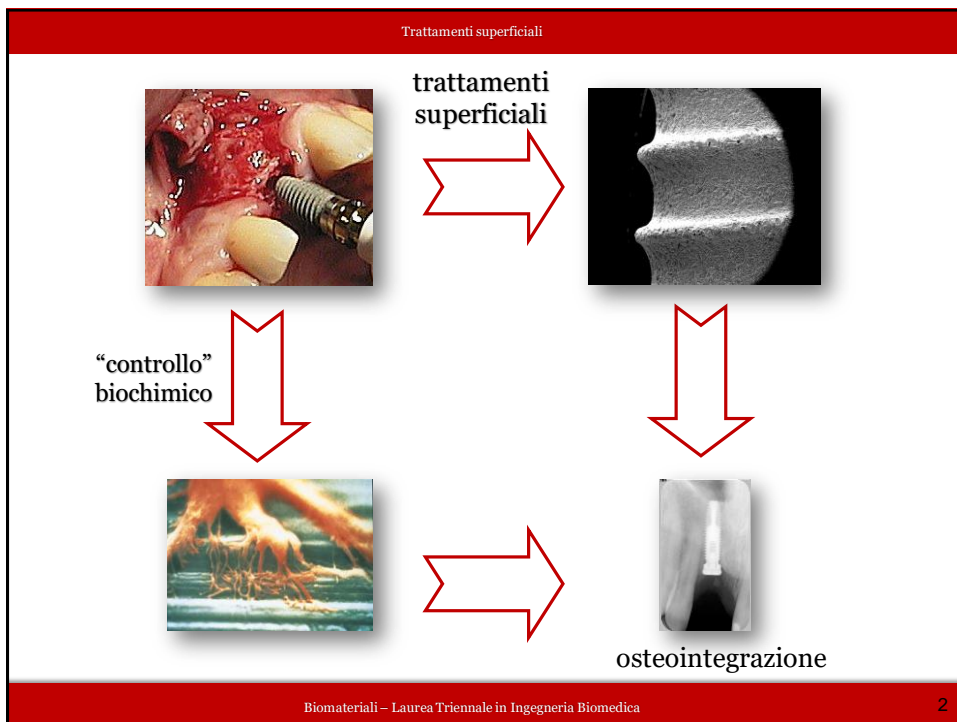


CASE STUDY: PROGETTAZIONE DI VITI METALLICHE ENDOSSEE



scopo della ricerca

messa a punto di una metodologia per la progettazione di impianti endossei che permettano:

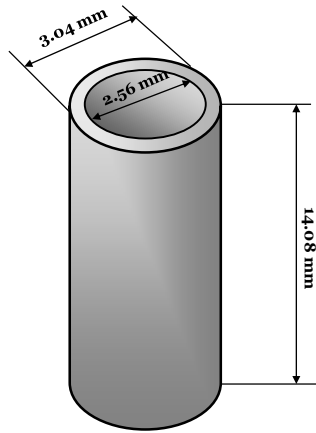
- ☐ una migliore integrazione tra impianto e tessuto ospite
- ☐ una migliore e più rapida guarigione

base di partenza

- ☐ comprovata **biocompatibilità del titanio**
- ☐ importanza della **morfologia superficiale** nel permettere l'adesione degli osteoblasti
- ☐ capacità di alcune **sequenze peptidiche** di favorire i processi fisiologici coinvolti nell'osteointegrazione

procedura sperimentale

- ☐ applicazione di trattamenti meccanici e chimici di modifica superficiale
- ☐ caratterizzazione delle superfici ottenute (SEM, AFM e profilometro)
- ☐ progettazione e sintesi del peptide di adesione
- ☐ individuazione di un carrier riassorbibile per veicolare il peptide di adesione
- ☐ determinazione della cinetica di rilascio
- ☐ test in vitro (colture cellulari)
- ☐ test in vivo (modello animale)



dimensioni dei cilindri in Ti:

$$\varnothing_{\text{int}} = 2.56 \text{ mm}$$

$$\varnothing_{\text{est}} = 3.04 \text{ mm}$$

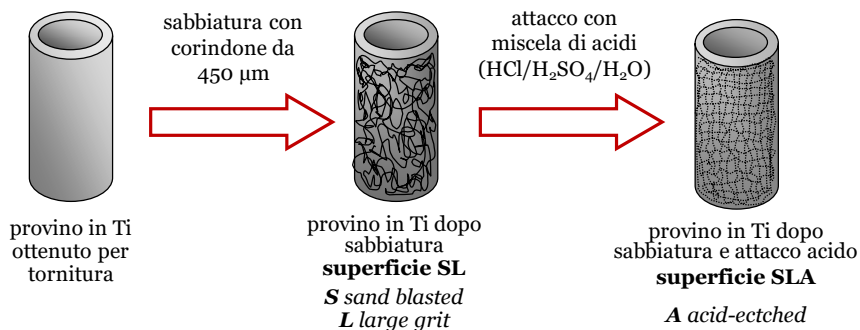
$$h = 14.08 \text{ mm}$$

i cilindri sono stati:

- ☐ trattati con tecniche di modifica superficiale
- ☐ rivestiti (*dip-coating*) con un film sottile di SiO_2 arricchito con il peptide di adesione

trattamento superficiale

- ☐ la rugosità rappresenta uno dei principali parametri che controllano il processo di osteointegrazione
- ☐ i cilindri in Ti sono stati trattati per riprodurre opportune caratteristiche morfologiche del tessuto osseo



rivestimento

sol-gel

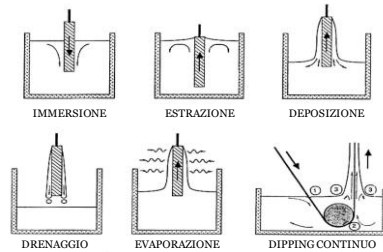
realizzazione di network inorganici usando come monomeri alcossidi di silicio

- idrolisi dell'alcossido
- formazione sospensione colloidale
- condensazione di una fase gel

vantaggi

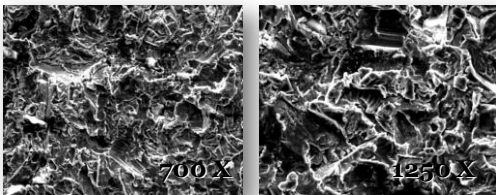
- ☐ basse temperature di processo
- ☐ comportamento bioattivo del film di silice
- ☐ esatta quantificazione del peptide di adesione nello strato depositato

dip-coating



analisi superficiale: SEM

SUPERFICIE SL



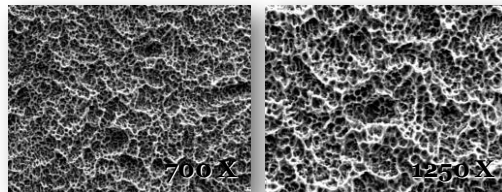
la superficie sabbiata presenta:

- ☐ profili irregolari e distinguibili
- ☐ rugosità grossolana
- ☐ imperfezioni di diverse dimensioni

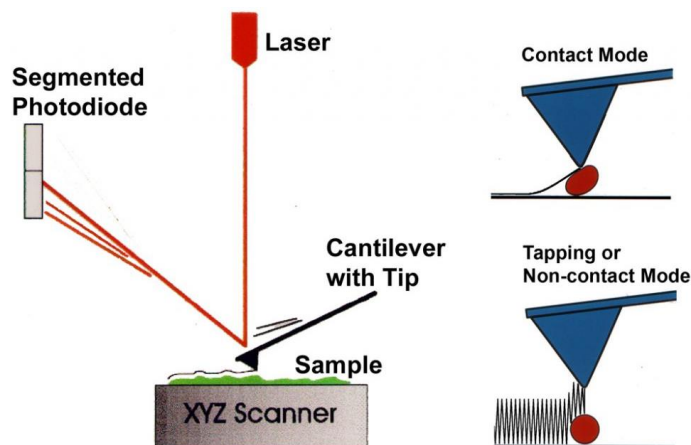
SUPERFICIE SLA

l'attacco acido produce:

- ☐ appiattimento della topografia
- ☐ doppio livello di rugosità
- ☐ tessitura compatta e uniforme
- ☐ struttura alveolare microporosa



analisi superficiale microscopia a forza atomica AFM

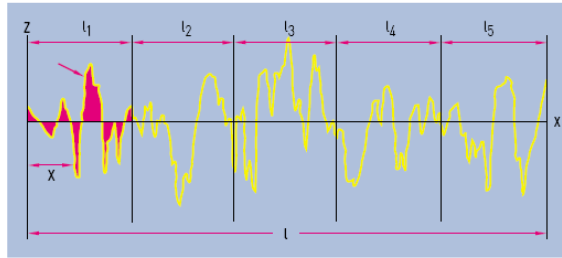


parametri di rugosità

Parametro	Descrizione	Unità di misura
S_a	rugosità media	[nm]
S_q	rugosità media quadratica	[nm]
S_z	rugosità media in cinque punti	[nm]
S_{sk}	asimmetria del profilo	[--]
S_{ku}	curtosi del profilo (descrive la distribuzione del profilo)	[--]
S_{ds}	densità degli altipiani di profilo	[1/ μm^2]
S_{sc}	raggio di curvatura medio dei picchi	[1/nm]
S_{dq}	media quadratica della pendenza del profilo	[1/nm]
S_{dr}	rapporto tra l'area della superficie e l'area della superficie proiettata	[%]

rugosità: parametri di ampiezza

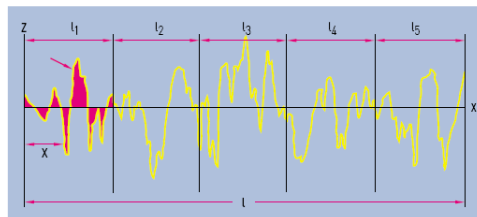
misure di caratteristiche verticali delle deviazioni della superficie



- ❑ $l_1 - l_5$ sono **lunghezze di campionamento** uguali e consecutive (il profilo viene suddiviso in lunghezze di campionamento l che sono lunghe a sufficienza per includere un numero statisticamente significativo di dati)
- ❑ la **lunghezza di valutazione** è definita come la lunghezza del profilo utilizzato per la misura dei parametri di rugosità o finitura superficiale
5 lunghezze di campionamento sono prese come standard

11

rugosità: parametri di ampiezza



- ❑ **R_a (S_a nel caso 3D)**
media aritmetica delle distanze assolute del profilo di rugosità rispetto alla linea media

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |z(x)| dx$$

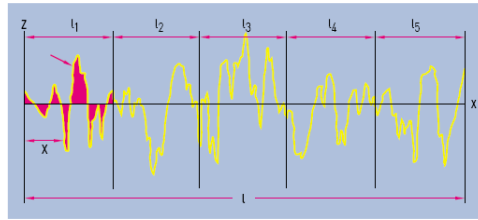
- ❑ **R_q (S_q nel caso 3D)**
scarto quadratico medio del profilo reale rispetto al valore medio

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l z^2(x) dx}$$

dà informazioni simili a R_a , ponendo una maggiore attenzione sugli elementi più alti e su quelli più bassi

12

rugosità: parametri di ampiezza



□ R_z (S_z nel caso 3D)

media aritmetica dei cinque picchi più alti e delle cinque valli più basse copre in tutto dieci elementi morfologici in un dato intervallo
è definito anche parametro verticale e può fornire informazioni sulla tipologia delle irregolarità

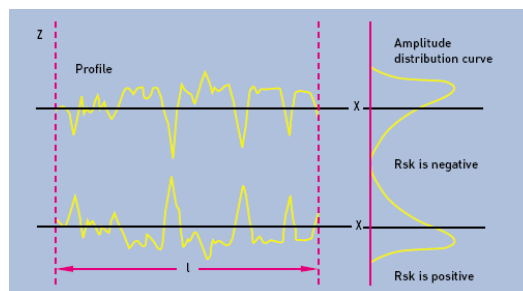
□ R_t (S_t nel caso 3D)

distanza massima tra il picco più alto e la valle più bassa nel profilo o sulla superficie

13

rugosità: parametri spaziali

misure di caratteristiche orizzontali delle deviazioni della superficie



□ R_{sk} (S_{sk} nel caso 3D) – **asimmetria**

misura della simmetria del profilo rispetto alla linea media
questo parametro identifica le differenze di simmetria su profili aventi il medesimo valore di R_a o R_q

□ R_{ku} (S_{ku} nel caso 3D) – **curtosi**

misura dell'acutezza del profilo

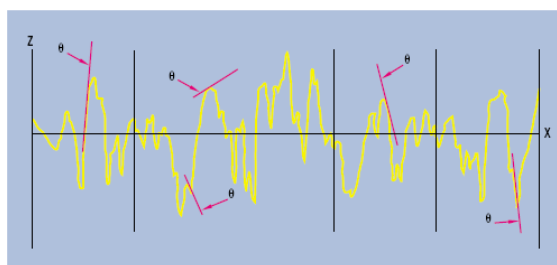
14

rugosità: parametri spaziali

- ❑ S_{ds}
densità di picchi per unità di superficie
- ❑ S_{sc}
raggio di curvatura medio dei picchi
- ❑ S_{dr} [%]
rapporto tra l'area della superficie e l'area della superficie proiettata
fornisce l'incremento dell'area superficiale (grazie a trattamento che aumenti la rugosità) rispetto a quella di partenza
 $S_{dr} = 100\% \rightarrow$ l'area della superficie doppia rispetto all'area della superficie proiettata

15

rugosità: parametri ibridi



- ❑ R_{dq} (S_{dq} nel caso 3D)
valore quadratico medio dell'inclinazione θ del profilo nella lunghezza di campionamento

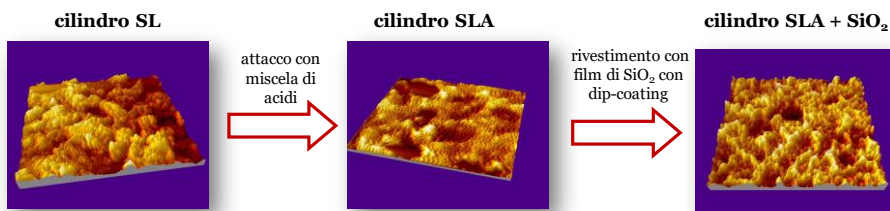
16

rugosità

- ❑ superfici lisce: $S_a < 0.5 \mu\text{m}$
- ❑ superfici leggermente ruvide: $0.5 \mu\text{m} < S_a < 1 \mu\text{m}$
- ❑ superfici moderatamente ruvide: $1 \mu\text{m} < S_a < 2 \mu\text{m}$
- ❑ superfici ruvide: $S_a > 2 \mu\text{m}$
→ migliore osteointegrazione

17

analisi superficiale: AFM



principali parametri di rugosità misurati all'AFM

CAMPIONE	rugosità media			asimmetria		rapporto tra l'area della superficie e l'area della superficie proiettata			
	S_a [nm]	S_q [nm]	S_z [nm]	S_{sk} [—]	S_{ku} [—]	S_{ds} [1/ μm]	S_{sc} [1/nm]	S_{dq} [1/nm]	S_{dr} [%]
SL (1° misura)	746	932	7038	0.642	2.81	0.178	0.000135	1.14	23.4
SL (2° misura)	726	876	5674	0.613	2.53	0.243	0.000104	0.815	24.1
SLA (1° misura)	843	1044	6342	0.128	2.77	0.228	0.000078	0.874	35.7
SLA (2° misura)	862	1048	6419	0.106	2.38	0.167	0.000064	1.11	31.1
SLA + film SiO ₂	1074	1322	8360	0.273	2.73	0.578	0.0002	1.43	64.3

18

analisi superficiale: confronto

CONFRONTO TRA SUPERFICI SL E SLA

- ☐ S_a , S_q , S_z aumentano
- ☐ S_{sk} diminuisce pur registrando valori positivi
- ☐ S_{dr} aumenta sensibilmente

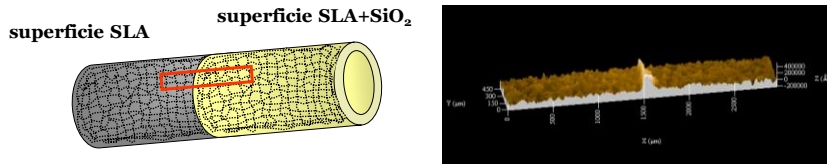
CONFRONTO TRA SUPERFICIE SLA E SLA RICOPERTA

- ☐ S_a , S_q , S_z aumentano
- ☐ S_{sk} aumenta rispetto a SLA restando inferiore ai valori di SL
- ☐ S_{ds} , S_{dq} , S_{sc} riportano un incremento sensibile
- ☐ S_{dr} cresce notevolmente

analisi superficiale: confronto

- ☐ l'attacco acido produce un secondo livello di microrugosità che si sovrappone alla precedente tessitura
- ☐ il rivestimento con film di SiO_2 pur non alterando la morfologia, determina una topografia più frastagliata e disomogenea

analisi superficiale: profilometro



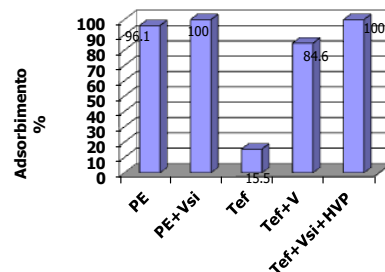
principali parametri di rugosità misurati al profilometro

CAMPIONE	S_a [μm]	S_q [Å]	S_z [Å]	S_{sk} [°]	S_{ku} [°]	$S_{\Delta q}$ [°]	S_{dq} [1/Å ²]
SLA	3.120	41079	196779	-1.00	4.55	5.01	5.30E-11
SLA + film di SiO ₂	3.197	40770	196745	-0.667	4.08	4.92	5.30E-11

rilascio da carrier

la tendenza all'adsorbimento del peptide è stata preliminarmente valutata impiegando diverse combinazioni di materiali:

- ☐ il polietilene non è adatto per effettuare saggi di rilascio
- ☐ il teflon risulta inerte al peptide
- ☐ la sequenza mostra elevata affinità per il vetro e per il ricoprimento in SiO₂

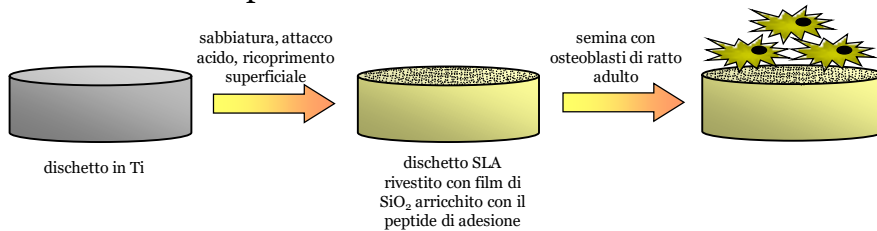


il network di silice non rilascia il peptide nel tempo sperimentale
→ si può ipotizzare che

- il peptide d'adesione resti disponibile all'interfaccia impianto-tessuto osseo
- non si generino fenomeni d'inibizione

saggi in vitro: metodo

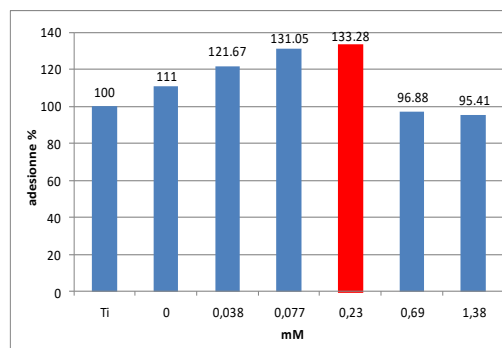
sono stati utilizzati come substrato dischetti in Ti con le stesse caratteristiche superficiali dei cilindri



il test *in vitro* consente di

- ☐ indagare la relazione dose-risposta
- ☐ determinare la concentrazione superficiale ottimale del peptide di adesione

saggi in vitro: risultati

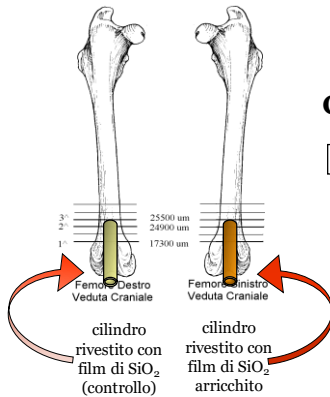


- ☐ il solo film di SiO_2 aumenta l'adesione
- ☐ il peptide promuove l'adesione degli osteoblasti
- ☐ la concentrazione influenza la bioattività (max 0.23 mM)

saggi in vivo

modello animale: conigli maschi razza *White New Zealand*

inserimento dei cilindri
nei femori dx e sin



- ☐ sacrificio degli animali a 2 e a 4 settimane dall'intervento
- ☐ inclusione dei segmenti ossei in araldite
- ☐ osservazione in luce UV di reperti istologici prelevati ad altezze corrispondenti

saggi in vivo: chirurgia

artrotomia



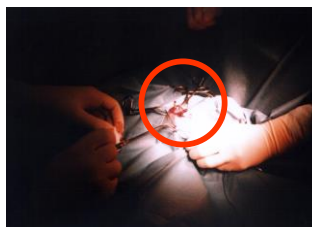
lussazione della rotula



creazione sede implantare



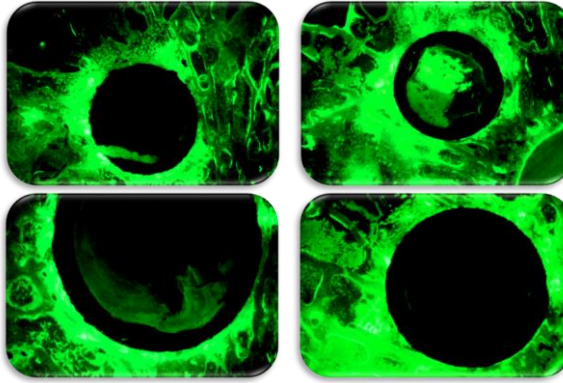
inserimento cilindri in Ti



saggi in vivo: risultati a due settimane

senza peptide d'adesione

con peptide d'adesione

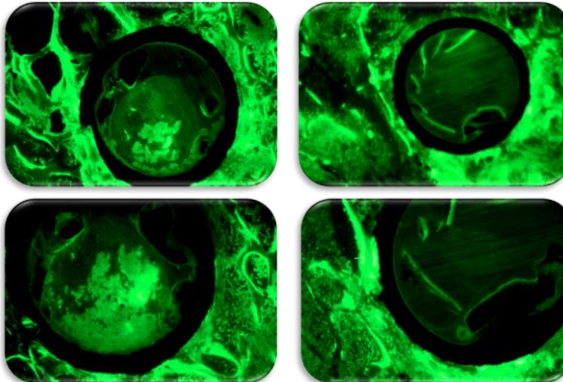


→ il marcatore osseo rileva una attività osteogenica più diffusa nei campioni arricchiti col peptide d'adesione

saggi in vivo: risultati a quattro settimane

senza peptide d'adesione

con peptide d'adesione



la differenza in termini di attività osteogenica tra campioni arricchiti e non arricchiti risulta meno marcata

conclusioni

- ❑ il rivestimento in film di SiO_2 non altera la morfologia superficiale
- ❑ il peptide d'adesione, intrappolato nel network di silice, resta disponibile all'interfaccia impianto-tessuto
- ❑ il peptide d'adesione favorisce l'adesione cellulare *in vitro*
- ❑ il peptide d'adesione promuove l'osteogenesi *in vivo*

I risultati ottenuti consentono di

- validare l'approccio progettuale alla fabbricazione di viti metalliche bioattive
- estendere l'attività sperimentale a modelli animali più complessi