

**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

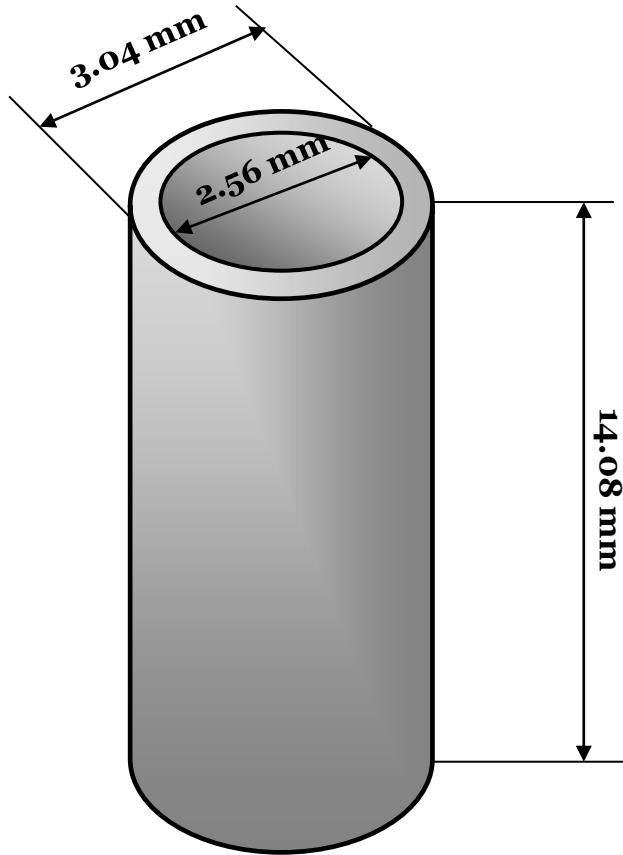
## Base di partenza

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:

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

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

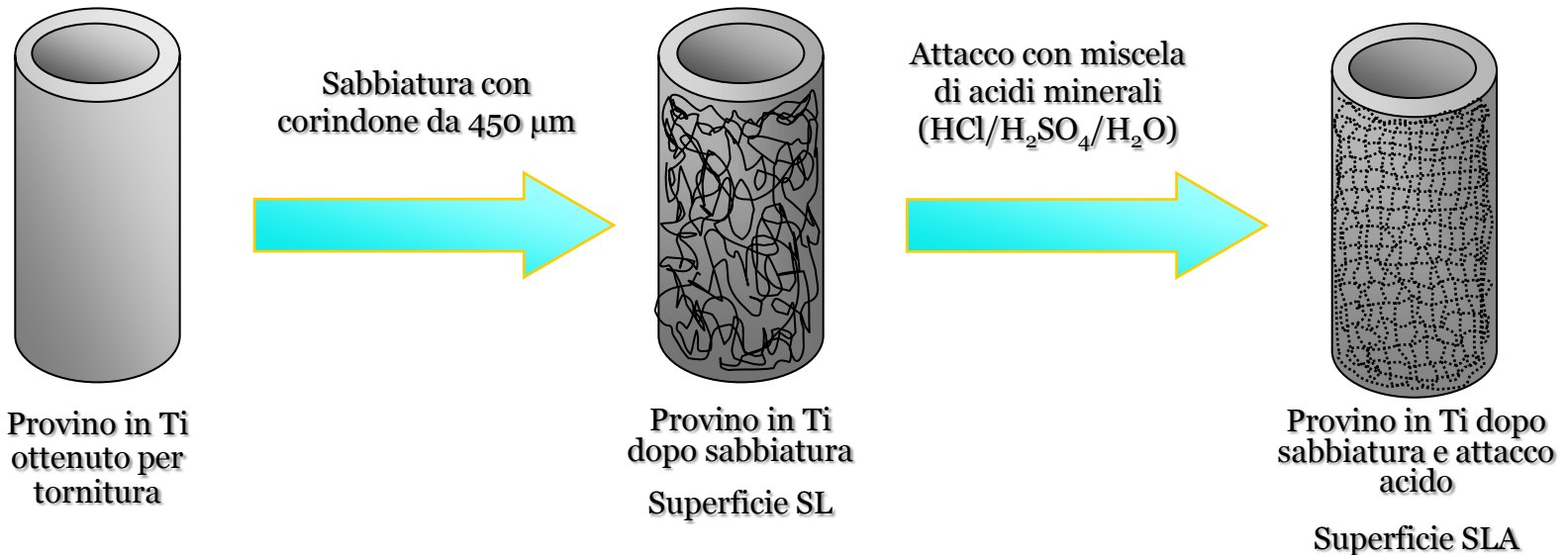
$$h = 14.08 \text{ mm}$$

I cilindri sono stati:

- trattati con tecniche di modifica superficiale;
- rivestiti (*dip-coating*) con un film sottile di  $\text{SiO}_2$  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

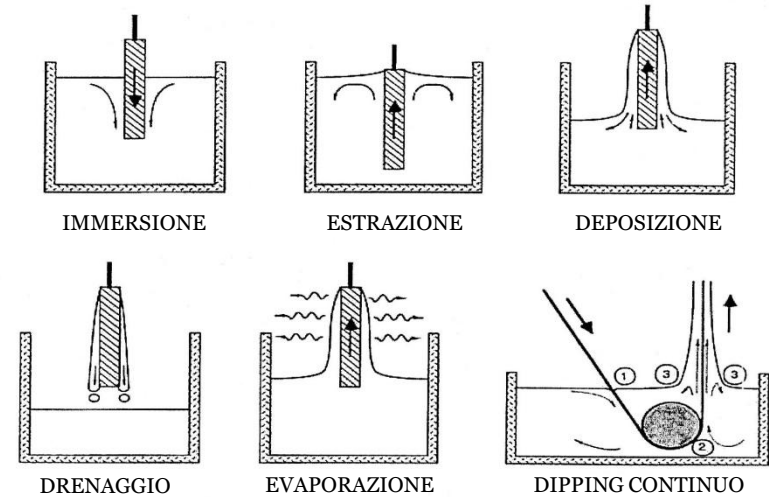
Si realizzano *network* inorganici usando come monomeri alcossidi di silicio:

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

## VANTAGGI

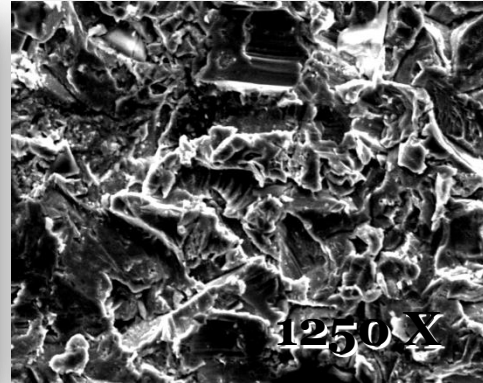
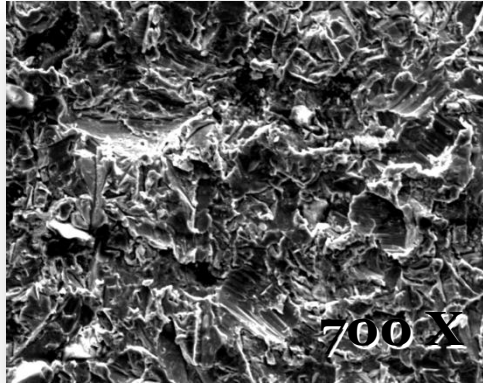
- basse temperature di processo;
- comportamento bioattivo del film di silice;
- esatta quantificazione del peptide di adesione nello strato depositato.

## DIP-COATING



# Analisi superficiale: SEM

## SUPERFICIE SL



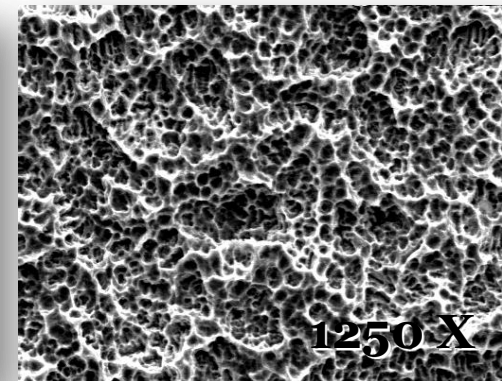
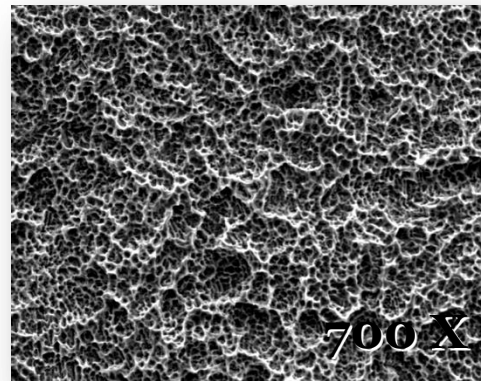
La superficie sabbiata presenta:

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

## SUPERFICIE SLA

L'attacco acido produce:

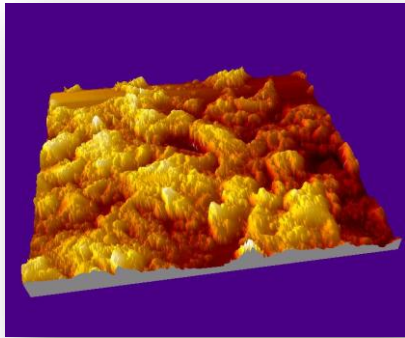
- appiattimento della topografia
- doppio livello di rugosità
- tessitura compatta e uniforme
- struttura alveolare microporosa





# Analisi superficiale: AFM

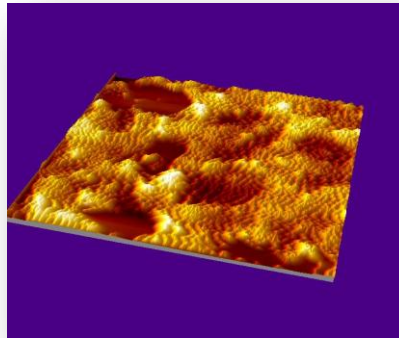
Cilindro SL



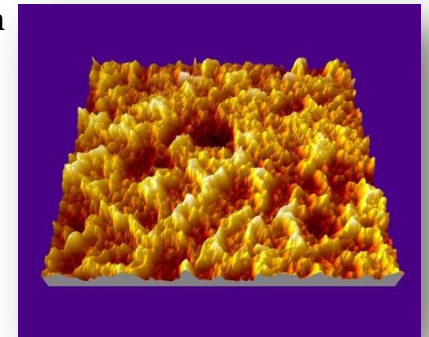
Attacco con  
miscela di  
acidi minerali



Cilindro SLA



Rivestimento con  
film di  $\text{SiO}_2$  con  
dip-coating

Cilindro SLA +  $\text{SiO}_2$ 

## Principali parametri di rugosità misurati all'AFM

CAMPIONE	$S_a$ [nm]	$S_q$ [nm]	$S_z$ [nm]	$S_{sk}$ [--]	$S_{ku}$ [--]	$S_{ds}$ [1/ $\mu\text{m}$ ]	$S_{sc}$ [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 $\text{SiO}_2$	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/ $\mu\text{m}^2$ ]
$S_{sc}$	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	[%]

# 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

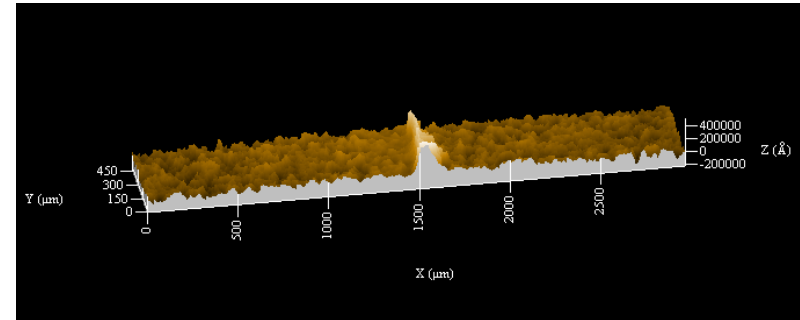
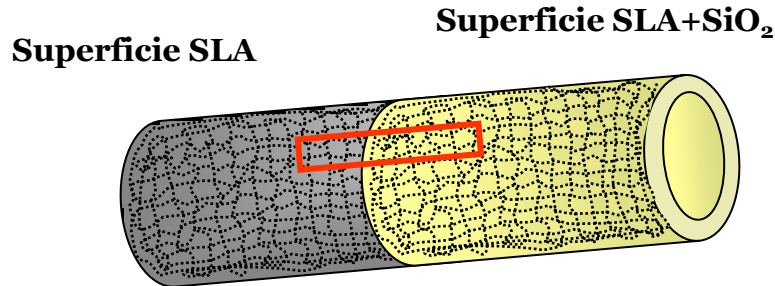
## CONFRONTO TRA SUPERFICIE SLA E SLA RICOPERTA

- $S_a$ ,  $S_q$ ,  $S_z$  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  $\text{SiO}_2$  pur non alterando la morfologia, determina una topografia più frastagliata e disomogenea

# Analisi superficiale: profilometro

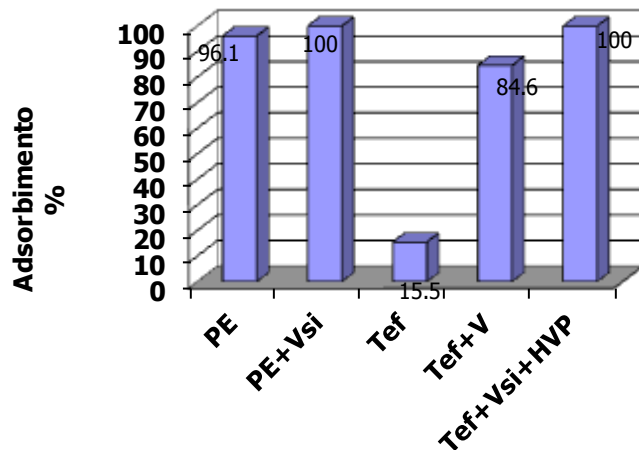


## Principali parametri di rugosità misurati al profilometro

CAMPIONE	$S_a$ [μm]	$S_q$ [Å]	$S_z$ [Å]	$S_{sk}$ [--]	$S_{ku}$ [--]	$S_{\Delta q}$ [°]	$S_{ds}$ [1/Å <sup>2</sup> ]
SLA	3.120	41079	196779	-1.00	4.55	5.01	5.30E-11
SLA + film di SiO <sub>2</sub>	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:



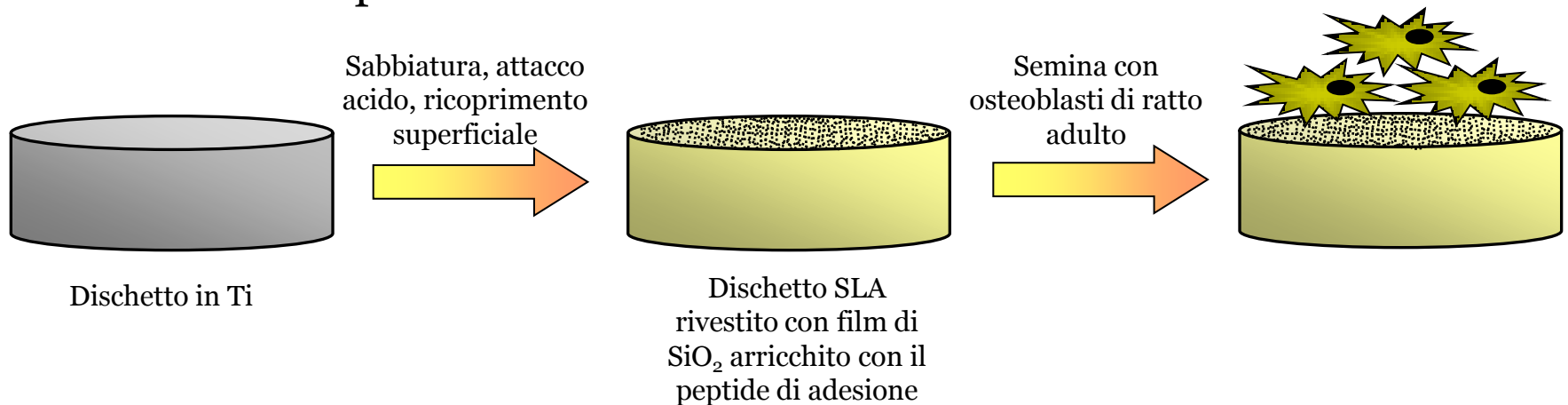
- il polietilene non è adatto per effettuare saggi di rilascio
- il teflon risulta inerte al peptide
- la sequenza mostra elevata affinità per il vetro e per il ricoprimento in  $\text{SiO}_2$

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

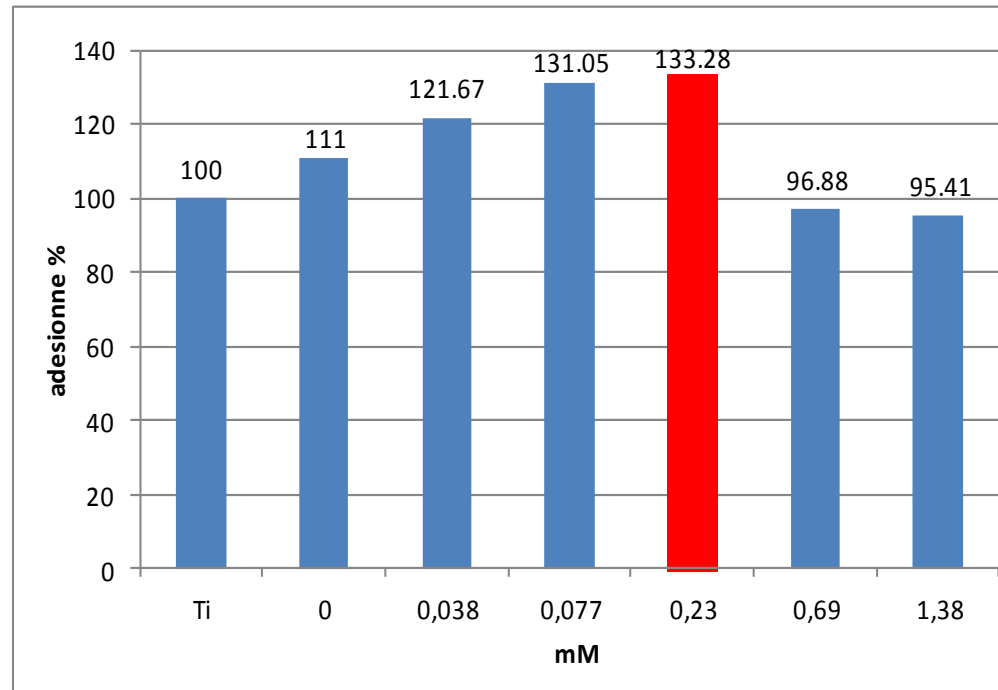
Sono stati utilizzati come substrato dischetti in Ti con le stesse caratteristiche superficiali dei cilindri:



Il test *in vitro* consente di:

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

# Saggi in vitro



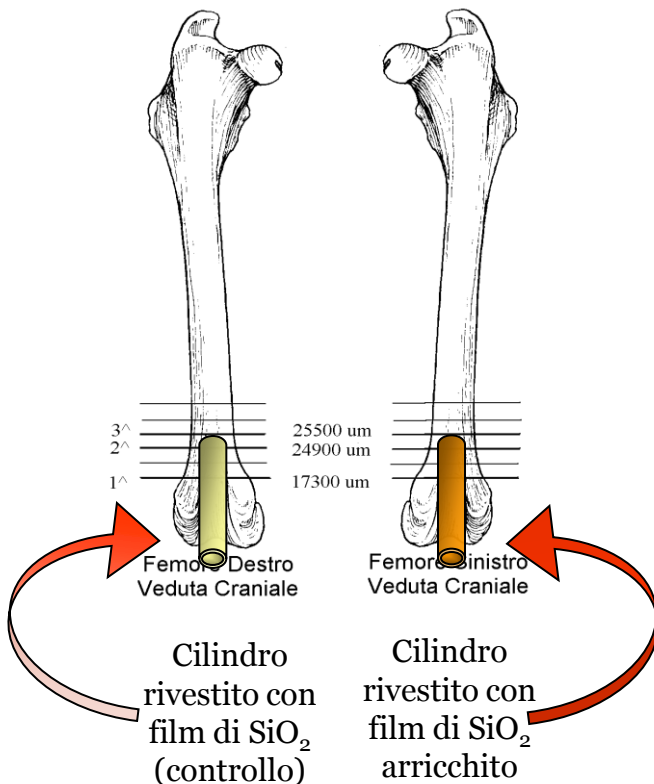
- il solo film di  $\text{SiO}_2$  aumenta l'adesione;
- il peptide promuove l'adesione degli osteoblasti;
- la concentrazione influenza la bioattività (max 0.23 mM)



# Saggi in vivo

**Modello animale:** conigli maschi razza *White New Zealand*

Inserimento dei cilindri nei  
femori dx e sin



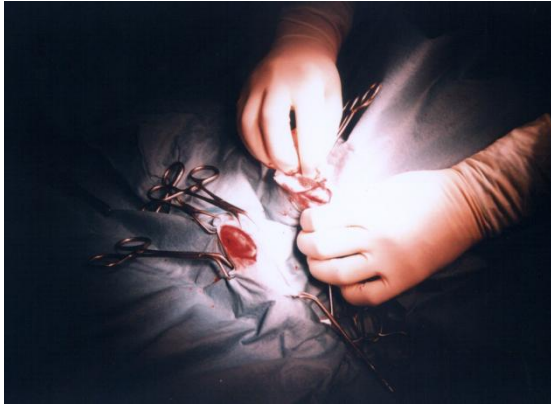
Marcatura con  
**Calcein Green**



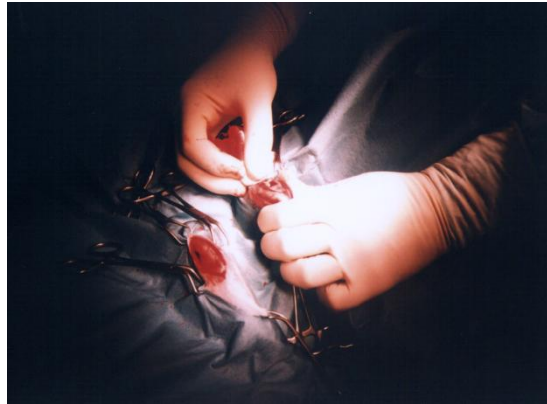
- sacrificio degli animali a 2 e a 4 settimane dall'intervento
- inclusione dei segmenti ossei in araldite
- osservazione in luce UV di reperti istologici prelevati ad altezze corrispondenti

# Saggi in vivo: chirurgia

artrotomia



lussazione della rotula



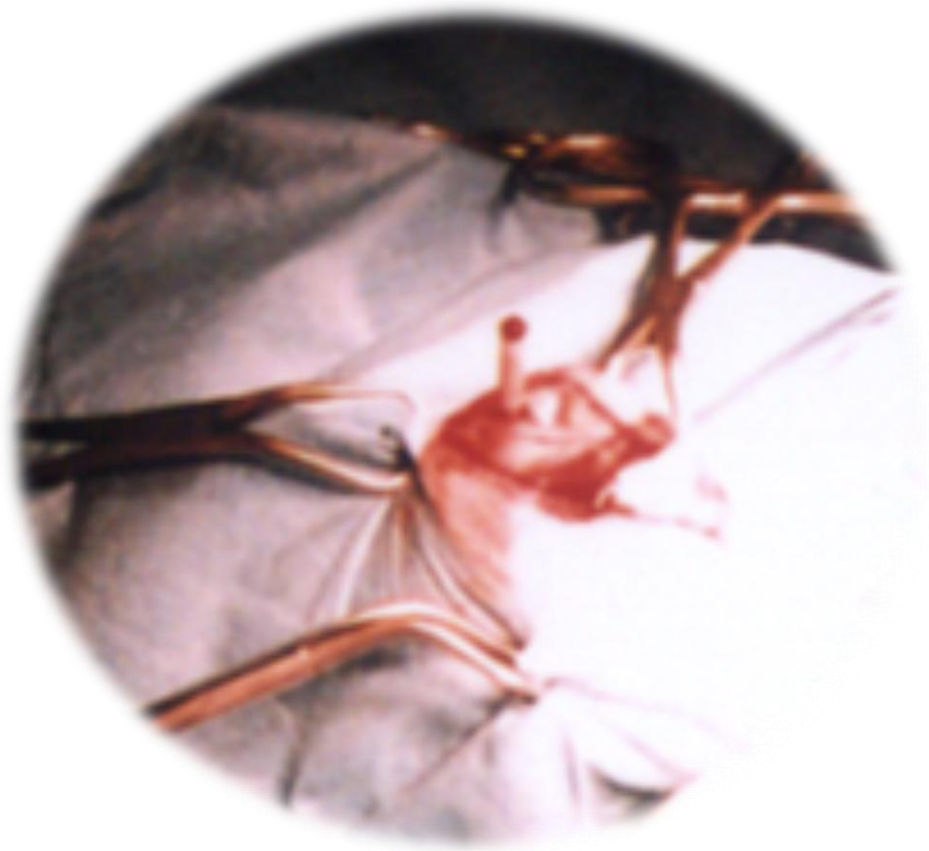
creazione sede implantare



inserimento cilindri in Ti

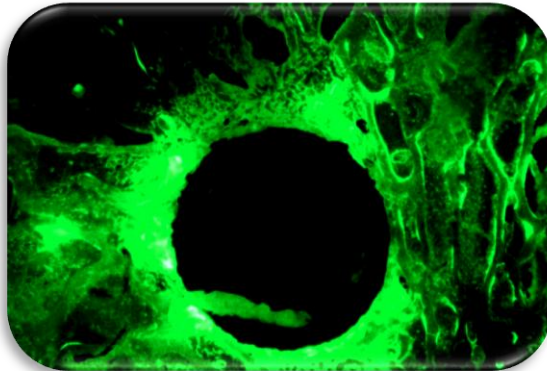


# Saggi in vivo: chirurgia

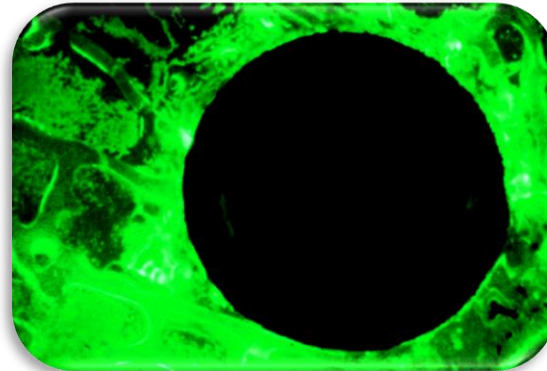
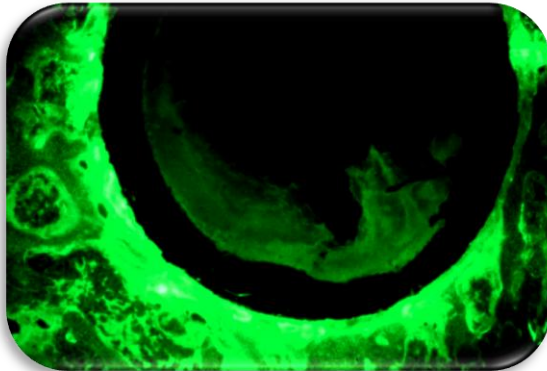
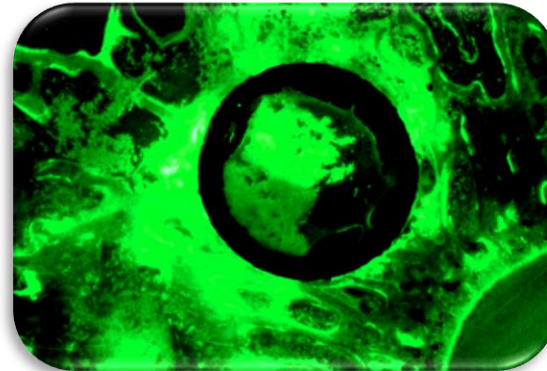


# Saggi in vivo: risultati a due settimane

senza peptide d'adesione



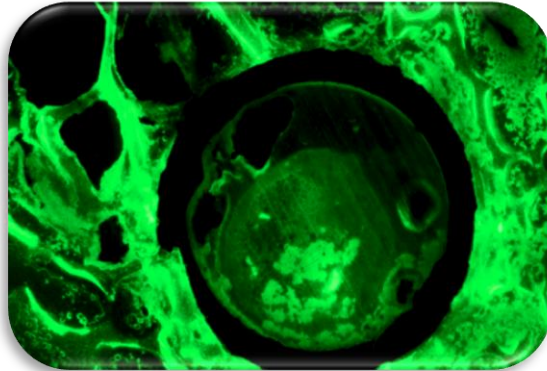
con peptide d'adesione



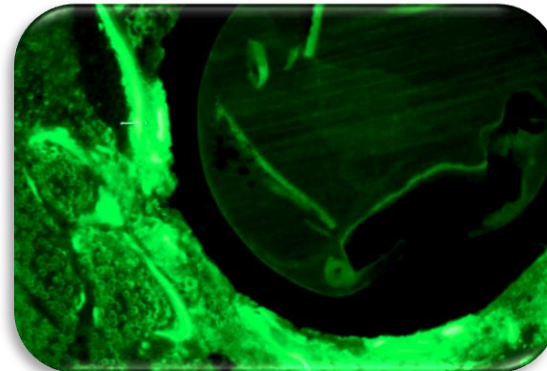
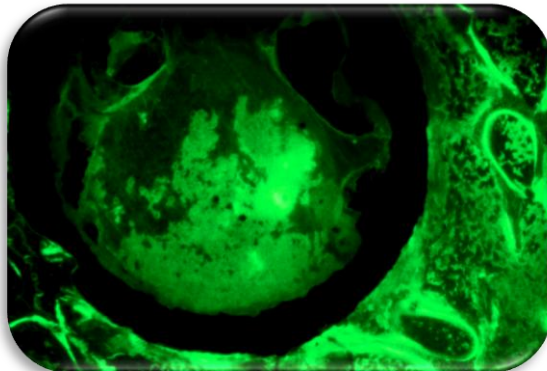
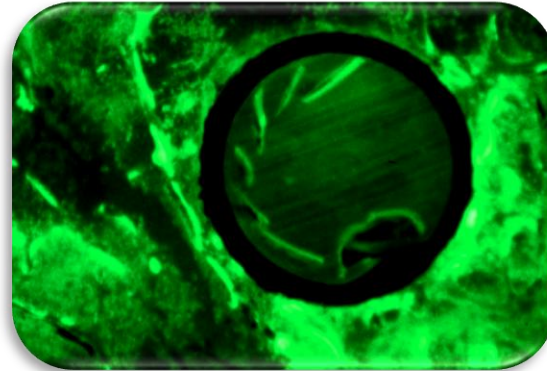
Il marcatore osseo rileva una attività osteogenica più diffusa nei campioni arricchiti col peptide d'adesione

# 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  $\text{SiO}_2$  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