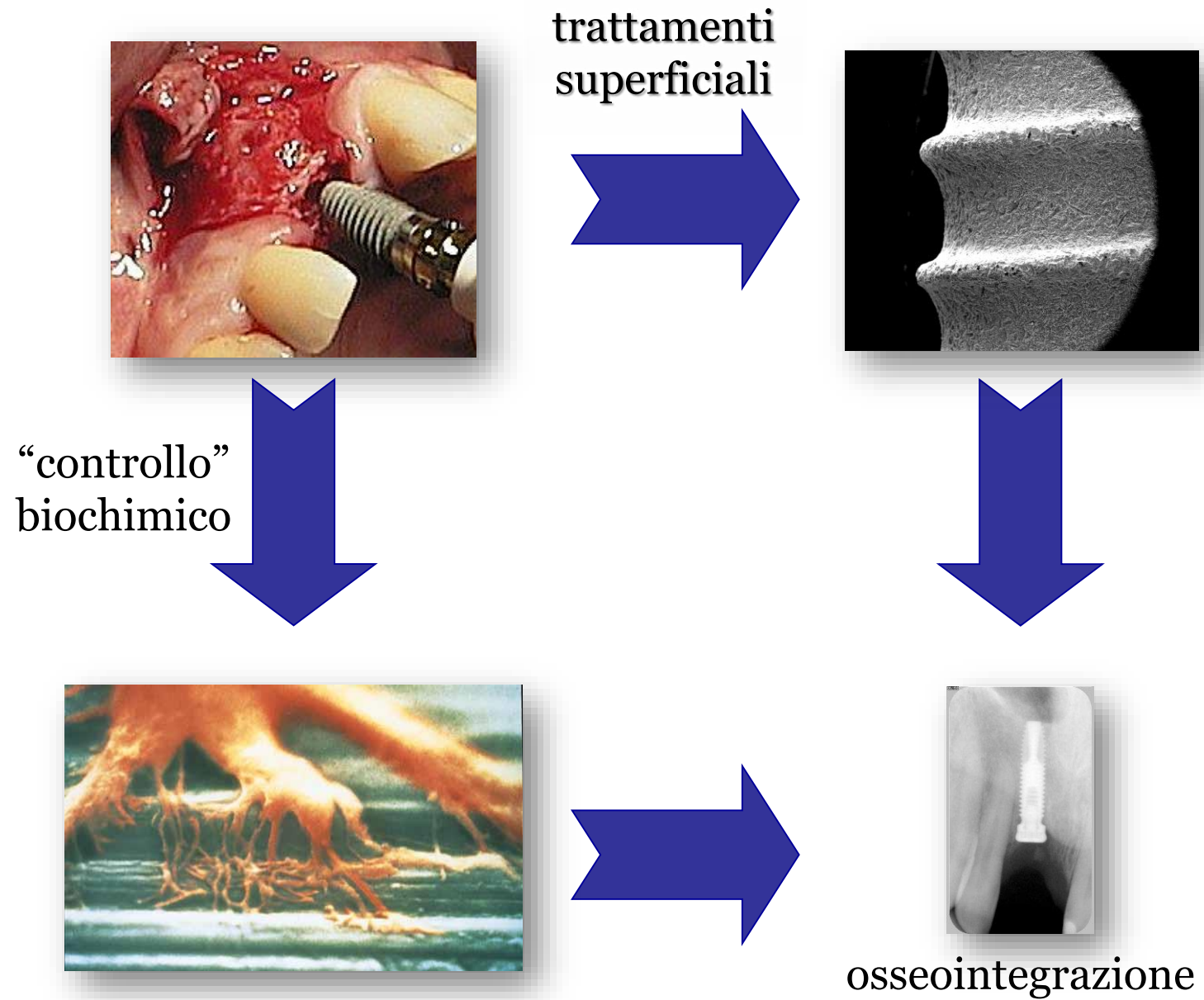


**CASE STUDY:
PROGETTAZIONE DI
VITI METALLICHE
ENDOSSEE**



Scopo della ricerca

Obiettivo della ricerca è la 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

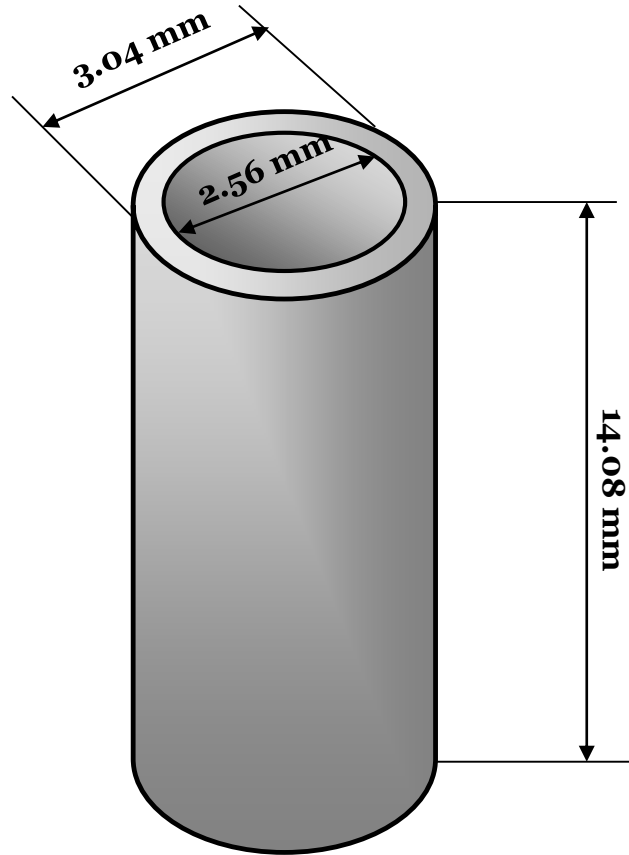
Base di partenza

Evidenze 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:

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

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

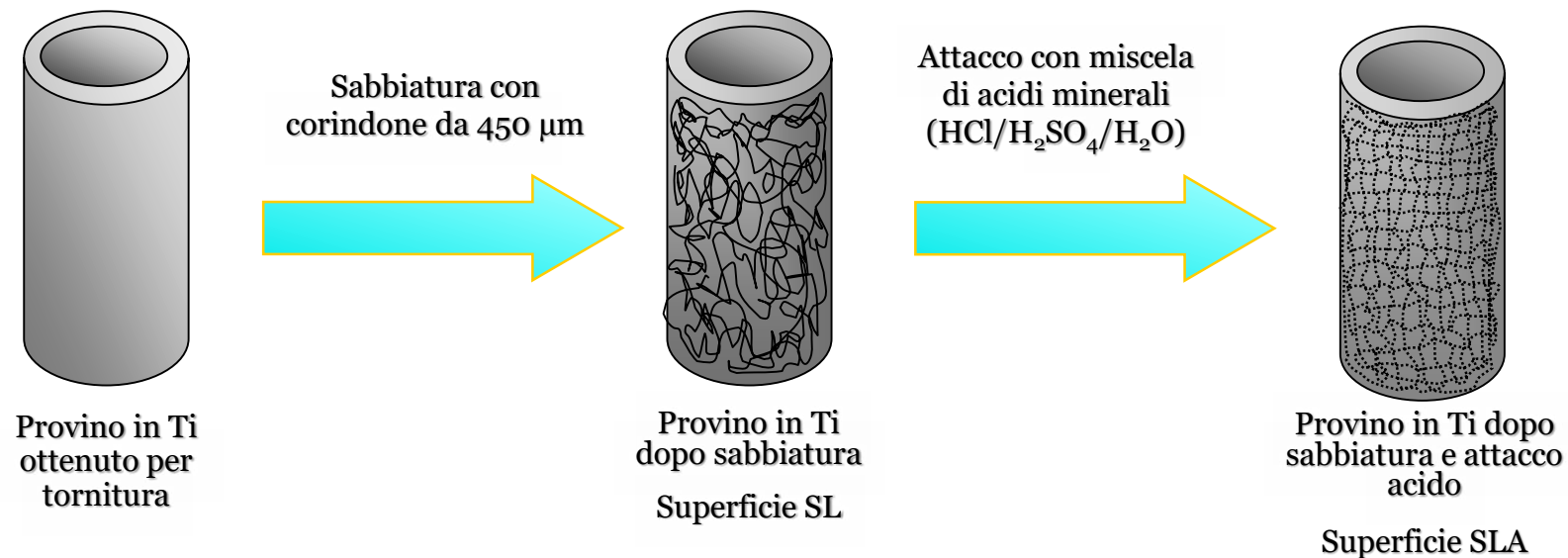
$$h = 14.08 \text{ mm}$$

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

È noto che la rugosità rappresenta uno dei principali parametri che controllano il processo di osteointegrazione; conseguentemente i cilindri in Ti sono stati trattati per riprodurre opportune caratteristiche morfologiche



Rivestimento

SOL-GEL

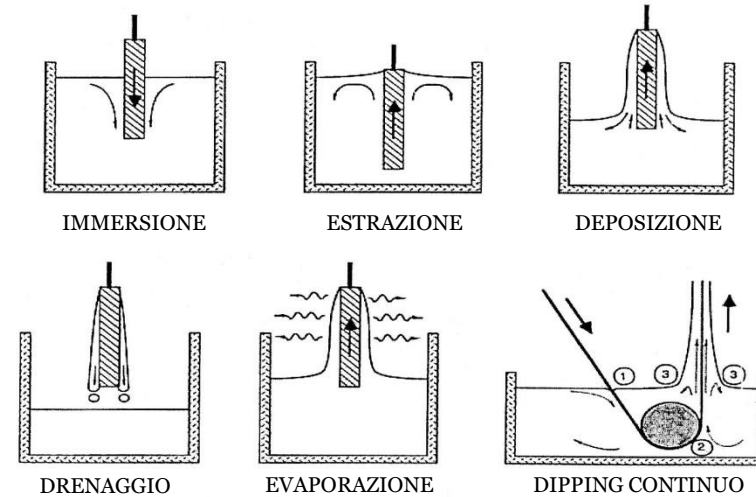
Si realizzano *network* inorganici usando come monomeri alcossidi di silicio:

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

VANTAGGI

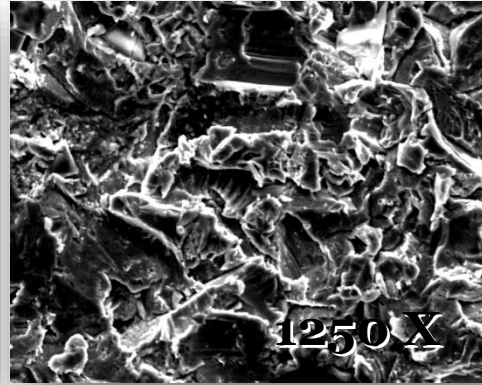
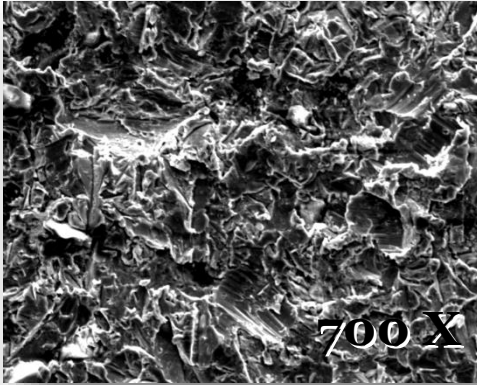
- basse temperature di processo;
- comportamento bioattivo del film di silice;
- esatta quantificazione del peptide di adesione nello strato depositato.

DIP-COATING



Analisi superficiale: SEM

SUPERFICIE SL



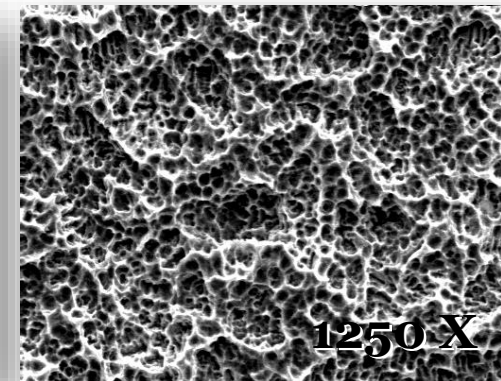
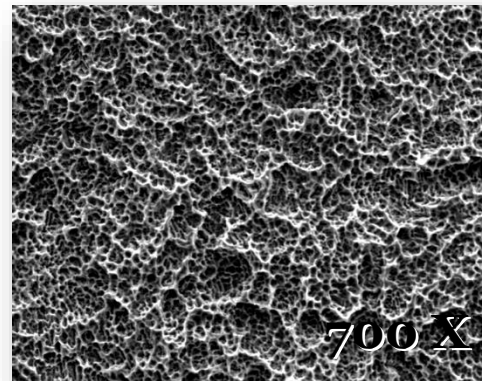
La superficie sabbiata presenta:

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

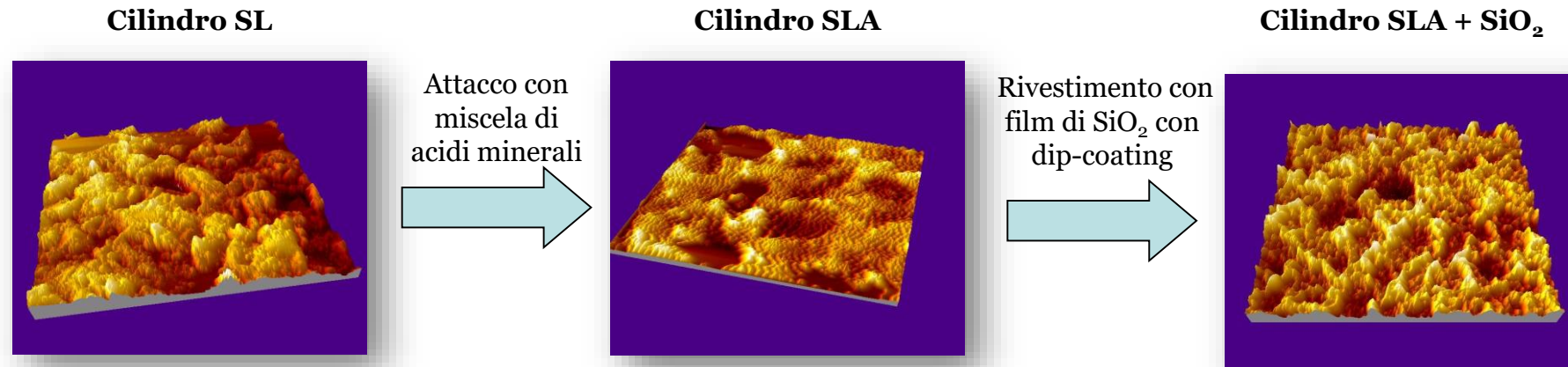
SUPERFICIE SLA

L'attacco acido produce:

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



Analisi superficiale: AFM



Principali parametri di rugosità misurati all'AFM

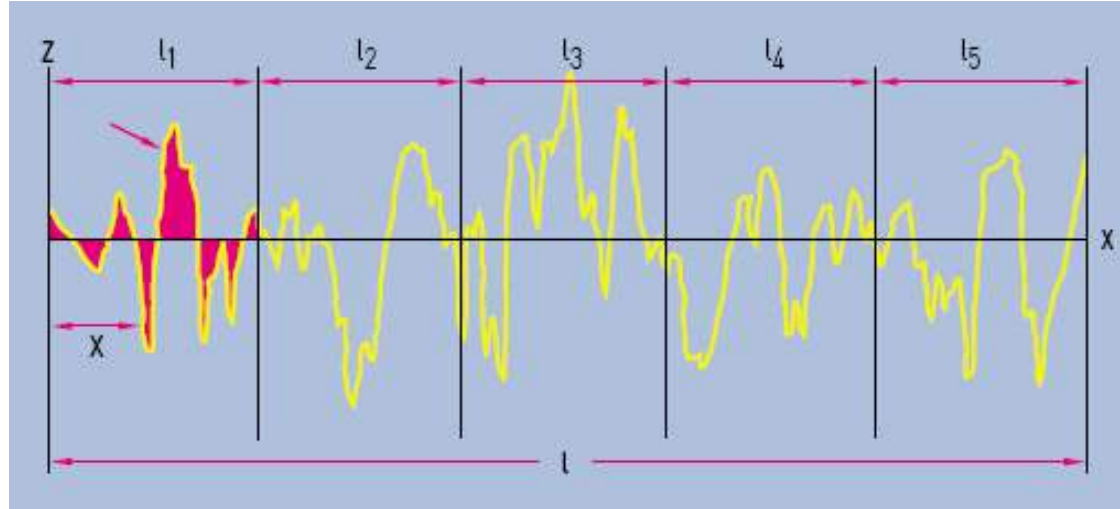
CAMPIONE	S _a [nm]	S _q [nm]	S _z [nm]	S _{sk} [--]	S _{ku} [--]	S _{ds} [1/μm]	S _{sc} [1/nm]	S _{dq} [1/nm]	S _{dr} [%]
SL (1° misura)	746	932	7038	0.642	2.81	0.178	0.000135	1.14	23.4
SL (2° misura)	726	876	5674	0.613	2.53	0.243	0.000104	0.815	24.1
SLA (1° misura)	843	1044	6342	0.128	2.77	0.228	0.000078	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

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	[%]

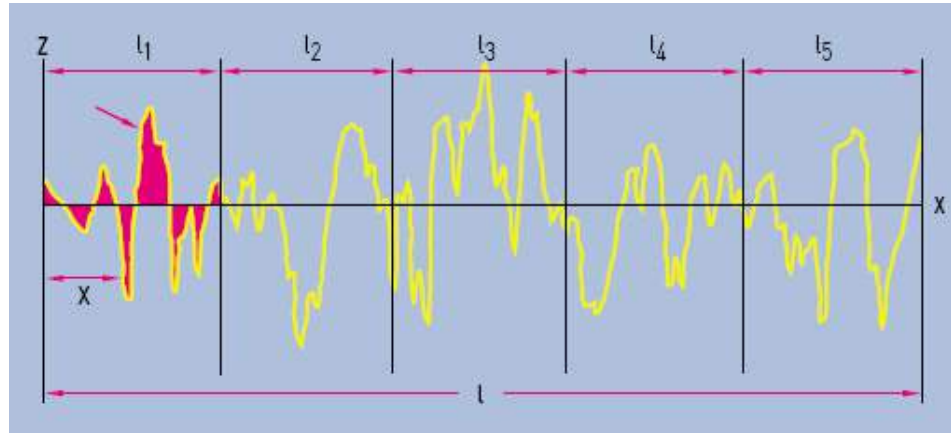
rugosità: parametri di ampiezza

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

rugosità: parametri di ampiezza



□ R_a (S_a nel caso 3D)

media aritmetica delle distanze assolute del profilo di rugosità rispetto alla linea media

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

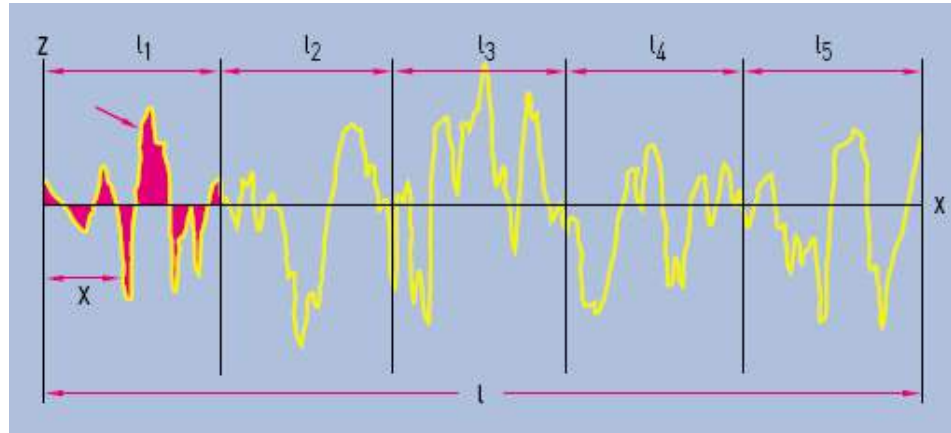
□ R_q (S_q nel caso 3D)

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

rugosità: parametri di ampiezza



□ R_z (S_z nel caso 3D)

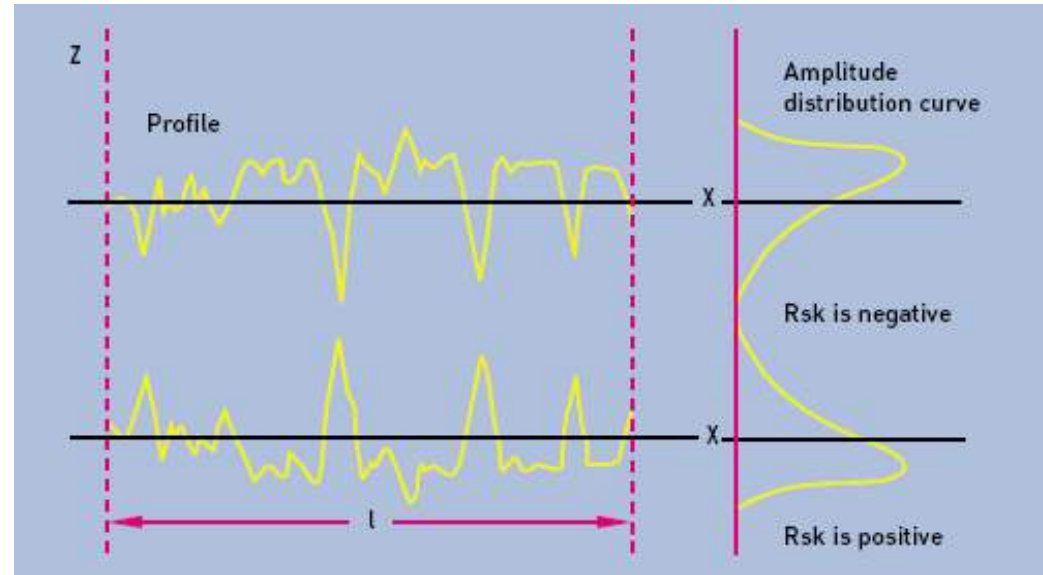
media aritmetica dei cinque picchi più alti e delle cinque valli più basse copre in tutto dieci elementi morfologici in un dato intervallo
è definito anche parametro verticale e può fornire informazioni sulla tipologia delle irregolarità

□ R_t (S_t nel caso 3D)

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

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

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

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

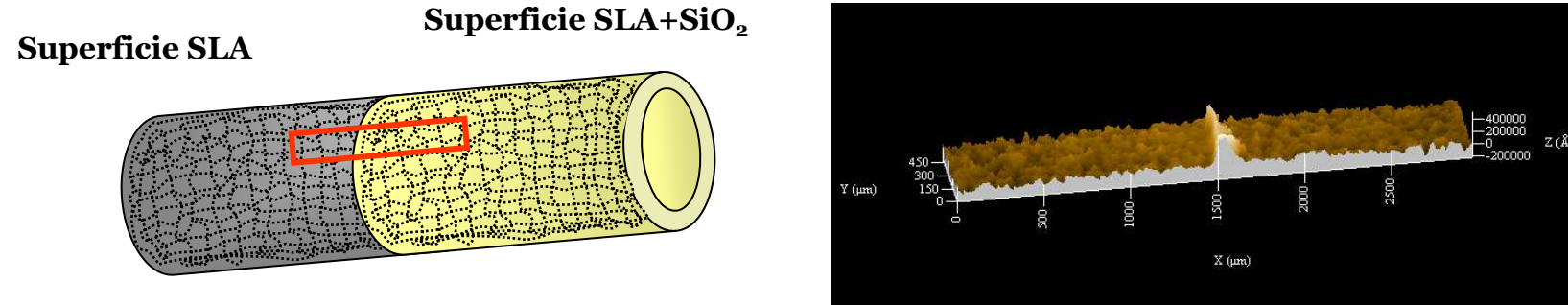
CONFRONTO TRA SUPERFICIE SLA E SLA RICOPERTA

- 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

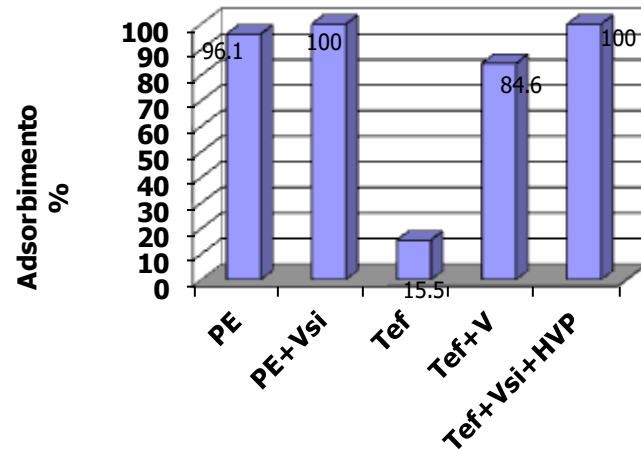


Principali parametri di rugosità misurati al profilometro

CAMPIONE	S_a [μm]	S_q [Å]	S_z [Å]	S_{sk} [--]	S_{ku} [--]	$S_{\Delta q}$ [°]	S_{ds} [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:



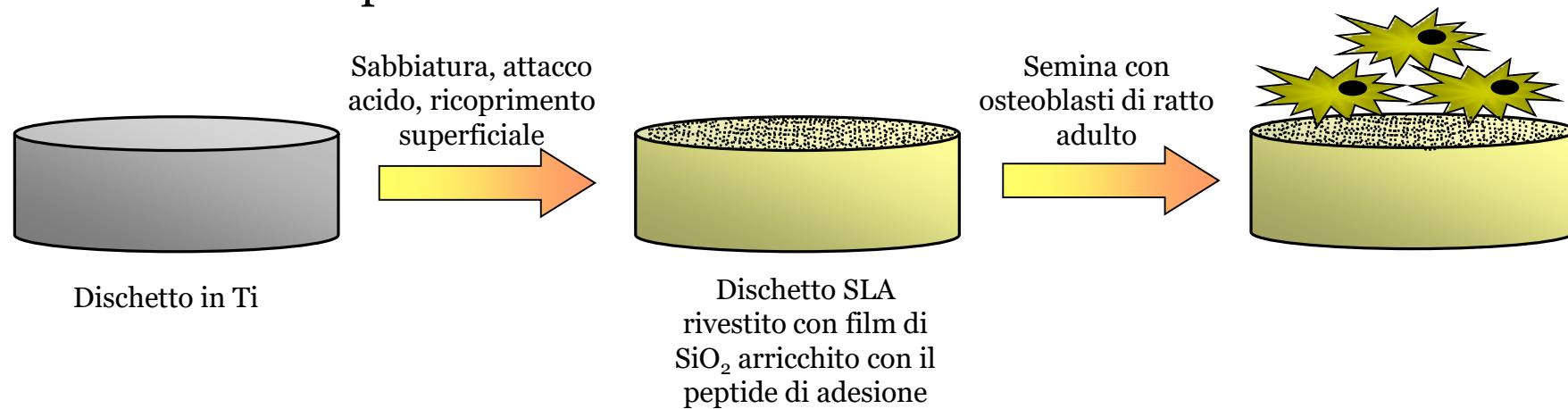
- il polietilene non è adatto per effettuare saggi di rilascio
- il teflon risulta inerte al peptide
- la sequenza mostra elevata affinità per il vetro e per il ricoprimento in SiO_2

Il *network* di silice non rilascia il peptide nel tempo sperimentale impostato e si può quindi ipotizzare che:

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

Saggi in vitro

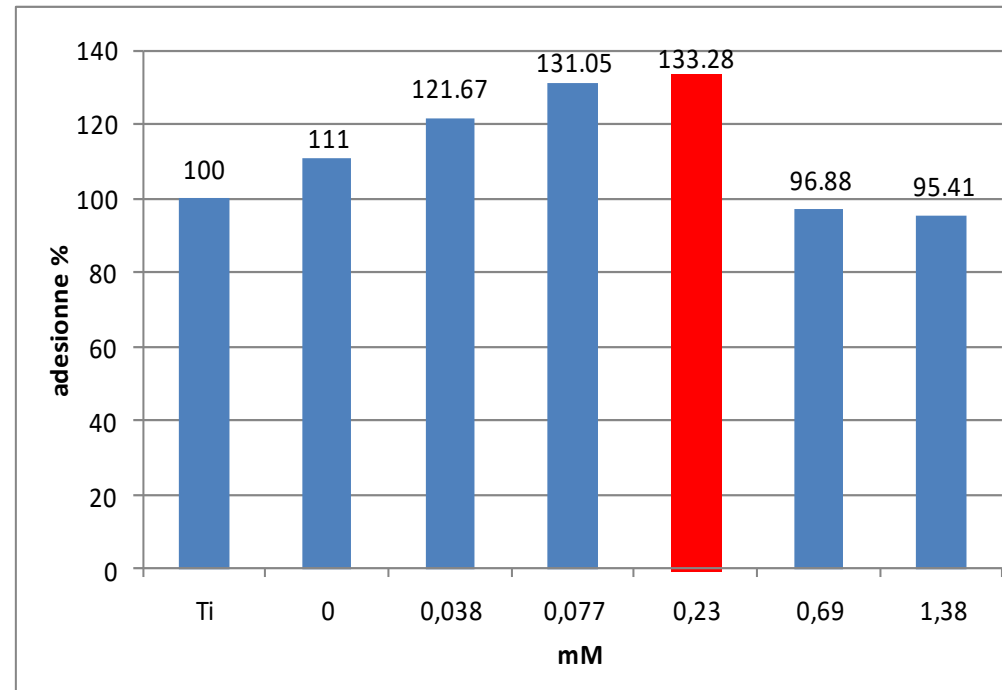
Sono stati utilizzati come substrato dischetti in Ti con le stesse caratteristiche superficiali dei cilindri:



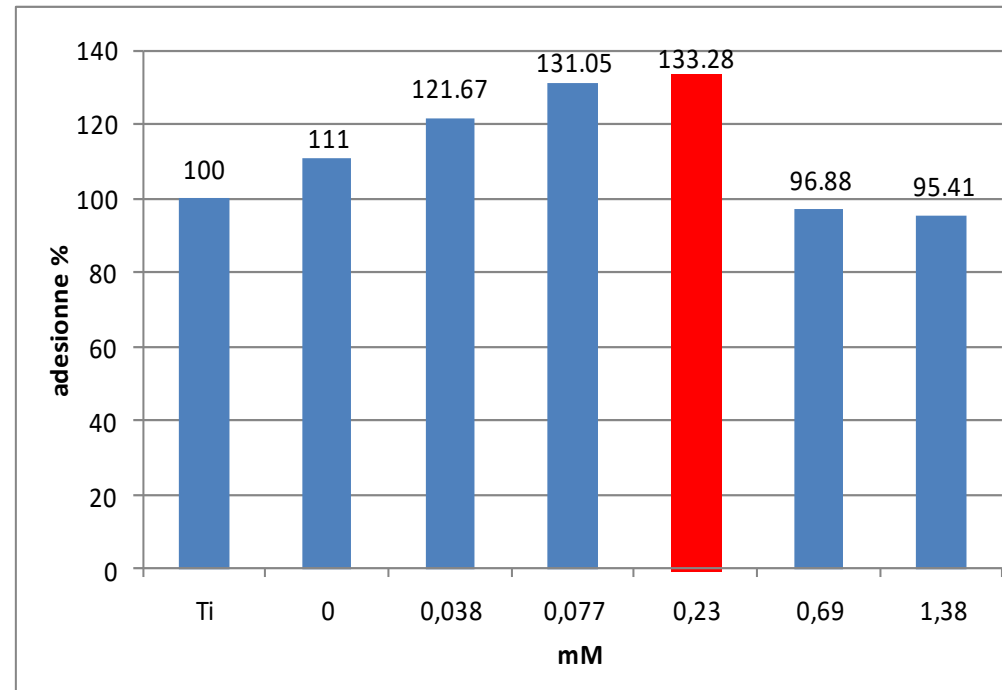
Il test *in vitro* consente di:

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

Saggi in vitro



Saggi in vitro

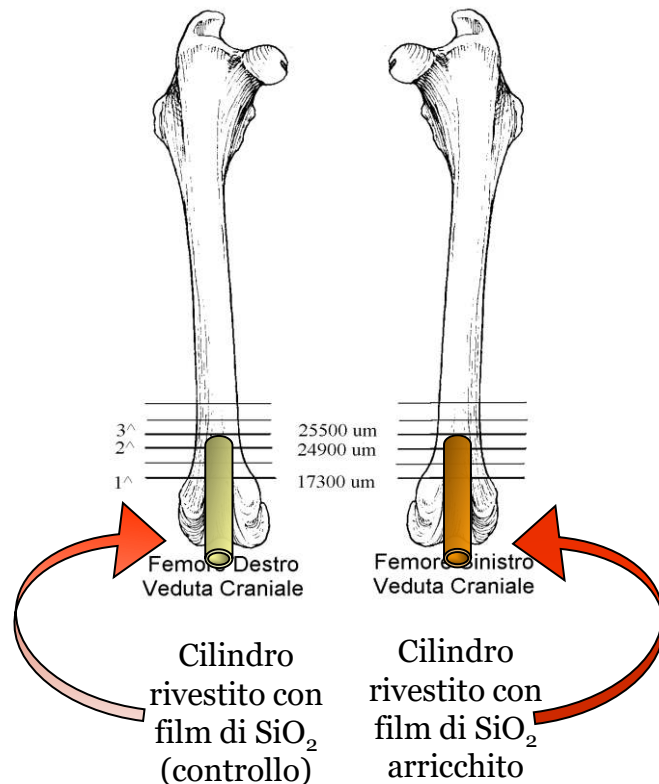


- il solo film di SiO_2 aumenta l'adesione;
- il peptide promuove l'adesione degli osteoblasti;
- la concentrazione influenza la bioattività (max 0.23 mM)

Saggi in vivo

Modello animale: conigli maschi razza *White New Zealand*

Inserimento dei cilindri nei
femori dx e sin



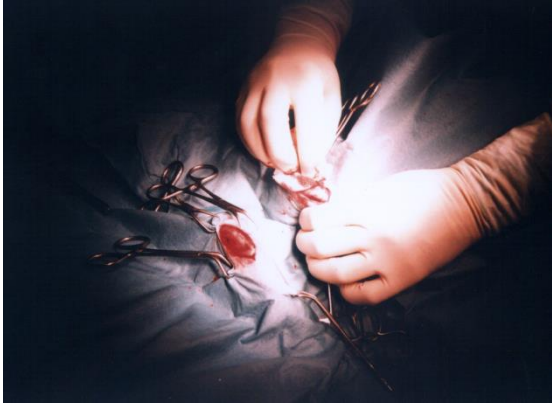
Marcatura con
Calcein Green



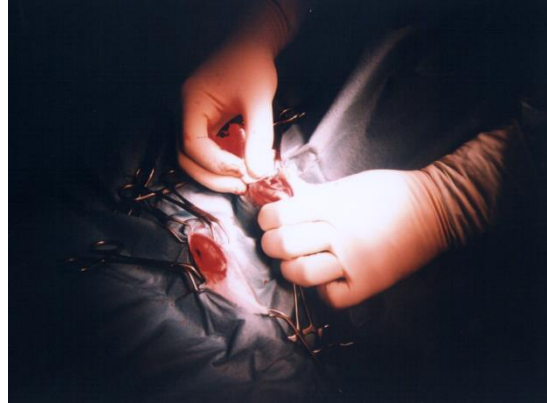
- sacrificio degli animali a 2 e a 4 settimane dall'intervento
- inclusione dei segmenti ossei in araldite
- osservazione in luce UV di reperti istologici prelevati ad altezze corrispondenti

Saggi in vivo: chirurgia

artrotomia



lussazione della rotula



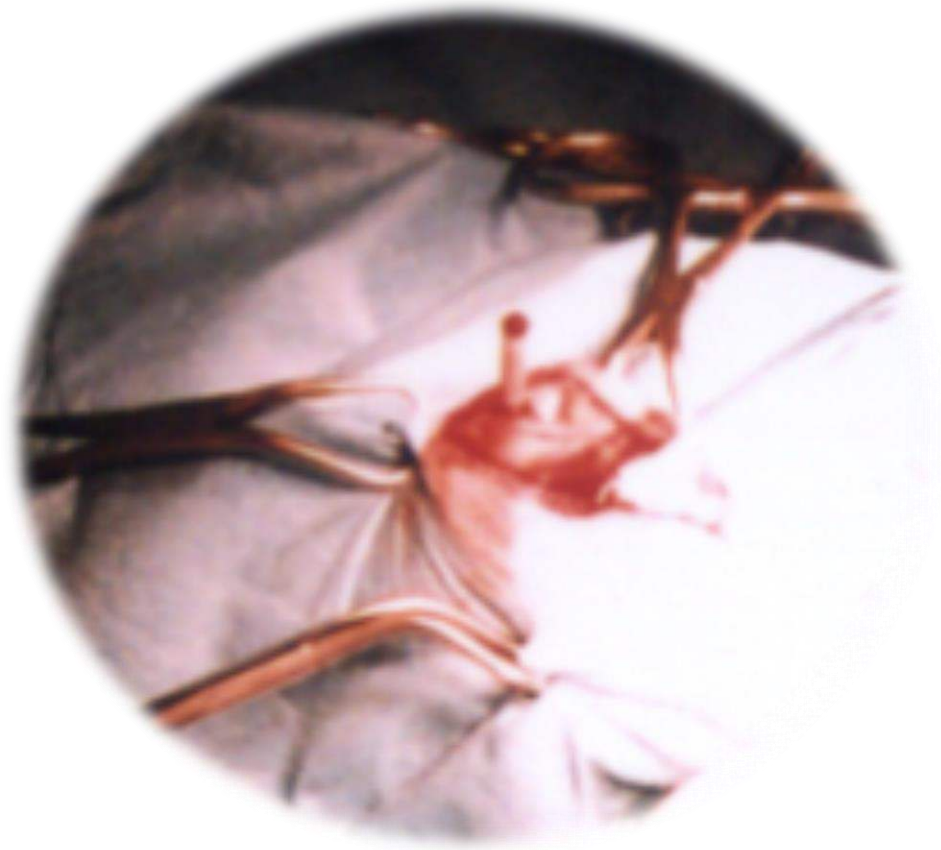
creazione sede implantare



inserimento cilindri in Ti

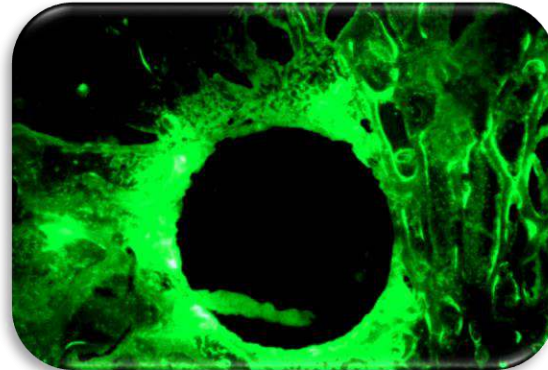


Saggi in vivo: chirurgia

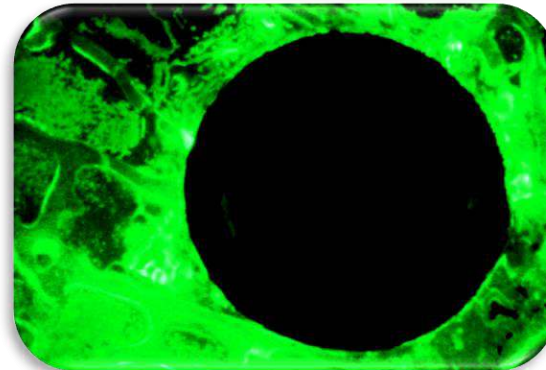
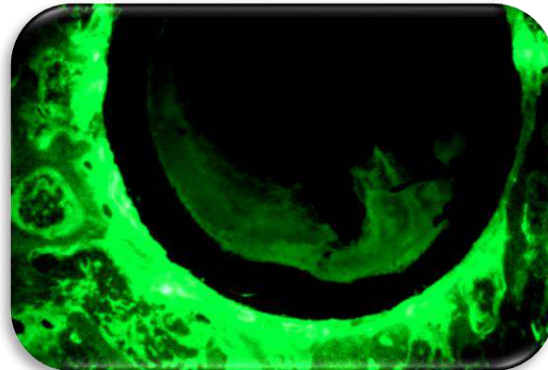
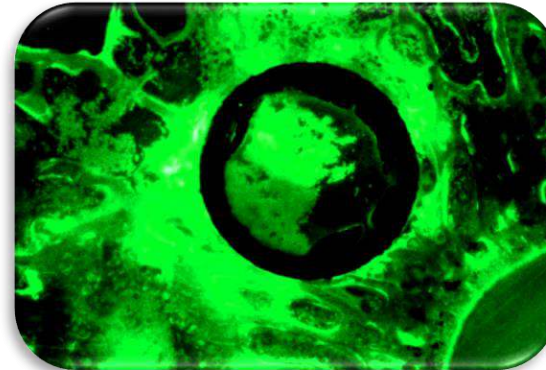


Saggi in vivo: risultati a due settimane

senza peptide d'adesione

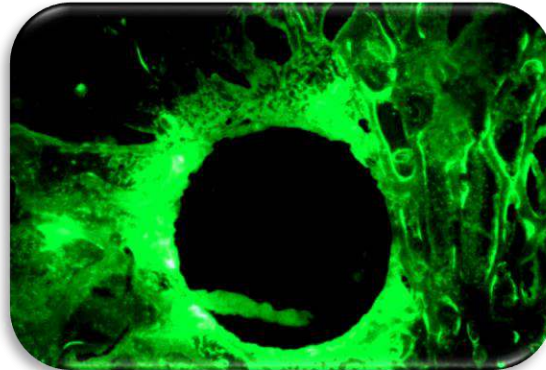


con peptide d'adesione

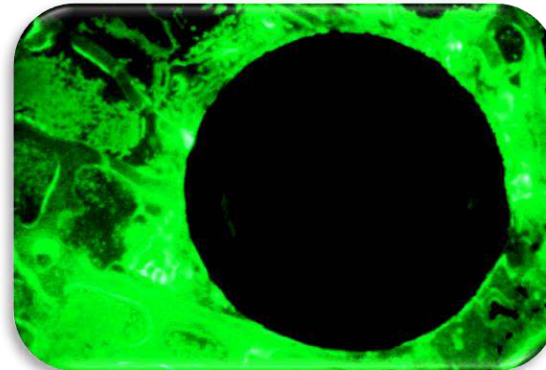
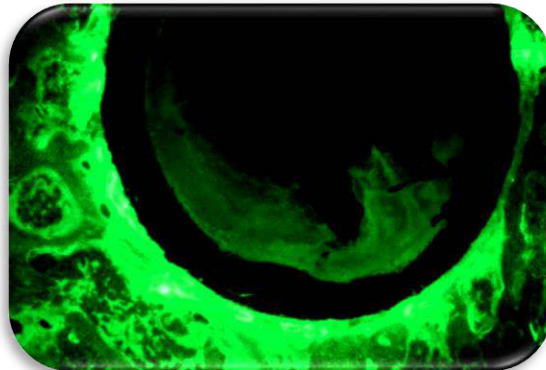
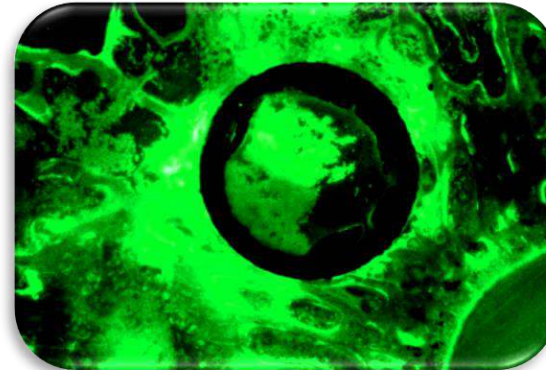


Saggi in vivo: risultati a due settimane

senza peptide d'adesione



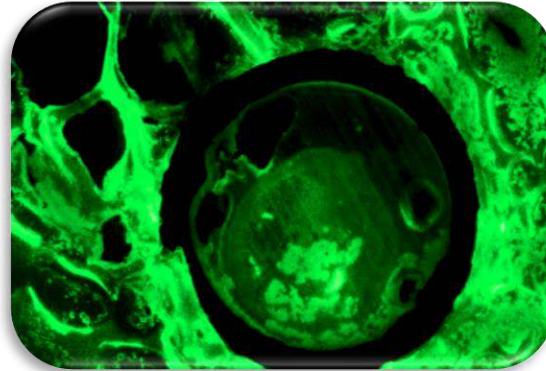
con peptide d'adesione



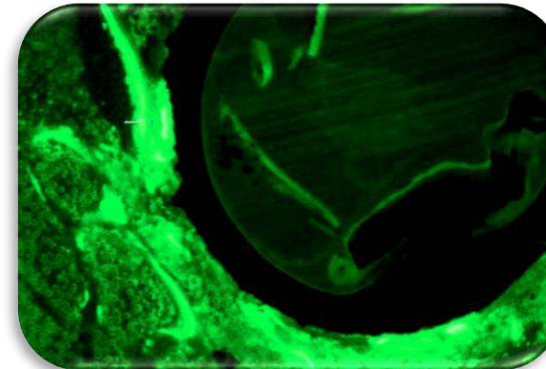
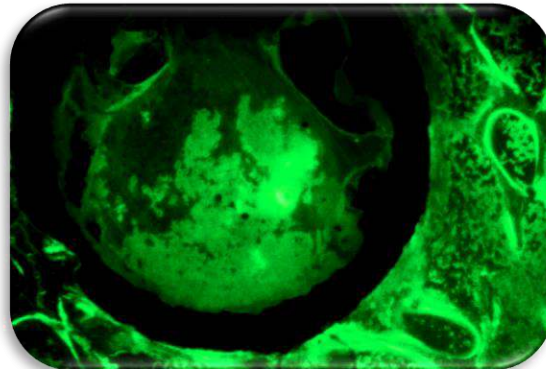
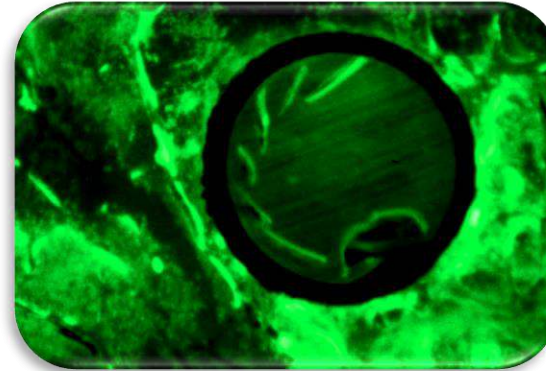
Il marcatore osseo rileva una attività osteogenica più diffusa nei campioni arricchiti col peptide d'adesione

Saggi in vivo: risultati a quattro settimane

senza peptide d'adesione

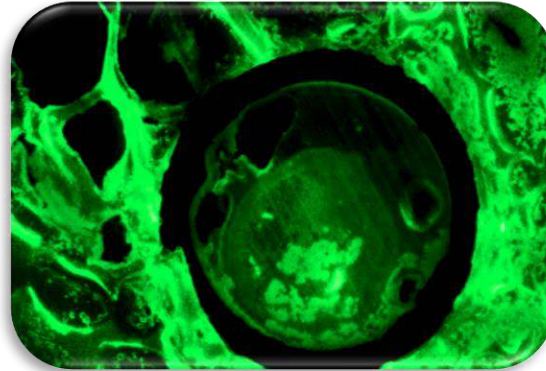


con peptide d'adesione

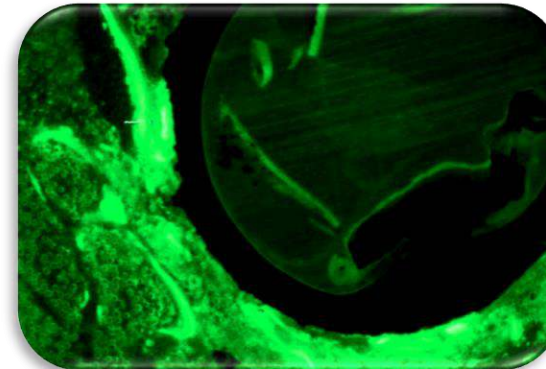
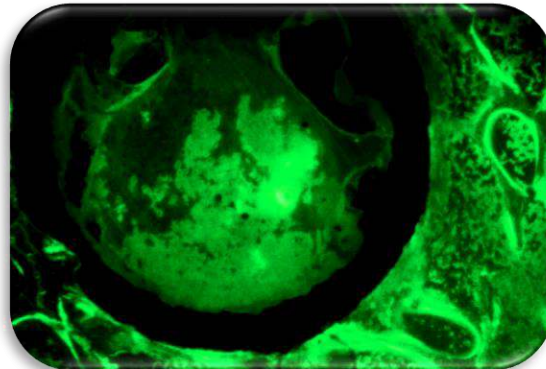
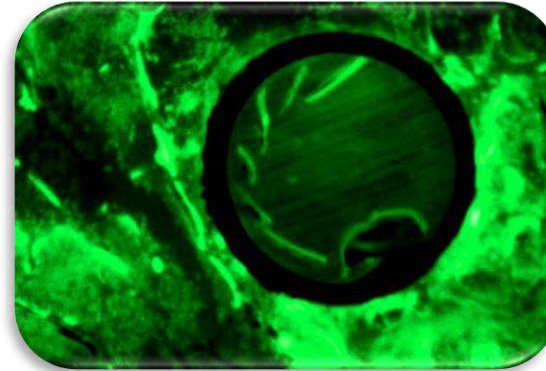


Saggi in vivo: risultati a quattro settimane

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 fabbricazioni di viti metalliche bioattive
- estendere l'attività sperimentale a modelli animali più complessi