione di tessuto osseo. Queste cellule, lavorando a ritmi più o meno intensi nelle varie fasi della vita, partecipano alla crescita, al rimodellamento e alla riparazione delle fratture ossee. Anche lo strato più esterno è caratterizzato da numerosi vasi che penetrano all'interno dell'osso. Il periostio si ancora al tessuto osseo sottostante mediante spessi fasci fibrosi di collagene, detti fibre perforanti di Sharpey, che origina dallo strato esterno del periosteo stesso. L'endostio è una sottile lamina di cellule che riveste le cavità midollari (sia nelle diafisi delle ossa lunghe sia nell'osso spugnoso), nonché tutte le altre cavità dell'osso (canali di Havers e di Volkmann). È formato da un singolo strato di cellule che, durante lo sviluppo e la crescita sono osteoblasti attivi nella produzione ossea e si trasformano poi in osteoblasti quiescenti, o cellule osteoprogenitrici con potenzialità osteogeniche, nell'adulto.

1.2.3.1 L'osso corticale. L'unità strutturale dell'osso corticale è l'**osteone** o sistema Haversiano (Figura 1.4 A). L'osteone è tipicamente un cilindro, di circa 200 μm in diametro, consistente di un canale centrale (**canale Haversiano**). Il numero e l'orientazione delle lamelle che compongono l'osteone è variabile. Nell'esempio (Figura 1.4 B) in una preparazione istologica, sotto luce polarizzata, le lamelle appaiono come un'alternanza di anelli bianchi e neri, a riflettere il differente orientamento delle fibre di collagene che compongono strati adiacenti di lamelle. Diversi strati di osteoni sono impacchettati a formare il tessuto osseo corticale. Solitamente nel canale Haversiano decorrono vasi sanguigni e linfatici, nonostante non sia inusuale

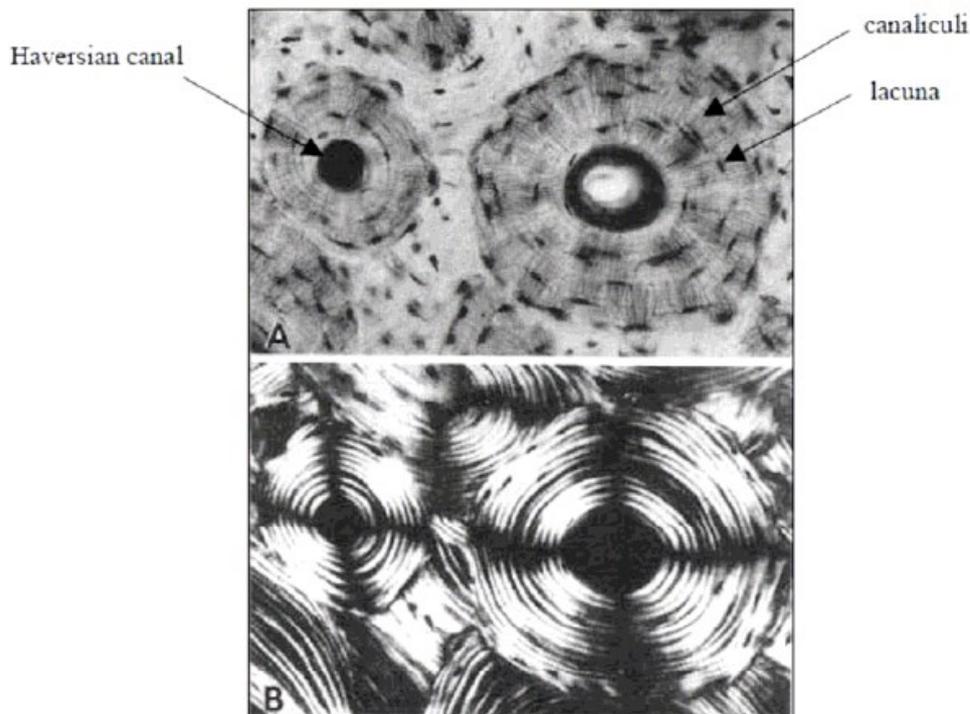


Figura 1.4 - (A) Sezione di una preparazione istologica di osso corticale, mostra il canale Haversiano, i canali di Volkmann ed i canalicoli. (B) Stessa sezione sotto luce polarizzata, mostra come l'osteone è composto da numerose lamelle concentriche (tratta da Cowin, 2001).

trovare anche terminazioni nervose. Canali trasversali, denominati **canali di Volkmann**, interconnettono i sistemi Haversiani consentendo la comunicazione tra periostio e midollo osseo. La superficie esterna di ogni osteone è circondata dalle così dette **linee cementanti**, uno strato di 1 o 2 μm di matrice mineralizzata carente di collagene. La carenza rende questa componente dell'osteone meno tenace. La struttura composta dell'osso corticale determina il diverso comportamento meccanico dell'osso quando posto in compressione piuttosto che in trazione. Nell'osso corticale sono presenti piccole cavità (**lacune**) in cui restano intrappolate le cellule ossee (**osteociti**). Microscopici canali tubolari (**canalicoli**) connettono le lacune tra loro ed ai canali Haversiani.

1.2.3.2 L'osso trabecolare. Questo tessuto non presenta sistemi Haversiani, ma è organizzato in un insieme di strutture allungate (trabecole) il cui spessore è tipicamente inferiore a 0.2 mm e la cui forma è variabile (Figura 1.5). La componente base che costituisce ogni trabecola è sempre la lamella. Queste, a differenza della struttura dell'osso corticale, non si organizzano in sistemi Haversiani bensì tendono ad impacchettarsi in foglietti paralleli, orientati preferenzialmente secondo la direzione principale delle trabecole stesse. La trabecola è appunto l'unità strutturale del tessuto trabecolare. Similmente al corticale, linee cementanti tengono uniti i pacchetti di lamelle, nelle trabecole, le une alle altre.

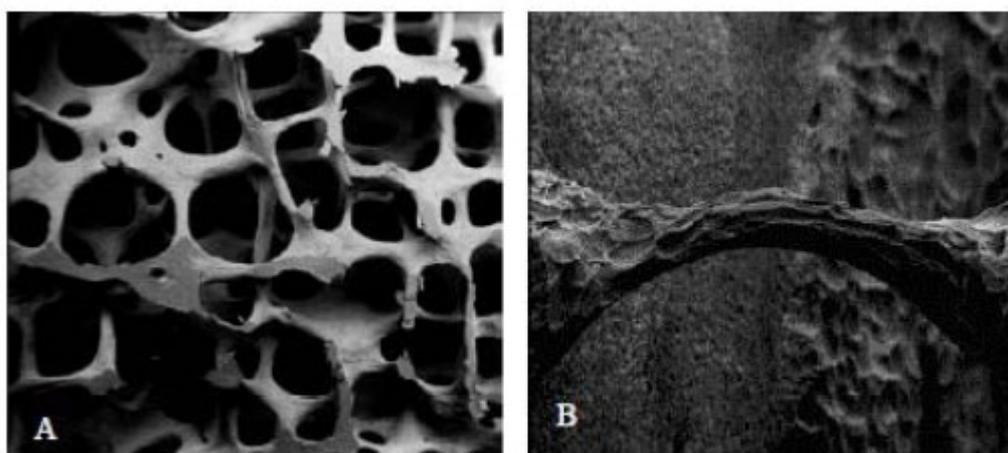


Figura 1.5 - (A) Sezione di tessuto trabecolare. (B) Singola trabecola.

Si nota una notevole variabilità nel tipo di microstruttura e nella densità apparente del tessuto trabecolare all'interno dello scheletro umano, in relazione alla zona da cui è stato estratto il provino. A tali differenti caratteristiche fisiche corrispondono caratteristiche meccaniche molto diverse. Anche l'orientazione della struttura trabecolare è strettamente legata al sito anatomico ed al suo ruolo meccanico, con conseguente effetto sulle caratteristiche meccaniche (Ohman et al., 2007). La struttura trabecolare tende ad allinearsi con la direzione principale di carico (Fiala, 1993; Hermann, 2011).

Questa a sua volta riflette, oltre all'anatomia locale dell'osso, anche l'azione delle forze muscolari e dei movimenti relativi dei segmenti ossei se consideriamo le zone articolari. Pertanto la struttura trabecolare può essere estremamente complessa e per questo motivo ha destato per anni la curiosità scientifica. La letteratura è infatti ricca di studi riguardo la microstruttura ed il relativo adattamento di questo tipo particolarissimo di tessuto alle condizioni di carico (Hébert et al., 2012; Ford et al., 1991; Goff et al., 2012; Odgaard, 1997; Bruyère et al., 1999). Sono stati condotti inoltre, una grande varietà di studi su come predire, utilizzando tecniche non invasive (risonanza magnetica, ultrasuoni, ecc.) , le caratteristiche meccaniche (Ford et al., 1991; Potdevin et al., 2012; Bobby and Ramakrishnan, 2008; Blok et al., 2010; Majumdar et al., 1998). Un notevole sforzo, sempre riguardo allo studio della struttura di questo materiale, è stato fatto anche dal punto di vista numerico. Infatti sono presenti studi modellistici di predizione del comportamento meccanico del tessuto, oltre che del suo adattamento (Faulkner et al., 1991; Adachi et al., 2001; Silva and Gibson, 1993; Depalle et al., 2012; Hazrati et al., 2012; Wang et al., 2012; Parr et al., 2013).

In definitiva, dal punto di vista della caratterizzazione sperimentale l'osso trabecolare è considerato ortotropo, con una direzione principale di resistenza, le caratteristiche nelle altre direzioni sono minori ed in genere considerate uguali.

1.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEL TESSUTO OSSEO TRABECOLARE: STATO DELL'ARTE

Esiste una grande varietà di tecniche sperimentali per la caratterizzazione del tessuto osseo in genere. Quindi, nei prossimi paragrafi, verranno analizzate solo quelle di interesse per il mio studio. Si ricorda che mi sono occupato di caratterizzazione di tessuto osseo trabecolare. Inoltre si fornirà una panoramica delle principali fonti di errore nello studio sperimentale di questo tipo di tessuto.

Comunemente, per la misura delle caratteristiche meccaniche dell'osso trabecolare, i provini di forma regolare di tessuto sono estratti dal segmento osseo e sottoposti a condizioni di carico semplici (trazione, compressione, flessione e torsione). Registrando la risposta del campione di tessuto osseo si riescono a determinare le diverse proprietà meccaniche del provino testato.

A tal scopo, nel corso del tempo, sono stati sviluppati ed applicati differenti modelli sperimentali e, grazie a questi, è stato possibile eliminare diversi artefatti che falsavano le misure sperimentali. Inoltre, per non introdurre ulteriori errori nelle misure, occorre considerare sia i parametri di prova che le modalità di conservazione del tessuto. È infatti dimostrato in letteratura che il comportamento meccanico del tessuto può variare in funzione dello stato di conservazione del tessuto e dei parametri di prova utilizzati.

Gli scenari di carico a cui si può sottoporre un campione di tessuto osseo sono diversi, quelli di maggior interesse, sono trazione, compressione e flessione. I test a trazione sono stati ampiamente utilizzati per determinare le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo (Bayraktar et al., 2004; Burstein et al., 1976; McCalden et al., 1993; Nyman et al., 2007; Smith and Smith, 1976). Sfortunatamente i provini devono essere

relativamente grandi e lavorati di precisione per essere sottoposti a questo tipo di test e questo limita, per il tessuto trabecolare, l'applicabilità di questo approccio. Sempre con lo scopo di ricavare le caratteristiche meccaniche del tessuto è stata spesso usata la prova a flessione (Boyce et al., 1998; Cuppone et al., 2004; Grimal et al., 2009; Keller et al., 1990; Snyder and Schneider, 1991; Zioupos and Currey, 1998), in genere secondo uno schema a tre punti. Anche in questo caso i campioni di tessuto devono essere sufficientemente lunghi per assicurare che il provino sia in condizione di flessione con componenti di taglio trascurabili. Ovviamente anche i test a compressione, per i cui dettagli si rimanda ai paragrafi successivi, trovano ampio supporto in letteratura (Burstein, et al., 1976; Carter and Hayes, 1977; Keller, 1994; Lotz et al., 1991; Ohman et al., 2008; Smith and Smith, 1976; Snyder and Schneider, 1991). Per completezza occorre citare anche i test di torsione, taglio, fatica e indentazione che possono a loro volta dare informazioni utili alla caratterizzazione meccanica del materiale.

Nei seguenti paragrafi si intende fornire una panoramica delle principali tecniche di conservazione e delle principali problematiche e fonti di errore relative alle prove di compressione del tessuto trabecolare, al fine di comprendere meglio le scelte effettuate nel contesto del mio studio.

1.3.1 Conservazione ed idratazione dei provini

Generalmente ci sono due metodi adatti alla conservazione del tessuto osseo dopo la morte del donatore: congelamento e fissazione chimica (in etanolo o formalina). Siccome solitamente il congelamento è la modalità preferita per la conservazione del materiale osseo da trapianto, numerosi studi in letteratura hanno investigato l'effetto di questo sulle proprietà meccaniche dell'osso (Goh et al., 1989; Hamer et al., 1996; Linde and Sorensen, 1993; Sedlin and Hirsch, 1966; Weaver, 1966; Yosibash et al., 2010). In uno solo di questi studi (Yosibash et al., 2010) è stato riscontrato un significativo cambiamento delle proprietà meccaniche dell'osso dopo il congelamento. Al contrario è invece stato dimostrato che un congelamento a temperature inferiori a -20°C non altera significativamente le caratteristiche meccaniche di tessuto osseo, sia esso corticale o trabecolare (Goh et al., 1989; Hamer et al., 1996; Linde and Sorensen, 1993; Sedlin and Hirsch, 1966; Weaver, 1966). Per il mio studio si è scelto di utilizzare solo provini così detti *fresh-frozen*, cioè ricavati da segmenti ossei dissezionati dal corpo e congelati (-20°) entro poche ore dal decesso del donatore (vedi 2.4 Provini).

La disidratazione del tessuto causa un incremento di modulo di Young e resistenza del tessuto, accompagnato da una riduzione della tenacità (Evans, 1973; Dempster and Liddicoat, 1952). Di conseguenza, per ottenere misure accurate, è necessario provare il tessuto in condizioni di idratazione fisiologica. Questo è possibile semplicemente immergendo il provino in soluzione fisiologica o spruzzandolo ripetutamente, sempre con soluzione fisiologica, durante tutta la procedura di prova.

1.3.2 Temperatura e velocità di deformazione

La temperatura dell'ambiente di prova influenza le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo. Per una misura accurata di queste, i provini di tessuto dovrebbero essere testati alla temperatura di 37°C, tuttavia ciò non è sempre possibile. È stato dimostrato che una temperatura ambiente di circa 23°C comporta un incremento del modulo elastico contenuto in un 2-4%, se confrontato con quello ottenuto a 37°C (Ashman, 1982; Bonfield and Li, 1968; Bonfield and Tully, 1982). Alla luce di questo, i provini in esame sono stati testati a temperatura ambiente (22-24°C) commettendo un errore stimabile, sulla misura del modulo elastico, trascurabile. È degno di nota che una temperatura inferiore a 37°C facilita inoltre il mantenimento dell'idratazione dei campioni.

La velocità di carico utilizzata durante il test meccanico del tessuto osseo ha effetti sulla misura di rigidità e resistenza. Al suo stato naturale l'osso è viscoelastico, si comporta come una molla con un piccolo smorzatore. Quest'ultimo elemento è quello sensibile alla velocità di carico, la sua resistenza alla deformazione fa aumentare esponenzialmente la rigidità del tessuto con la velocità di carico facendo variare, anche se in maniera ridotta, le caratteristiche meccaniche rilevate. Infatti, aumentando la velocità di carico di un ordine di grandezza, si ottiene un incremento della resistenza pari al 15% circa (Carter and Hayes, 1977). Per simulare le condizioni fisiologiche la velocità di deformazione dovrebbe essere compresa tra 0.01 s⁻¹, tipica della camminata, e 0.1 s⁻¹, tipica della corsa. I campioni testati nel presente lavoro sono stati sollecitati ad una velocità di 0.01 s⁻¹.

1.3.3 Tecniche di compressione

I test a compressione sono stati largamente utilizzati in letteratura per la determinazione delle proprietà meccaniche dell'osso come ad esempio modulo di Young, snervamento e carico di rottura (Burstein, et al., 1976; Carter and Hayes, 1977; Keller, 1994; Lotz et al., 1991; Ohman et al., 2008; Smith and Smith, 1976; Snyder and Schneider, 1991). Tuttavia, una prova di compressione può essere molto meno accurato di una a trazione qualora non si rispettino alcune raccomandazioni presenti in letteratura (Keaveny et al., 1997), atte a limitare i così detti **end-side effects**, cioè la condizione che si viene a creare all'interfaccia tra provino e dispositivi di applicazione del carico per la quale si commettono grossi errori nelle misure meglio specificati di seguito.

Una tecnica largamente utilizzata, nonché la prima ad essere stata proposta, è la **platen technique**. Questa prevede che il provino sia posto tra due piastre, nella macchina di prova, e quindi compresso. La misura di deformazione è ottenuta direttamente dallo spostamento dei due piatti, solitamente registrata dalla macchina di prova stessa. Tuttavia, dalla letteratura emergono due problemi sperimentali che affliggono questa tecnica (Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1997; Un et al., 2006): la cedevolezza del sistema di carico ed il citato *end-side effect* (successivamente suddiviso in **end-effect strutturale** ed **end-effect di attrito**).

La cedevolezza del sistema di carico entra in gioco come fonte di errore in quanto, le deformazioni sono misurate dal trasduttore montato dentro l'attuatore. Di conseguenza le deformazioni dell'intero sistema di applicazione del carico si sovrappongono al comportamento del provino, comportando una sovrastima della deformazione su quest'ultimo, che corrisponde

ad una sottostima della rigidezza. Se i dati non vengono corretti considerando tale fenomeno, si incorre in grossi errori di misura (Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1993a). Gli *end-side effect* strutturale e di attrito, che agiscono in maniera combinata, nascono all'interfaccia tra campione e piastre di trasmissione del carico, causando errori casuali e sistematici (Odgaard and Linde, 1991; Keaveny et al., 1993a). Quello strutturale deriva dall'oscillazione e dallo scorrimento delle trabecole all'interfaccia tra provino e piastre, con una conseguente maggiore deformazione assiale e localizzata in corrispondenza degli estremi del campione, causata dal venir meno del supporto reciproco delle trabecole a causa del taglio del provino. Ciò conduce ad un errore casuale (Keaveny et al., 1997) e ad una sottostima sistematica del modulo elastico (Linde and Hvid, 1989; Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1993a). L'effetto frizionale riguarda sempre l'interfaccia campione-piastre: la parte centrale del provino risulta più deformata di quella vicino all'interfaccia quindi, apparentemente, serve una maggiore forza per deformare il provino rispetto a quella che ci si aspetterebbe dall'applicazione della legge di Hooke (Linde and Hvid, 1989; Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1993a). Alla luce di quanto detto l'effetto frizionale comporta una sovrastima del modulo elastico.

Per eliminare questi errori è stato modificato il modello sperimentale. Per evitare di considerare la cedevolezza del sistema di carico è stato introdotto l'uso di un estensimetro appoggiato direttamente sul provino (Linde and Hvid, 1989; Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1997). Per limitare gli *end-side effects*, si può utilizzare la tecnica detta *end-cap technique*, ad esempio immergendo le estremità del provino in polimetilmetacrilato (**PMMA**) (Linde and Hvid, 1989; Keaveny et al., 1997; Odgaard, 1997). Nella tecnica a quattro estensimetri, un estensometro è posto sul centro del provino e

quindi ricollocato a 90° dalla posizione precedente per quattro volte sul perimetro del provino. Disponendo della registrazione, per ogni posizione, della curva forza-spostamento e possibile calcolare il modulo elastico complessivo del provino, come media di quelli ricavati da ogni curva. Si ritiene così di ottenere una più precisa stima delle caratteristiche e di non soffrire *dell'end-side effect* frizionale, poiché lo strumento di misura è collocato lontano dalle estremità del campione (Keaveny et al., 1997). Un risultato importante: è stato riscontrato che la *platen-technique* sottostima sistematicamente (da 20% a 40% a seconda della geometria del provino) il modulo elastico rispetto alle tecniche ora considerate più accurate, (Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1997) quali il metodo ottico (Odgaard and Linde, 1991) e l'*end-cap technique* con uno o più estensometri (Keaveny et al., 1997).

Per il mio studio ho optato per la tecnica *end-cap* a quattro estensometri come base di partenza. Va precisato che la mia volontà non è tanto fare un vero e proprio studio finalizzato alla caratterizzazione del materiale quanto di acquisire i dati sperimentali necessari alla validazione di un modello numerico. Questo però non significa trascurare gli artefatti e le problematiche riscontrate in letteratura. Al contrario il modello sperimentale deve assicurare la massima accuratezza possibile, in quanto i dati vengono usate come valori di riferimento nella validazione. Questo spiega il tipo di approccio che ho seguito nelle scelte fatte per definire il modello sperimentale.

1.3.4 Dimensioni e geometria del provino

La dimensione e la geometria del provino, in relazione alla corretta stima del modulo elastico, rappresentano argomenti tutt'ora oggetto di dibattito in letteratura.

La dimensione esterna del provino dovrebbe essere maggiore di 4-5 mm, in modo da contenere almeno cinque trabecole e soddisfare così l'assunzione di mezzo continuo necessaria al calcolo dei parametri meccanici (Harrigan et al., 1988). Un recente studio ha dimostrato che la dimensione trasversale minima del provino deve essere di almeno 8 mm. Al di sotto di questa dimensione decade l'assunzione di mezzo continuo e le proprietà misurate sono correlate alle caratteristiche delle poche celle strutturali che costituiscono la sezione resistente.

Per quanto riguarda la geometria, sono adottati tipicamente provini cubici o cilindrici. In letteratura, si riscontra che anche la geometria del provino influenza le caratteristiche misurate sperimentalmente. Il modulo elastico ricavato da un cilindro dalle proporzioni 1:1, cioè il cui diametro uguaglia la lunghezza, non differisce significativamente da quello ricavato da un provino cubico delle stesse dimensioni (Linde et al., 1992). Tuttavia si sono riscontrati artefatti strutturali incrementando le dimensioni del provino ed il rapporto lunghezza/larghezza, suggerendo una geometria cilindrica dal rapporto 2:1 come scelta dalla quale scaturisce la miglior accuratezza (Linde et al., 1992; Keaveny et al., 1993b; Keaveny et al., 1997). D'altro canto, il provino cubico è la scelta più comune quando si vogliono analizzare le caratteristiche in direzione assiale e laterale dell'osso trabecolare (Linde et al., 1992; Goulet et al., 1994). Ricordando quanto detto precedentemente, la scelta dell'*end-cap technique* applicata ad un provino cilindrico di rapporto

2:1, rappresenta la tecnica che comporta la miglior accuratezza nella determinazione delle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo in compressione (Keaveny et al., 1997; Guo, 2001), di conseguenza questo rappresenta il modello di riferimento. Tuttavia solo pochi studi sono disponibili a tal riguardo e spesso relativi allo stesso gruppo di lavoro (come ad esempio Keaveny et al., 1997 e Morgan et al., 2003). Per il mio studio ho estratto quindi provini cilindrici di diametro nominale di 10 mm e lunghezza 26 mm, di cui 3+3 mm sono stati immersi in PMMA per realizzare gli *end-caps*, seguendo appunto le direttive ricavate dall'analisi della letteratura.

CAPITOLO 2:

MATERIALI E METODI

2.1 INTRODUZIONE ALLE TECNICHE DI ANALISI E MISURA UTILIZZATE NEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Come anticipato nei paragrafi precedenti, il mio studio aveva l'obiettivo di sviluppare un protocollo sperimentale per l'acquisizione di dati utili per la validazione di un modello numerico della struttura trabecolare. A tal fine ho condotto

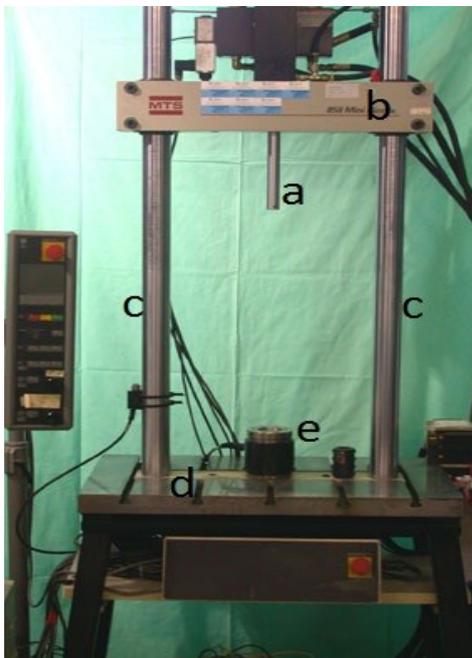


Figura 2.1 - MTS monoassiale

- (a) Attuatore.
- (b) Traversa.
- (c) Colonna.
- (d) Basamento.
- (e) Cella di carico.

prove di compressione su provini cilindrici di osso trabecolare. Ho sottoposto il provino ad una condizione di carico ben definita per mezzo di una macchina di prova servoidraulica (MTS Mini Bionix 858 monoassiale) (Figura 2.1). Questa tipologia di macchine ha tipicamente delle caratteristiche costruttive comuni. La struttura portante è costituita da un basamento sul quale sono vincolate due colonne. Queste sorreggono una traversa la cui distanza dal basamento è regolabile. Il carico viene applicato per mezzo di un attuatore, in questo caso un cilindro idraulico, montato sulla

traversa. Il controllo della macchina è effettuato attraverso un anello di retroazione chiuso, gestito da un'elettronica di controllo collegata ad un computer, che corregge il comando in funzione del segnale acquisito dal trasduttore usato per controllare l'attuatore. Tramite il computer è possibile definire i parametri della prova e tipo e numero delle curve di carico. La retroazione sul sistema di controllo può avvenire sia controllando la posizione dell'attuatore (controllo di posizione), che il carico applicato al provino (controllo di carico). Nello specifico, le prove sono state condotte in controllo di spostamento, cioè imponendo un movimento dell'attuatore a velocità costante fino al raggiungimento della posizione desiderata. Tale scelta è dettata dal fatto che non è possibile stabilire a priori il carico di snervamento di un generico provino di tessuto trabecolare. Tuttavia i dati disponibili in letteratura suggeriscono che il limite elastico del materiale si raggiunge imponendo una deformazione media di 0.01ϵ (Linde, 1994). Per l'esecuzione della prova ho utilizzato un modello sperimentale (Figura 2.2), che ho modificato a partire da uno già esistente presso il Laboratorio. Il modello sperimentale prevede due



Figura 2.2 - Setup

- (a) Testina portacampione.
- (b) Supporto testina.
- (c) Attuatore MTS.
- (d) Cella di carico MTS.

testine porta campione e relativi supporti per il montaggio delle stesse sulla cella di carico e sull'estremità dell'attuatore. Oltre ai suddetti dispositivi è stato necessario realizzare un sistema di allineamento del campione ed i supporti e gli accessori necessari al montaggio ed alla calibrazione del **sistema di correlazione di immagini (DIC)** nella macchina di prova.

Nei paragrafi successivi si darà una descrizione più dettagliata del

modello sperimentale nel suo complesso, oltre ad approfondire le modalità di acquisizione della struttura dei campioni e della misura delle caratteristiche meccaniche dei provini di tessuto osseo oggetto di studio.

2.1.1 Sistemi di allineamento e fissaggio

Il sistema usato per vincolare il provino alle due testine porta campione cui si è accennato in precedenza, rappresenta un aspetto estremamente rilevante al fine del buon esito dello studio. Questo deve garantire un montaggio rigido del campione sulla macchina di prova, eliminando tutti i gradi di libertà ad eccezione dello spostamento lungo l'asse del provino. Inoltre la posizione del campione di tessuto deve essere tale da rispettare l'assunzione di condurre prove di compressione pura. A tal scopo è necessario l'utilizzo di un posizionatore (Figura 2.3), anch'esso modificato a partire da un esemplare preesistente, che deve

permettere il corretto allineamento verticale del provino durante la fase in cui l'estremità del provino viene vincolata mediante resina acrilica in una testina portacampione. Il posizionatore è dotato di un alloggiamento per una testina porta campione e di una struttura per la sospensione del provino durante la procedura di cementazione (vedi 2.5.2 Allineamento dei

provini). La scelta di vincolare gli estremi del campione in una resina acrilica (polimetilmetacrilato, **PMMA**) è dettata dalla volontà di limitare quanto più possibile i citati *end-side effects*. Il PMMA penetra per qualche decimo di millimetro nelle cavità trabecolari della superficie del provino, fungendo da interfaccia rigida tra le trabecole terminali del provino di tessuto osseo e la testina. Questo permette quindi la

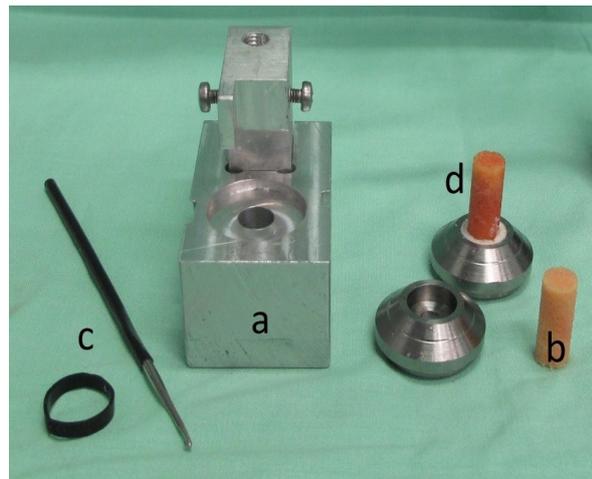


Figura 2.3 - Posizionatore provino

- (a) Posizionatore del provino.**
- (b) Campione di tessuto osseo.**
- (c) Accessori di allineamento.**
- (d) Provino vincolato nella testina portacampione.**

trasmissione del carico al tessuto, limitando la concentrazione di tensioni sulle trabecole alle estremità del provino e garantendo una corretta trasmissione dei carichi. Lo strumento di allineamento del provino è stato utilizzato per vincolare solo una delle estremità del campione, essendo la seconda colata effettuata direttamente in macchina (vedi 2.5.4 Montaggio in macchina). Questo approccio garantisce il corretto allineamento del provino ed elimina eventuali problemi legati alla tolleranze di lavorazione con cui sono stati realizzati tutti i componenti. Infatti sebbene tutte le componenti siano state realizzate in un'unica lavorazione, ovvero senza mai smontare il pezzo in lavorazione dalla macchina utensile, non è possibile ottenere tolleranze più strette di quelle garantite dalle macchine utensili installate presso il Laboratorio.

Entrambe le testine portacampione sono dotate di una cavità, di diametro nominale di 14 mm (Figura 2.4), in grado di accogliere il provino e la resina acrilica usata per vincolarlo. Sul fondo della cavità cilindrica ho realizzato un foro filettato in cui è avviato un grano (Figura 2.4). Questo è necessario per un'agevole estrazione del provino, che dopo essere stato vincolato ad un'estremità nella resina acrilica, deve poter essere rimosso dalla testina portacampione e collocato in un apposito contenitore per la scansione mediante microtomografo computerizzato. In fase di esecuzione della prova sarà possibile ruotare o rimuovere agevolmente il provino, cementato nelle testine portacampione e quindi solidale alle stesse, dalla macchina di prova per la realizzazione del pattern superficiale necessario per eseguire le misure di deformazione mediante la tecnica di correlazione d'immagini (vedi 2.6.5 Realizzazione del *pattern* DIC).

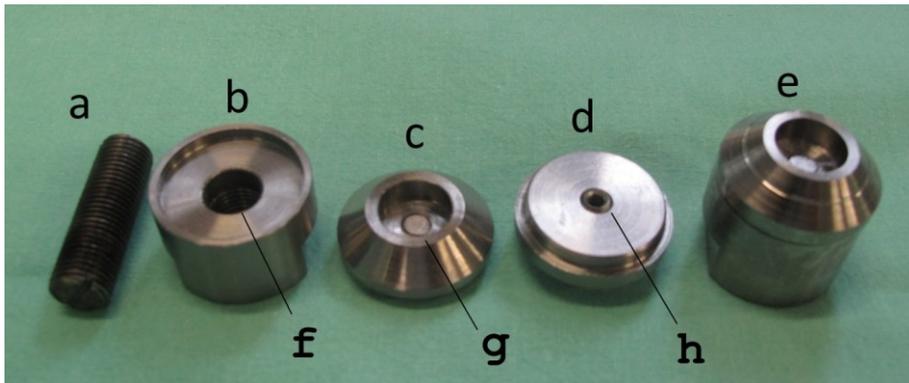


Figura 2.4 - Dettagli delle sistema di applicazione del carico a provino.

- (a) Barra filettata M12 di fissaggio.
- (b) Supporto testina.
- (c) Testina portacampione (vista dall'alto).
- (d) Testina portacampione (vista dal basso).
- (e) Accoppiamento testina e supporto.
- (f) Foro per l'inserimento della barra filettata.
- (g) Cavita per la colata del PMMA (diametro 14 mm).
- (h) Grano filettato per l'estrazione della colata.

2.1.2 Scansione mediante microtomografia computerizzata (μ CT)

Lo strumento utilizzato per l'acquisizione della microstruttura di ogni provino testato è un microtomografo computerizzato (μ CT) (Skyscan 1072, Belgium) (Figura 2.5). In generale, questi sistemi di acquisizione consistono di un tubo a raggi X con alta capacità di messa a fuoco, un portacampione rotante per la scansione del provino ed una unità di rilevazione del segnale trasmesso per l'acquisizione delle immagini di proiezione. Tutto il processo di scansione, descritto nei paragrafi seguenti, è controllato da un computer.



Figura 2.5 - Microtomografo computerizzato (μ CT) (Skyscan 1072, Belgium) utilizzato per la scansione della microstruttura dei provini.

2.1.2.1 Digitalizzazione della struttura trabecolare. Questo processo è suddivisibile in più passi qui brevemente descritti. Il provino cilindrico viene collocato in un apposito contenitore cilindrico (*holder*) e immerso in soluzione fisiologica, quindi collocato nell'apposita sede in μ CT. La base del portacampione è dotata di due motori passo-passo che permettono l'acquisizione di diverse proiezioni del provino. In particolare la procedura di acquisizione prevede che l'*holder* sia posizionato ad una specifica altezza rispetto al generatore RX per l'acquisizione di proiezioni del campione a diverse angolazioni, ruotandolo via via secondo programmazione. Pertanto prima di ogni scansione l'*holder* viene ruotato di un angolo calcolato sulla base del numero di scansioni da acquisire. Al termine della procedura, la serie di immagini di proiezione ottenute (Figura 2.6) possono essere utilizzate per la ricostruzione 3D della microstruttura del campione di tessuto osseo.

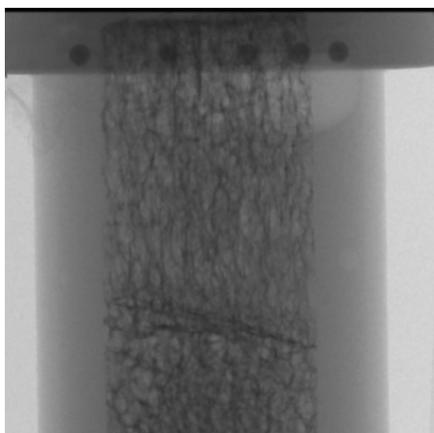


Figura 2.6 - Proiezione frontale ottenuta mediante μ CT di un provino cilindrico.

I parametri di acquisizione impiegati per la scansione dei provini utilizzati nel mio lavoro sono i seguenti:

- sorgente RX alimentata a 50 kV e 200 μ A;
- filtro di Al di 1 mm;
- tempo di esposizione di 5.9 s;
- passo di rotazione di 0.9° su un complessivo di 185° ;
- passo assiale di 19.53 μ m;
- campo di vista di 20x20 mm.

Con questi parametri di acquisizione la risoluzione della μ CT è di 19,5 μ m/pixel. Ovviamente il campo di vista utilizzato per garantire questa risoluzione non permette la scansione di tutta la lunghezza del il provino (26 mm), comprendendo

quindi anche il piano su cui sono posizionati i riferimenti. La ricostruzione completa del provino in μ CT, è infatti una condizione indispensabile alla registrazione dei dati sperimentali sul modello numerico. Pertanto la scansione è stata suddivisa in due parti parzialmente sovrapposte e successivamente unite per ottenere il provino completo.

Il secondo passo necessario alla digitalizzazione della microstruttura prende il nome di algoritmo di retroproiezione e permette, a partire da ogni singola proiezione ad una data altezza del provino, di ricostruire una sezione trasversale dello stesso (Figura 2.7). Il segnale di radiazione trasmessa, relativo ad ogni posizione radiale del provino, rappresenta un'informazione monodimensionale direttamente correlabile alla densità del campione (Figura 2.8 A). Rappresentando questo segnale in scala di grigi e retroproiettandolo secondo l'angolo di acquisizione (Figura 2.8 B) si riesce a ricostruire una sezione dell'oggetto scansionato.

Il terzo passo per ottenere la rappresentazione digitale della struttura del campione è la binarizzazione delle immagini ottenute. Infatti queste sono caratterizzate da zone chiare e scure che riflettono la rispettiva assenza o presenza di tessuto osseo (Figura 2.7).

L'ultimo passo del processo, appunto la ricostruzione tridimensionale della microstruttura, è effettuata tramite la sovrapposizione delle

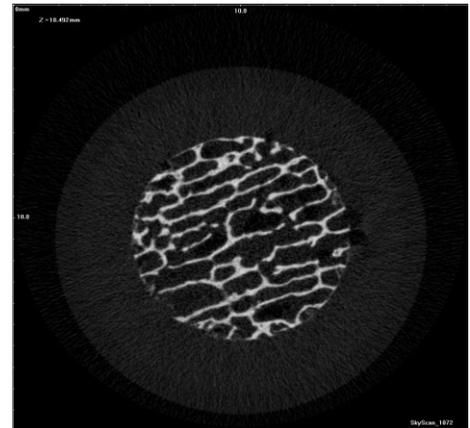


Figura 2.7 - Sezione trasversale ottenuta mediante μ CT di un provino cilindrico.

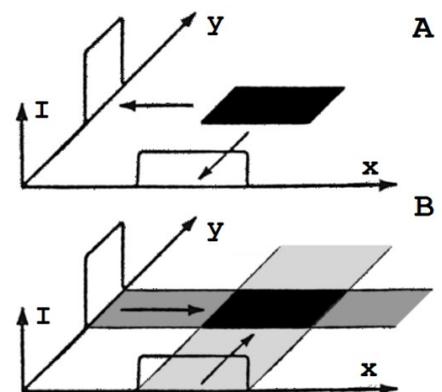


Figura 2.8 - (A) registrazione del segnale trasmesso. (B) Retroproiezione del segnale in livelli di grigio.

immagini relative alle varie sezioni del provino scansionato. Il processo con cui l'insieme delle immagini, ottenute attraverso la scansione μ CT, vengono assemblate al fine di generare il modello 3D della microstruttura è descritto nel paragrafo seguente.

2.1.3 Realizzazione del modello μ FEM

Per realizzare il modello μ FEM, è necessario convertire ogni pixel delle immagini tomografiche in voxels cubici, delle stesse dimensioni dei pixel di partenza ($19.5 \mu\text{m}$) ai quali viene assegnato lo stesso livello di grigio. In seguito, al fine di ridurre il numero di elementi del modello ed il conseguente costo computazionale, la sezione trasversale del provino viene nuovamente campionata, portando la risoluzione da $19.5 \mu\text{m}$ a $39.0 \mu\text{m}$ ed assegnando come livello di grigio la media dei voxels di partenza. Dall'analisi dell'istogramma di queste è possibile stabilire una soglia di grigio globale che permette di discriminare l'osso dal resto ed in base alla quale si assegnano valori di 0 o 1 ad ogni voxel. Una volta ottenuta la struttura binaria tridimensionale viene implementato un test di connettività per escludere tutte le zone disconnesse, che non permetterebbero il calcolo del modello μ FEM (Figura 2.9). A questo punto ogni elemento è un esaedro a 8 nodi, che sarà cubico a causa del tipo di ricostruzione effettuata sul *dataset* di μ CT. Ogni elemento viene poi considerato elastico lineare. Quindi è definito

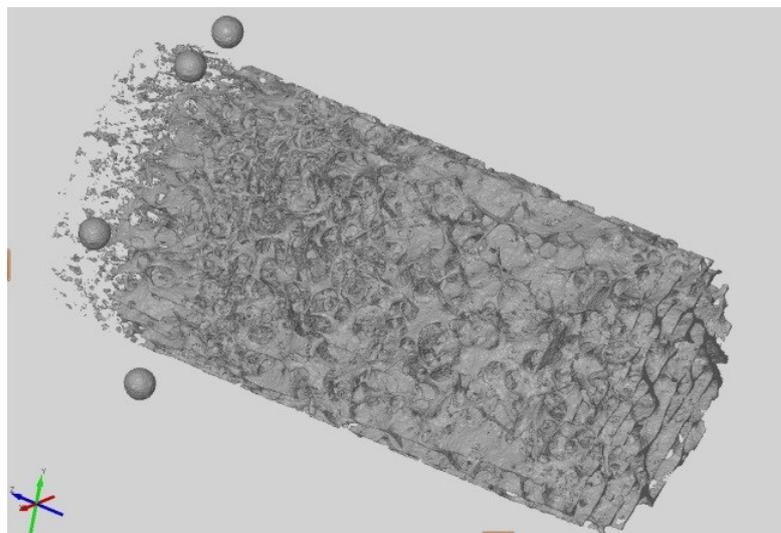


Figura 2.9 - Modello 3D del provino cilindrico.

meccanicamente solo da modulo elastico e coefficiente di Poisson. Questi due parametri vengono assegnati in maniera uniforme ad ogni elemento del modello μ FEM. Per quanto riguarda la modellazione delle condizioni sperimentali nel FEM, a tutti i nodi appartenenti alla zona delle colate (in Figura 2.9 si può notare una zona in cui le trabecole appaiono meno fitte a causa della presenza del PMMA), sono stati vincolati con nessun grado di libertà. A tutti gli altri nodi è concesso solo un grado di libertà, quello assiale. Tutti gli aspetti della modellazione sono descritti in uno studio condotto parallelamente e dettagliati in un elaborato a cui si rimanda (Iori, 2013).

2.1.4 Sistemi di misura delle deformazioni

Completata la scansione del provino, questo viene montato sulla macchina di prova. Si procede quindi con la realizzazione del secondo vincolo mediante la cementazione con resina acrilica della seconda estremità del provino. Il provino può quindi essere sottoposto alla prova di compressione. Durante la prova il carico assiale applicato è misurato da una cella di carico, mentre quelli della corsa dell'attuatore vengono misurati dal **trasduttore di spostamento (LVDT)** collocato nell'attuatore della macchina di prova. Pertanto questi sono registrati dall'elettronica della macchina di prova. La classe di precisione di cella ed LVDT è la medesima, cioè classe 0.5% misurato su 10 punti equidistanziati. Il FS è di ± 1500 kN per la cella di carico e di ± 50 mm per l'LVDT (corrisponde alla corsa fisica del cilindro di attuazione della macchina di prova).

2.1.4.1 Misura mediante sistema meccanico. Uno dei sistemi di misura delle deformazioni adottati, generalmente usato nelle prove di caratterizzazione dei materiali, è quello che prevede l'uso di un estensometro. L'estensometro (Figura 2.10) è un trasduttore dotato di due bracci mobili collegati ad una componente deformabile su cui sono montati degli estensimetri. Ad uno spostamento relativo tra i bracci dell'estensometro corrisponde una deformazione elastica del componente su cui sono montati gli estensimetri. La misura del segnale degli estensimetri, tramite calibrazione dello strumento, permette di risalire alla misura della variazione della distanza relativa tra i due bracci dell'estensometro. Quello utilizzato nel mio studio è un estensometro (MTS mod634.31F-24) che, in una configurazione che ha corsa ± 2.5 mm, ha classe di accuratezza 0.5%. Sulle estremità dei bracci dell'estensometro

sono montati due coltelli, realizzati su misura, che permettono il montaggio dell'estensometro direttamente sulla superficie esterna del campione di tessuto osseo. La distanza tra le due lame nella posizione di riferimento è di 10 mm. Va precisato che la realizzazione di coltelli dedicati è stata indispensabile per poter utilizzare questo modello di estensometro (Figura 2.10). Infatti, i coltelli originali non consentivano il montaggio dell'estensometro per problemi di ingombro, essendo la superficie libera del provino ridotta e con accesso limitato dalle testine che vincolano il provino di tessuto osseo.

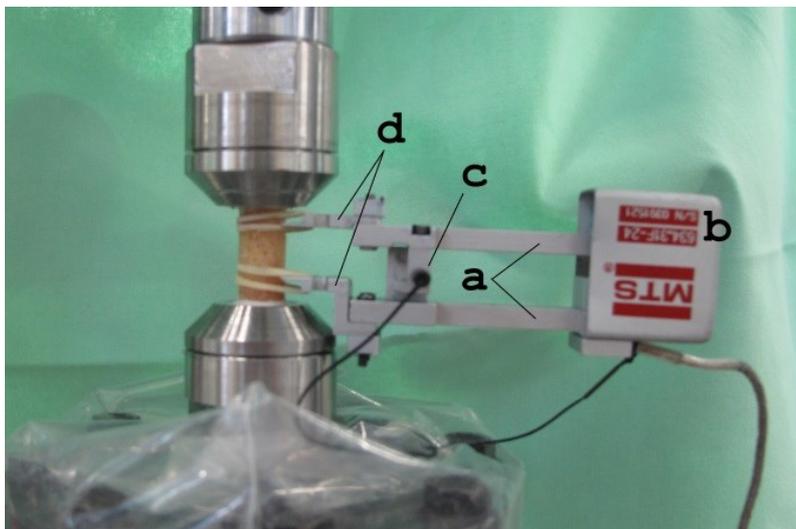


Figura 2.10 - Estensimetro

- | | |
|--------------------|-------------------------------|
| (a) Bracci mobili. | (c) <i>Pin</i> di bloccaggio. |
| (b) Carcassa. | (d) Coltelli <i>custom</i> . |

2.1.4.2 Misura mediante tecnica di correlazione di immagini.

La correlazione di immagine digitale (**DIC - Digital Image Correlation**) è una tecnica ottica di misura degli spostamenti e delle deformazioni superficiali, che negli ultimi anni è stata ampiamente adottata nel campo della meccanica sperimentale, specialmente nel campo della misura di grandi deformazioni. La DIC si basa sul confronto di una serie di immagini che riprendono l'oggetto a partire da uno stato di riferimento iniziale e ne seguono l'evoluzione negli stati deformati successivi. Preparando opportunamente la superficie del provino, cioè rivestendolo con una distribuzione stocastica di punti ad elevato contrasto (*pattern*), è possibile identificare ogni zona della superficie del provino in maniera univoca. Il sistema acquisisce una serie di immagini del provino in diverse condizioni di deformazione calcolando gli spostamenti che compie ciascuna zona del provino, permettendo di risalire al campo degli spostamenti della superficie osservabile dalle telecamere del sistema e, per derivazione, a quello delle deformazioni. Quest'ultima misura, nel caso di piccole deformazioni come nella presente applicazione, è problematica in quanto il rumore, inevitabilmente presente sul sensore delle telecamere, influenza le misure degli spostamenti e viene incrementato dall'algoritmo di calcolo delle deformazioni. L'utilizzo di due videocamere accoppiate permette la visualizzazione stereoscopica dell'oggetto e quindi la misura degli spostamenti nelle tre dimensioni. Il dispositivo di correlazione presente in Laboratorio (Figura 2.11) (ARAMIS 5M, prodotto dalla GOM) è dotato di telecamere CCD in bianco e nero (256 livelli di grigio) della risoluzione di 2448x2050 pixel, ovvero 5 Mpixel. Queste possono lavorare ad una frequenza massima di 15 Hz con tempi di esposizione variabili tra 0.1 ms e 2 s. Tale sistema è completo di scheda di acquisizione, sulla quale sono presenti diversi canali

analogici utilizzati per il collegamento alla macchina di prova, e di una stazione di lavoro con il software di elaborazione (ARAMIS v6.3, GOM). Il software permette di gestire tutte le fasi di misura, dalla calibrazione all'acquisizione della sequenza di immagini del provino sollecitato ed infine all'elaborazione, in fase di *post-processing*, dei dati raccolti. E' altresì possibile creare documentazione relativa al progetto o esportare i dati per elaborarli con algoritmi esterni al programma.

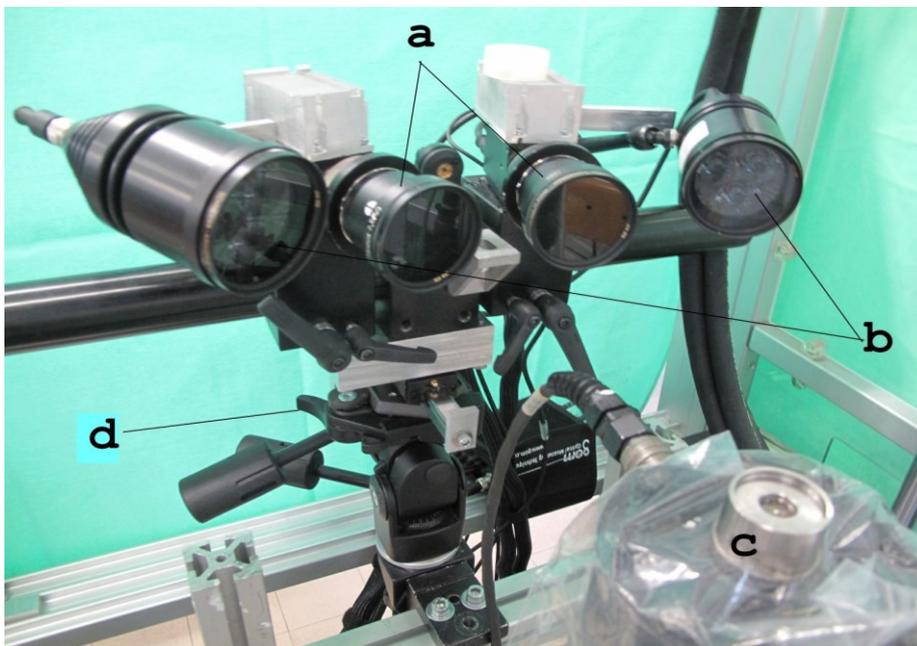


Figura 2.11 - Dispositivo di correlazione di immagini

- | | | | |
|-----|-----------------|-----|------------------------|
| (a) | Telecamere CCD. | (c) | Alloggiamento provino. |
| (b) | Luci LED. | (d) | Cavalletto. |

2.1.4.3 Calibrazione del DIC. Per poter utilizzare il DIC è necessaria una calibrazione dei sistemi stereoscopici, che in generale consiste nel misurare con accuratezza i parametri del sistema di fotocamere. Questi dipendono dalla posizione relativa delle due camere, dalle dimensioni del sensore CCD e dalla sua posizione relativa rispetto al centro ottico. Al termine della calibrazione il sistema è in grado di eseguire la trasformazione prospettica fra il sistema dello spazio tridimensionale, ed il sistema di riferimento delle fotocamere, avente origine nel centro ottico ed asse z orientato secondo la normale al piano della lente. In tale modo è possibile risalire alla posizione di un generico punto P nello spazio, conoscendo la posizione che quel punto occupa nelle due immagini stereoscopiche raccolte (GOM, 2009). La calibrazione è un'operazione solitamente eseguita *offline* e fa uso di una serie di oggetti contenenti un *pattern* con caratteristiche geometriche predefinite. Registrando la posizione di questi punti noti ed operando la trasformazione inversa tra sistemi di coordinate è possibile stimare i parametri del sistema di acquisizione. Il processo di calibrazione va ripetuto ogni volta che il sistema viene spostato, quando vengono cambiate le ottiche del sensore oppure quando le immagini raccolte presentano ampie zone scorrelate.

Per effettuare la calibrazione, il costruttore fornisce una serie di pannelli detti **primari di calibrazione** (Figura 2.12), di dimensioni differenti e scelti in funzione della finestra di misura che si intende utilizzare. I primari presentano in superficie un motivo regolare ed alcuni dettagli irregolari, noti con una precisione di alcuni ordini di grandezza superiore a quella con la quale si intendono determinare le distanze nello spazio tridimensionale.

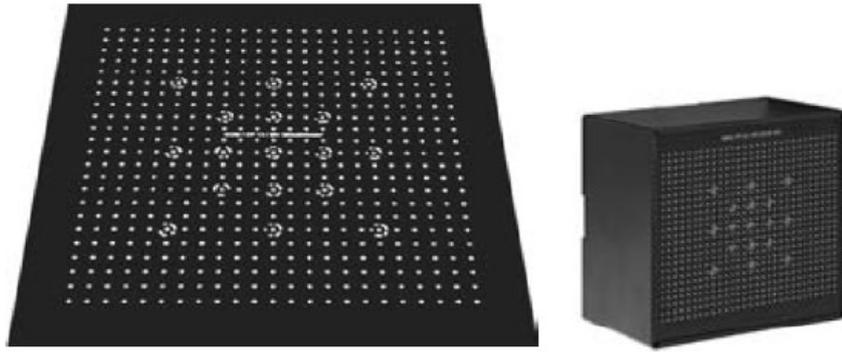


Figura 2.12 - Primari di calibrazione, disponibili in Laboratorio, per differenti finestre di misura (forniti da GOM). Da sinistra a destra, 250x200 e 12x15.

Dalle dimensioni del provino si risale anche ai parametri che occorre impostare sull'hardware, con la finestra di misura di 25X21 mm utilizzata nella mia applicazione:

- Distanza fra le camere di 74 mm
- Distanza fra il supporto delle camere ed il provino di 250 mm
- Angolo fra le camere di 25°
- Apertura del diaframma di 4.5

Tutti i parametri fisici del dispositivo suddetti sono da considerarsi indicativi, servono solo per disporre tutte le componenti nella posizione ottimale in quanto, tutti i parametri reali del sistema vengono calcolati con precisione nel processo di calibrazione.

Quindi, dopo essere entrati nella modalità di calibrazione dal *software*, occorre disporre il primario in diverse posizioni spaziali ed acquisire ogni volta l'immagine secondo una procedura guidata (Figura 2.13). Al termine della procedura il *software* riporta i risultati dell'elaborazione, tra i quali il coefficiente di deviazione. Questo, secondo quanto consigliato da produttore, deve essere compreso fra 0.01 e 0.04 pixel. Il coefficiente di deviazione viene calcolato come la deviazione media delle coordinate di tutti i punti ottenute durante la calibrazione ed esprime l'incertezza sulla posizione di un pixel nell'immagine acquisita.



Figura 2.13 - Rappresentazione della procedura di calibrazione guidata del sistema ARAMIS (tratta da GOM, 2009).

La procedura di calibrazione richiede movimenti relativi tra camere e primario dell'ordine dei millimetri con una precisione di almeno 50 μm (GOM, 2009). Per poter attuare la procedura di calibrazione direttamente sulla macchina di prova, è stata necessaria la realizzazione di un supporto, da fissare all'attuatore della macchina di prova (Figura 2.14 A), che supportasse il primario di calibrazione nella stessa posizione in cui verrà a trovarsi il provino durante l'acquisizione, e che ne permetta l'orientamento secondo protocollo. Inoltre, come si può notare dalla procedura di calibrazione (Figura 2.13 Step 2 e 3), è previsto che il sistema di telecamere venga spostato in avanti di $1/2$, il centro di fuoco supera il primario, ed indietro di $1/3$, il primario supera il centro di fuoco, dello spessore di fuoco (10 mm per il mio campo di vista pari a 25x21 mm). Per eseguire queste operazioni in modo preciso e ripetibile, ho costruito un sistema di movimentazione, inserito nel cavalletto del sistema DIC, dotato di vite micrometrica digitale (Figura 2.14 C). Si precisa che il sistema di movimentazione è realizzato in modo che l'asse di intersezione delle ottiche delle telecamere coincida con l'asse dell'attuatore (Figura 2.14 B), condizione necessaria per non dover correggere la distanza delle camere durante i posizionamenti angolari del primario (Figura 2.13 Step 6,7,10 e 12). Di conseguenza al termine della calibrazione occorre spostare le camere indietro della distanza corrispondente al raggio del provino (5 mm). Una volta eseguita la calibrazione il sistema è nella condizione di operare correttamente.

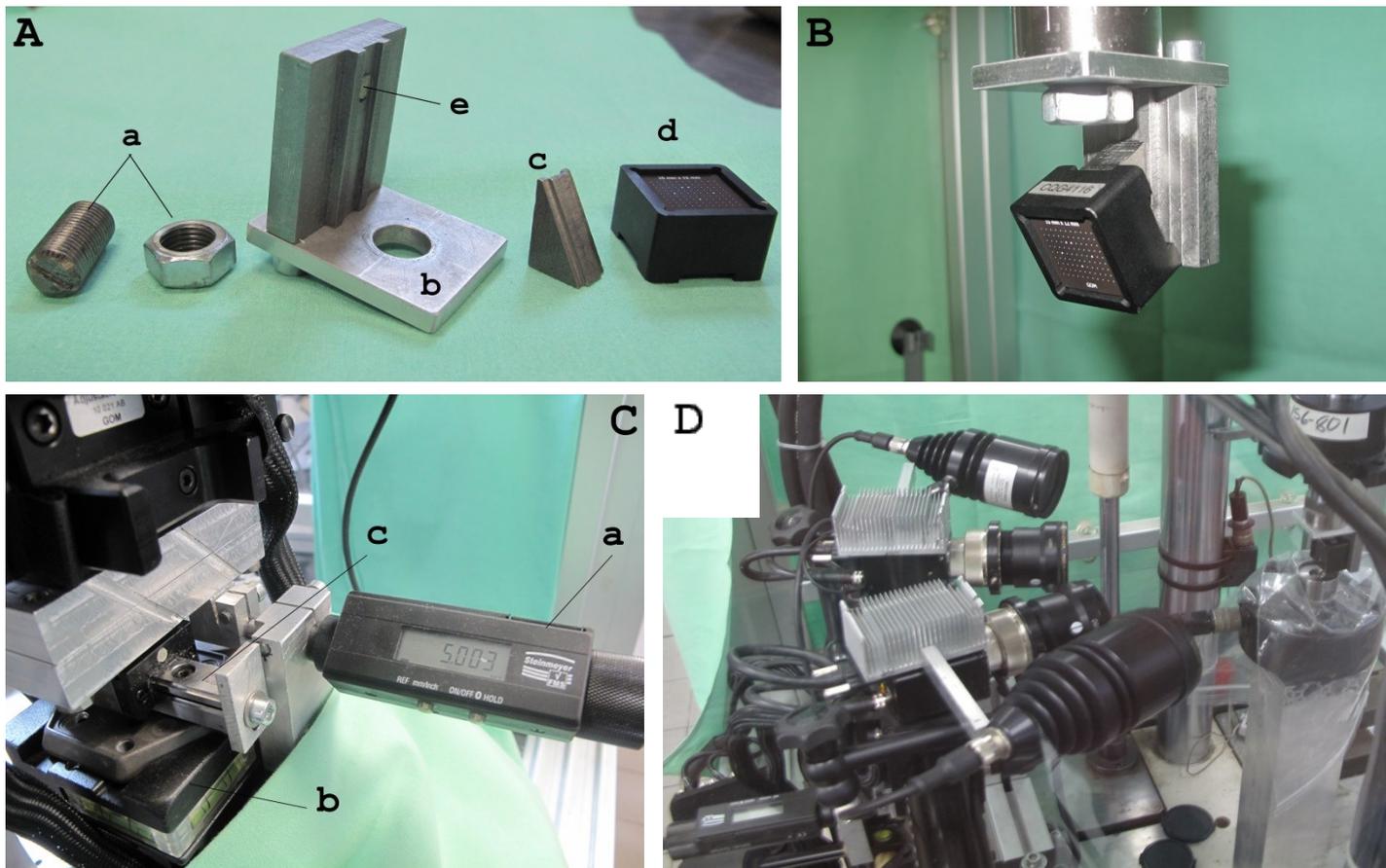


Figura 2.14 - Dettagli relativi al montaggio del sistema di correlazione di immagini nella macchina di prova.

(A) Elementi necessari alla calibrazione in macchina di prova:

- (a) Fissaggio all'attuatore.
- (b) Supporto del primario.
- (c) Piano inclinato di 30°.
- (d) Primario di calibrazione.
- (e) Magnete di sostenimento per (c).

(B) Montaggio del primario.

(C) Sistema di movimentazione delle telecamere:

- (a) Vite micrometrica.
- (b) Cavalletto ARAMIS.
- (c) Guida lineare.

(D) Visione di insieme del sistema di correlazione in fase di calibrazione.

2.1.4.4 Principio di funzionamento del DIC. L'immagine ripresa viene suddivisa in sottodomini di pixel, detti **facet**, solitamente quadrati e di dimensione $N \times N$, dove N è detta **facet size**. Le **facet** possono essere sfasate di un certo numero di pixel M che viene detto **facet step** (GOM, 2009). La sovrapposizione che ne risulta determina anche la risoluzione con cui la mappa di spostamento viene calcolata (Figura 2.15).

Infatti, ogni **facet** rappresenta un punto di calcolo per gli spostamenti. L'elaborazione del set di immagini che le contengono permette di calcolare un valore di spostamento assegnato proprio alla coordinata del centro geometrico della **facet** relativa. Quindi maggiore è la loro sovrapposizione e maggiore

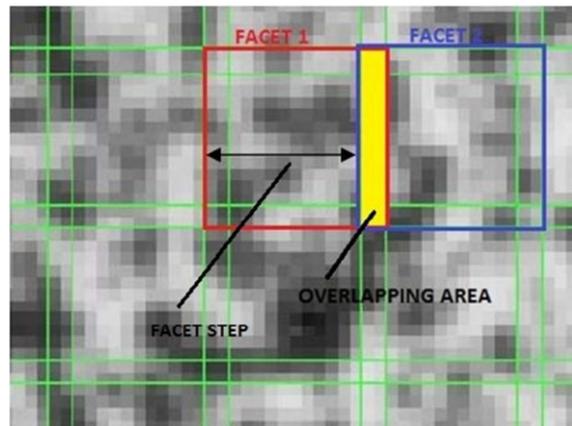


Figura 2.15 - Esempio di *facet size* 15x15 e *facet step* 13x13 (tratta da GOM, 2009).

è la risoluzione della mappa di spostamento. Aumentando il numero di **facets** cresce anche il peso computazionale del calcolo ed il tempo necessario alla sua esecuzione. Alla fine dell'elaborazione dei dati si ha quindi a disposizione, per ogni **frame** acquisito, un reticolo di punti le cui coordinate sono note (centro della **facet**) ed ai quali è associato uno spostamento misurato/calcolato. Le coordinate sono fornite in 3D sfruttando la visione stereoscopica.

2.2 DEFINIZIONE DEL SISTEMA DI RIFERIMENTO

La definizione dei sistemi di riferimento è sempre un passo cruciale in tutti i casi in cui sia necessaria una registrazione dei dati sperimentali. Nel caso specifico è stato necessario definire un sistema di riferimento univoco che rispondesse alle richieste dell'analisi numerica sul modello al calcolatore. Infatti c'è la necessità di registrare l'informazione raccolta mediante l'estensometro, collocato fisicamente sul provino, nel modello μ FEM della microstruttura dello stesso provino. Lo stesso vale per la tecnica DIC. Da valutazioni precedentemente condotte presso il Laboratorio è emerso che collocando virtualmente l'estensimetro sul modello μ FEM in posizioni diverse dalla posizione fisica in cui si trovava durante la prova sperimentale, la simulazione numerica della prova di compressione approdava a risultati molto diversi (Iori, 2013). Da qui l'idea di sviluppare un metodo che consentisse di definire sia la posizione circonferenziale che assiale dello strumento di misura rispetto al provino ed utilizzarla per la registrazione dei dati sperimentali sul modello numerico. A tale scopo ho adottato un sistema di riferimenti in alluminio, ai quali poter riferire la posizione dell'estensometro durante la prova. Si tratta di sfere calibrate, del diametro di 1 mm, e composte da alluminio puro, collocate sulla colata superiore del provino (Figura 2.16) (vedi 2.5.3 Applicazione dei riferimenti). Queste, sono visibili in μ CT (Figura 2.6) e non generano artefatti, e sono quindi individuabili da μ CT a modello μ FEM (Figura 2.9). Le sfere sono accessibili durante le prove e identificano univocamente quattro generatrici circonferenziali: 0° , 90° , 180° e 270° . Una quinta sfera è stata utilizzata per generare un'asimmetria del sistema di riferimento (Figura 2.16), in modo da marcare univocamente la prima generatrice

(0°), ed una direzione fissata a priori per numerare le successive. Le prove di compressione sono quindi state svolte collocando l'estensometro lungo la generatrice identificata da ognuna delle sfere. Inoltre durante la prova è stata misurata la distanza assiale tra una delle lame dell'estensometro e la superficie esposta della sfera di riferimento, mediante un truschino digitale (vedi 2.5.5 Riferimento per la registrazione della misura meccanica di deformazione). Con queste due informazioni è possibile registrare i dati sperimentali sul μ FEM. Lo stesso sistema di riferimento è stato utilizzato anche per riferire la posizione del dispositivo DIC. Ovviamente in questo caso non è possibile fornire la posizione assiale dello strumento in quanto non vi è contatto col campione. È possibile solo identificare la generatrice in sede sperimentale e, per la registrazione della mappa di spostamento ottenuta, occorre identificare la matrice di trasformazione che permette di passare dal sistema di coordinate del DIC a quello del μ FEM (vedi 2.3.1 Registrazione dei dati DIC).

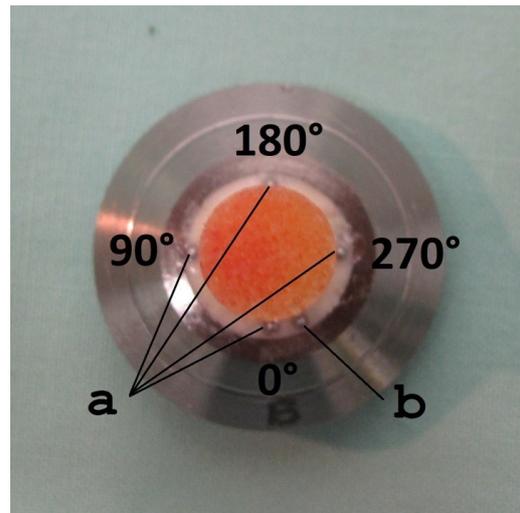


Figura 2.16 - Sistema di riferimento sul provino:

- (a) Sfere che individuano le generatrici.
- (b) Sfera che individua l'origine del sistema di riferimento.

2.3 DEFINIZIONE DELLA PROCEDURA OPERATIVA

Il protocollo sperimentale da me sviluppato è completamente volto alla validazione di un modello numerico della microstruttura di un campione cilindrico di tessuto trabecolare. In questo paragrafo si fornirà una descrizione completa della procedura operativa sviluppata nel corso della mia tesi, rimandando ai paragrafi successivi quanto riguarda i dettagli della preparazione dei provini (vedi 2.5 Preparazione dei provini). Oltre alle prove studiate per la validazione del μ FEM, ho condotto prove mirate alla valutazione dell'effetto della vernice sul comportamento meccanico del tessuto in esame. Queste condividono alcuni punti della procedura con quelle di validazione, i cui dettagli sono riportati in un paragrafo successivo (vedi 2.6.2 Prove finalizzate alla validazione del modello numerico). Si precisa inoltre che non tutti i provini presentati in questa tesi sono stati testati con entrambe le tecniche di acquisizione (estensimetro e DIC) e che quella qui descritta è la procedura finale messa a punto, che le contempla entrambe. La procedura operativa di validazione del modello numerico è brevemente riportata di seguito:

- Estrazione del provino dal segmento osseo a livello dei condili femorali.
- Allineamento del provino alla testina portacampione e realizzazione di uno degli *end-cap* in PMMA.
- Applicazione dei riferimenti in alluminio necessari alla registrazione dei dati sul modello μ FEM. Una volta terminata questa fase il provino deve essere estratto dalla testina portacampione.
- Acquisizione della microstruttura trabecolare del provino mediante μ CT.

- Ricollocazione del provino nella testina portacampione e montaggio in macchina di prova. Questa fase comprende la realizzazione del secondo *end-cap*, eseguita direttamente in macchina.
- Esecuzione delle prove di compressione mediante la tecnica ad estensometro sulle quattro generatrici (4 ripetizioni ognuna). Riportando per ognuna la posizione dell'estensometro per la registrazione dei dati (vedi 2.5.5 Riferimento per la registrazione della misura meccanica di deformazione).
- Realizzazione del *pattern* per le acquisizioni mediante DIC.
- Esecuzione delle prove di compressione mediante la tecnica DIC.
- Esecuzione della prova di rottura del provino (acquisizione DIC o ad estensometro in relazione al provino in esame).

2.3.1 Registrazione dei dati DIC

La registrazione dei dati acquisiti mediante DIC si basa sul fatto di disporre, alla fine dell'elaborazione dei dati relativi ad ogni *frame* acquisito, di un reticolo di punti le cui coordinate sono note (centro della facet) ed ai quali è associato uno spostamento misurato/calcolato. Le coordinate sono ovviamente fornite in 3D sfruttando la visione stereoscopica. Da questa base di dati, detta anche *mesh*, prende le mosse il processo di registrazione dei dati, la cui intenzione è quella di ottenere la matrice di trasformazione che permette di passare delle coordinate dal sistema DIC a quelle con cui è stata acquisita la microstruttura del provino. Innanzitutto occorre ottenere le coordinate, nel sistema delle camere, della sfera che individua la generatrice considerata. Tramite il software di ARAMIS è possibile, previa individuazione manuale sulla coppia di immagini dello stato indeformato di alcuni punti che giacciono sulla superficie della sfera, effettuare la ricerca della superficie sferica che passa per tali punti. Ottenute queste, si procede a spostarvi l'origine del sistema di coordinate, normalmente centrato nel punto di fuoco. A questo punto possono essere aggiunte ulteriori tre sfere collocate, rispetto alla nuova origine del sistema di riferimento, a formare una terna cartesiana. È proprio tramite quest'ultima che si intende ricavare la matrice di trasformazione da applicare alle mappe di spostamento degli stati deformati. Ora è possibile importare la *mesh* 3D, arricchita delle sfere suddette, nel programma di allineamento automatico di ARAMIS (GOM Inspect 7.5) unitamente al modello della microstruttura del provino e procedere ad un allineamento preliminare sfruttando la sfera che individua la generatrice (Figura 2.17 A). Questa è infatti presente nel μ FEM, perché acquisita durante la scansione μ CT, ma anche

nella *mesh* ottenuta con DIC, perché è stata interpolata ed aggiunta al *dataset*. Dopo il preallineamento, il *software* è in grado di trovare l'orientamento della *mesh* che minimizza la distanza tra i punti della superficie che la compongono e quelli che costituiscono la superficie del modello della microstruttura (Figura 2.17 B). Dalle coordinate finali della tripletta di sfere è quindi possibile ottenere la matrice di trasformazione, che permette di passare dal sistema di riferimento DIC a quello del μ FEM, e quindi sfruttarla per la registrazione di tutte le immagini acquisite. Non potendo disporne, infatti, sarebbe necessario procedere alla registrazione secondo le modalità suddette di ogni *frame* ottenuto con DIC.

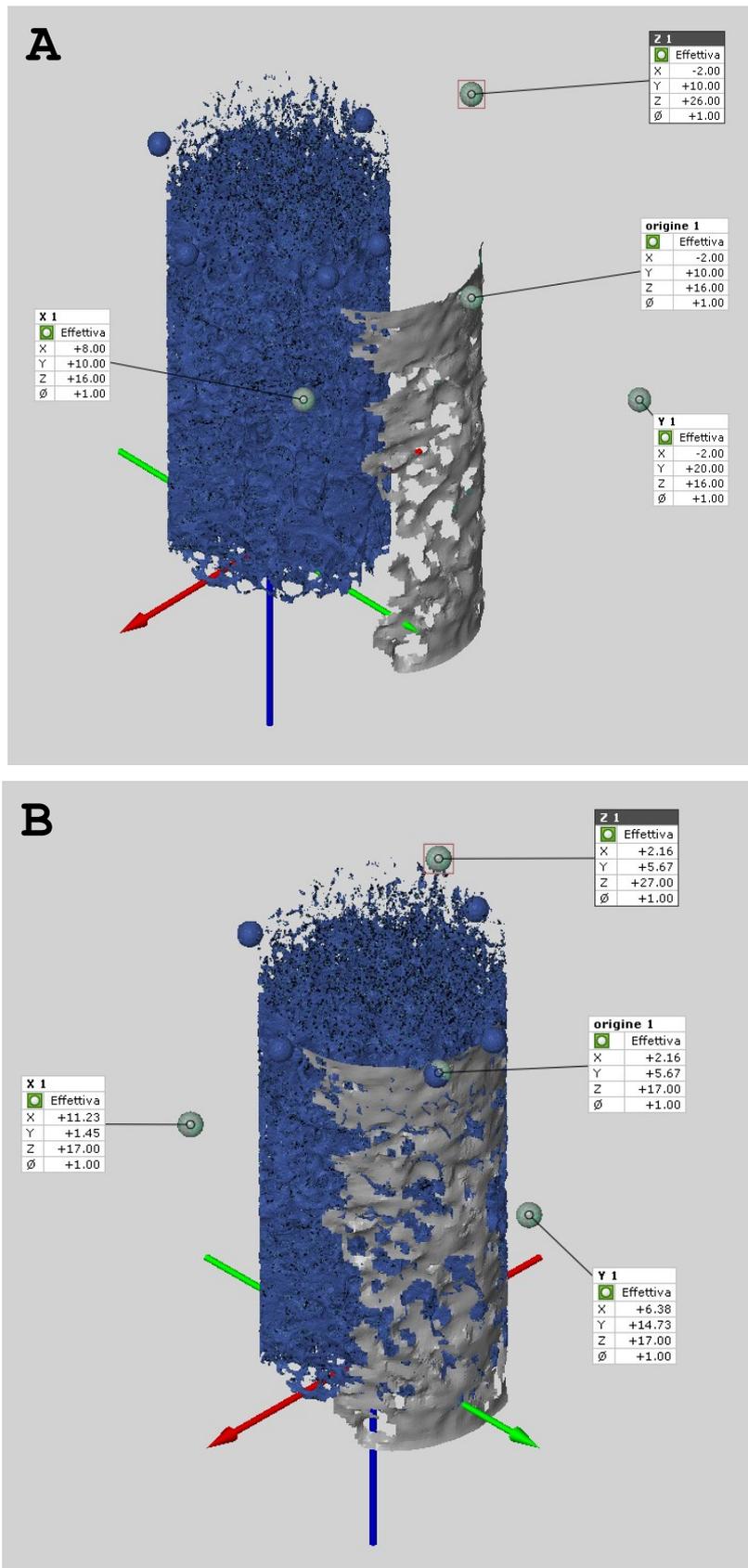


Figura 2.17 - Immagini relative alla registrazione dei dati acquisiti mediante DIC. (A) Fase di preallineamento. (B) Risultato dell'allineamento automatico di ARAMIS.

2.4 PROVINI

I provini sono stati prelevati dalla porzione distale di femori umani (Figura 2.18). La procedura di estrazione del campione di segmento osseo prevede che il corpo del donatore venga posto, entro le 12 ore successive alla morte, a temperatura controllata (4°C). Entro 96 ore dal decesso, il corpo viene dissezionato ed i campioni anatomici ricavati sono portati ad una temperatura inferiore ai -20°C, alla quale resteranno fino al loro utilizzo scientifico. Pertanto i



Figura 2.18 - Femore dal quale sono stati estratti i provini.

campioni di tessuto sono considerati congelati a fresco (*fresh frozen*). Per completezza, per ogni campione il Laboratorio dispone di scheda riassuntiva in forma anonima delle generalità del donatore (sesso, età, peso, ecc.) oltre che delle cause di morte e delle abitudini generali (dedizione all'alcool, fumo, ecc.). Oltre a questi dati, vengono fornite tutta una serie di analisi, certificate da enti riconosciuti, eseguite a garanzia della non pericolosità dei tessuti biologici in oggetto. In particolare, vengono eseguiti sui campioni test per HIV, epatite (B e C) e sifilide. Per chiarezza si riportano l'elenco dei provini utilizzati nelle prove preliminari ed nelle prove finalizzate alla validazione del μ FEM, indicando le procedure sperimentali a cui sono stati sottoposti (Tabella 2.1).

ID Provino	Scansione	Tecnica di misura		Tipo di prova	
	μ CT	Meccanica	DIC	Preliminare	Validazione
2503-06		*	*	*	
3029-06		*	*	*	
3585-06		*	*	*	
4297-06		*	*	*	
3015-01	*	*			*
3015-03	*	*			*
3015-04	*	*			*
3586-01	*	*	*		*
3586-04	*	*	*		*
3585-05	*	*	*		*

Tabella 2.1 - Elenco dei provini e delle procedure sperimentali.

2.5 PREPARAZIONE DEI PROVINI

Ogni fase del protocollo sperimentale, descritto nella definizione della procedura operativa, richiede un certo numero di lavorazioni da effettuare sul campione di tessuto osseo prima di poterlo testare. Nei seguenti paragrafi si darà appunto una descrizione di tutta la procedura necessaria ad ottenere i provini utilizzati nelle prove.

2.5.1 Estrazione dei provini

I provini provengono dalla parte distale di femori. Questa parte del segmento osseo è stata quindi tagliata qualche centimetro sopra alla metafisi femorale per consentirne l'afferraggio nella morsa di una troncatrice (Remet) (Figura 2.19). Il taglio è eseguito mediante un disco diamantato e sistema di lubrificazione ad acqua. Questo passo permette di estrarre sezioni trasversali dello spessore desiderato (26 mm), ricavate dal segmento che interessa la zona dei

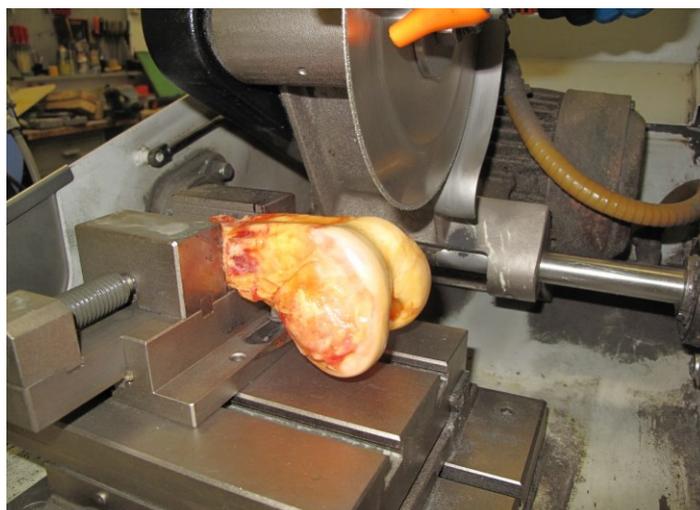


Figura 2.19 - Segmento distale di femore durante la realizzazione della sezione trasversale.

condili femorali (circa 1-2 cm sopra alla superficie articolare) (Figura 2.19). A questo punto, utilizzando una fresa diamantata cava, di calibro nominale di 10 mm, sono stati estratti i provini cilindrici di tessuto (Figura 2.20). La sezione è posta in un contenitore in PVC ed immersa in soluzione fisiologica per evitarne il surriscaldamento durante il taglio.

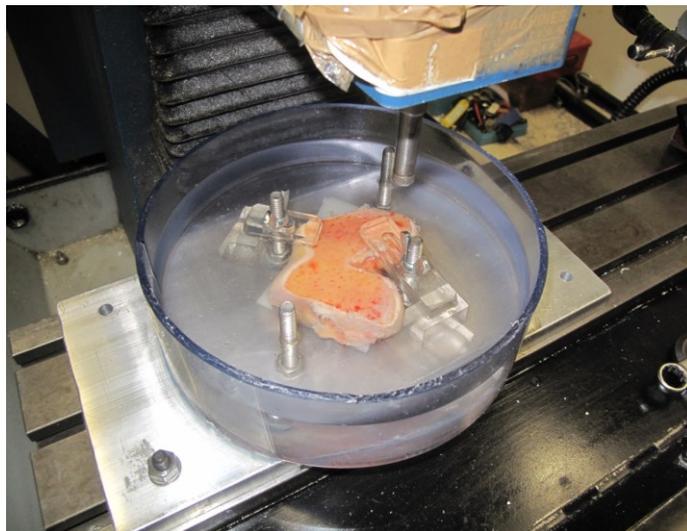


Figura 2.20 - Estrazione dei campioni cilindrici di tessuto mediante fresa CNC.

2.5.2 Allineamento dei provini

Utilizzando il dispositivo di allineamento, il provino è stato sospeso e mantenuto ortogonale alla testina in cui si è realizzato il primo *end-cap*. Una volta riempito il pozzetto della testina portacampione di PMMA (dosaggio: 70% polvere e 30% monomero in peso) e collocata la stessa nell'apposita sede del dispositivo di allineamento (Figura 2.21 A), è possibile affondare il provino nel cemento. Questa operazione deve essere eseguita utilizzando la punta di un truschino (Figura 2.21 B), precedentemente posta alla corretta altezza (23 mm più alta del bordo superiore della testina), per garantire che resti libera dal cemento una lunghezza di provino sufficiente a garantire, 20 mm di lunghezza utile ed altri 3 mm per il secondo *end-cap*. Durante il processo di polimerizzazione della resina occorre mantenere idratato il provino, in quanto l'aspirazione della cappa, necessaria vista la tossicità del monomero di PMMA, tende a disidratare il tessuto.

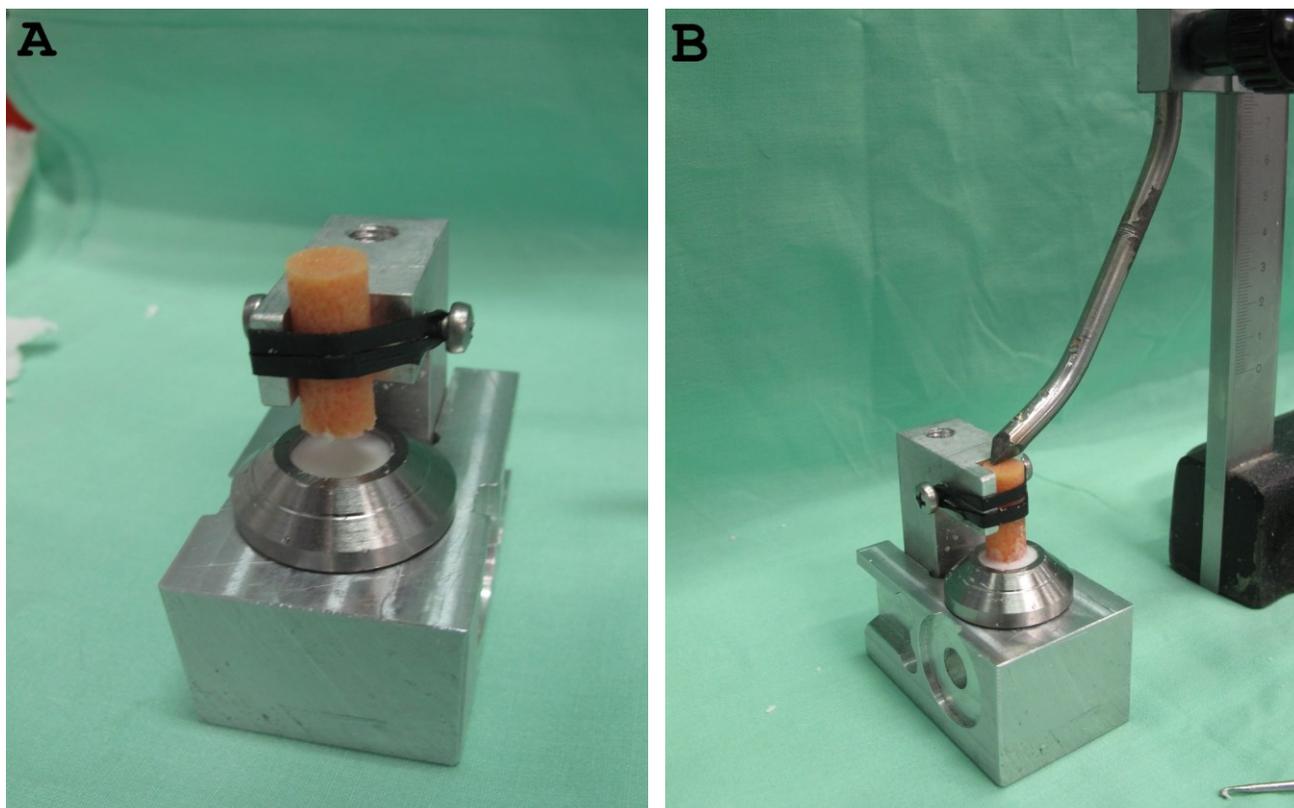


Figura 2.21 - (A) Prima fase della procedura di allineamento del provino. (B) Immersione del provino nel PMMA mediante truschino.

2.5.3 Applicazione dei riferimenti

Le sfere metalliche, che costituiscono il sistema di riferimento rispetto al quale misurare la posizione spaziale dell'estensometro, devono essere posizionate direttamente sulla superficie libera del cemento, senza che questo venga estratto dalla testina. In questo modo la testina stessa fornisce un ottimo appoggio per la presa in una morsa girevole graduata. Quest'ultima è stata collocata sotto un trapano a colonna e, utilizzando una punta da 1.5 mm, sono stati realizzati dei piccoli fori, di profondità di circa 0.5 mm (Figura 2.22 A), aventi la funzione di contenere le sfere, che possono essere incollate in queste posizioni mediante un adesivo a presa rapida (cianoacrilato) (Figura 2.22 B). Durante questa fase occorre prestare la massima attenzione: è molto facile far affondare completamente le sfere nella colla, non permettendo di rilevarne la quota mediante truschino in fase di misura (vedi 2.5.5 Riferimento per la registrazione della misura di deformazione). Al termine di tale procedura occorre estrarre il provino dalla testina ed eseguire l'acquisizione mediante μ CT (vedi 2.1.2 Scansione microtomografia computerizzata (μ CT)).

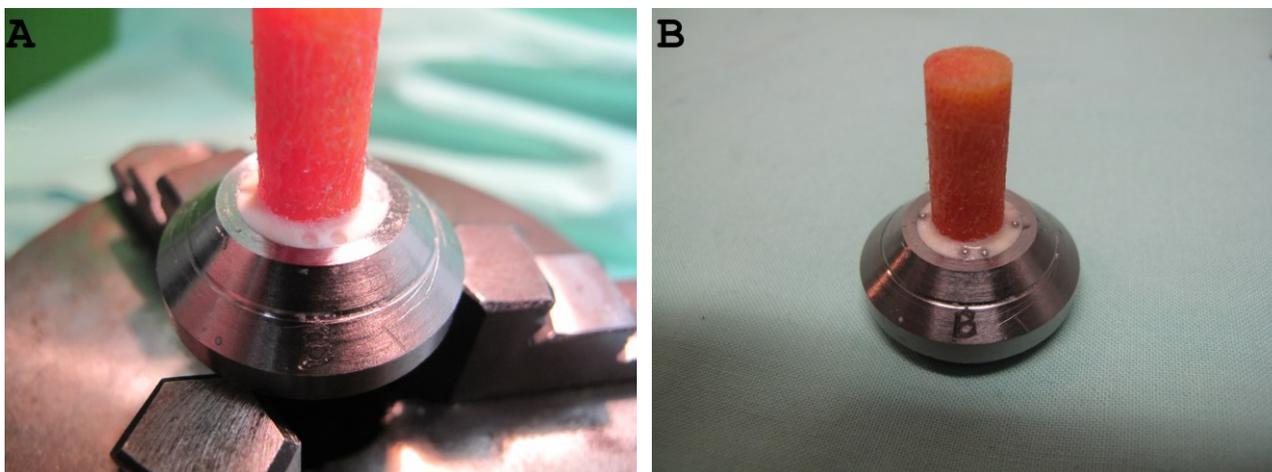


Figura 2.22 - (A) Dettaglio dei fori realizzati per contenere le sfere di riferimento. (B) Provino con sistema di riferimenti montati, pronto per la scansione in μ TC.

2.5.4 Montaggio in macchina

Una volta scansionati, i provini possono essere provati. Il campione deve essere ricollocato nella testina e quindi montato sulla macchina di prova (Figura 2.23 A). Utilizzando un truschino, è possibile determinare al decimo di millimetro la quota dell'attuatore per ottenere una lunghezza libera del provino pari a 20 mm (Figura 2.23 A e B). Al termine di questo passo si registra la posizione dell'attuatore, posizione che si dovrà ripristinare inserendo il provino nel pozzetto della testina portacampione una volta inserito il PMMA nello stesso pozzetto della testina. Quindi si solleva l'attuatore e si prepara e versa la resina (Figura 2.23 C) prima di riposizionare il provino nella posizione precedente.

Sempre allo scopo di preservare il tessuto, trascorsi circa 15-20 min dalla deposizione del PMMA, tempo in cui il provino è mantenuto idratato, è necessario sollevare l'attuatore e porre il provino a bagno in soluzione fisiologica (Figura 2.23 D) in attesa che il cemento polimerizzi completamente (circa 1 ora dalla preparazione) e assuma la rigidità adeguata.

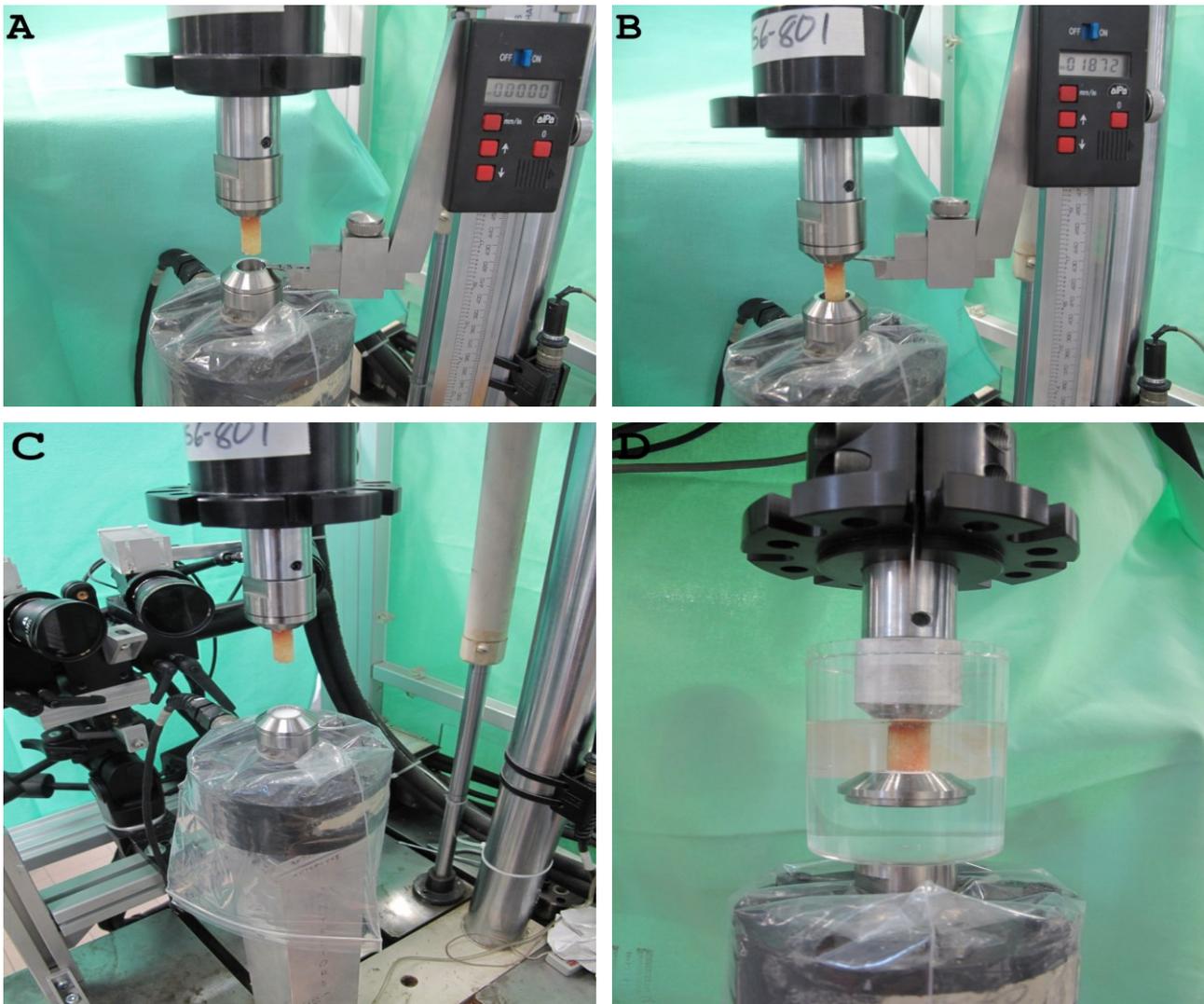


Figura 2.23 - (A) Azzeramento del truscino alla quota della testina inferiore. (B) Collocazione dell'attuatore secondo la quota target (18.7 mm) indicata da truscino. (C) Riempimento pozzetto di PMMA. (D) Idratazione del provino in attesa della completa polimerizzazione del PMMA.

2.5.5 Riferimento per la registrazione della misura meccanica di deformazione

Sono state ampiamente descritte le necessità inerenti la registrazione dei dati relativi alla misura della deformazione eseguita utilizzando l'estensometro. In questo paragrafo si vogliono fornire i dettagli operativi relativi alla misura della posizione relativa tra sfere ed estensometro. A tale scopo ho utilizzato un truschino digitale.

La generatrice a cui riferire la misura può essere agevolmente identificata visivamente dall'operatore, che provvede a tenerne traccia nelle intestazioni dei file di dati raccolti. Invece, per la misura della distanza sfera-estensometro, la procedura adottata è la seguente:

- Si porta la superficie superiore della punta del truschino a contatto con la sfera che identifica la generatrice in esame e si procede al suo azzeramento (Figura 2.24 A). Non essendo garantito che le sfere siano tutte alla stessa altezza tale passo deve essere ripetuto per ogni generatrice. Per agevolare questa operazione è meglio procedere a campo libero, cioè quando l'estensometro non è ancora stato posizionato sulla nuova generatrice, date le ridotte dimensioni dello spazio di manovra a disposizione e delle sfere.
- Si porta in contatto la superficie della punta del truschino con quella inferiore della lama superiore dell'estensometro (Figura 2.24 B) e si registra la misura approssimando al decimo di millimetro.

Occorre precisare che il truschino digitale è in grado di fornire misure precise al centesimo di millimetro. Questa rappresenta una precisione di un ordine di grandezza superiore a quella con cui si fornisce la misura. La scelta riguardo l'approssimazione è dettata dalla stessa procedura utilizzata

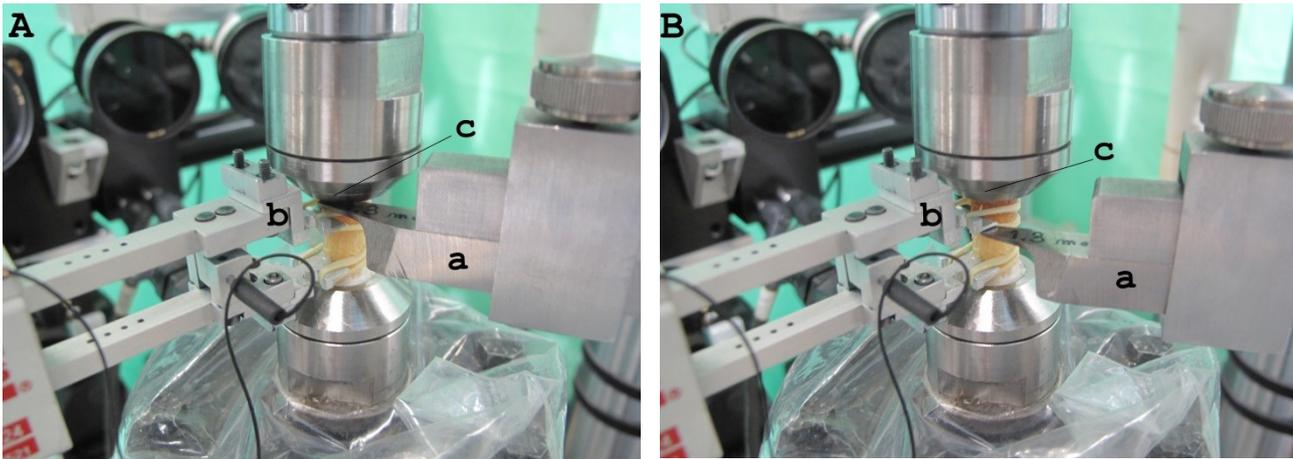


Figura 2.24 - (A) Rilevazione della quota delle sfera. (B) Rilevazione della distanza del coltello dell'estensometro dalla sfera.

- (a) Punta del truschino digitale.**
- (b) Coltello dell'estensometro.**
- (c) Posizione della sfera di riferimento (non visibile).**

per ricavare questa informazione. Nel momento in cui viene collocata la punta del truschino in contatto col coltello dell'estensometro, fissato al provino mediante due elastici, se ne perturba inevitabilmente la posizione. Ne consegue che fornire una misura al centesimo non avrebbe senso. Va comunque considerato il fatto che le analisi preliminari di sensitività condotte sul modello numerico dimostrano che l'identificazione della posizione con un'accuratezza del decimo di millimetro è sufficiente, in quanto variazioni nelle predizioni del modello numerico si hanno spostando la posizione dell'estensometro di almeno 1 mm (Iori, 2013), ovvero un ordine di grandezza superiore all'accuratezza con cui si identifica sperimentalmente la posizione spaziale dei coltelli dell'estensometro.

Completata questa operazione si procede con la prova di compressione, che prevede la misura delle deformazioni con la tecnica meccanica (vedi 2.6.2 Prove finalizzate alla validazione del modello numerico).

2.5.6 Realizzazione del *pattern* DIC

Come accennato in precedenza il DIC necessita della realizzazione, sulla superficie del provino da acquisire (Figura 2.24 A), di un *pattern* stocastico ad elevato contrasto. Questo è stato realizzato, utilizzando una penna aerografo, in due passi:

- Copertura con una fondo omogeneo di vernice bianca a base d'acqua (Figura 2.25 B).
- Copertura a "spruzzo" con vernice acrilica nera (Figura 2.25 C).

Il *pattern* deve avere determinate caratteristiche, specificate dal costruttore, variabili in funzione della finestra di misura da utilizzare. In generale la distribuzione di grigio deve essere non strutturata ed in particolare la dimensione dei puntini deve essere proporzionale all'estensione della finestra di misura. A tal scopo è stato necessario regolare diluizione della vernice, pressione erogata alla penna ed apertura dello spillo che regola il flusso di vernice. La scelta di questi parametri è stata fatta utilizzando nomografi redatti in un studio, svolto presso il Laboratorio, atto alla standardizzazione del processo di verniciatura (Lionello, 2013). Una volta realizzato il *pattern* non è più possibile idratare il provino, in quanto il velo d'acqua lucido disturba le camere causando saturazione diffusa delle immagini, impedendo di fatto l'acquisizione. Pertanto è fondamentale procedere celermente alle prove con DIC. Questo non è però un problema in quanto le prove con il DIC sono molto rapide, circa 30 min per condurre le prove (vedi 2.6.2 Prove finalizzate alla validazione del modello numerico).

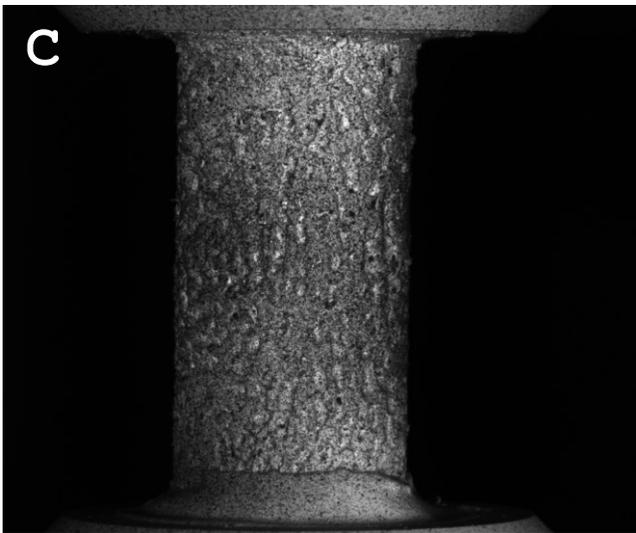
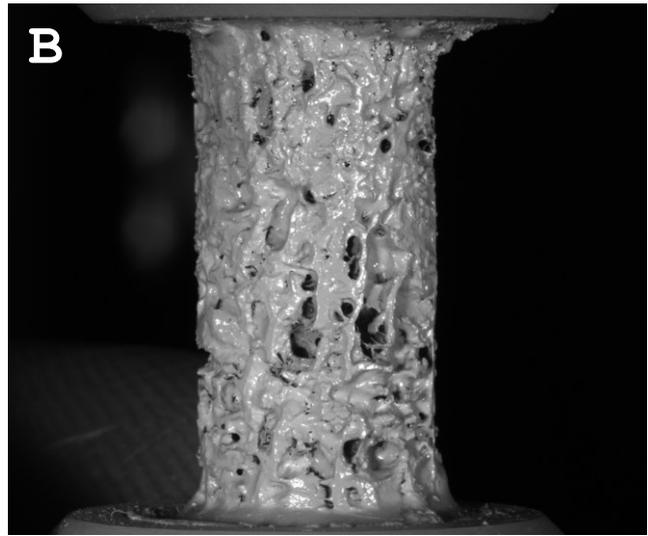
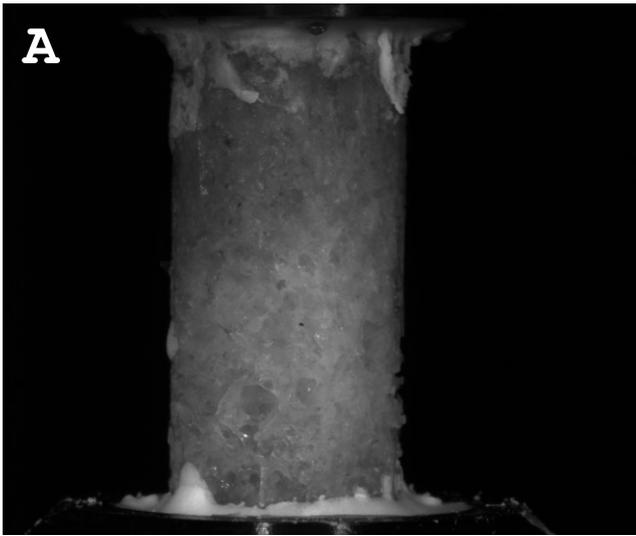


Figura 2.25 - Vista del provino con DIC a vari stadi della preparazione. (A) Prima della realizzazione del *pattern*. (B) Dopo la realizzazione del fondo coprente (vernice bianca a base d'acqua). (C) Dopo la realizzazione dei puntini stocastici ad alto contrasto (vernice acrilica nera).

2.6 ESECUZIONE DELLE PROVE

Ho condotte una serie di prove preliminari con obiettivi diversi ed a diversi stadi dello sviluppo del protocollo. Diversi provini sono stati testati prima di approdare alla versione definitiva del protocollo di prova con la tecnica ad estensometro precedentemente descritta. Infatti durante l'esecuzione delle prime prove, sono emersi aspetti non considerati in fase di progetto e che hanno reso necessaria una revisione del protocollo di prova. Anche per la messa a punto dell'acquisizione del campo di spostamento con la tecnica DIC è stata svolta una prova preliminare, su un provino non scansionato in μ CT, che non verrà presentata. Si farà pertanto riferimento ai soli provini testati secondo l'ultima versione del protocollo di prova di seguito descritto.

Nei paragrafi seguenti saranno brevemente descritte le modalità di prova relative ai punti fondamentali del mio studio:

- Effetto della vernice sul provino.
- Prestazioni de sistema DIC su provini di tessuto trabecolare.
- Protocollo sperimentale di validazione del modello numerico.

2.6.1 Prove preliminari

Ho eseguito una serie di prove preliminari finalizzate ad comprendere se fosse possibile utilizzare i dati DIC ai fini della validazione del μ FEM. Una necessità a riguardo, è quella di poter condurre le prove con DIC senza alterare le caratteristiche meccaniche del tessuto. Quindi, ho condotto una serie di prove per indagare l'effetto della vernice sul comportamento meccanico del tessuto in esame. Ho usato le stesse registrazioni anche per analizzare le prestazioni del sistema DIC sul tessuto trabecolare.

2.6.1.1 Verifica dell'effetto della vernice sul provino. Al fine di investigare quest'effetto sul provino ho testato quattro provini non scansionati in μ CT, quindi non sottoposti alla relativa preparazione. Le modalità ed i parametri di prova sono analoghi alle prove di validazione descritte in seguito. Ci si limita pertanto a descrivere la sola sequenza operativa:

- Ho eseguito un condizionamento delle interfacce tra provino e cemento di 20 cicli di carico.
- Ho acquisito quattro ripetizioni mediante estensometro collocato sul lato del provino visualizzabile dal DIC, per misurare le caratteristiche meccaniche del provino fresco.
- Ho eseguito altre quattro ripetizioni acquisendo con il sistema DIC.
- Ho ripetute le acquisizioni con l'estensometro al fine di confrontare i risultati ottenuti con i precedenti.
- Infine ho portato il provino al collasso acquisendone la deformazione mediante estensometro, in modo da disporre di dati accurati per valutare se variazioni nelle caratteristiche meccaniche dei provini, eventualmente

riscontrate, siano imputabili alla vernice o allo snervamento della struttura.

2.6.1.2 Analisi delle prestazioni del sistema DIC. Per questa analisi non ho condotto delle prove ulteriori. Ho infatti utilizzato i dati registrati nelle prove di verifica dell'effetto della vernice, confrontando il dato dell'estensometro sul provino fresco con quelli del sistema DIC (vedi 2.7.3 Analisi delle prestazioni del sistema di correlazione di immagini).

2.6.2 Prove finalizzate alla validazione del modello numerico

Ho provato un totale di quattro campioni cilindrici di tessuto trabecolare ai fini della validazione del modello numerico della microstruttura dei provini secondo il protocollo messo a punto. Tra le prove di validazione, una è stata condotta mediante la sola tecnica ad estensometro ed altre tre inserendo nel protocollo anche la tecnica DIC (Tabella 2.1). Le due tecniche di acquisizione sono state implementate sequenzialmente. Non vi sono alcune differenze nelle sollecitazioni imposte al provino nei due tipi di acquisizione. L'unica differenza è nel fatto che, utilizzando l'estensometro il provino è sempre fermo nella posizione in cui è stato colato durante il montaggio in macchina, è l'estensometro ad essere via via posizionato secondo le diverse generatrici, mentre per acquisire diverse proiezioni con DIC occorre ruotare il provino sul suo supporto, in quanto DIC non può essere spostato durante la prova. La rotazione del campione non è esente da problemi. Infatti, può accadere di non riuscire a condurre i test in condizione di compressione pura a causa degli errori di eccentricità che possono accumularsi nelle varie fasi della procedura (cementazione del provino, posizionamento delle testine sul supporto, ecc.). Anomalie di questo tipo possono comunque essere facilmente individuate dalle informazioni ricavate dall'analisi delle immagini.

Le prove finalizzate alla validazione del modello numerico sono state svolte come segue:

- Ho eseguito un condizionamento del provino per consentire eventuali assestamenti delle interfacce tra provino e cemento. A partire da una condizione di precarico di circa

-20 N, ho imposto una funzione sinusoidale, di ampiezza picco-picco di 0.20 mm e frequenza di 1 Hz, della durata di 20 cicli. Questo corrisponde ad una sollecitazione del provino ad una velocità di deformazione di 0.01 s^{-1} .

- Sempre partendo da un precarico di circa -20 N ho testato il provino, registrando la deformazione superficiale mediante estensometro, imponendo una rampa di spostamento a velocità costante di 0.20 mm/s, corrispondente ad una velocità di deformazione di 0.01 s^{-1} , per una corsa totale dell'attuatore di 0.20 mm. Per ogni generatrice sono state effettuate quattro ripetizioni al fine di aumentare l'accuratezza delle misure, senza ricollocare l'estensometro tra le ripetizioni ma procedendo solo all'azzeramento della distanza tra i coltelli e della relativa lettura.
- Con gli stessi parametri di prova (0.20 mm/s, -20 N di precarico e 0.20 mm di corsa), ho testato il provino acquisendo quattro ripetizioni per ogni generatrice con il sistema DIC. Questo è possibile, come detto, ruotando il provino, solidale alle testine in cui è vincolato, nella macchina di prova.
- Sempre con gli stessi parametri di prova (0.20 mm/s e -20 N di precarico), ho portato il provino a collasso imponendo una corsa dell'attuatore di 2 mm (l'acquisizione è stata effettuata mediante estensimetro o DIC a seconda del provino).

Le prove e le preparazioni a cui occorre sottoporre i provini sono sequenziali (vedi 2.3 Definizione della procedura operativa).

2.7 ANALISI DEI DATI

I dati raccolti con il sistema DIC sono stati elaborati, per ottenere le mappe di spostamento, mediante il software dedicato (ARAMIS v6.3, GOM). Attraverso lo stesso software sono state eseguite altre operazioni, eseguite in *post-processing*, quali:

- Procedura di registrazione per le prove di validazione del modello μ FEM.
- Collocazione degli estensometri virtuali utilizzato per l'analisi delle prestazioni di DIC sul tessuto trabecolare.

I dati raccolti mediante l'estensometro e quelli ricavati dagli estensometri virtuali appena citati, sono stati elaborati mediante MATLAB (The MathWorks Inc.), ambiente di calcolo nel quale è stato sviluppato il codice necessario a tal scopo. Di seguito viene riportata la descrizione dell'analisi effettuata riguardo alla specifica tipologia di prova condotta, unitamente ad alcune curve di carico e mappe di spostamento esemplificative dei metodi utilizzati.

2.7.1 Calcolo del modulo elastico dalla curva di carico

Ho effettuato il calcolo del modulo elastico, sui dati ottenuti mediante l'estensometro, procedendo nel seguente modo. La prima operazione eseguita è la conversione delle curve forza-spostamento in curve tensione deformazione. In seguito ho eliminato i dati relativi alla curva di scarico perché non di interesse. Su ogni ripetizione di una singola generatrice ho quindi isolato il tratto lineare ($R^2=0.995$) sulle curve convertite in diagrammi tensione-deformazione. A tal scopo ho considerato solo i dati a partire da un livello di carico superiore a -50 N. Quindi, procedendo ricorsivamente, ho eliminato via via punti dalla sequenza di dati fino a raggiungere un coefficiente di correlazione superiore al valore di soglia di 0.995 sui punti della curva restanti. Ottenuto il tratto lineare della curva, ho proceduto ad un'interpolazione ai minimi quadrati per ottenerne la pendenza, corrispondente al modulo elastico stimato del provino. Si riporta a titolo di esempio una curva elaborata in questo modo (Figura 2.26). I moduli elastici delle varie ripetizioni della stessa generatrice sono stati poi mediati ottenendo i **moduli elastici apparenti** (E_a) del provino. Gli E_a delle quattro generatrici sono stati mediati nuovamente per ottenere una stima del **modulo elastico complessivo** (E_c) del provino testato.

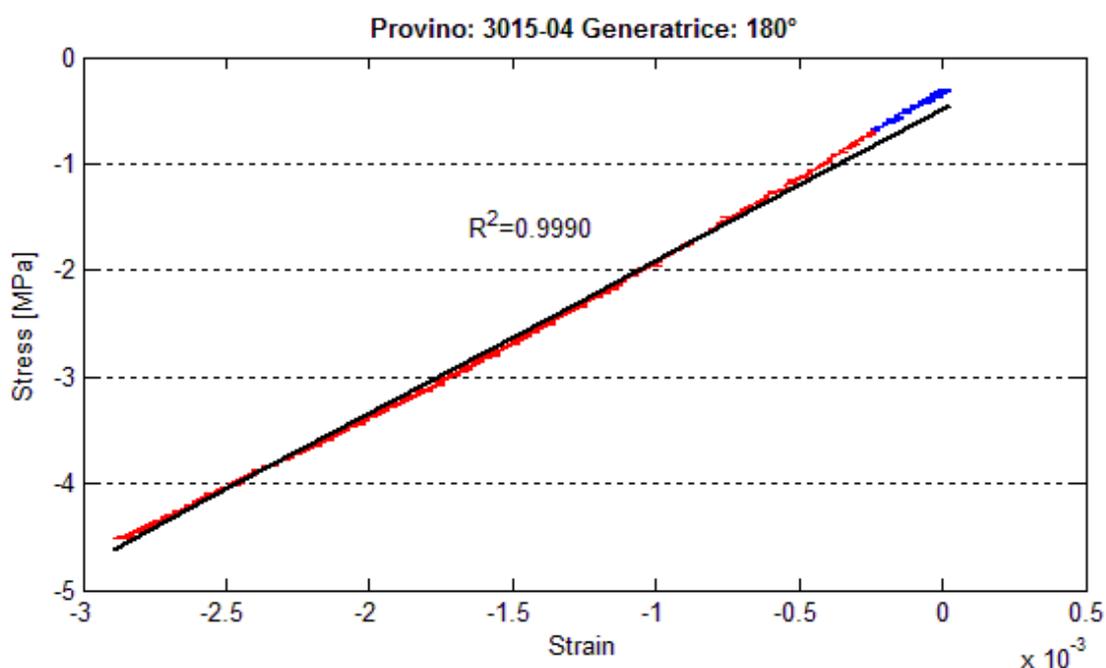


Figura 2.26 - Esempio di regressione lineare per il calcolo del modulo elastico: in blu i dati di partenza, in rosso quelli utilizzati per la regressione ed in nero la retta di regressione.

Successivamente, per verificare l'assunzione di aver condotto le prove in campo elastico, i valori di carico raggiunti nelle varie ripetizioni sono stati confrontati con quello della prova a rottura. Il criterio è che durante i test in campo elastico non si superi il 50% del carico di rottura misurato nell'ultima prova (Linde, 1994). Un'ulteriore verifica di questo aspetto è ottenibile confrontando, per ogni provino, le prime curve di carico ottenute con quella della prova a rottura: variazioni eventualmente riscontrate nella pendenza delle curve a rottura rispetto alle iniziali, delineano alterazioni nella microstruttura del materiale. Questo violerebbe l'assunto di condurre la prova sulla medesima struttura acquisita in μ CT, rendendo vano il tentativo di validazione del modello numerico ricavato. Anche per questa analisi, si riportano le curve di carico della generatrice 0° ed il tratto iniziale relativo alla prova a rottura condotta sulla medesima generatrice, a titolo di esempio (Figura 2.27).

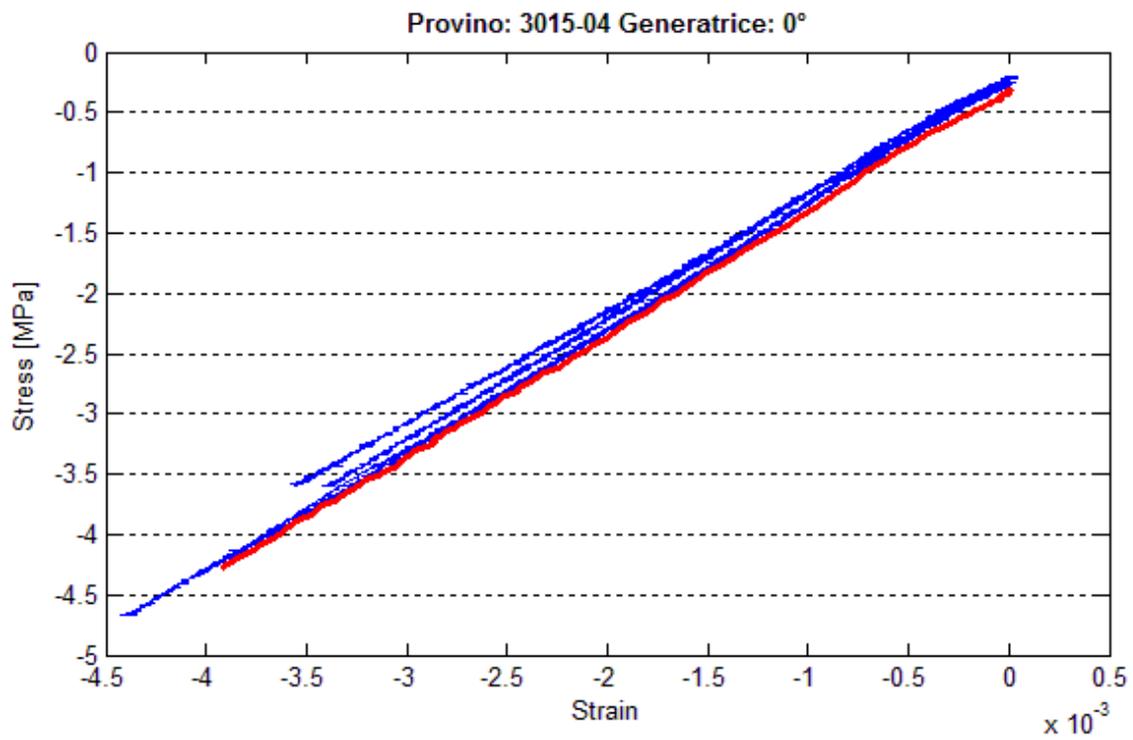


Figura 2.27 - Esempio di confronto della pendenza del tratto iniziale delle quattro curve di carico della generatrice 0° (in blu) con quella del tratto iniziale della curva di carico della prova a rottura della generatrice 0° (in rosso).

2.7.2 Analisi dell'effetto della vernice sul provino

La valutazione dell'effetto della vernice è stata condotta utilizzando i soli dati ottenuti tramite l'estensometro delle prove relative (vedi 2.6.1.1 Verifica dell'effetto della vernice sul provino). Ho proceduto al calcolo del modulo elastico complessivo, secondo la stessa modalità descritta nel paragrafo precedente per il calcolo del modulo dai dati dell'estensometro. Ho quindi calcolato per i provini, sia prima che dopo la verniciatura, il modulo elastico apparente per ogni generatrice. Sui risultati ottenuti ho eseguito un test statistico non parametrico per dati appaiati (Wilcoxon), per verificare se le differenze riscontrate dovessero essere imputate a fattori sistematici o accidentali.

2.7.3 Analisi delle prestazioni del sistema di correlazione di immagini

Le prestazioni del sistema di acquisizione DIC sono state analizzate confrontando le sue misure registrate durante le prove preliminari, si precisa che i provini utilizzati sono gli stessi utilizzati per l'analisi dell'effetto della vernice sui provini. Le misure fornite dall'estensometro sono state confrontate con quelle ottenute dal sistema DIC. A tal scopo ho sfruttato la possibilità di collocare nella fase di post-elaborazione delle immagini una serie di estensometri virtuali sulla mappa di spostamento (Figura 2.28) ed ottenere delle misure di spostamento puntuali, analoghe a quelle dell'estensometro. Operativamente, in ogni ripetizione sono

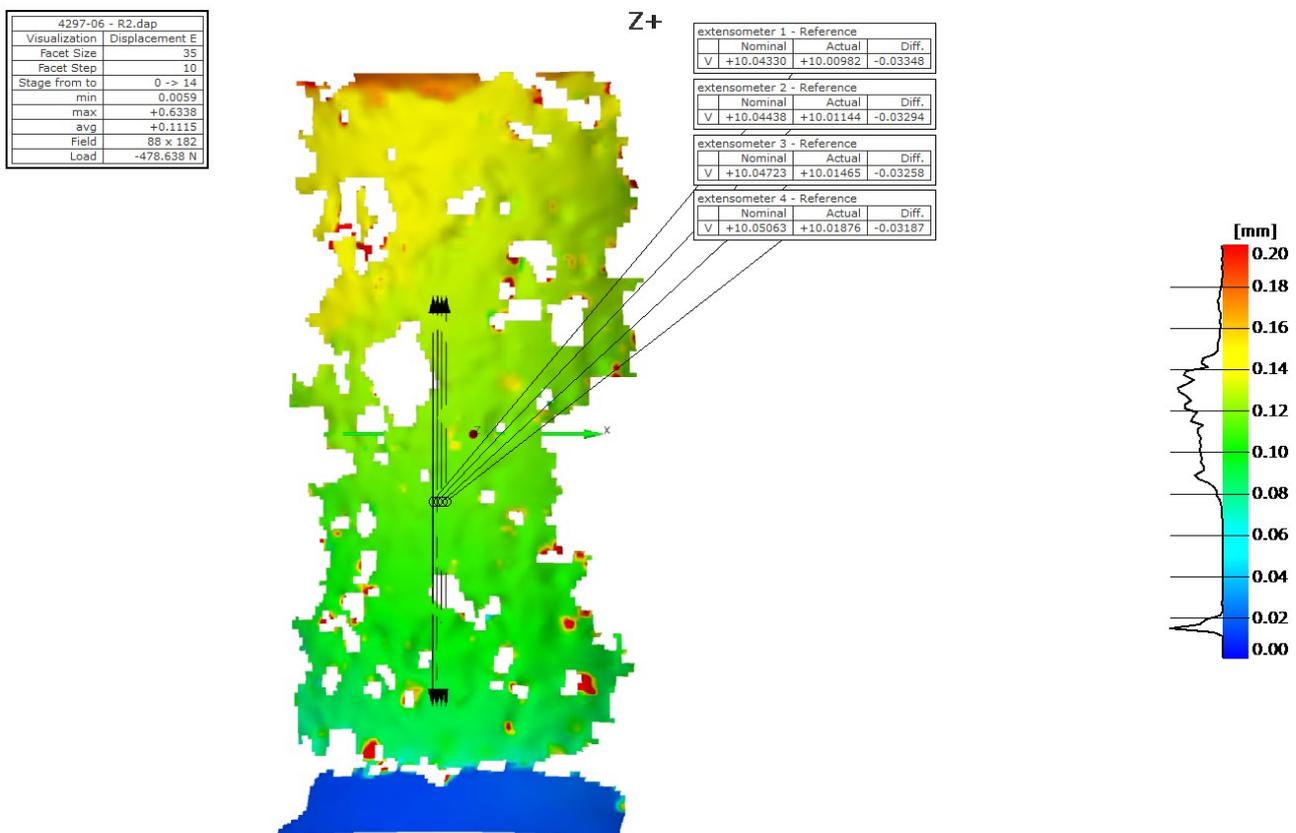


Figura 2.28 Esempio di collocazione degli estensometri virtuali sulla mappa di spostamento elaborata dal DIC relativa ad uno stato deformato del provino.

stati collocati quattro estensometri virtuali, in corrispondenza alla posizione in cui era stato posizionato l'estensometro reale durante le prove. Il numero di questi replica nell'elaborazione il contatto non puntuale che si verifica tra estensometro reale e provino. Tale posizione, nota grazie alle misure eseguite per identificare la posizione spaziale dell'estensometro nei provini scansionati, non è nota in questi provini in quanto le sfere non sono presenti. Per confrontare le due misure, si è quindi proceduto con l'assunzione di aver condotto le prove su un provino omogeneo. Questa ipotesi, ovviamente errata parlando di caratterizzazione del tessuto trabecolare, è indispensabile per poter confrontare i dati in quanto le lunghezze iniziali dell'estensometro reale e di quello virtuale non sono le stesse. Non è stato possibile collocare gli estensometri virtuali con la precisione necessaria. Ho considerato quindi il delta massimo di spostamento, fornito da estensometro reale e virtuale (media dello spostamento dei quattro collocati) imponendo l'ipotesi di omogeneità del provino su entrambi i dati. L'ipotesi di omogeneità, seppur palesemente errata, si riflette sul calcolo della grandezza da confrontare su entrambe le tecniche di acquisizione. Quindi ho calcolato i delta di spostamento massimi, dei quattro estensometri virtuali (i cui risultati sono stati mediati per ottenere una sola misura) e dell'estensometro reale, sotto l'ipotesi di omogeneità. Ovvero, per ogni ripetizione:

$$\Delta L_{\max} = \Delta L * L_{\text{ideale}} / L_{\text{vera}}$$

Dove, ΔL è il massimo delta di spostamento misurato attraverso l'estensometro reale o degli estensometri virtuali rispettivamente, L_{ideale} è la lunghezza di riferimento (stessa per estensometro reale e per i quattro virtuali pari a 10 mm) ed L_{vera} è la lunghezza di partenza vera misurata rispettivamente dall'estensometro virtuale e dagli estensometri virtuali. Operando questa proporzione i dati risultano

omogeneizzati ed è possibile il confronto diretto di quanto misurato dall'estensimetro reale (standard di riferimento) e dal sistema di acquisizione DIC (media del risultato ottenuto dai singoli estensometri virtuali). Confrontando i due risultati è quindi possibile stabilire le prestazioni, in termini di errore percentuale ed accuratezza, del sistema DIC rispetto alla tecnica ad estensometro in quanto, sull'osso trabecolare, quest'ultima è riconosciuta essere lo standard di riferimento.

CAPITOLO 3:

RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 PROVE PRELIMINARI

La serie di prove preliminari era finalizzata a rispondere a due quesiti sperimentali ovvero:

- Valutare l'effetto dell'applicazione della vernice sul provino per realizzare il pattern necessario per la misura delle deformazioni mediante tecnica ottica.
- Quantificare l'accuratezza con cui un sistema ottico può misurare gli spostamenti superficiali di un provino di tessuto osseo trabecolare durante una prova di compressione.

L'ordine con cui sono presentati tali risultati non è casuale. Infatti prima di poter inferire sulle capacità del sistema DIC occorre essere sicuri di escludere altri possibili artefatti, come appunto il potenziale effetto della vernice sulle caratteristiche meccaniche del provino. Il rationale delle valutazioni dei dati inerenti queste prove è quindi: se le variazioni sui dati, acquisiti con la tecnica ad estensometro prima e dopo la verniciatura, non sono attribuibili a fattori sistematici bensì casuali (test statistico di *Wilcoxon*) allora è possibile confrontare i dati DIC con quelli acquisiti prima della verniciatura per stabilire le prestazioni di DIC. Altrimenti, sapendo che il fattore sistematico verniciatura ha presumibilmente alterato le caratteristiche del provino, occorre eseguire la valutazione delle prestazioni di DIC rispetto ad uno standard di riferimento in cui siano presenti

gli stessi fattori sistematici, appunto le prove eseguite con l'estensimetro dopo quelle DIC. Questo però risulterebbe superfluo in quanto, causando un'alterazione delle caratteristiche del tessuto, la tecnica DIC non si potrebbe applicare affatto.

3.1.1 Effetto della vernice sul comportamento meccanico del provino.

Per la valutazione statistica dell'effetto della verniciatura sulle caratteristiche meccaniche del provino ho fatto ricorso al test non parametrico per dati appaiati di *Wilcoxon*. A tal scopo sono stati messi a confronto i valori di spostamento massimo e modulo elastico ottenuti nelle prove eseguite prima e dopo la verniciatura (Tabella 3.1). Il test statistico ha stabilito che non vi sono differenze nelle popolazioni analizzate ($p_{value}=0.14$). Sebbene la dimensione campionaria sia ridotta, i dati acquisiti supportano la legittimità ad utilizzare i dati registrati con l'estensometro prima della verniciatura come standard di riferimento per la valutazione delle prestazioni del DIC, per la quale si rimanda al paragrafo seguente.

Provini	Modulo elastico apparente [GPa]		Differenza %
	Fresco	Verniciato	
2503-06	1.73±0.03	1.71±0.01	-1.2%
3029-06	1.18±0.08	1.18±0.04	0.0%
3585-06	0.66±0.11	0.64±0.06	-3.0%
4297-06	2.17±0.19	2.10±0.56	-3.2%

Tabella 3.1 - Valori di modulo elastico apparente oggetto dello studio statistico. I provini *Fresco* sono in condizioni naturali mentre quelli *Verniciato* hanno subito la realizzazione del pattern DIC. Le misure sono riportate con tolleranza espressa come $\pm 2\sigma$.

Occorre sottolineare che, nonostante la scarsissima potenza statistica, solo in un caso le differenze percentuali riscontrate hanno superato il 3% (rif. int. 4297-06). Questo è un dato importante se si osserva l'ordine di grandezza della dispersione cui sono soggette le misure di questo caso specifico. Quindi si fa' notare come sia plausibile che le differenze percentuali osservate siano originate dalla

variabilità dei dati e non da fattori sistematici. Questo non elimina l'esigenza di programmare una campagna di prove che allarghi il campione statistico al fine di aumentarne la potenza.

3.1.2 Prestazioni del sistema di correlazione di immagini.

Per la valutazione delle prestazioni del sistema DIC ho messo a confronto i valori di variazione della distanza tra i due livelli su cui erano fissati i bracci dell'estensometro reale o virtuale. L'accuratezza delle misure DIC è stata quindi valutata in termini di errore percentuale ed accuratezza rispetto al *gold* di riferimento citato (Tabella 3.2).

Provini	Delta spostamento [μm]		Errore	Errore	Accuratezza
	Ext	DIC	[μm]	%	%
2503-06	29.7 \pm 4.6	33.1 \pm 7.6	3.4	11.4	4.5
3029-06	25.8 \pm 5.2	26.5 \pm 4.1	0.7	2.8	
3585-06	14.2 \pm 32.8	14.3 \pm 34.6	0.1	0.6	
4297-06	15.3 \pm 3.1	15.8 \pm 4.3	0.5	3.3	

Tabella 3.2 - Valutazioni delle prestazioni di DIC rapportate allo standard di riferimento (Ext). Le misure sono riportate con tolleranza espressa come $\pm 2\sigma$.

L'errore è contenuto in pochi punti percentuali ad eccezione di un caso (rif. int. 2503-06). Per questo caso l'errore massimo tra i valori medi è di 3.4 μm e l'accuratezza risultante è comunque soddisfacente. Infatti la precisione con cui il sistema riesce a riportare gli spostamenti è dello stesso ordine di grandezza degli elementi del modello della microstruttura. Inoltre si osserva che gli errori riscontrati potrebbero tranquillamente essere compatibili con l'incertezza dell'estensometro utilizzato sul tessuto trabecolare. Infatti, seppur l'estensometro abbia classe 0.5%, questa è valutata in condizioni operative ottimali, nel caso specifico l'estensometro è fissato in modo precario (elastici). Alla luce di questo è plausibile che l'incertezza dell'estensometro aumenti notevolmente rispetto a quella nominale.

L'accuratezza complessiva di DIC non è elevata ma, avendo in generale a che fare con misure la cui magnitudine è molto ridotta, ordine di qualche decina di μm , si può osservare che l'errore commesso da DIC riscontrato è quindi di pochissimi μm , valori più che ottimi. A supporto della tecnica DIC va notato che la dispersione sui dati è la medesima di quella dell'estensometro, ma quest'ultimo fornisce una misura puntuale. Il sistema DIC permette di raccogliere una quantità di informazione enormemente maggiore rispetto all'estensometro mantenendo le stesse prestazioni. Questo pone in una condizione di vantaggio intrinseco utilizzando il DIC.

3.2 PROVE FINALIZZATE ALLA VALIDAZIONE DEL MODELLO NUMERICO

In conformità agli obiettivi preposti al mio studio, mi sono concentrato sull'analisi dei risultati ottenuti in termini di possibilità di ottenere misure, accurate e ripetibili, utilizzabili per la validazione del modello numerico della microstruttura dei provini di osso trabecolare testati con la tecnica ad estensometro e DIC. In tale chiave di lettura, un aspetto rilevante, intrinseco alla microstruttura del tessuto osseo trabecolare, è l'effetto dell'anisotropia strutturale sulle caratteristiche meccaniche locali dell'osso, ovvero sul modulo elastico misurato sperimentalmente.

3.2.1 Misure mediante estensometro

Si ricorda che i moduli elastici delle varie ripetizioni della stessa generatrice sono stati mediati, ottenendo i moduli elastici apparenti (E_a) del provino. Gli E_a delle quattro generatrici sono stati mediati nuovamente per ottenere una stima del modulo elastico complessivo (E_c) del provino testato. L'alta variabilità di E_a su generatrici dello stesso provino, è un effetto diretto dell'anisotropia strutturale intrinseca ed è il motivo per il quale è stato sviluppato il metodo *end-caps* a quattro estensometri. Il μ FEM dovrebbe essere in grado di cogliere quest'effetto replicando gli andamenti di E_a riscontrati sperimentalmente. Rilevante per la validazione è l'affidabilità di E_c , questo è infatti fondamentale perché è il parametro sperimentale che entra nell'algoritmo che, sfruttando il μ FEM, stima il **modulo elastico reale del tessuto** (E_{tissue}). L'algoritmo di calcolo prevede che si assegni un valore di tentativo del **modulo elastico di tessuto** ($E_{\text{tissue},\text{FEM}}$) al FEM, corrispondente a 19 GPa, ed utilizzando E_a si definisce:

$$E_a/E_{\text{tissue}}=E_{a,\text{FEM}}/E_{\text{tissue},\text{FEM}}$$

Detta ipotesi di elasticità del modello, dove $E_{a,\text{FEM}}$ è il modulo elastico apparente del modello μ FEM, dalla quale si ricava:

$$E_{\text{tissue}}=(E_a/E_{a,\text{FEM}}) * E_{\text{tissue},\text{FEM}}$$

Pertanto l'attenzione è focalizzata su ripetibilità e accuratezza dei valori di E_a , ottenuti con la tecnica meccanica ad estensometro, per avere un dato affidabile per testare le reali potenzialità del modello μ FEM. L'accuratezza della stima di E_c non può essere confrontata, non disponendo del vero valore di modulo elastico del tessuto. Però, basando il calcolo di E_c su una serie di dati relativi a quattro ripetizioni su quattro generatrici, si può ritenere di

effettuare una stima accettabile ai fini modellistici, come suggerito anche dalla letteratura (Keaveny et al, 1997).

Alla luce di quanto detto, per ogni provino testato ho analizzato la variabilità degli E_a calcolati (Figura 3.1), riferiti a meno di due volte la deviazione standard calcolata sui moduli elastici delle varie ripetizioni (Tabella 3.3), riscontrando ottimi risultati.

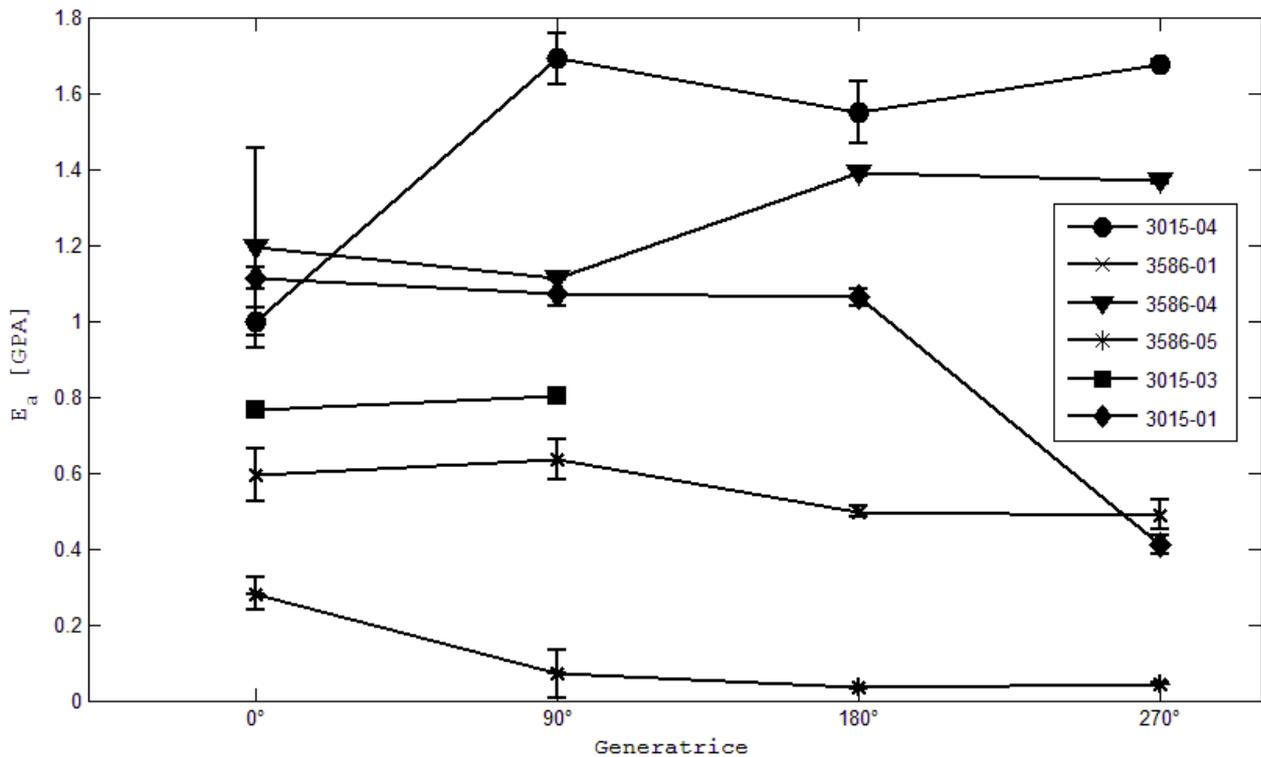


Figura 3.1 - Andamento dei moduli elastici apparenti (E_a) lungo le generatrici dei provini testati.

Provino	Modulo elastico apparente [GPa]				Modulo elastico [GPa]
	0°	90°	180°	270°	
3586-01	0.60±0.14	0.64±0.11	0.50±0.01	0.49±0.08	0.55±0.14
3015-04	1.00±0.07	1.70±0.13	1.55±0.17	1.68±0.02	1.48±0.66
3586-04	1.20±0.52	1.12±0.01	1.40±0.02	1.37±0.02	1.27±0.27
3585-05	0.28±0.09	0.07±0.13	0.03±0.00	0.03±0.00	0.11±0.23
3015-03*	0.77±0.02	0.80±0.02	*	*	0.79±0.05
3015-01	1.11±0.06	1.08±0.07	1.07±0.04	0.41±0.05	0.92±0.68

Tabella 3.3 Riassunti dei moduli elastici apparenti (E_a) lungo le generatrici dei provini testati, calcolati come media delle quattro ripetizioni effettuate su ogni generatrice. Le misure sono riportate con tolleranza espressa come $\pm 2\sigma$.

Si precisa che per un provino (rif. int. 3015-03) non è stato possibile calcolare misurare E_a sulle quattro generatrici a causa del danneggiamento durante l'esecuzione della prova sulla generatrice 180°, e che la deviazione massima dei dati riscontrata è 0.52 GPa per un solo provino (rif. int. 3586-04), mentre è inferiore a 0.17 GPa per tutti gli altri. Quindi l' E_c relativo, è stato calcolato mediando i due soli dati disponibili. Inoltre tutte le anomalie riscontrate sulle curve di carico in fase di elaborazione dei dati sono state valutate caso per caso. Queste anomalie possono derivare dall'urto dell'estensometro sulla superficie di una delle testine portacampione, scivolamenti della colata nel pozzetto della testina portacampione (nel caso si sia sfilata di qualche μm , durante la curva di scarico, per effetto ventosa tra la testina portacampione ed il relativo supporto), presenza di liquidi all'interfaccia, ecc.

Un'altra grandezza di interesse è il delta di spostamento massimo registrato dall'estensometro. Grazie alle informazioni per la registrazione dell'estensometro sul μFEM , è possibile identificare due volumi, corrispondenti alla zona di insistenza delle lame dell'estensometro, e vincolarne lo spostamento assiale all'informazione raccolta sperimentalmente (Iori, 2013). In particolare la lettura dell'estensometro

viene assunta essere la differenza tra lo spostamento medio dei nodi del FEM appartenenti ai due volumi identificati (Figura 3.2). Da questo si evince come, l'accuratezza dei dati di spostamento misurati sia una condizione sperimentale necessaria per le esigenze dello studio numerico.

Si precisa che è molto difficile ottenere misure accurate di grandezze così piccole ed i risultati ottenuti (Figura 3.3), la cui accuratezza è stata valutata in termini di deviazione dei dati (Tabella 3.4), possono considerarsi ottimi per i fini preposti in quanto, la dispersione massima è di 96 μm sulle uniche misure che si avvicinano ai 200 μm mentre è sempre inferiore a 20 μm per le altre.

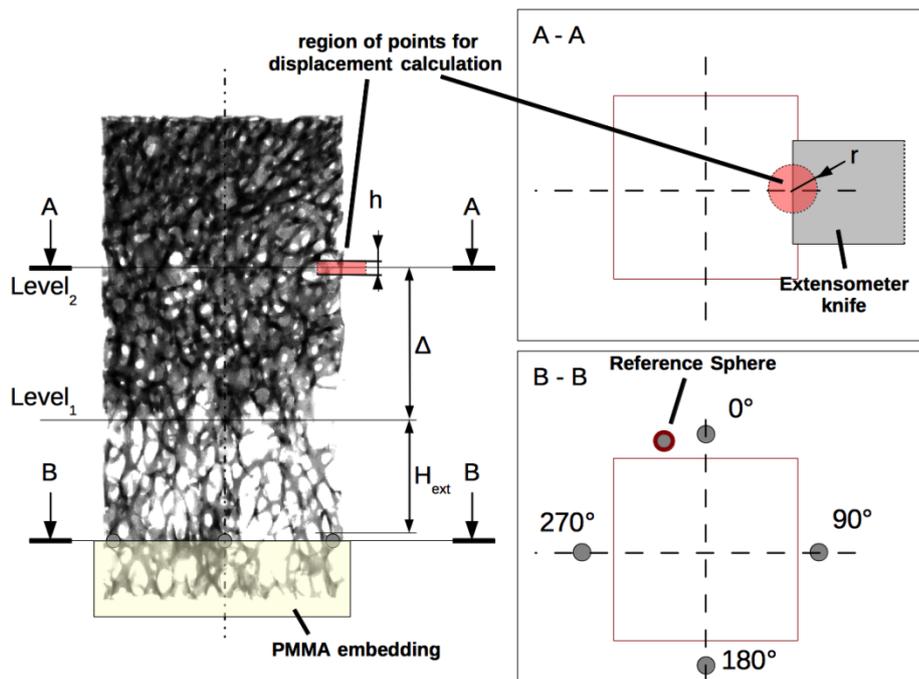


Figura 3.3 - Schematizzazione della registrazione dei dati di spostamento forniti dall'estensometro.

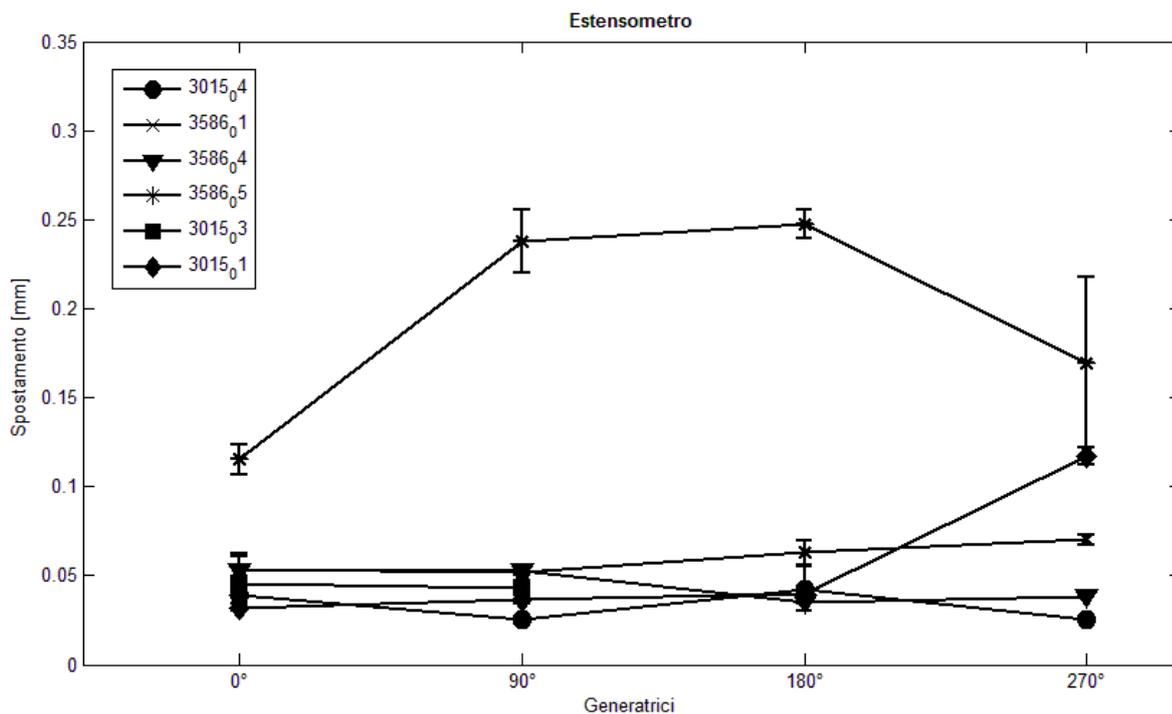


Figura 3.3 - Andamento del delta di spostamento lungo le generatrici dei provini testati.

Provino	Spostamento massimo [μm]			
	0°	90°	180°	270°
3586-01	53.8±14.6	52.1±3.0	62.8±13.4	70.1±5.1
3015-04	38.7±9.1	25.0±4.6	42.5±25.2	25.5±2.6
3586-04	52.5±20.2	52.5±3.3	35.4±2.2	38.6±1.5
3585-05	115.1±16.8	237.7±36.0	247.3±16	169.5±96
3015-03	45.1±7.1	42.9±5.0	*	*
3015-01	32.2±4.3	36.4±4.4	40.1±7.9	117.0±9.2

Tabella 2.2 - Riassunto dei valori di spostamento massimo. Le misure sono riportate con tolleranza espressa come $\pm 2\sigma$.

3.2.2 Misure mediante DIC

Le acquisizioni DIC sono state elaborate mediante il *software* dedicato, e rese disponibili alla modellazione. In questo contesto mi limito a riportare alcuni esempi di elaborazione volte a descrivere i punti forti e le debolezze del sistema DIC.

Come anticipato, la potenzialità di DIC è di fornire una grossa mole di informazioni a tutto campo (Figura 3.4). Disporre di accurate mappe degli spostamenti significa surclassare le misure ad estensometro in quanto raccolgono un'informazione puntuale.

In generale, nell'uso di DIC, occorre prestare massima attenzione alla realizzazione del *pattern*. Infatti, seppur il sistema abbia rivelato un certo grado di flessibilità, per un provino (rif. int. 3586-04) non è stato possibile effettuare l'elaborazione perché la distribuzione del *pattern* non era corretta, essendo eccessivamente sbilanciata verso lo scuro (Figura 3.5).

Dall'utilizzo del sistema DIC, è confermato che la tecnica ha difficoltà ad acquisire gli spostamenti su superfici irregolari, ovvero che presentano discontinuità come gli spazi tra le trabecole e cavità di grandi dimensioni (Figura 3.6). Le zone relative appaiono come grosse macchie nere, quindi illeggibili, o come zone altamente distorte, quindi intracciabili. Entrambi gli effetti, possono determinare di fatto l'impossibilità di calcolare i dati di spostamento superficiale. Questo può rivelarsi problematico nell'intento di applicare tale tecnica per l'acquisizione di provini trabecolari la cui frazione ossea è ridotta, come ad esempio i provini di tessuto trasecolare prelevato da pazienti osteoporotici o da distretti anatomici particolari.

La grossa potenzialità, compatibilmente con la problematica suddetta, è quella di fornire, oltre alla ricca informazione contenuta nella mappa di spostamento, un punto di vista nuovo nell'analisi della modalità di collasso del tessuto avendo la potenzialità di seguire la struttura con ottima accuratezza. Queste osservazioni non sono disponibili con la misura basata sull'uso dell'estensometro in quanto non si hanno a disposizione immagini del provino a diversi livelli di compressione.

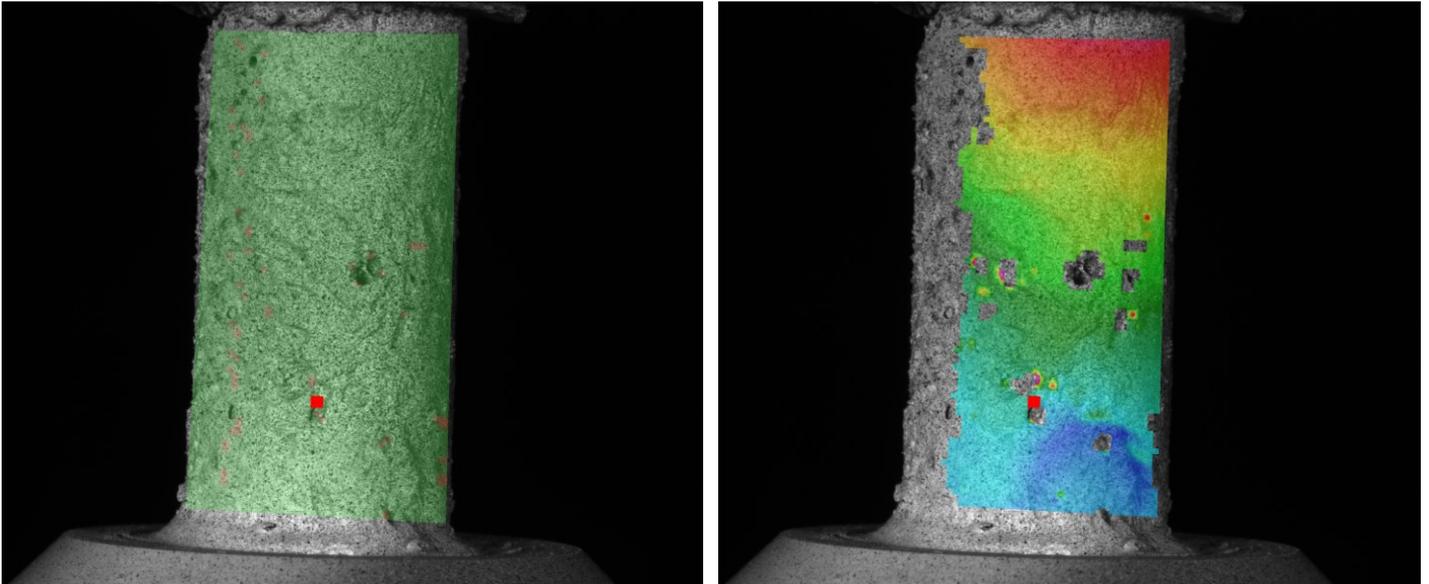


Figura 3.4 - Esempio di elaborazione ottima ottenuta mediante DIC.

(A) Dettaglio della scelta, effettuata tramite software della zona del provino da cui ricavare la mappa di spostamento. Il punto rosso è il punto di partenza per il calcolo (*start-point*).

(B) Mappa degli spostamenti ottenuta.



Figura 3.5 - Esempio acquisizione di un provino impossibile da elaborare, il *pattern* realizzato è troppo scuro.

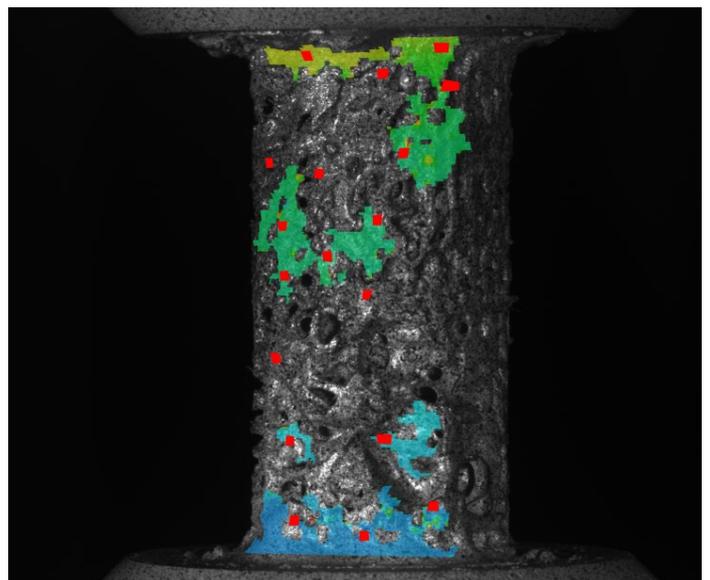


Figura 3.6 - Esempio di acquisizione di un provino problematico per DIC. La presenza di grossi spazi tra le trabecole non permette l'elaborazione di grosse zone della mappa di spostamento desiderata.

Il numero dei punti rossi (*start-point* dell'elaborazione collocati) palesano la difficoltà nell'elaborazione.

CAPITOLO 4:

CONCLUSIONI

4.1 CONCLUSIONI

Le prove sperimentali pianificate sono state portate a termine con successo. Tutti gli obiettivi sono stati raggiunti e soddisfatti.

Il nuovo protocollo sperimentale sviluppato è risultato efficace nel fornire dati utilizzabili nella validazione del modello numerico. L'accuratezza con cui si riescono a fornire le misure e le informazioni necessarie sono adeguate alle esigenze per quanto riguarda la tecnica ad estensometro. È inoltre risultato possibile effettuare la registrazione dei dati sperimentali utilizzando il protocollo sviluppato.

Il sistema di correlazione delle immagini (DIC) si è rivelato uno strumento potente nell'analisi del comportamento meccanico e sicuramente fornirà una notevole quantità di informazione supplementare utile ai fini della validazione del modello agli elementi finiti della microstruttura dei provini (μ FEM), nonostante i limiti. Dai dati ricavati dalle prove preliminari è emerso che la realizzazione del pattern per l'acquisizione DIC non comporta alterazioni nel comportamento meccanico dei provini ($p_{\text{value}}=0.14$) con differenze percentuali rilevate nel calcolo del modulo elastico minori del 3,2%. Da sottolineare che una valutazione accurata sull'effetto della vernice su una popolazione campionaria ampia è uno dei punti fondamentali per arrivare a considerare la tecnica DIC pari in prestazioni potenziali a quella mediante estensometro. Le prestazioni di

DIC sono ottime, ho ottenuto un'accuratezza complessiva del 4,5% osservando una differenza massima, tra gli spostamenti misurati da estensometro e DIC, di 3.4 μm . Va precisato che, anche se non di pari accuratezza, il sistema DIC offre una quantità di informazione molto superiore a quella dell'estensometro.

I risultati delle prove di validazione sono ottimi, il calcolo del modulo elastico apparente, relativo alla singola generatrice del provino, è risultato molto accurato, con dispersioni minori di 0.17 GPa. Questo è estremamente rilevante al fine della validazione del modello μFEM . La dispersione rilevata sulle misure di spostamento è inferiore a 20 μm .

La campagna di prove pianificata per il proseguo del presente studio, confermerà o smentirà quanto ipotizzato.

4.2 SVILUPPI FUTURI

Questo studio ha permesso di definire un protocollo sperimentale che sarà utilizzato per il proseguimento del progetto di ricerca in corso e che prevede lo sviluppo di un modello agli elementi finiti del tessuto osseo. Inoltre è già in corso di valutazione l'opzione di eseguire le misure di deformazione acquisendo con la tecnica meccanica ed ottica contemporaneamente. La campagna dovrà prevedere anche uno studio approfondito dell'effetto della vernice sul comportamento meccanico del tessuto osseo trabecolare che allarghi la verifica ad un ampio numero di provini, per avere la potenza statistica necessaria ad escludere che le piccole differenze osservate siano dovute ad un errore sistematico.

Importante, al termine della campagna di prova sarà possibile inferire in modo robusto sulle potenzialità del modello sperimentale ma, ancora più importante, sarà possibile disporre di una mole di dati sperimentali accurati, grazie ai quali effettuare la validazione del modello numerico agli elementi finiti della microstruttura del tessuto osseo. Qualora si raggiungesse l'obiettivo, si avrebbe a disposizione uno strumento (μ FEM) per studiare gli affetti di patologie sulla qualità del tessuto osseo, in quanto sarebbe basato su una solida base sperimentale.

Un'ulteriore mia proposta è l'evoluzione del modello sperimentale per condurre le prove acquisendo mediante estensometro e DIC contemporaneamente, disponendo i due strumenti su due generatrici opposte ed eliminando gli elastici di supporto dell'estensometro (Figura 2.10). Questo permetterebbe di migliorare il confronto tra le due tecniche e la precisione su cui si inferisce sulle prestazioni del sistema DIC.

Inoltre propongo la conduzione, parallelamente alla campagna di acquisizione già in programma, di uno studio della capacità di acquisizione del DIC rapportata all'indice **BV/TV (Bone Volume su Total Volume)** per esplorare il reale limite della tecnica DIC nelle applicazioni su tessuto trabecolare.

BIBLIOGRAFIA

- Adachi T, Tsubota K, Tomita Y, Hollister SJ. *Trabecular surface remodeling simulation for cancellous bone using microstructural voxel finite element models*. J Biomech Eng. 2001 Oct;123(5):403-9.
- Ashman, R.B., 1982. *Ultrasonic determination of the elastic properties of cortical bone: techniques and limitations*. Ph.D. thesis, Tulane university, New Orleans, LA.
- Bayraktar, H.H., Morgan, E.F., Niebur, G.L., Morris, G.E., Wong, E.K., Keaveny, T.M., 2004. *Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue*. J Biomech. 37, 27-35.
- Blok Y, Gravesteijn FA, van Ruijven LJ, Koolstra JH. *Micro-architecture and mineralization of the human alveolar bone obtained with microCT*. Arch Oral Biol. 2010 Oct 31.
- Bobby TC, Ramakrishnan S. *Characterization of trabecular structure in human femur radiographic images using ridgelet transform and support vector machines*. Biomed Sci Instrum. 2008;48:532-9.
- Bonfield, W., Li, C.H., 1968. *The temperature dependence of the deformation of bone*. J Biomech. 1, 323-329.
- Bonfield, W., Tully, A.E., 1982. *Ultrasonic analysis of the Youngs modulus of cortical bone*. J Biomed Eng. 4, 23-27.
- Boyce, T.M., Fyhrie, D.P., Glotkowski, M.C., Radin, E.L., Schaffler, M.B., 1998. *Damage type and strain mode associations in human compact bone bending fatigue*. J Orthop Res. 16, 322-329.
- Bruyère Garnier K, Dumas R, Rumelhart C, Arlot ME. *Mechanical characterization in shear of human femoral cancellous bone: torsion and shear tests*. Med Eng Phys. 1999 Nov;21(9):641-9.
- Burstein, A.H., Reilly, D.T., Martens, M., 1976. *Aging of bone tissue: mechanical properties*. J Bone Joint Surg Am. 58, 82-86.
- Carter, D.R., Hayes, W.C., 1977. *The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure*. J Bone Joint Surg Am. 59, 954-962.

- Cowin, S., 2001. *Bone Mechanics Handbook*. Second edition, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Cuppone, M., Seedhom, B.B., Berry, E., Ostell, A.E., 2004. *The longitudinal Young's modulus of cortical bone in the midshaft of human femur and its correlation with CT scanning data*. *Calcif Tissue Int.* 74, 302-309.
- Dempster, W.T., Liddicoat, R.T., 1952. *Compact bone as a non-isotropic material*. *Am J Anat.* 91, 331-362.
- Depalle B, Chapurlat R, Walter-Le-Berre H, Bou-Said B, Follet H. *Finite element dependence of stress evaluation for human trabecular bone*. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013 Feb;18:200-12.
- Evans, F.G. Preservation effects. In: Burdi, A.R., editor. *Mechanical properties of bone*. Springfield, Illinois, USA: Charles C Thomas publisher; 1973. p. 56-60.
- Faulkner KG, Cann CE, Hasegawa BH. *Effect of bone distribution on vertebral strength: assessment with patient-specific nonlinear finite element analysis*. *Radiology.* 1991 Jun;179(3):669-74.
- Fiala, P., Hert, J. *Principal types of functional architecture of cancellous bone in man*. *Funct Dev Morphol.* 1993;3(2):91-9.
- Ford JC, Wehrli FW. *In vivo quantitative characterization of trabecular bone by NMR interferometry and localized proton spectroscopy*. *Magn Reson Med.* 1991 Feb;17(2):543-51.
- Goff MG, Slyfield CR, Kummari SR, Tkachenko EV, Fischer SE, Yi YH, Jekir MG, Keaveny TM, Hernandez CJ. *Three-dimensional characterization of resorption cavity size and location in human vertebral trabecular bone*. *Bone.* 2012 Jul;51(1):28-37.
- Goh, J.C., Ang, E.J., Bose, K., 1989, *Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones*. *Acta Orthop Scand.* 60, 465-467.
- GOM, 2009. *ARAMIS User Manual - Software*. GOM mbH.
- Goulet, R.W., Goldstein, S.A., Ciarelli, M.J., Kuhn, J.L., Brown, M.B., Feldkamp, L.A., 1994. *The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone*. *J. Biomech.* 27, 375-389.
- Guo, X.E., 2001. *Mechanical properties of cortical bone and cancellous bone tissue*. In: Cowin, S. (Ed.), *Bone Mechanics Handbook*, Second ed. CRC Press, Boca Raton, USA, p. 10.01-23.
- Grimal, Q., Hauptert, S., Mitton, D., Vastel, L., Laugier, P., 2009. *Assessment of cortical bone elasticity and strength: mechanical testing and ultrasound provide complementary data*. *Med Eng Phys.* 31, 1140-1147.

-
- Hamer, A.J., Strachan, J.R., Black, M.M., Ibbotson, C.J., Stockley, I., Elson, R.A., 1996. *Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone.* J Bone Joint Surg Br. 78, 363-368.
- Harrigan, T.P., Jasty, M., Mann, R.W., Harris, W.H., 1988. *Limitations of the continuum assumption in cancellous bone.* J. Biomech. 21, 269-275.
- Hazrati Marangalou J, Ito K, van Rietbergen B. *A new approach to determine the accuracy of morphology-elasticity relationships in continuum FE analyses of human proximal femur.* J Biomech. 2012 Nov 15;45(16):2884-92.
- Hébert D, Lebrun R, Marivaux L. *Comparative three-dimensional structure of the trabecular bone in the talus of primates and its relationship to ankle joint loads generated during locomotion.* Anat Rec (Hoboken). 2012 Dec;295(12):2069-88.
- Hermann, G. *The Classic: The Architecture of the Trabecular Bone (Tenth Contribution on the Mechanics of the Human Skeletal Framework).* Clin Orthop Relat Res. 2011 November; 469(11): 3079-3084.
- Iori G. *Micro-FEM models based on micro-CT reconstructions for the in-vitro characterization of the elastic properties of trabecular tissue.* Università degli studi di Bologna, Ingegneria Meccanica presso Laboratorio di Tecnologia Medica (Istituto Ortopedico Rizzoli).
- Keaveny, T.M., Borchers, R.E., Gibson, L.J., Hayes, W.C., 1993a. *Theoretical analysis of the experimental artifact in trabecular bone compressive modulus.* J. Biomech. 26, 599-607.
- Keaveny, T.M., Borchers, R.E., Gibson, L.J., Hayes, W.C., 1993b. *Trabecular bone modulus and strength can depend on specimen geometry.* J. Biomech. 26, 991-1000.
- Keaveny, T.M., Pinilla, T.P., Crawford, R.P., Kopperdahl, D.L., Lou, A., 1997. *Systematic and random errors in compression testing of trabecular bone.* J. Orthop. Res. 15, 101-110.
- Keller, T.S., Mao, Z., Spengler, D.M., 1990. *Young's modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone.* J Orthop Res. 8, 592-603.
- Keller, T.S., 1994. *Predicting the compressive mechanical behavior of bone.* J Biomech. 27, 1159-1168.
- Lionello et al. *Applicazione del pattern su provini da sottoporre a Digital Image Correlation (DIC).* MPP 33, 2011.
- Linde, F., Hvid, I., 1989. *The effect of constraint on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens.* J. Biomech. 22, 485-490.

- Linde, F., Hvid, I., Madsen, F., 1992. *The effect of specimen geometry on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens.* J. Biomech. 25, 359-368.
- Linde, F., Sorensen, H.C., 1993, *The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone.* J Biomech. 26, 1249-1252.
- Linde F. *Elastic and viscoelastic properties of trabecular bone by a compression testing approach.* Dan Med Bull. 1994 Apr;41(2):119-38.
- Lotz, J.C., Gerhart, T.N., Hayes, W.C., 1991. *Mechanical properties of metaphyseal bone in the proximal femur.* J Biomech. 24, 317-329.
- Majudmar S, Kothari M, Augat P, Newitt DC, Link TM, Lin JC, Lang T, Lu Y, Genant HK. *High-resolution magnetic resonance imaging: three-dimensional trabecular bone architecture and biomechanical properties.* Bone 1998 May;22(5):445-54.
- Malluche, H.H., Faugere, M.C., 1986. *Atlas of mineralized bone histology.* Karger AG, Basel, Switzerland.
- McCalden, R.W., McGeough, J.A., Barker, M.B., Court-Brown, C.M., 1993. *Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure.* J Bone Joint Surg Am. 75, 1193-1205.
- Nyman, J.S., Roy, A., Tyler, J.H., Acuna, R.L., Gayle, H.J., Wang, X., 2007. *Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone.* J Orthop Res. 25, 646-655.
- Odgaard, A., Linde, F., 1991. *The underestimation of Young's modulus in compressive testing of cancellous bone specimens.* J. Biomech. 24, 691-698.
- Odgaard, A., 1997. *Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture.* Bone 20, 315-328.
- Ohman, C., Baleani, M., Perilli, E., Dall'Ara, E., Tassani, S., Baruffaldi, F., Viceconti, M., 2007. *Mechanical testing of cancellous bone from the femoral head: experimental errors due to off-axis measurements.* J Biomech. 40, 2426-2433. Epub 2007 Jan 2425.
- Ohman, C., Dall'Ara, E., Baleani, M., Van Sint Jan, S., Viceconti, M., 2008. *The effects of embalming using a 4% formalin solution on the compressive mechanical properties of human cortical bone.* Clin Biomech (Bristol, Avon). 23, 1294-1298.
- Parr WC, Chamoli U, Jones A, Walsh WR, Wroe S. *Finite element micro-modelling of a human ankle bone reveals the importance of the trabecular network to mechanical performance: new methods for*

-
- the generation and comparison of 3D models.* J Biomech. 2013 Jan 4;46(1):200-5.
- Potdevin G, Malecki A, Biernath T, Bech M, Jensen TH, Feidenhans'l R, Zanette I, Weitkamp T, Kenntner J, Mohr J, Roschger P, Kerschnitzki M, Wagermaier W, Klaushofer K, Fratzl P, Pfeiffer F. *X-ray vector radiography for bone micro-architecture diagnostics.* Phys Med Biol. 2012 Jun 7;57(11):3451-61.
- Sedlin, E.D., Hirsch, C., 1966, *Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone.* Acta Orthop Scand. 37, 29-48.
- Smith, C.B., Smith, D.A., 1976. *Relations between age, mineral density and mechanical properties of human femoral compacta.* Acta Orthop Scand. 47, 496-502.
- Silva MJ, Gibson LJ. *Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure.* Bone. 1997 Aug;21(2):191-9.
- Smith, C.B., Smith, D.A., 1976. *Relations between age, mineral density and mechanical properties of human femoral compacta.* Acta Orthop Scand. 47, 496-502.
- Snyder, S.M., Schneider, E., 1991. *Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography.* J Orthop Res. 9, 422-431.
- Un, K., Bevill, G., Keaveny, T.M., 2006. *The effects of side-artifacts on the elastic modulus of trabecular bone.* J. Biomech. 39, 1955-1963.
- Wang C, Wang L, Liu X, Fan Y. *Numerical simulation of the remodelling process of trabecular architecture around dental implants.* Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2012 May 9.
- Weaver, J.K., 1966, *The microscopic hardness of bone.* J Bone Joint Surg Am. 48, 273-288.
- Weiss, L., 1990. *Cell and tissue biology, A Textbook of Histology.* Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- Williams, P.L., 1995. *Gray's anatomy.* 38th edition, Churchill Livingstone, London, UK.
- Yosibash, Z., Tal, D., Trabelsi, N., 2010. *Predicting the yield of the proximal femur using high-order finite element analysis with inhomogeneous orthotropic material properties.* Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 368, 2707-2723.
- Zioupos, P., Currey, J.D., 1998. *Changes in the stiffness, strength, and toughness of human cortical bone with age.* Bone. 22, 57-66.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Laboratorio di Tecnologia Medica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli per avermi dato la possibilità di portare a termine questo progetto. Un ringraziamento particolare va al mio relatore, Prof. Ing. Luca Cristofolini, e ai miei correlatori, Ing. Massimiliano Baleani e Dott. Pani Martino.

Ripensando a quello che mi lascio alle spalle..

Un ringraziamento speciale lo devo al mio cervello, che ha resistito senza troppe ripercussioni alle fatiche di questi anni... alla fine non ci sono rimasto troppo!

Un grazie a tutti i ragazzi del Laboratorio, per come siete e per l'atmosfera che solo grazie a voi è possibile vivere in Laboratorio. In particolare a Giacomo, per aver con pazienza sopportato le mie continue richieste... sono in arrivo più birre di quante secondo me riesci a reggere!

Grazie ai miei vecchi, non mi avete mai fatto mancare niente. Grazie ai vostri sacrifici sono qui oggi, sono sicuro che siete orgogliosi di me e spero a mia volta, da genitore, di riuscire in quello che siete riusciti a fare per me in una vita. Pensate a voi e godetevi un po' di riposo... è proprio ora! Vi voglio bene!

Tu invece Lucia, un esserino speciale... poco ma sicuro! Sarei perso senza te, mi rammarica il fatto che con le misere frasi che sono in grado di mettere insieme non riuscirei mai spiegarti la mia gratitudine... ti amo!

Chi altro... Pàmela compagna fedele... poi gli altri...