

NOI HIDROGELURI pH si TERMOSENZITIVE PENTRU REGENERAREA TESUTULUI CARTILAGINOS

SINTEZA LUCRARI CONTRACT 249 / 2010/ Faza 3

1. INTRODUCERE

Chitosanul este o biopoliaminozaharida liniara si este al doilea cel mai raspandit biopolymer dupa celuloza[1, 2]. Are o structura cationica, rezulta din deacetilarea partiala a chitinei si contine unitati de glucozamina si N-acetilglucozamina (Fig.1) Aceasta structura este similara glicozaminoglicanilor naturali (GAG) si din acest motiv polimerului are o bioactivitate extrem de ridicata[3]. Chitosanul poate fi metabolizat de enzimele umane cum este "lizoziima".

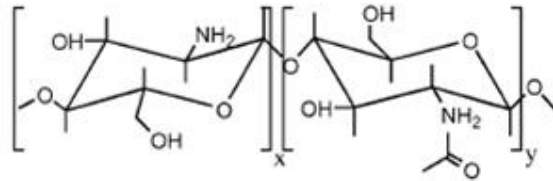


Fig. 1 Structura chimica a chitosanului

Datorita biocompatibilitatii, biodegradabilitatii, a caracterului imunogen scazut si a naturii sale cationice, chitosanul a fost investigat pentru mai multe aplicatii in domeniul ingineriei tesuturilor. Cu toate acestea chitosanul nemodificat poate fi dizolvat numai in solutii acide datorita legaturilor de hydrogen intermoleculare, ceea ce limiteaza utilizarile sale ca hidrogel. Derivatii de chitosan solubili in apa ajuta cresterea celulelor iar compozitele de chitosan si alte proteine bioactive sunt capabile a crea o ambienta biomimetica adecvata pentru implantarea celulelor[4, 5, 6].S-au realizat hidrogeluri din derivatii de chitosan prin gelifiere cu glutaraldehida, radiatii UV, sau termic. Recent, pe chitosan , au fost grefate lanturi de poly(*N*-isopropylacrylamide) si grupari *N*- isobutirice pentru a obtine hidrogeluri termosensibile[12-14]. Prin grefarea pe chitosan a vanilinei sau hidroxibenzaldehidei s-au realizat produsi reticulabili prin UV hidrogelurile derivate avand o compatibilitate imbunatatita[7, 8]. Hidrogelurile pe baza de chitosan se foloseste pentru reconstructii celulare de tipul tesuturilor moi (piele, cartilagii, vase de sange) sau dure (oase etc.). Raportul dintre unitatile glucozaminice si suma acestora cu unitatile *N*-acetyl-glicosamine este cunoscut drept grad de deacetilare (DD). In functie de provenienta polimerului si procedeul de preparare DD poate varia intre 30 – 95 % [9, 10, 11]. Masa moleculara, gradul de deacetilare si cristalinitatea chitosanului sunt principalii parametric structurali care influenteaza solubilitatea, rezistenta mecanica, si degradabilitatea materialelor pe baza de chitosan.

Se cunosc polimeri care in solutii apoase suporta tranzitii de faza induse de valoarea temperaturii sau de valoarea pH^{uliu} . O astfel de tranzitie este schimbarea brusca de solubilitate ca raspuns la cresterea temperaturii mediului. La aceasta temperatura procesul de hidratare al polimerului prin formarea legaturilor de hidrogen intre apa si polimer, devine nefavorabil in comparatie cu interactiunile polimer – polimer, apa – apa. O tranzitie brusca are loc cand macromoleculele solvate din solutia apoasa se deshidrateaza rapid si de aceea se transforma in structuri mai hidrofobe care se separa sub forma de gel[12, 13]. Gelifierea poate avea loc si prin reticulare ionica[14, 15] dupa o schimbare a pH-ului[16, 17] sau a temperaturii cand se produce o tranzitie ghem – globula. Se considera ca aceasta tranzitie este guvernata de balanta hidrofil – hidrofob si de energia libera de amestecare[18, 19]care este descrisa de relatia: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. La cresterea temperaturii creste mai mult termenul $T\Delta S$ si de aceea energia libera are valoare negativa ceea ce inseamna asocierea macromoleculelor. Dependenta de temperatura a anumitor interactiuni moleculare cum ar fi legaturile de hidrogen si efectele hidrofobe, contribuie la separarea fazelor. Aceste tipuri de hidrogeluri sunt cunoscute ca hidrogeluri inteligente, pH si termo-senzitive. La incalzirea acestor solutii in intreaga masa apar zone fizice de jonctiune ale segmentelor lanturilor de polimer pentru a forma hidrogelul.

Datorita structurii chimice policationice, chitosanul este insolubil in solventi neutri sau alcalini. Este insa solubil in solutii acide ($pH < 6.2$) datorita transformarii prin protonarea stoechiometrica a grupelor aminice libere de pe lanturile macromoleculare in forma solubila RNH^+ [20] ceea ce inseamna formarea unor solutii polielectrolitice. Daca se neutralizeaza grupele amino ale chitosanului (NH_3^+) prin folosirea unor complexe poliolic dibazice si daca se creste si temperatura atunci se formeaza geluri in urma unui proces de separare de faze[14, 15, 16, 17]. Se pot obtine in acest mod hidrogelurilor inteligente de tip termo si pH senzitive pe baza de chitosan.

Solubilitatea polimerului la temperaturi scazute se datoreste probabil hidratarii de catre complexul poliolic dibazic folosit in scopul realizarii hidrogelului. La incalzire lanturile de chitosan pierd apa de hidratare, lanturile se lipesc si astfel se formeaza hidrogelul.

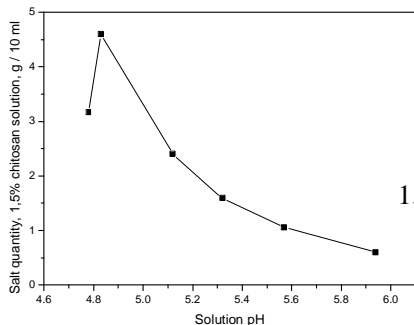
Se presupune ca formarea hidrogelului dintre chitosan si complexii poliolici dibazici se datoreaza urmatoarelor tipuri de interactii: neutralizarea lanturilor de chitosan datorita atractie electrostatica dintre chitosan si complexii poliolici dibazici, legaturii de hidrogen intre lanturile de chitosan neutralizate, interactiuni hidrofobe chitosan – chitosan[21, 22] . Mai exista si opinia ca la acest mecanism mai contribuie si caracterul hidrofob de structurare al apei al restului organic din complexul poliolic[22]. In mod necesar formarea hidrogelului are loc la cresterea brusca a ponderii fortelor de atractie hidrofobe de apropiere a lanturilor polimerice si a legaturilor de hidrogen asupra fortelor de repulsie electrostatica intercatenara. Mecanismul nu este insa inca pe deplin elucidat.

Controlul balantei hidrofil / hidrofob si a energiei libere de amestecare a solutiilor de chitosan permite realizarea unei game largi de hidrogeluri cu o gama larga de proprietati mecanice corespunzatoare pentru regenerarea tesuturilor moi (piele, cartilagii). Necesitatile practice de materiale pentru ingineria reparatorie a tesutului adipos sunt numeroase. Principalele proprietati ale hidrogelurilor utilizabile in acest domeniu sunt proprietatile mecanice care au valori mai mari decat in cazul tesutului adipos[23, 24, 25].

Lucrarile desfasurate au avut drept scop studierea posibilitatilor de control a balantei hidrofob – hidrofil in vederea realizarii unor hidrogeluri pH si termosensitive pe baza de chitosan si chitosan modificat ca urmare a unei tranzitii sol - gel produsa la temperatura fiziologica de 37 °C si un pH variabil intre 6.9 si 7.4 in aprox.3 ore. Alte conditii urmarite au fost ca hidrogelurile sa nu fie citotoxice, sa aiba proprietati mecanice care sa permita utilizarea in ingineria tesutului cartilagos si sa aiba o consistenta variabila, de la cazul in care nu sunt miscibile cu mediul de cultura pana la cel in care este posibila manipularea. Studiile efectuate au avut in vedere selectia noilor hidrogeluri in mai multe trepte inclusiv cea de testare a comportarii ca suport pentru cresterea celulelor, testare care a fost efectuata de coordonatorul de proiect.

2. LUCRARI PENTRU REALIZAREA SI CARACTERIZAREA UNOR NOI SUPORTURI 3-D PE BAZA DE CHITOSAN PENTRU REGENERAREA TESUTRULUI CARTILAGINOS

Lucrarile sau efectuat folosind 3 topuri de chitosan cu grade de deacetilare (DD) de: 75, 93, 90. S-a selectat ca varianta de lucru pentru testarea capacitatii de crestere si proliferare celulara tipul cu 75 DD. S-au realizat solutii acide de chitosan cu concentratii din intervalul 1 – 3 % polimer, folosind diferiti acizi in diferite concentratii. S-a renunta la solutiile cu concentratie de 2 si 3 % chitosan din cauza viscozitatii foarte mari. Aceste solutii au fost tratate cu proceduri specifice pentru indepartarea componentilor mic molecular. In functie de tipul acidului utilizat pentru protonare, in scopul realizarii unui pH de 6.9 – 7.4, s-au avut in vedere diferite variante de neutralizare. S-au folosit saruri de tipul complexilor polioliici bazici care s-au asociat cu altele care se regasesc in mediile de cultura celulare. S-a corelat valoarea pH cu concentratia sarurilor folosite (Fig.2).Din considerente legate de protejarea conditiilor optime de crestere a celulelor, s-au eliminat variantele in care, pentru realizarea pH neutru, se foloseau cantitati mari din aceste saruri. In studiile efectuate s-a reusit sa se identifice posibilitatile de reducere a



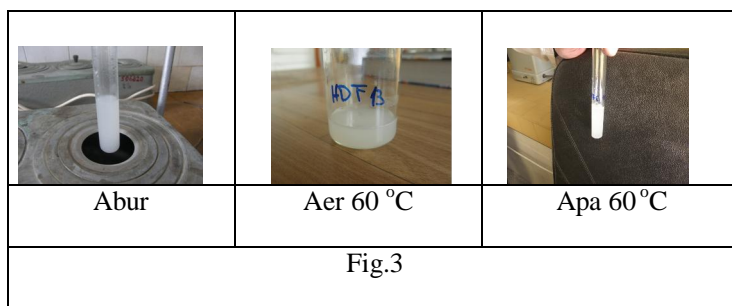
cantitatii de protonant si implicit de neutralizant cu conditia pastrarii conditiilor in care are loc tranzitia sol – gel adica 37 °C si pH= 6.9 – 7.4 .

Fig.2 Dependenta cantitatii sarii neutralizante de pH solutiei care se protoneaza

S-a constatat ca consistenta hidrogelurilor variaza in functie de concentratia sarurilor neutralizante si de modul de introducere a acestora in sistemul de reactie. S-a testat efectul asupra consistentei hidrogelurilor a introducerii sarurilor neutralizante sub forma de solutii apoase, de solutii in diferite solutii tampon sau ca pulbere. In cazul solutiilor cu 1.5 % chitosan s-a constatat ca consistenta hidrogelurilor scade de la varianta manipulabila la cea cu consistenta scazuta specifica hidrogelului care nu se amesteca cu mediul de cultura daca raportul polimer – neutralizant variaza de la 40 la 5. Daca concentratia solutiei de polimer este 2 %

atunci limita inferioara a consistentei se atinge cand raportul polimer – neutralizant este 3. Valoarea optima a raportului polimer – neutralizant s-a selectat in functie de consistenta hidrogelului si de eficienta acestora ca suport de crestere celulara . Pentru cresterea valorilor proprietatilor mecanice ale hidrogeluri obtinute s-au avut in vedere variante de crestere a densitatii de reticulare prin introducerea unor componente de reticulare covalenta a chitosanului (genipin) cat si realizarea unor hidrogeluri hibride prin asocierea chitosanului cu alti polimeri naturali (gelatina, alginat de sodiu). S-a observat ca reticularea covalenta cu genipin se desfasoara cu viteza foarte mica si ca pe masura de reactia evolueaza suportul se coloreaza in nuante din ce in ce mai inchise de albastru. La concentratii mici de saruri neutralizante, cu cat reactia este mai avansata cu atat consistent hidrogelului este mai pronuntata si se apropie de valoarea care permite manipularea usoara a hidrogelurilor. Aceste lucrari sunt in desfasurare. Hidrogelurile chitosan - alginat au nuante opace de diferite intensitati, in functie de raportul de compundare. Studiile de realizare a unor hidrogeluri pH si termosensitive de tip hybrid pe baza de chitosan sunt in desfasurare.

Formarea hidrogelurilor pH si termosensitive pe baza de chitosan s-a urmarit prin identificarea valorilor de temperature si pH la care solutia polimerica se transforma din incolora in opalescenta (fig.3). O prima selectie a variantelor de lucru a avut in vedere variantele in care tranzitia sol – gel are loc la 37 °C si pH = 6.9 – 7.4 si care conduc la hidrogeluri cu consistent intre cele doua limite mentionate: sa nu fie miscibile cu mediul de cultura ca limita inferioara si sa fie manipulabile.



Un rezultat interesant s-a obtinut la testarea stabilitatii noilor hidrogeluri in conditii dynamo mecanica (37 °C timp de 20 min. la 1 Hz).S-a analizat comportarea hidrogelurilor in domeniul de frecvente 0.1 – 10 Hz (Fig.4). Dupa cum se observa din aceasta figura modulul de stocare si rigiditatea sunt doua proprietati care la frecvente mai mici de 5 Hz cresc continuu. Daca frecventa este intre 5 si 10 Hz se observa ca dupa cca. 20 – 25 min. aceste proprietati ating o valoare de palier. Modul de variatie a modulului de pierderi se poate interpreta ca o scadere a defectelor de structura a hidrogelurilor cu cresterea solicitarilor mecanice care actioneaza asupra acestuia. S-ar parea ca in aceste conditii reactia de formare a gelului continua si din acest motiv proprietatile elastice ale acestor hidrogeluri cresc iar la un anumit nivel al solicitarilor mecanice ating valori de palier. Explicatia pare plauzibila daca ne gandim la starea de ghem afanat sau mai putin afanat pana la cea de globula specific tranzitiei de faza sol – gel prin care se formeaza hidrogelul de chitosan. S-ar parea ca solicitarile mecanice ajuta macromoleculele de chitosan sa formeze hidrogelul, adica sa traca din starea de ghem in cea de globula. Aceste aspecte se vor elucida in cadrul studiilor in desfasurare legate de mecanismul de formare al hidrogelurilor pH si termosensitive pe baza de

chitosan și chitosan modificat. Comportarea hidrogeluri în condiții dynamo – mecanice a fost un alt nivel de selecție a noilor hidrogeluri și a vizat variante cu comportare similară țesuturilor cartilajinoase.

Un alt criteriu de selecție a fost eficiența noilor hidrogeluri ca suporturi pentru dezvoltare celulară. Rezultatele testelor de creștere celulară au demonstrat că eficiența noilor hidrogelurilor ca suporturi 3 – D pentru creșterea celulelor este condiționată de următorii parametri: tipul acidului cu care se efectuează protonarea chitosanului în soluții apoase și concentrația acestuia, gradul de îndepărtare a componentelor polimerice micromoleculare din soluția de chitosan, concentrația și tipul sărurilor folosite pentru neutralizarea chitosanului protonat, morfologia hidrogelurilor, modul de realizare a nivelului dorit pentru proprietățile mecanice. S-a selectat ca mediu de realizare a soluțiilor de chitosan un acid organic slab care are activitate microbiologică ridicată. S-a renunțat la toate variantele compoziționale în care concentrația sărurilor neutralizante depășea valorile specifice mediilor de cultură. Tranzitia sol – gel se produce în condiții mult mai controlabile dacă se îndepărtează componentii micromoleculare din soluțiile cu care se lucrează. Analiza SEM a noilor hidrogeluri a arătat că dacă nu se folosește o procedură de control a caracteristicilor microarhitecturii porilor atunci hidrogelurile sunt formate din pori neuniformi ca formă și dimensiuni, au o microarhitectură puternic neomogenă (fig.5). Prin procedura freeze – drying s-a reușit să se realizeze hidrogeluri cu pori sferici, uniformi, interconectați și cu dimensiuni sub 100 μm. Suporturile realizate în acest mod au asigurat condiții bune de creștere și dezvoltare celulară. Omogenitatea porozității noilor hidrogeluri a fost un alt criteriu de selecție important. Porozitatea și raportul de gonflare s-a măsurat pentru hidrogelurile care au dovedit o bună comportare ca și suporturi pentru creșterea celulelor (Fig.7). Sunt în curs de efectuare studii pentru creșterea gradului de interconectivitate laterală și eventual a diametrului mediu al porilor. Gradul de hidratare al acestor hidrogeluri este de 83 % (Fig.8) iar raportul de gonflare la echilibru este de 38 – 40 % (Fig.9)

Analiza microarhitecturii porilor în funcție de gradul de hidratare al hidrogelului și de cel de gonflare demonstrează că este posibil ca gradul de reticulare al noilor hidrogeluri să fie puțin prea ridicat. Deși hidrogelurile au o porozitate uniformă, totuși dimensiunea relativ redusă a porilor și a gradului de interconectare laterală pot fi, alături de gradul de hidratare și de raportul de gonflare la echilibru dovezi că gradul de reticulare al acestor suporturi este ridicat. Nivelul proprietăților elastice de 2000 – 2200 Pa impune continuarea studiilor pentru găsirea celor mai bune metode de creștere a mărimii ochiurilor, a gradului de interconectivitate laterală și a valorii proprietăților elastice.



Fig.7 Hidrogeluri pH și termosensibile care au demonstrat o bună comportare ca și suporturi pentru cultivarea celulelor

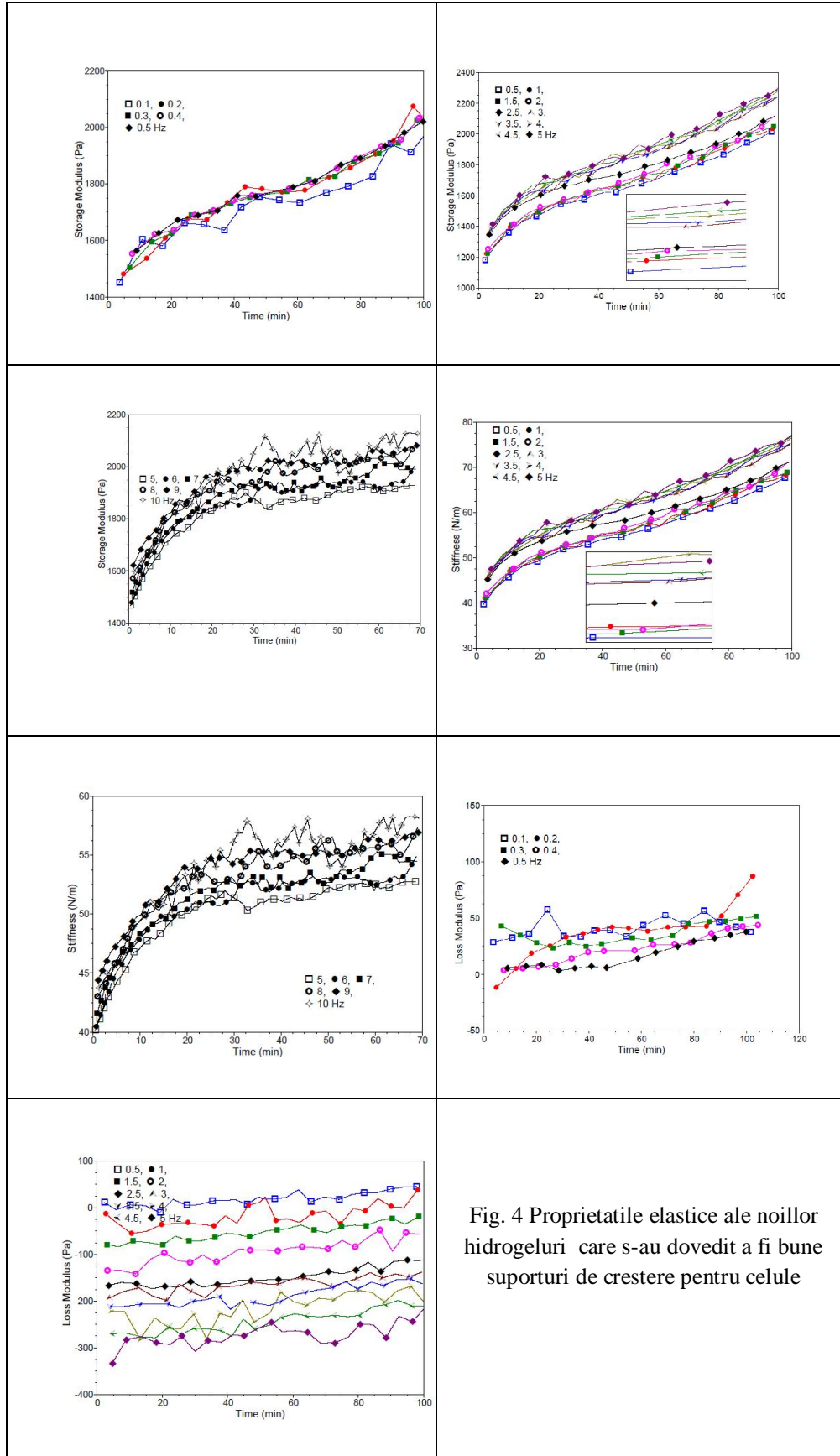
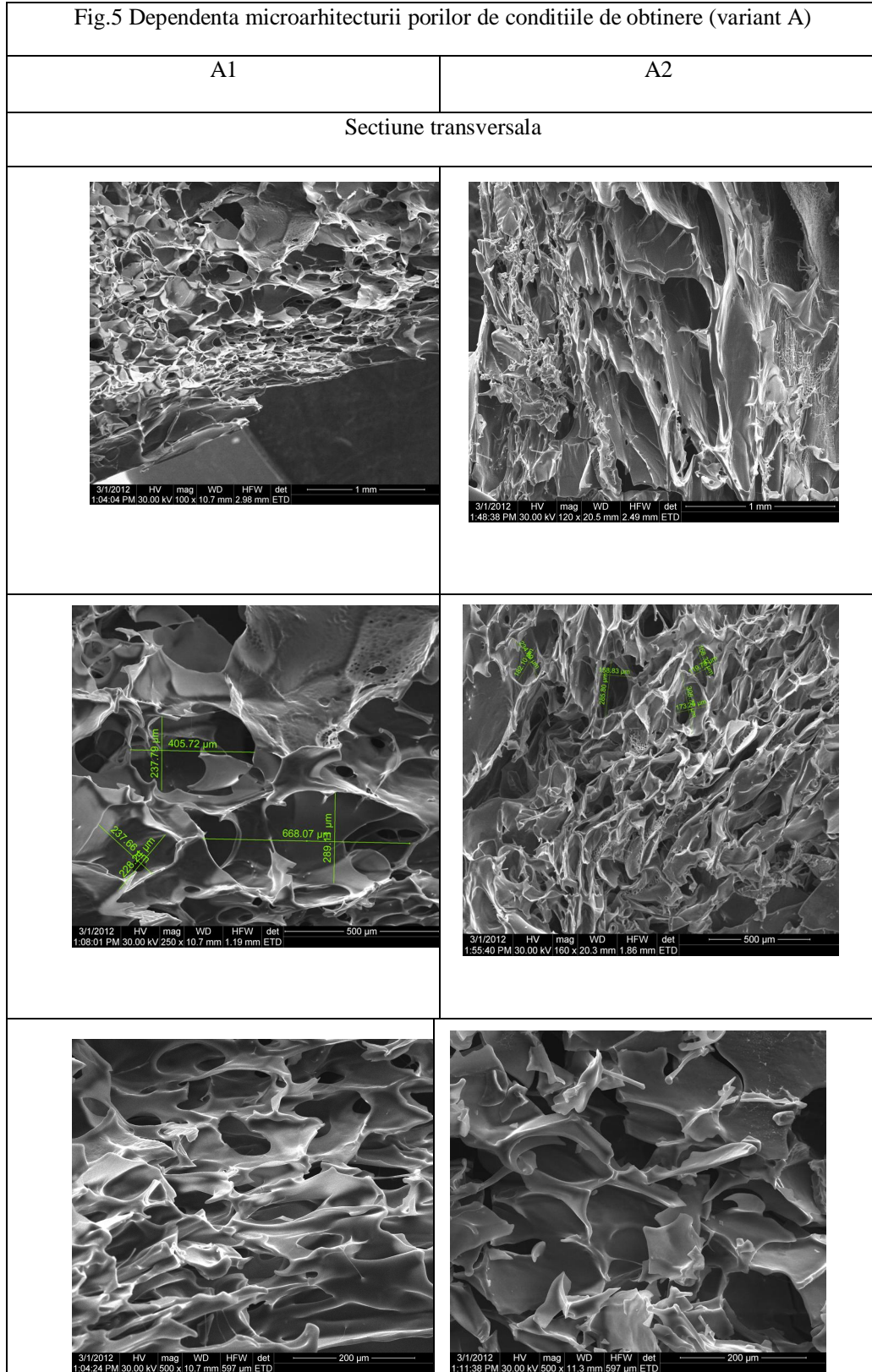
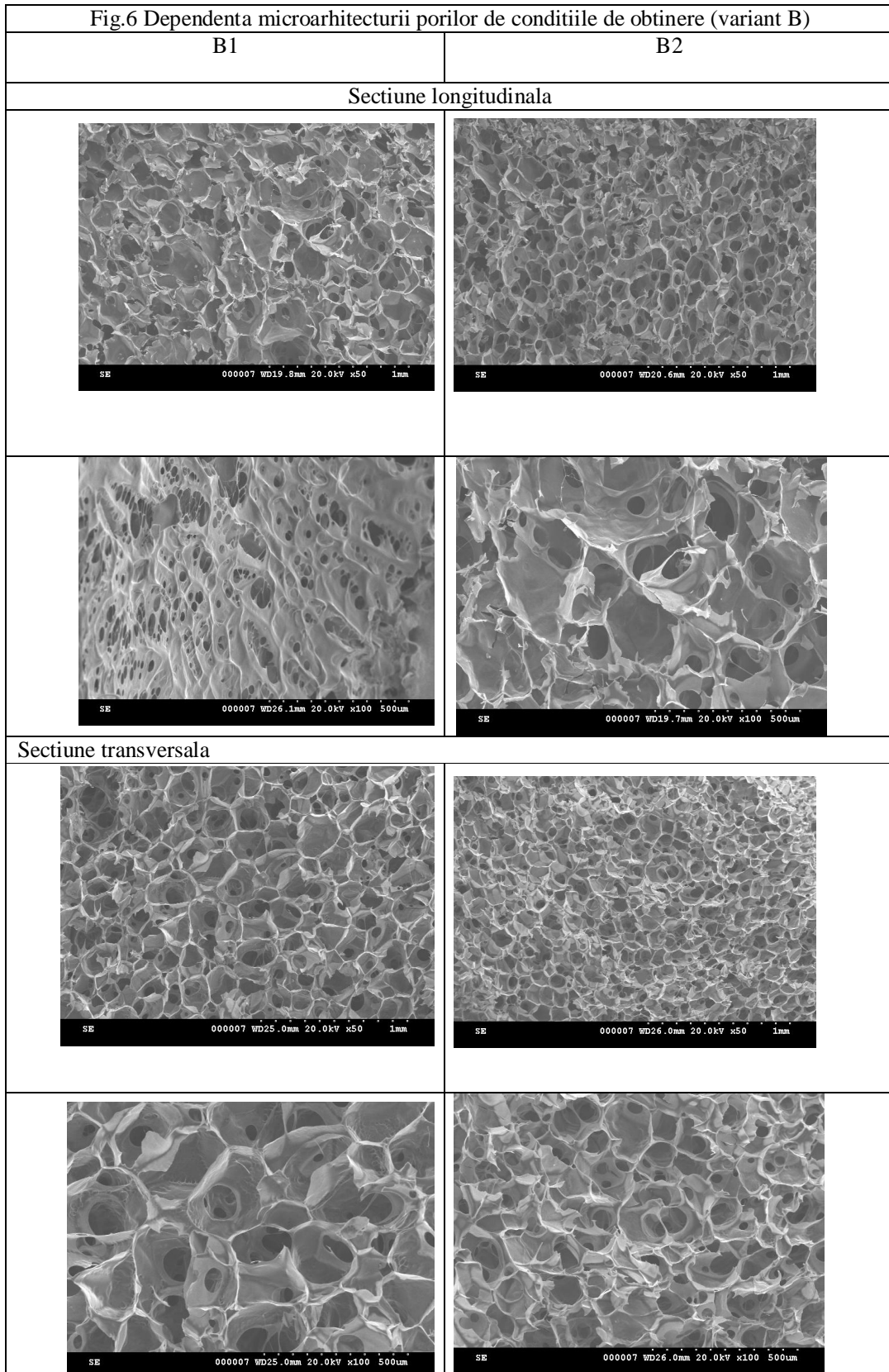


Fig.5 Dependenta microarhitecturii porilor de conditiile de obtinere (variant A)





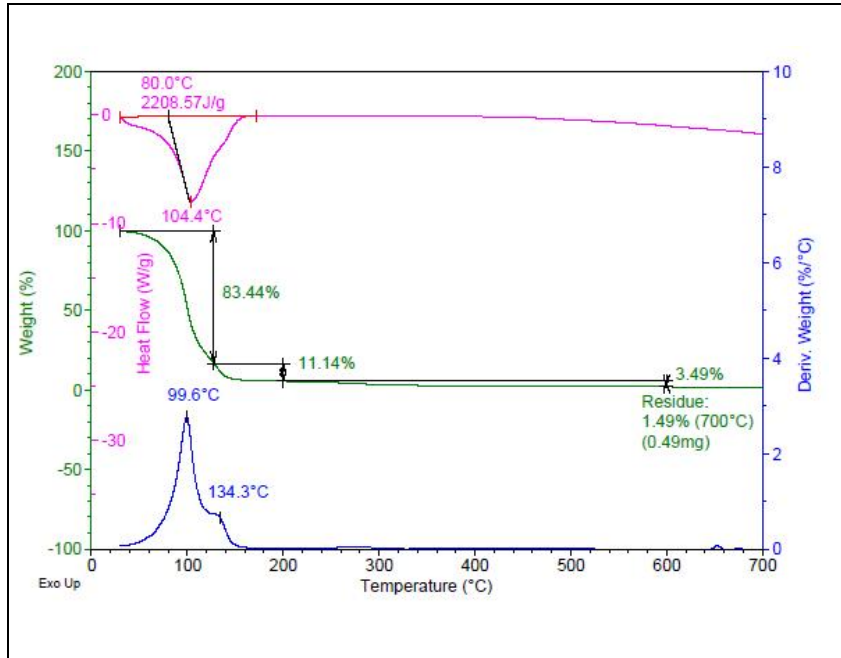


Fig.8 Gradul de hidratare al hidrogelurilor care au demonstrat o buna comportare ca suporturi 3 – D pentru cresterea celulelor

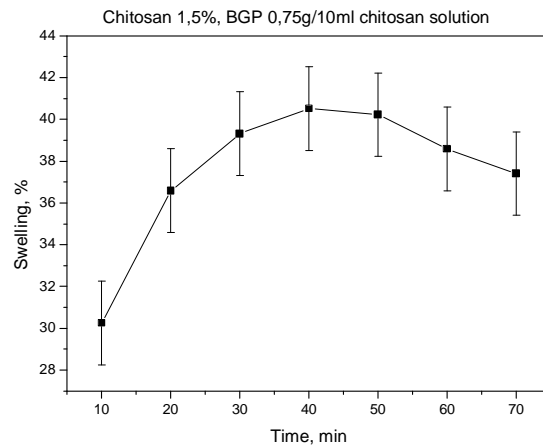


Fig.9 Raportul de gonflare al hidrogelurilor care au demonstrat o buna comportare ca suporturi 3 – D pentru cresterea celulelor

3. CONCLUZII

2. S-au studiat posibilitatile de alterare a balantei hidrofil – hidrofob specifica solutiilor unui biopoliaminozaharid natural in vederea generarii unei tranzitia sol-gel pentru obtinerea unor hidrogeluri pH si termosensitive destinate regenerarii tesutului cartilagos. S-a studiat posibilitatile de realizare a unor hidrogeluri pe baza de chitosan, la temperatura fiziologica de 37 °C, la un pH variabil intre 6.9 si 7.4 in aprox.3 ore. Alte conditii urmarite au fost ca hidrogelurile sa aiba o consistenta variabila, de la situatia sa nu fie miscibile cu mediul de cultura pana la cea in care sa fie manipulabile, sa nu fie citotoxice pentru celule si sa aiba proprietati mecanice care sa permita utilizarea in ingineria tesutului cartilagos.
3. In studiile efectuate s-a urmarit sa se identifice posibilitatile de reducere a cantitatii de protonant si implicit de neutralizant cu conditia pastrarii conditiilor in care are loc tranzitia sol – gel adica 37 °C si pH= 6.9 – 7.4 .
4. Studiile efectuate au avut in vedere selectia noilor hidrogeluri in mai multe trepte inclusiv cea de testare a comportarii ca suport pentru cresterea celulelor. Aceasta testare a fost efectuata de coordonatorul de proiect. In prima etapa s-au eliminat toate variantele in care tranzitia sol – gel nu se producea la 37 °C si pH intre 6.9 – 7.4. Deasemeni s-au eliminat toate variantele cu consistenta in afara limitelor de interes.
5. Un criteriu important de selectie a noilor hidrogeluri a fost eficienta acestora ca suporturi pentru dezvoltare celulara. Rezultatele testelor de crestere celulara au demonstrate ca eficienta noilor hidrogelurilor ca suporturi 3 – D pentru cresterea celulelor este conditionata de urmatoarii parametri: tipul acidului cu care se efectueaza protonarea chitosanului in solutii apoase si concentratia acestuia, gradul de indepartare a componentilor polimerici mic molecular din solutia de chitosan, concentratia si tipul sarurilor folosite pentru neutralizarea chitosanului protonat, morfologia hidrogelurilor, modul de realizare a nivelului dorit pentru proprietatile mecanice.
6. Un alt criteriu important de selectie a fost omogenitatea microarhitecturii porilor noilor hidrogeluri si nivelul proprietatilor elastice. S-a reusit sa se realizeze hidrogeluri cu pori sferici, uniformi, interconectati si cu dimensiuni sub 100 µm. Suporturile realizate in acest mod au asigurat bune conditii de crestere si dezvoltare celulara. Gradul de gonflare la echilibru a acestor hidrogeluri a fost de 38 – 40 % iar cel de hidratare de 83 %
7. Sunt in curs de efectuare studii pentru elucidarea mecanismului de reactie si de control a proprietatilor elastice si morfologice ale noilor hidrogeluri in vederea unei eficiente adecvante a proprietatilor acestora la cerintele tesuturilor cartilaginoase.

BIBLIOGRAFIE.

1. V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 274 (2004) 1–33
2. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects
Tianhong Dai, Masamitsu Tanaka, Ying-Ying Huang, Michael R Hamblin, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011 July; 9(7): 857–879. doi: 10.1586/eri.11.59
3. S. Poapa –Nita, “Control of the hydrophilic / hydrophobic interaction balance in the processing of the chitosan hydrogels for the tissue engineering”, *European Cells and Materials* < Vol.16, Suppl.1, 2008, pg.45
4. Hsieh, W.C.; Chang, C.P.; Lin, S.M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2007**, 57, 250–255.
5. Yuan, Y.; Chesnutt, B.M.; Utturkar, G.; Haggard, W.O.; Yang, Y.; Ong, J.L.; Bumgardner, J.D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym.* **2007**, 68, 561–567.
6. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N.A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Europ. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 19–34.
7. Ma, J.; Wang, H.; He, B.; Chen, J. A preliminary *in vitro* study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* **2001**, 22, 331–337.
8. Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **2001**, 22, 261–268.
9. Hirano S, Tsuchida H, Nagao N (1989) *Biomaterials* 10:574
10. Dornish M, Kaplan D, Skaugrud O (2001) Bioartificial organs III: tissue sourcing, immunoisolation, and clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 944:388
11. VandeVord PJ, Matthew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH (2002) *J Biomed. Mater Res* 59:585
12. H.G. Schild, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Prog. Polym. Sci.* 17 (1992) 163–249.
13. A.S. Hoffman, Intelligent polymers, in: K. Park (Ed.), *Controlled Drug Delivery—Challenges and Strategies*, American Chemical Society, Washington, 1997, pp. 485–498.
14. A. Rozier, C. Mazuel, J. Grove, B. Plazonnet, Gelrite: A novel, ionactivated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 163–168
15. S. Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda, Y. Peled, A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *J. Control. Release* 44 (1997) 201–208.

16. S. Kumar, B.O. Haglund, K.J. Himmelstein, In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery, *J. Ocul. Pharmacol.* 10 (1994) 47–56.
17. B. Srividya, R.M. Cardoza, P.D. Amin, Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system, *J. Control. Release* 73 (2001) 205–211.
18. L.D. Taylor, L.D. Cerankowski, Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions—a study of lower consolute behavior, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 13 (1975) 2551–2570
19. M. Heskins, J.E. Guillet, Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide), *J. Macromol. Sci. Chem.* A2 (1968) 1441–1455
20. Madihally SV, Matthew HWT (1999) *Biomaterials* 20:1133
21. Eve Ruel-Garier, Jean-Christophe Leroux In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2004) 409–426
22. Chenite A., M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions *Carbohydrate Polymers* 46 (2001) 39-47
23. Athanasiou KA, Agarwal A, Dzida FJ. Comparative study of the intrinsic mechanical properties of the human acetabular and femoral head cartilage. *J.Orthop.Res.* 1994;12:340-9.
24. Armstrong CG and Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1982;64:88-94
25. Demarteau O, Pillet L, Inaebnit A, Borens O, Quinn TM. Biomechanical characterization and in vitro mechanical injury of elderly human femoral head cartilage: comparison to adult bovine humeral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(6):589-96.