UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

VALUTAZIONE DELLE FORZE DI FISSAZIONE DI SCAFFOLD MAGNETICI DI ULTIMA GENERAZIONE PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

Relatore:
Prof. Claudio Cobelli

Laureando:
Matteo Berni

Correlatore:
Ing. Zimi Sawacha

Tutor Aziendale:
Ing. Nicola Lopomo

Sessione di Novembre

Anno Accademico 2011 – 2012

Autorizzo consultazione e prestito tesi

Sommario

Background

Le problematiche relative al tessuto osseo e cartilagineo possono essere causa di traumi o di patologie degenerative, quali osteonecrosi e perdita di sostanza ossea.
Tali danni fin'ora sono stati risolti chirurgicamente attraverso l'uso di dispositivi, sia interni che esterni, in grado di conferire stabilità fisica e meccanica al tessuto interessato, non consentendo però un processo di ricrescita e rigenerazione del tessuto danneggiato da parte del paziente. Nell'ultimo decennio, grazie alla ricerca in ambito dell' Ingegneria tissutale, sono stati sviluppati particolari supporti, gli scaffold, realizzati in materiali biocompatibili e bioriassorbibili, i quali agiscono da impalcatura per le cellule mesenchimali che, anche grazie all'adozione di particolari fattori di crescita, promuovono il processo di rigenerazione e riparazione tessutale. Lo scopo di questa tesi è valutare le forze di fissazione di una nuova tipologia di scaffold, aventi caratteristiche magnetiche, nell'ambito della rigenerazione ossea.

Materiali e Metodi

L'attività di tesi è stata svolta presso il Laboratorio di Biomeccanica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, nell'ambito del progetto europeo Magister.
Le procedure analizzate hanno previsto l'uso di un particolare simulatore magneto-meccanico realizzato in materiale non ferromagnetico,in modo da non influire sulle sollecitazioni d'interazione tra scaffold magnetico e magneti.
Le configurazioni analizzate sono riferite al trattamento di due tipologie diverse di danni ossei: quelli inerenti a difetti intramidollari e quelli dovuti all'assenza di interi compartimenti ossei. Per ogni set up realizzato sono state analizzate le fasi di allontanamento e di avvicinamento dello scaffold dai magneti, in modo da simulare le sollecitazioni a cui esso verrà sottoposto in vivo e determinare cosi le forze a cui l'interazione magnetica dovrà essere superiore per evitare il distacco dell'innesto stesso. Le distanze analizzate per ogni configurazione variano in base all'entità delle forze magnetiche misurate, soprattutto in base alla particolare disposizione dei diversi magneti utilizzati. Al fine di misurare sia la distanza relativa scaffold-magnete che le forze d'interazione, sono stati utilizzati un calibro digitale (Tipo 15DCX Digimatic Caliper, Risoluzione 0.01 mm) ed una cella di carico (Tipo K-25, Cella di Compressione e Tensione, Valore massimo misurabile 20 N, Risoluzione 0.02 N) avente output digitale, opportunamente assemblati al simulatore magneto-meccanico. I dati ottenuti sperimentalmente sono poi stati confrontati,al fine di una loro convalidazione, con quelli ottenuti attraverso simulazioni analitiche, realizzate con l'adozione di particolari e specifici programmi quali Matlab 200b e Comsol 3.5 Multiphysics. Di notevole criticità, per la maggior parte dei set-up, è risultata la fase di azzeramento, sia a causa delle forze d'interazione, le quali hanno raggiunto anche notevoli entità, sia per evitare che le sollecitazioni cosi misurate risentissero della forza peso dei dispositivi e del non ottimale posizionamento dell'innesto nel simulatore.

Risultati

Dall'analisi dell'andamento delle forze magnetiche e dalla comparazione analitico-sperimentale,oltre alla validazione delle configurazioni realizzate, si è evidenziato che le simulazioni relative all'uso di scaffold per danni ad ossa lunghe forniscono forze di fissazione molto maggiori rispetto a quelle relative a danni intramidollari. Inoltre tali sollecitazioni risultano dipendere sia dalla distanza, sia dalla configurazione magnetica analizzata, con particolare rilevanza data dalla geometria e dal materiale di cui i magneti sono composti. Soprattutto nella fase iniziale di allontanamento e in quella finale di avvicinamento risultano dalle analisi piccole incongruenze con i dati analitici, dati per l'appunto dalla criticità della fase di azzeramento delle configurazioni magnetiche adottate.

Conclusioni

Il seguente studio ha permesso di verificare che le forze magnetiche d'interazione, nonostante siano di notevole entità in particolari configurazioni, non risultano essere sempre sufficienti per garantire la stabilità assoluta, fisica e meccanica, dell'innesto in situ, rendendo necessario in alcuni casi l'utilizzo di dispositivi di fissazione, soprattutto in riferimento ai danni ad ossa lunghe, dove le sollecitazioni a cui il tessuto osseo è sottoposto risultano essere notevolmente maggiori rispetto a quelle presenti a livello superficiale. Ciononostante, un notevole passo avanti è stato realizzato sulla strada di un minor utilizzo di pratiche e materiali invasivi per il trattamento di danni ossei e cartilaginei, dove un nuovo e importante ruolo è ormai ricoperto dalla rigenerazione autonoma dei tessuti lesi tramite l'uso di scaffold.

Indice

1 Introduzione **1**

1.1 Background e Stato dell'Arte 1

1.2 Scaffold e rigenerazione spontanea dei tessuti 1

1.2.1 Problematiche delle tecniche attuali 1

1.2.2 Caratteristiche e composizione di scaffold ossei 2

1.3 Patologie che possono richiedere l'utilizzo di scaffold 5

1.3.1 Osteotomia delle ossa lunghe 5

1.3.2 Perdita di sostanza ossea 7

1.3.3 Osteonecrosi 8

1.3.4 Lesioni cartilaginee 9

1.4 Vantaggio nell'utilizzo di scaffold 10

1.5 Problematiche di stabilità meccanica e fissazione 11

1.5.1 Il ruolo della tensione nel rimodellamento osseo 11

1.5.2 Proprietà meccaniche degli scaffold ossei 12

1.5.3 Metodi di fissazione per scaffold ossei 13

1.6 Scaffold magnetici 19

1.6.1 Progetto Magister 20

1.6.2 Problema di fissazione di scaffold magnetici 21

1.7 Struttura ospitante l'attività di tirocinio 21

1.8 Obiettivi del lavoro 22

1.8.1 Verificare una nuova tipologia di fissazione 22

2 Materiali e Metodi **23**

2.1 Soluzione di fissazione per scaffold magnetici 23

2.1.1 Fissazione scaffold magnetici per danni ossei intrarticolari 23

2.1.2 Fissazione scaffold magnetici per danni ad ossa lunghe 24

2.1.3 Simulazione analitica di fissazione tramite Comsol e Matlab . . . 25

2.2 Protocollo Sperimentale 26

2.3 Verifica Simulazione 27

2.3.1 Arco 28

2.3.2 Cella di carico 28

2.3.3 Calibro digitale 29

2.4 Descrizione dei test 30

2.4.1 Calibrazione del simulatore 30

24.2 Trazione magnete-magnete 31

2.4.3 Trazione magnete-foglio di Cobalto 32

2.4.4 Trazione magnete-pin 33

2.4.5 Trazione pin-foglio di Cobalto 34

2.4.6 Forze laterali magnete-magnete 36

2.5 Simulazione fissazione scaffold su osso femorale 38

3 Risultati **39**

3.1 Discussione risultati 39

3.1.1 Trazione magnete-magnete 40

3.1.2 Trazione magnete-foglio di Cobalto 42

3.1.3 Trazione magnete-pin 43

3.1.4 Trazione pin-foglio di Cobalto 44

3.1.5 Forze laterali magnete-magnete 47

3.1.6 Simulazione fissazione scaffold su osso femorale 49

4 Discussione e Conclusione **51**

A Istituto Ortopedico Rizzoli **53**

A.1 Ubicazione 53

A.2 Descrizione Struttura 54

A.2.1 Divisioni, servizi e dipartimenti 55

A.3 Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica 57

A.2 Laboratorio NaBi 58

Bibliografia **61**

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Background e Stato dell'Arte

La riparazione dei difetti ossei e cartilaginei, siano essi conseguenti ad un trauma, ad una progressiva degenerazione del tessuto o ad un intervento di resezione ossea legato a cause diverse (infettive o oncologiche), ha sempre rappresentato un'importante prova in ambito clinico, chirurgico e riabilitativo. Negli ultimi anni, accanto ai più perfezionati metodi di trattamento, sostegno e cura delle lesioni ossee e cartilaginee tramite dispositivi di *fissazione esterni ed interni*, si è sviluppata una nuova tendenza nell'utilizzo di materiali biocompatibili e bioriassorbibili, che mirano da un lato a ridare stabilità meccanica al sistema compromesso tramite l'uso di dispositivi hardware (composti generalmente da materiali non riassorbibili introdotti con sistemi invasivi *in situ*), ma anche attraverso proliferazione e rigenerazione del tessuto originario. Queste tecniche si avvalgono, nella quasi totalità dei casi, dell'utilizzo di supporti biologici per la ripopolazione delle cellule, gli *scaffold*.

1.2 Scaffold e rigenerazione spontanea dei tessuti

1.2.1 Problematiche delle tecniche attuali

L'osso è uno dei tessuti con maggiore richiesta di rigenerazione, sostituzione o ricostruzione a causa di lesioni provocate da vari fattori, naturali o traumatici. Finora i metodi utilizzati, non esenti dal provocare situazioni critiche, per trattare queste problematiche sono stati principalmente due:

Ricostruzione chirurgica

Nella ricostruzione chirurgica, le protesi sintetiche ed i materiali utilizzati, quali leghe, metalli e ceramiche, non possono sostituire completamente le funzioni biologiche e probabilmente non saranno in grado nel tempo di prevenire il progressivo deterioramento del tessuto.

Trapianti

Tutti i vari tipi di trapianti presentano delle limitazioni: nell'*autotrapianto* (*autograft*), le possibilità di complicazione sono generalmente dovute ad una limitata disponibilità di tessuto osseo, alla durezza del sito donatore ed alla prolungata riabilitazione; l'*allotrapianto* (*allograft*) presenta problematiche legate alla scarsità di donatori, alla limitata vascolarizzazione, al possibile trasferimento di agenti patogeni ed al continuo utilizzo di farmaci immunosoppressivi che, da un lato prevengono la possibilità di rigetto, mentre dall'altro possono causare infezioni batteriche, virali e carcinogenesi.

1.2.2 Caratteristiche e composizione di scaffold ossei

Per ovviare alle problematiche relative alle procedure menzionate sopra, negli ultimi anni l'Ingegneria tissutale ha messo a disposizione di medicina e chirurgia una nuova tecnologia tendente a rigenerare e ridare stabilità ai tessuti: tale innovazione prende il nome di ***scaffold***. Lo scaffold, (Fig. 1.1) è una matrice extra-cellulare porosa il cui scopo principale è quello di supportare la crescita, l'organizzazione ed il differenziamento di cellule mesenchimali provenienti dal paziente, fatte proliferare prima *in vitro*, poi *in vivo*, sul supporto stesso. Il primo obiettivo di questa tecnologia è quindi quello di rigenerare il tessuto, in particolar modo quello osseo, con struttura e funzioni comparabili con quelle dell'osso e della cartilagine nativa.



Fig. 1.1: Esempio di scaffold per trattamento difetti cartilaginei ed osteocondrali del ginocchio.

Gli scaffold devono possedere proprietà biologiche, fisiche e strutturali adatte alle condizioni fisiologiche del tessuto che andranno a rigenerare. Con particolare riferimento al tessuto osseo e cartilagineo, tali caratteristiche risultano essere:

- **biocompatibilità**, cioè la capacità di generare una corretta risposta biologica;
- **bioriassorbibilità**, in modo da consentire la completa sostituzione dello scaffold con osso nativo di nuova formazione;
- **osteoconduzione**, cioè la capacità, anche tramite l'uso di altri dispositivi, di promuovere la migrazione e l'adesione di cellule che contribuiscono alla formazione di nuovo tessuto osseo;
- **osteoinduzione**, che garantisce la differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti.

Nella progettazione di questi innesti, oltre alle caratteristiche sopra citate, devono essere rispettati altri parametri quali proprietà meccaniche adeguate, struttura superficiale che garantisca l'adesione e la porosità del supporto, in modo da favorire la crescita di nuovo tessuto all'interno dello scaffold stesso. Per questi motivi, risulta di primaria importanza la scelta di materiali potenzialmente utilizzabili per la creazione di scaffold, che risultano essere:

Polimeri

I polimeri sono materiali compositi caratterizzati da lunghissime catene che possono presentarsi sotto forma di fibre, tessuti, film e liquidi viscosi, trovando cosi un vasto impiego sia in campo chirurgico che biomedico [1]. Questi composti si differenziano, principalmente per la loro origine, in due categorie: naturali e sintetici.

I ***polimeri naturali*** possiedono il grande vantaggio di essere biocompatibili e biodegradabili, in quanto simili ai componenti strutturali presenti nei tessuti umani. Le tipologie più utilizzate risultano essere amido, collagene, chitina e chiosano, utilizzati per la riparazione di svariati danni, in particolare quelli legati ai tessuti ossei e cartilaginei. Tuttavia la bassa resistenza meccanica e l'alta velocità di degradazione portano a non utilizzare questi biomateriali singolarmente, ma in associazione con altri o conseguentemente la modifica delle loro proprietà chimiche attraverso *cross-linking*, che da un lato migliora resistenza meccanica ed aumenta il tempo di degradazione, mentre può causare effetti tossici, diminuendo la biocompatibilità del materiale; per tale motivo l'uso di biopolimeri naturali per la produzione di scaffold ossei è decisamente molto limitato.



Fig. 1.2: Geometrie di scaffold ossei realizzati in idrossiapatite.

I ***polimeri sintetici*** hanno il pregio di possedere struttura chimica molto varia grazie al numero dei monomeri di partenza attualmente noti e disponibili; si possono inoltre ottenere in molteplici forme, con diversi gradi di porosità globale, dimensione, velocità di degradazione e proprietà meccaniche. Una classe importante di questa suddivisione include l'acido poliglicolico, l'acido polilattico ed il policaprolattone.

L'*acido poliglicolico* (PGA) è stato utilizzato già negli anni '70 come materiale di suture: tuttavia la sua degradazione risulta essere troppo rapida per molte applicazioni, dal momento che già dopo 2-4 settimane perde le sue proprietà meccaniche.

Per migliorare le prestazioni si è fatto quindi riscorso all'*acido polilattico* (PLA) che, a causa della sua più elevata idrofobicità, limita l'assorbimento di acqua, rendendo la sua idrolisi più lenta rispetto a quella del solo PGA.

Il *policaprolattone* (PCL) è un polimero sintetico biodegradabile e biocompatibile, soprattutto usato come scaffold polimerico per l'ingegneria tissutale ossea grazie al fatto che presenta una cinetica di riassorbimento notevolmente inferiore rispetto all'acido poliglicolico e polilattico, riconducibile all'elevato grado di cristallinità.

Ceramici

I soli polimeri, anche se molto duttili, non sono in grado di sopperire alle caratteristiche meccaniche e fisiche che gli scaffold devono possedere per poter essere utilizzati come innesti ossei e cartilaginei. Per ovviare a ciò, in combinazione con i polimeri, sono stati utilizzati i ceramici, composti inorganici che contengono elementi metallici e non, con composizione e proprietà variabili entro un largo spettro.

Le bioceramiche impiegate per l'osteogenesi sono principalmente basate su un componente fondamentale che riveste un ruolo di rilievo anche nei tessuti: il *fosfato di calcio*. Tale composto indica una classe molto complessa che, a seconda del rapporto calcio-fosfato, della presenza di acqua e di impurezze ed in funzione della temperatura, viene distinto in idrossiapatite e Beta fosfato tricalcico (Fig. 1.2).

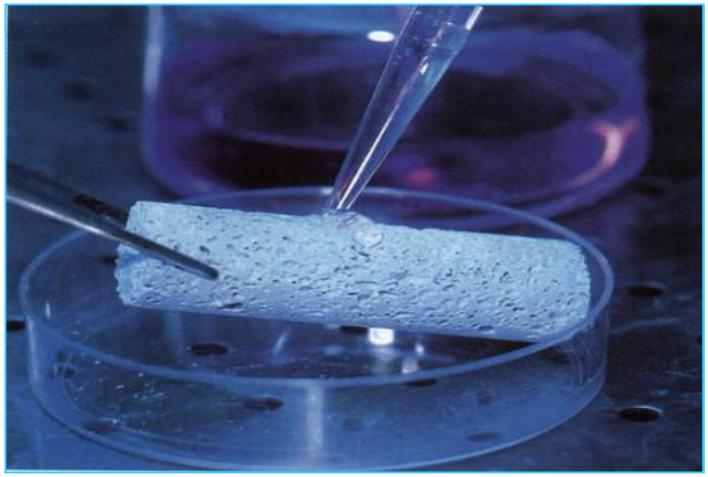


Fig. 1.3: Scaffold realizzato con l'uso combinato di materiali ceramici e polimerici.

Entrambe le forme sono altamente biocompatibili ed in grado di formare legami diretti con i tessuti duri già dopo quattro settimane dall'impianto; per queste loro caratteristiche sono molto usate negli impianti ossei. Gli svantaggi principali legati al loro uso sono la fragilità e la loro lenta degradazione [1]. Per ovviare alle problematiche che entrambi i materiali presentano, nella realizzazione di scaffold tridimensionali per innesti ossei e cartilaginei vengono utilizzati, in opportune configurazioni e proporzioni sia polimeri che ceramici (Fig.1.3).

1.3 Patologie che possono richiedere l'utilizzo di scaffold

L'utilizzo di scaffold specifici per il trattamento di lesioni cartilaginee ed ossee non è ancora diffuso ed applicabile in maniera estensiva alle molteplici problematiche che possono insorgere; al momento esistono alcune patologie per cui l'apporto di questa nuova tecnologia risulta essere più che rilevante (Fig.1.4).

1.3.1 Osteotomia delle ossa lunghe

Nell'intervento di osteotomia, lo scopo principale è quello di mutare l'asse di un arto per ottenere una situazione meccanica più favorevole. In pratica il chirurgo va a creare una frattura programmata più o meno completa la cui sede e modalità di esecuzione sono scelte al fine di traslare le forze pressorie da una regione ad un'altra, scaricando il compartimento articolare danneggiato; per ottenere ciò viene sezionata una parte di osso maggiormente distale o prossimale e spostato dalla sua posizione originale a quella d'interesse.



Fig. 1.4: Posizione delle principali problematiche ossee che insorgono nel corpo umano.

Comunemente si ricorre a questa procedura quando l'artrosi del ginocchio è presente in un compartimento ed è un intervento temporaneo, necessario per ritardare l'impianto di protesi mono-compartimentale o di protesi totale di ginocchio.
La letteratura [2] sottolinea che utilizzando questo tipo di procedura sull'articolazione del ginocchio, la chirurgia è in grado di mutare le zone di pressione andando a sollecitare maggiormente la parte meno usurata e contribuendo cosi ad una diminuzione del dolore avvertita dal paziente.

Le zone solitamente sottoposte ad osteotomia sono la parte distale del femore e quella più prossimale della tibia (Fig.1.5).

Negli ultimi anni è più usata l'osteotomia di addizione (open wedge) dato che permette di conservare una maggior quantità di osso senza modificare il bilanciamento dei legamenti e l'altezza della rotula.



Fig.1.5: Osteotomia Tibiale e Femorale.

Le dimensioni della sezione ossea che verrà traslata dipendono dall'angolo che si vuole raggiungere per ottenere l'effetto terapeutico desiderato. Le superfici di sezione devono essere fissate fin tanto che il callo osseo non si sia formato rendendo indeformabile la correzione. Tale tecnica è indicata per pazienti relativamente giovani ed attivi ed in presenza di danneggiamenti in un solo compartimento dell'articolazione.

Il principale vantaggio è dato dal fatto che consente l'immediata ripresa della deambulazione e del carico sull'arto e quindi il mantenimento di un buon tono muscolare; inoltre è stato dimostrato che nel 60-75% dei casi, il paziente non avverte dolore nemmeno dopo 10 anni dall'intervento [2].

1.3.2 Perdita di sostanza ossea

La perdita di sostanza ossea può essere provocata sia da fattori propri dell'ambiente biologico, quali osteoporosi e tumori, sia a cause di fenomeni non dipendenti direttamente dal paziente, come mobilizzazioni protesiche ed infezioni. L'osteoporosi è una malattia che rende le ossa "porose", cioè meno compatte e quindi più fragili (Fig.1.6); inizialmente non provoca sintomi rilevanti, infatti la prima manifestazione è solitamente data da fratture.

La fase di distruzione viene gestita da un tipo di cellula detta osteoclasta e quella di costruzione dal tipo osteoblasta. Superati i 40 anni può accadere che il tessuto osseo costruito non sia sufficiente a rimpiazzare quello distrutto dagli osteoclasti, questo comporta che, con il passare degli anni si vada incontro ad una lenta perdita di sostanza ossea (osteoporosi senile).

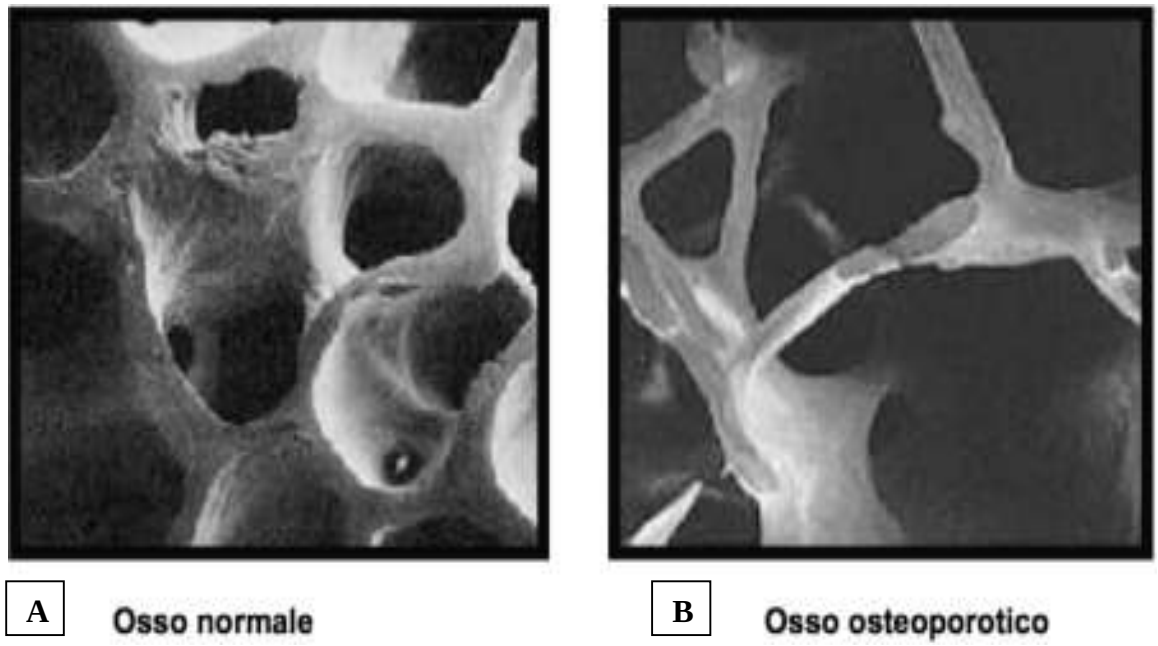


Fig. 1.6: Differenza strutturale tra A) tessuto osseo sano e B) affetto da osteoporosi.

La mobilizzazione asettica protesica è una delle principali causa di fallimento delle protesi d'anca e di ginocchio ed è certamente favorita dalla mancanza di stabilità primaria dell'impianto nell'immediato postoperatorio: la differente rigidezza delle strutture a contatto, la presenza di vincoli in grado di trasmettere solo sollecitazioni di taglio e di compressione sono dei fattori che rendono inevitabili i micromovimenti relativi che sono, al tempo stesso, causa ed effetto del tipo di interfaccia presente fra l'osso e l'impianto stesso. La mobilizzazione può portare quindi alla perdita di sostanza ossea e al fallimento dell'impianto protesico stesso.

1.3.3 Osteonecrosi

L’ osteonecrosi, o necrosi avascolare (asettica), indica la cessazione delle attività biologiche vitali del tessuto osseo; con maggiore frequenza sono coinvolti la testa femorale e quella omerale, i condili femorali, il piatto tibiale e le ossa piccole delle mani e dei piedi (Fig.1.7).

La necrosi ossea può essere provocata da un gran numero di fattori lesivi, che agiscono con intensità tale da determinare un danno irreversibile nelle strutture o negli equilibri metabolici cellulari, come ad esempio calore, traumi, irradiazioni, corrente elettrica, agenti chimici tossici, disturbi della circolazione che portino ad una cattiva ossigenazione del tessuto e microrganismi patogeni o loro tossine.



Fig.1.7: Radiografia mostrante lesione littica della testa femorale dovuta ad osteonecrosi.

Per effetto dell’ osteonecrosi, le cellule perdono la loro individualità funzionale, risentendo maggiormente dell’ ambiente esterno: in esse penetrano sostanze presenti nei liquidi interstiziali, cessa l’attività respiratoria, si modifica il pH con conseguente manifestazione di alterazioni della struttura cellulare fino alla sua completa dissoluzione.

Quando la malattia colpisce la regione metafisaria di un osso può decorrere asintomatica, mentre il coinvolgimento dell’osso sottostante di un’articolazione portante comporta un significativo rischio di sviluppare una frattura sottoarticolare, con conseguenti incongruità articolare e artrosi.

1.3.4 Lesioni cartilaginee

I tessuti cartilaginei delle articolazioni umane, soprattutto quelli presenti in anca, ginocchio e caviglia, possono subire con frequenza seri danni di origine traumatica o patologica (Fig.1.8). E' possibile distinguere infatti lesioni circoscritte, dovute principalmente a fenomeni traumatici, e patologie degenerative (artrosi, artrite reumatoide e necrosi avascolare), nelle quali le cartilagini articolari sono destinate a scomparire e a causare probabili lesioni dell'osso circostante.

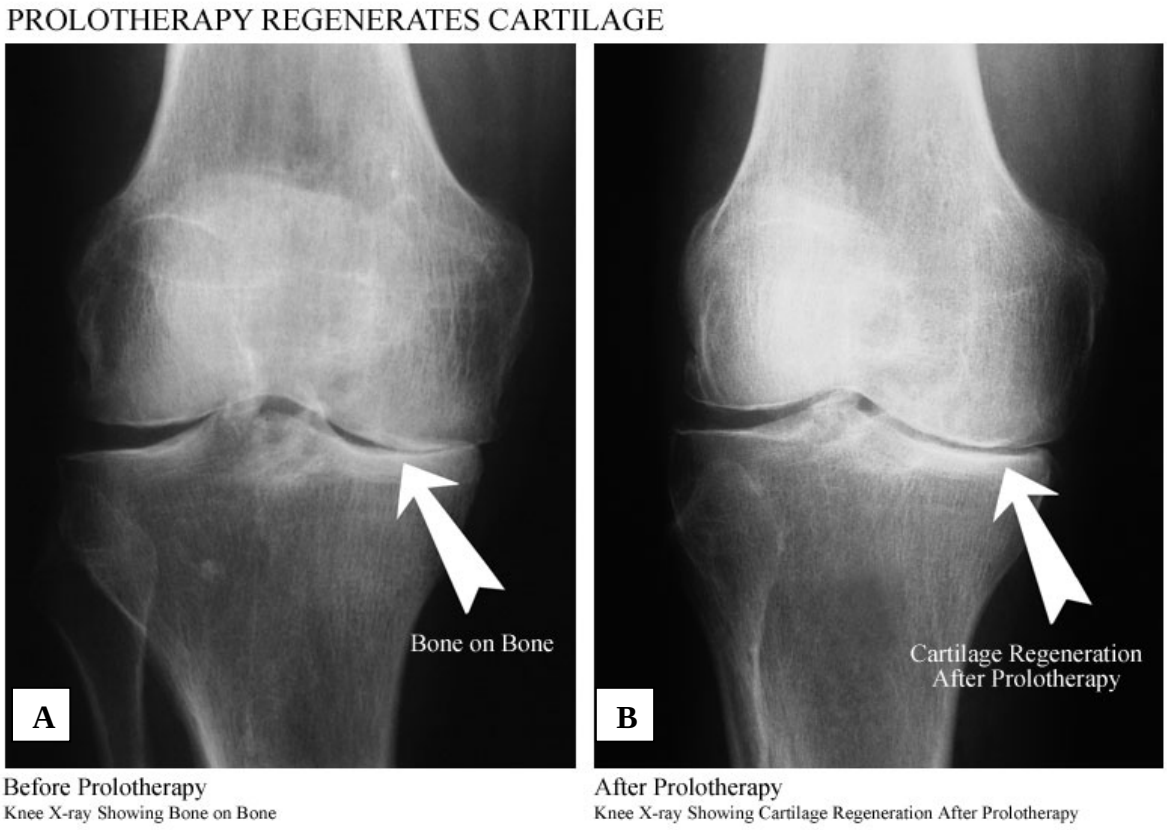


Fig. 1.8 A-B: Radiografia che evidenzia la presenza di patologia cartilaginea al ginocchio A) trattata con rigenerazione tramite proliferazione B).

In ogni caso la cartilagine articolare non si ripara da sé: le lesioni non guariscono ma possono aumentare e creare conseguenze notevoli per la mobilità dell'arto e possono portare ad una patologia degenerativa artrosica. Lesioni cartilaginee possono essere inoltre lesioni condrali pure (coinvolgono esclusivamente la cartilagine articolare) o lesioni condrali miste (associate ad alterazioni dell'osso subcondrale, sede di impianto della cartilagine articolare).

1.4 Vantaggi nell'utilizzo di scaffold

Le problematiche associate al trattamento di patologie legate al malfunzionamento o alla perdita di funzionalità di organi e tessuti hanno orientato, negli ultimi anni, l'interesse della ricerca scientifica verso la medicina rigenerativa, che prevede la riparazione del tessuto danneggiato. Si sono aperti cosi diversi scenari: la possibilità di inserire fattori di crescita nel sito danneggiato, in modo da stimolare le cellule a rigenerare il tessuto, o in alternativa, di coltivare in vitro un tessuto, che una volta rigenerato, verrà trapiantato *in vivo* sul paziente (Fig.1.9).

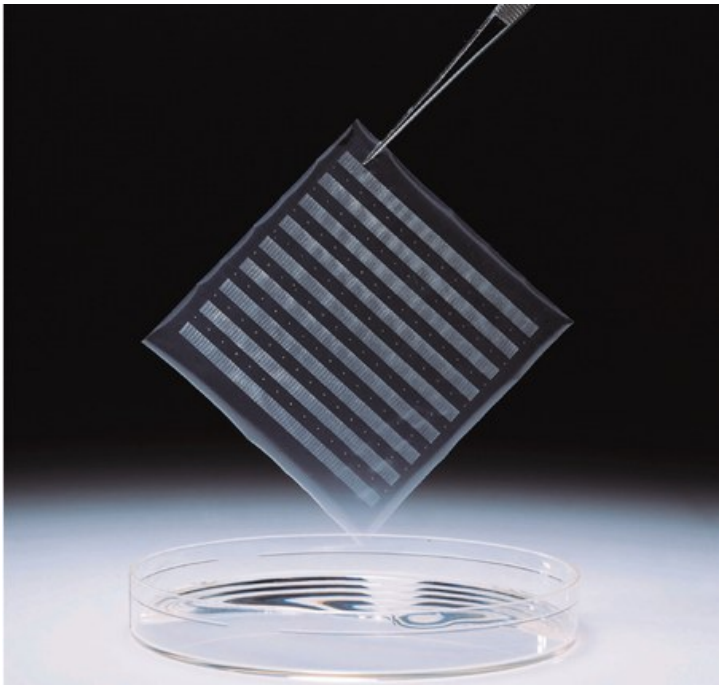


Fig. 1.9: Esempio di scaffold per rigenerazione cartilaginea e cutanea.

In entrambi i casi risulta essenziale la presenza di uno scaffold tridimensionale, capace di mimare la matrice extra-cellulare e guidare attivamente il processo di rigenerazione tissutale. In tal senso assume un ruolo fondamentale l'impiego di molecole-segnale di natura proteica, tra le più note ricordiamo i fattori di crescita, direttamente coinvolte nella proliferazione cellulare e nella rigenerazione tissutale.

I principali vantaggi che derivano dall''utilizzo di scaffold nell'ambito della medicina rigenerativa riguardano il fatto di avere la possibilità di sostituire il tessuto danneggiato con tessuto sano di nuova generazione che risulterà avere le medesime caratteristiche di quello originario, poiché concepito a partire dalle cellule base appartenenti al paziente stesso.

In tal modo sarà possibile ridurre l'utilizzo di procedure invasive, in particolare modo in ambito di problematiche ossee e cartilaginee, che portano all'utilizzo di materiali estranei al corpo umano, che possono causare problemi di compatibilità e soprattutto infezioni del sistema in esame.

1.5 Problematiche di stabilità meccanica e fissazione

1.5.1 Il ruolo della tensione nel rimodellamento osseo

La metodologia che si basa sull'utilizzo di scaffold ha lo scopo di promuovere una rigenerazione del tessuto che, per svariate motivazioni, risulta essere danneggiato. Svariati studi in vivo [3], relativi alle problematiche del tessuto osseo, hanno dimostrato che questo fenomeno di rigenerazione è principalmente dovuto al sovrapporsi dell'effetto dato dalla stabilità meccanica, dal potenziale biologico dell'osseo e dai tessuti molli circostanti (Fig.1.10). Il ruolo della stabilità meccanica nella procedura di fissazione di fratture ossee si è evoluto a partire dai problemi di non fissazione, passando per l'era della fissazione tramite dispostivi interni ed esterni, fino ad arrivare al concetto di *fissazione biologica*. Una fissazione non stabile spesso porta a risultati catastrofici, come la ritardata o non unione, perdita di tessuto, con conseguente peggioramento della situazione, richiedendo spesso interventi molto invasivi per porvi rimedio.

Materiali	Modulo di Young (GPa)	UTS (MPa) forza tensile	Elongazione %	Densità (g/cm^2)
Femore direzione assiale	17.0	130	3.0	2.0
Femore direzione tangenziale	12.0	60	1.0	2.0
Osso spongioso	0.1	2	2.5	1.0

Fig. 1.10: Proprietà meccaniche dei tessuti ossei.

Da quanto sperimentato da *Perren et al.* [4], si evince che la rigenerazione del tessuto osseo non può avvenire in condizioni di tensione ed allungamento superiori a quelle che ne hanno determinato la rottura. Il tipo di guarigione che avviene nella sede della frattura è regolata da due parametri, inversamente proporzionali tra loro:

- **distanza** tra le sezioni interessate dalla frattura;
- **tensione** presente tra esse.

Tali parametri però non risultano avere la stessa importanza nel processo di guarigione in quanto essa è correlata maggiormente alla distanza che la frattura provoca, distanza che quindi va a determinare la qualità del tessuto osseo che si andrà a formare. Nel caso di stabilità massima della frattura, con tensione minore del 2% rispetto a quella di rottura (fissazione rigida), si verifica la guarigione del tessuto osseo primario a condizione che i segmenti siano in intimo contatto tra loro. La fissazione rigida è ottenuta tramite l'utilizzo di placche di compressione e viti. In condizione di parziale stabilità, con tensione pari a 2-10% di quella di rottura, si ottiene invece la guarigione del tessuto osseo secondario. La non unione della frattura avviene quando la tensione di sollecitazione supera il 10% della tensione di rottura [3], [4].

1.5.2 Proprietà meccaniche degli scaffold ossei

Secondo la *Legge di Wolff* [5], la risposta a carichi deformanti causa un rimodellamento osseo, mentre la sua assenza ne provoca un riassorbimento: è possibile affermare, di conseguenza, che la presenza di una tensione, di entità appropriata, agente sulla parte d'interesse, provochi un mutamento nell' attività degli osteociti.
A tale scopo, sono state effettuate prove di innesto sia di tessuto osseo sia di scaffold, con il risultato, soprattutto nel secondo caso, di rigenerazione ossea più repentina rispetto alla normalità dei casi. La differenza principale tra le due casistiche, tuttavia, indica che innesti sintetici o comunque privi di cellule come gli scaffold, per svolgere la stessa funzione di innesti ossei, devono avere particolari proprietà, che, in base a quanto teorizzato da *Bauer e Muschler* [6], risultano essere le seguenti :

- essere **osteoconduttivi**, in modo che, oltre ad integrarsi fisicamente e meccanicamente con il tessuto osseo circostante, siano in grado di trasmettere i carichi attraverso il sito del trapianto;

- avere **caratteristiche meccaniche**, come rigidezza e resistenza a compressione, che prevengano l'insorgere di problematiche sotto l'azione di carichi *in vivo*;

- essere composti da materiali che permettano o facilitino il **riassorbimento osteoclastico**.

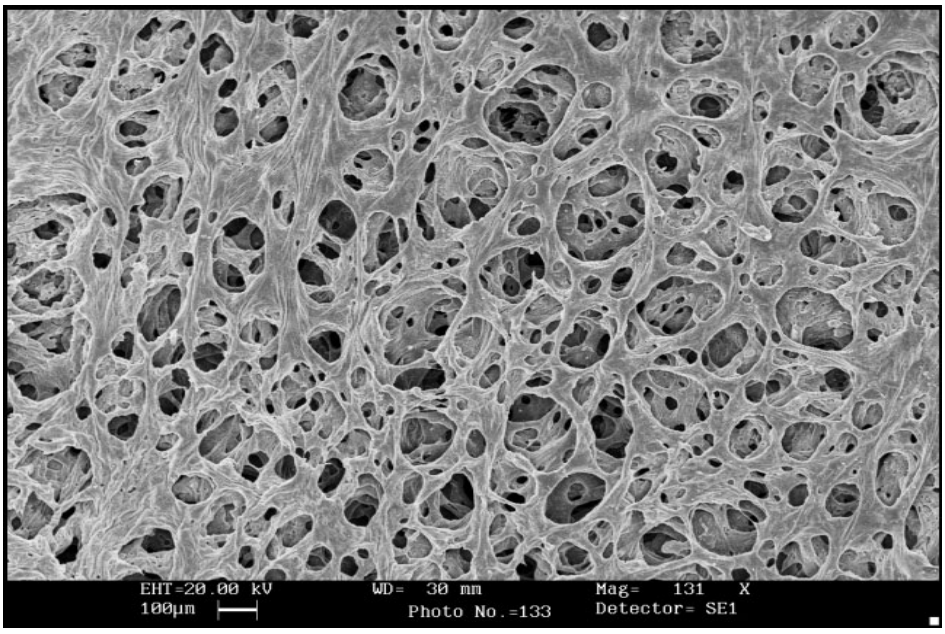


Fig. 1.11: Esempio di porosità di scaffold osseo.

In base a quanto espresso, la porosità dello scaffold risulta essenziale, in quanto consente la trasmissione di variazione di pressione attraverso la maggior parte della superficie del materiale (Fig.1.11). In tali circostanze è probabile che innesti acellulari, sotto l'azione di sollecitazioni interne ed esterne, possano avere un ruolo attivo nel rimodellamento osseo.

Tuttavia non è solo la porosità dello scaffold ad influire sulle sue proprietà meccaniche, ma anche i materiali con cui è realizzato, che per la maggior parte risultano essere idrossiapatite, acido polilattico e poliglicolico, e l'estensione dell'innesto che si andrà ad eseguire. Soprattutto nei casi esaminati di innesti ossei, gli scaffold agiscono come componenti attivi, cioè le loro proprietà meccaniche variano con il progredire della rigenerazione tissutale [4], [5], [6].

1.5.3 Metodi di fissazione per scaffold ossei

Spesso le proprietà meccaniche possedute dagli scaffold non sono sufficienti ne a consentirne un posizionamento stabile *in situ*, ne a garantire un buon livello di stabilità meccanica alla frattura, con conseguenti danni dovuti ad errate distribuzioni di carichi meccanici, rigenerazione di tessuto osseo non nella zona d' interesse e, nel caso peggiore, di non-unione o cattiva unione del difetto. Di conseguenza, accanto all'utilizzo di scaffold per la rigenerazione, risulta quasi necessario l'uso di dispositivi di fissazione (interni o esterni) o, per ovviare, il ricorrere a particolari tecniche di sutura che ne consentano un fissaggio *in situ* senza l'utilizzo di hardware. I dispositivi e tecniche di fissazione sono distinti in **interna** ed **esterna**.

Fissazione interna

Dispositivi e tecniche appartenenti alla fissazione interna hanno la caratteristica comune di essere invasivi, cioè è necessario avere una visione reale e completa del sito in cui si è verificato il danno osseo per la loro applicazione. Convenzionalmente, tali dispositivi includono placche e viti, chiodi intramidollari, placche di bloccaggio e d'appoggio, tutti realizzati con materiali, come titanio, cobalto e acciaio inossidabile, che oltre ad essere durevoli e biocompatibili con l'organismo umano, possiedono rigidezza e flessibilità necessarie a supportare l'osso umano.

Complessi di placche e viti

I complessi di placche e viti hanno la particolarità di poter agire sia per condividere che per sopportare completamente il carico, a seconda delle dimensioni del danno e dell'interferenza data dall'eventuale presenza di frammenti ossei. Alla luce del fatto che il tessuto osseo è molto resistente alla compressione, mentre il metallo lo è alle tensioni, le piastre devono essere poste in zone di equilibrio dove agiscano soltanto quest' ultime componenti di sollecitazione [3]. L' anello debole del complesso placca-viti-osso risulta essere l'interfaccia tra viti ed osso : a tale scopo infatti, agisce la piastra che, come una stecca interna che fissa tra loro le estremità ossee, aumenta la superficie di tale interfaccia, riducendo notevolmente lo stress, anche grazie all' utilizzo di polimetilmetacrilato, iniettato nei fori, oppure di viti rivestite di idrossiapatite.

Placche di bloccaggio

Le placche di bloccaggio permettono di convertire sollecitazioni di taglio in sollecitazioni di compressione, garantendo la fissazione del tessuto osseo grazie alla sua maggior resistenza a questo tipo di carico. In questi particolari dispositivi, la forza di fissazione, data dalla somma di tutte le sollecitazioni presenti nelle varie interfacce viti-osso, risulta essere molto maggiore rispetto al caso sopra trattato [3].

Placche Buttress

Le placche Buttress, differentemente dalle precedenti, agiscono per contrastare le forze di taglio sul sito di frattura non aumentando la superficie di contatto dell' interfaccia vite-ossa, ma convertendo tali sollecitazioni in forze di compressione.
Tali dispositivi sono posizionati al vertice della frattura ed utilizzati per trattare danni intra-articolari, come le fratture di tibia (Fig. 1.12).



Fig. 1.12: Placca di Buttress fissata al vertice della frattura con viti.

Chiodi intramidollari

I chiodi intramidollari interni offrono un vantaggio di fissazione meccanica unico: essendo posti in prossimità dell' asse neutro di flessione delle ossa, sono in grado di sopportare carichi per periodi più lunghi rispetto a quelli che porterebbero a rottura placche e viti (Fig. 1.13).



Fig. 1.13: Uso di chiodi intramidollari per fissazione frattura femore.

Studi clinici hanno dimostrato che permettono di ottenere un livello di fissazione maggiore rispetto a qualsiasi altro dispositivo nel trattamento di fratture diafisarie.

Sfortunatamente, il processo iniziali d'impianto produce un danno alla fornitura di sangue intramidollare, causando la formazione di nuovo tessuto osseo poroso e meno resistente rispetto a quello originario.

Pin

I pin svolgono un ruolo di notevole importanza nel processo di stabilità e fissazione di frammenti ossei aventi dimensioni troppo ridotte per poter essere trattati con le precedenti tecniche. Il loro utilizzo però, previsto sia per dispositivi di fissazione interna che esterna, può causare sepsi, dovuta principalmente alla scelta del sito (più il tessuto è morbido, maggiore è la probabilità che si sviluppi), a danni cutanei, a pessima sterilizzazione e all'utilizzo di dispositivi di potenza, i quali nel processo di foratura del tessuto osseo generano calore, provocando anche necrosi cellulare.

Accanto all'utilizzo di questi dispositivi, negli ultimi anni, soprattutto nelle procedure di fissazione di scaffold, si sono affiancate particolari tecniche di innesto tramite suture ed altri materiali biologici: colla di fibrina e suture chirurgiche.

Colla di Fibrina

E' un adesivo a due componenti formato da un concentrato di fibrinogeno e da soluzioni di trombina. Al momento dell'utilizzo questi componenti vengono miscelati in presenza di ioni calcio, riproducendo così le fasi finali del processo della coagulazione (Fig. 1.14). Questa particolare sostanza é priva di tossicità per i tessuti su cui viene applicata, promuove la formazione in pochi secondi di un coagulo ben adeso ai tessuti, é completamente riassorbita in qualche giorno e appare in grado di stimolare i processi riparativi e la crescita dei tessuti lesi su cui é applicata.

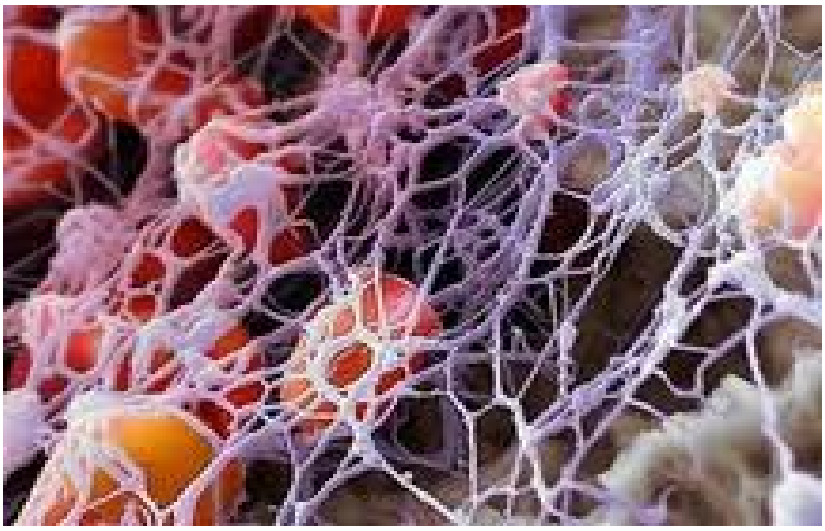


Fig. 1.14: Azione colla di fibrina su cellule e tessuto osseo attorno lo scaffold.

Attualmente ne vengono utilizzati diversi tipi, normalmente suddivisi in due categorie: i prodotti commerciali e quelli realizzati in laboratorio, che si differenziano per la metodologia di preparazione del concentrato di fibrinogeno [7], [9], [10].

Suture

Tecniche che si basano sulla fissazione dello scaffold ai tessuti circostanti al danno, non tramite dispositivi esterni, ma tramite sutura. A seconda delle superfici articolari d'interesse, possiamo distinguere due tipologie di sutura: quella transossea che prevede l'uso di dispositivi di puntamento e di perforazione per praticare fori di dimensioni opportune nel tessuto osseo d'interesse, dove .lo scaffold viene ancorato al difetto tramite quattro nodi tripli realizzati ai suoi angoli con filo di sutura Vicryl 2-0, e quella cartilaginea, e quella *cartilaginea* , dove lo scaffold è posto nell'area del difetto e suturato al tessuto cartilagineo circostante tramite cucitura, con distanza approssimativa di 4 millimetri l'una dall'altra (Fig. 1.15).

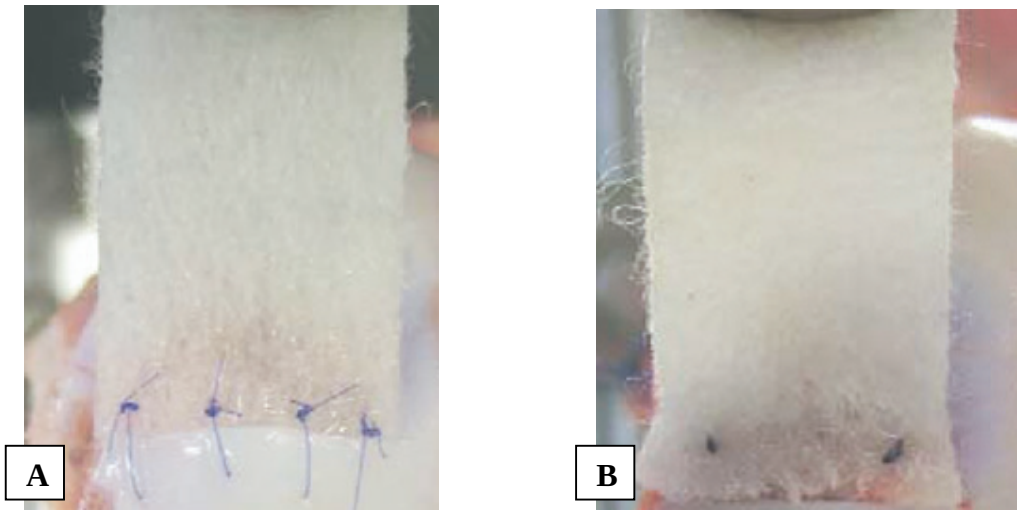


Fig. 1.15 A-B : Metodi di fissazione per scaffold rigenerativi tramite A) sutura transossea e B) sutura cartilaginea.

Da evidenziare il fatto che queste tecniche di fissazione sono realizzabili, soprattutto in riferimento ai danni cartilaginei, quando tale tessuto non è degenerato e quando il distacco è recente : infatti un frammento osteocartilagineo distaccatosi da tempo risulta essere ricoperto, nella quasi totalità dei casi, da tessuto fibroso o da cartilagine iperplastica, rendendo necessaria una procedura antecedente la sutura, consistente nell'asportazione del tessuto neoformato attorno al danno [4], [7], [9].

Fissazione esterna

I dispositivi appartenenti alla fissazione esterna prevedono un'invasione minima dell'anatomia umana durante il periodo di trattamento. La maggior parte della struttura di fissaggio, l'*esoscheletro*, si trova al di fuori del corpo umano, ed è collegata ai frammenti ossei tramite sottili fili e perni. Questi dispositivi offrono una fissazione relativamente instabile e sono utilizzati, in svariate geometrie, per il trattamento di fratture aperte e di non unioni infette, relativamente alla tibia e al radio. La rigidità del dispositivo dipende dal numero e dal diametro dei perni usati, dalla loro distanza dalla frattura e dall'impalcatura esterna [4], [8].

In base alla geometria, tali dispositivi possono essere suddivisi in due categorie principali: *monoassiali* e *multiplanari*.

Fissatori Monolaterali o Assiali

I fissatori monoassiali sono costituiti da barre fissate tramite l'uso di pin transossei. Tale tipologia di fissatori è particolarmente indicata per il trattamento di difetti riguardanti ossa lunghe : sono applicati infatti alla faccia laterale del femore e alla parte mediale della tibia, per evitare danni alle strutture neuro-vascolari e muscolari. Impiantati con segmenti di trasposto, ne consentono lo spostamento durante la fase post-operatoria, man mano che avanza il processo di rigenerazione (Fig.1.16).

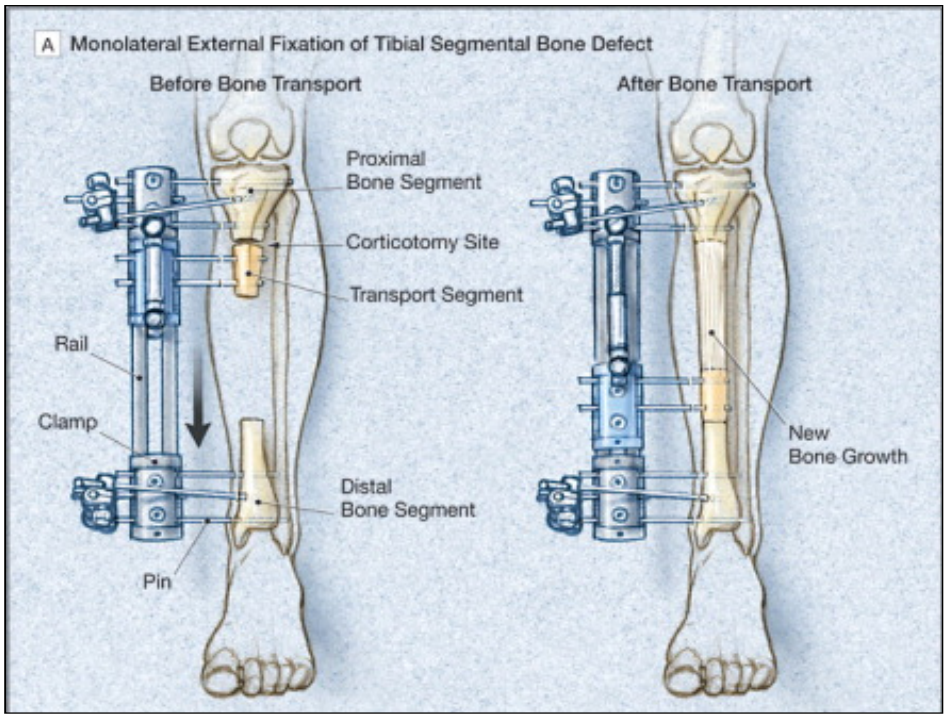


Fig. 1.16: Fissatore Monolaterale Mobile.

Fissatori Multiplanari

I fissatori multiplanari consistono in anelli, o sezioni di anelli, fissati tramite fili, pin e viti ai tessuti ossei sottostanti, permettono di mantenere stabile e fissa la frattura, dopo avere riportato in asse i due segmenti adiacenti, e risultano particolarmente indicati nel caso di fratture esposte, soprattutto per il fatto di consentire un accesso diretto ai tessuti molli esterni precedentemente danneggiati (Fig.1.17).

Un'ulteriore differenziazione di questa tipologia di fissatori è data dal tipo di funzionalità che permettono all'articolazione: in base a tale fattore è possibile distinguere *fissatori stazionari* e *fissatori mobili*.

Fissatori Stazionari

I fissatori stazionari sono costituiti sia da fissatori assiali che multiplanari. Questa tipologia è indicata per garantire elevata stabilità in riferimento a fratture ossee, grazie al fatto che allineamento e posizione restano costanti ed invariati per tutto il periodo precedente alla rimozione (Fig.1.17).

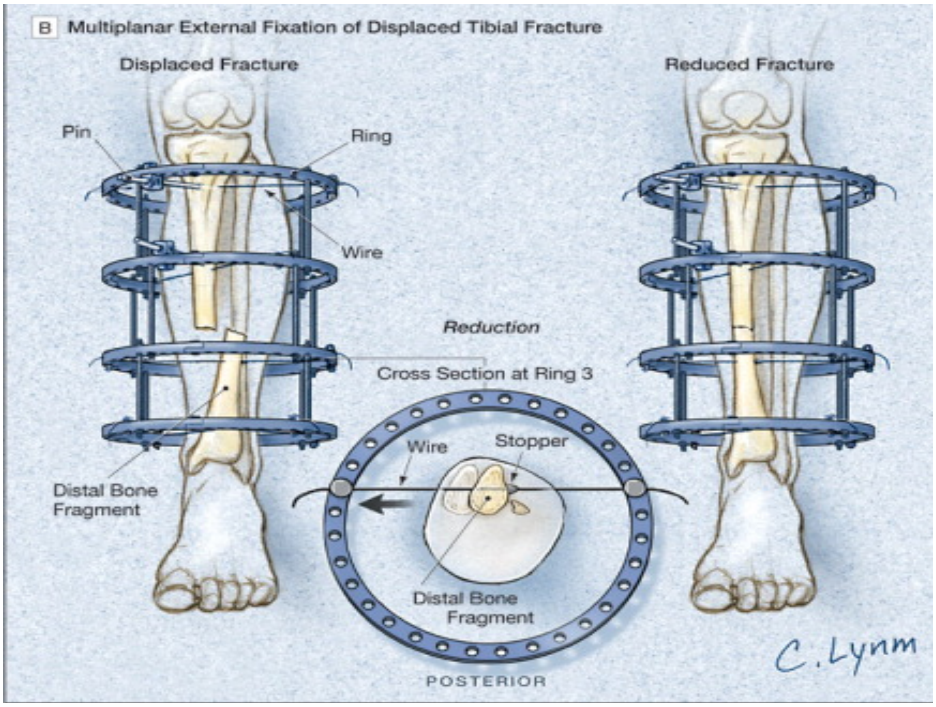


Fig. 1.17: Fissatore Multiplanare Statico.

Fissatori Mobili

A differenza dei precedenti, l'uso dei fissatori mobili è previsto nell' ortopedia ricostruttiva e, recentemente, nella riduzione graduale di gravi fratture : a tale scopo risultano essere molto utili soprattutto per il fatto di consentirne un cambiamento continuo nell'assetto, in parallelo alla graduale guarigione (Fig.1.16). Come i precedenti, sia fissatori assiali che multiplanari possono avere funzionalità stazionaria o mobile.

Fissatori ad anello

Questi dispositivi sono altamente versatili in quanto consentono una regolazione post-operatoria, aumentando la rigidezza con il crescere del carico applicato : in tal modo è quindi possibile modificare le proprietà meccaniche del telaio durante il periodo di trattamento. Data la vicinanza dell'esoscheletro ai tessuti, sussiste la possibilità di accedere alla cute ed ai tessuti molli, in modo da consentire il trattamento di ferite ed infezioni post-operatorie. L'applicazione di questi dispositivi prevede una perdita minima di sangue e ridotti danni ai tessuti molli.

1.6 Scaffold magnetici

Nonostante sia una tecnologia nata da pochissimi anni, già molti passi avanti sono stati compiuti per apportarne migliorie, sia dal punto di vista strutturale che da quello delle possibili tecniche con cui questi innesti vengono fissati all'interno del comparto osseo danneggiato.

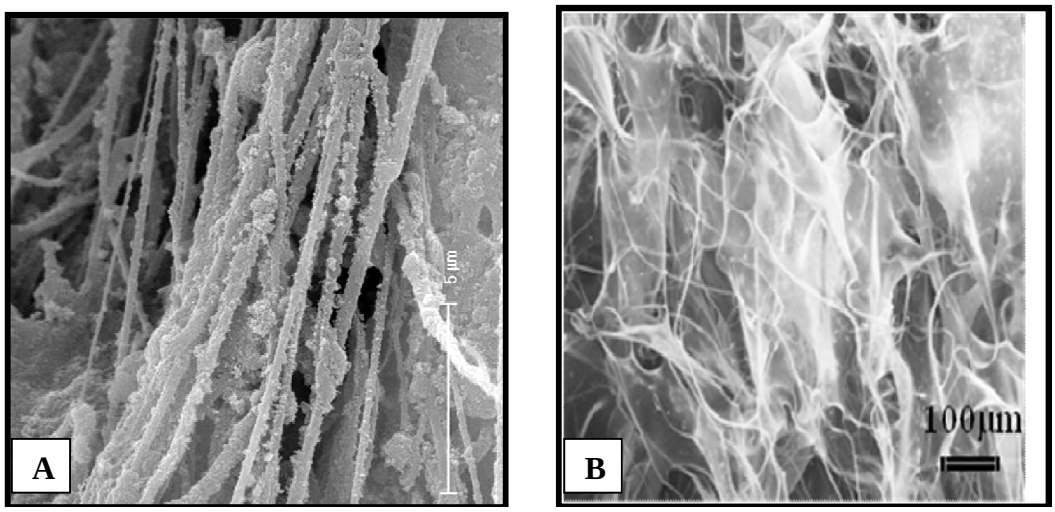


Fig. 1.18: Differenza nella disposizione di fibre A) sottoposte e B) non sottoposte a campo magnetico.

Una nuova idea che sta prendendo piede nell'Ingegneria tissutale è il possibile utilizzo di particolari tipologie di scaffold magnetici, che permettano, attraverso l'applicazione di un flusso magnetico esterno oppure di un flusso magnetico interno generato dall'interazione tra magneti stessi, una fissazione ottimale, possibilmente senza l'utilizzo di hardware, come fissatori interni, che richieda solo il fissaggio interno dello scaffold e di magneti tramite suture ed altre tecniche.



Fig. 1.19: Logo Progetto Magister.

Vari studi *in vivo* hanno dimostrato che proprietà e caratteristiche del tessuto osseo rigeneratosi risultano essere pressoché identiche a quelle dell'osso originario nel caso in cui le cellule mesenchimali siano sottoposte, prima, durante e dopo il processo di differenziazione, a campi magnetici [11], (Fig.1.18). In questa direzione si inserisce il progetto europeo ***Magister*** (Fig.1.19).

1.6.1 Progetto Magister

Il Progetto Magister è una collaborazione europea, iniziata nel Dicembre 2008 e della durata di 48 mesi, tra il Consiglio Nazionale delle Ricerche, l'Università di Bologna e Zagabria, e partner esperti in magnetismo (ISMN), biologia (BSMU), fisica delle particelle (USC) e tecnologia relativa agli scaffold (ISTEC).

Gli scopi principali di questa partnership sono molteplici e di notevole importanza per quanto concerne lo sviluppo delle nuove tecnologie dell'Ingegneria tissutale:

- sviluppare una **nuova tipologia di scaffold magnetici** per l'applicazione *in vivo* a danni ossei;

- determinare una particolare configurazione di **flusso magnetico per la fissazione** di scaffold e magneti tramite interazione;

- elaborare un **prototipo meccanico** per la determinazione di metodologie di fissazione magnetica in gravi patologie riguardanti danni al tessuto osteocondrale.

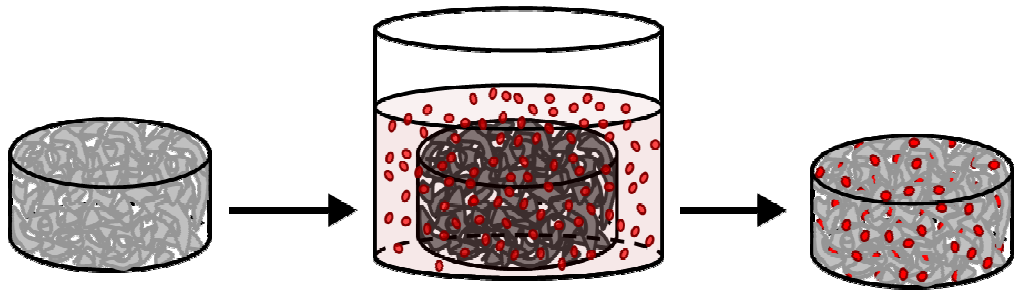


Fig. 1.20: Scaffold in idrossiapatite magnetizzato tramite l'uso di fluidi ferromagnetici.

Per quanto riguarda la realizzazione di scaffold magnetici, varie tecniche sono state prese in analisi, tra le quali le più promettenti sono l'utilizzo di magneti al Neodimio-Boro e Samario-Cobalto inseriti direttamente all'interno di innesti in collagene ed idrossiapatite, l'utilizzo di soluzioni ferromagnetiche nelle quali inserire gli scaffold per garantirne una reazione attiva ai flussi magnetici ad esso applicati oppure l'adozione diretta di materiali magnetici, come il Cobalto, da utilizzare insieme a quelli più tradizionali per ottenere compartimenti con particolari proprietà (Fig.1.20).

In relazione alla configurazione magnetica, è importante evidenziare che i valori del campo magnetico applicati ai tessuti non eccedono il valore di 300 mT, oltre il quale si avrebbero effetti dannosi per il corpo umano.

1.6.2 Problema di fissazione di scaffold magnetici

In relazione all' utilizzo di scaffold magnetici, le principali problematiche da affrontare riguardano il problema di fissazione con il tessuto osseo circostante e le interazioni che questi avranno con i magneti impiantati con essi per consentirne un'azione diretta sul rimodellamento osseo. Possibili tecniche per garantire la *fissazione assoluta dello scaffold* al tessuto riguardano sia l'uso di hardware interno, come viti, chiodi e placche di bloccaggio, sia metodi innovativi recentemente sviluppatesi, come l'adozione di colla di fibrina e particolari tecniche di sutura transossea e cartilaginea. In riferimento all'*interazione scaffold - flusso magnetico*, sia esso generato da magneti, anch'essi all'interno del sito danneggiato, oppure tramite soluzioni esterne, risultano di primaria importanza la distanza a cui tali devono sussistere per generare forze che generino un processo attivo e diretto di rimodellamento, e la fissazione propria dei magneti utilizzati, per i quali le tecniche che prevedono l'uso di hardware non sono adatte.

1.7 Struttura ospitante l'attività di tirocinio

L'attività di tirocinio si è svolta presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, in particolare all'interno del Laboratorio di Biomeccanica e di Innovazione Tecnologica e del Laboratorio di Nano-Biotecnologie. L'istituto Rizzoli è una struttura medico-sanitaria dove, al fianco dell'attività ospedaliera e chirurgica, si è sviluppato nell'ultimo decennio un importante centro di ricerca che vede la collaborazione di personale qualificato nei vari settori della scienza applicati allo sviluppo medico, come Fisica, Ingegneria, Matematica e Scienze Motorie. In tale ottica, notevole rilievo hanno i Laboratori di Biomeccanica ed Innovazione Tecnologica e di Nano-Biotecnologie, all'interno dei quali vengono compiuti studi, di importanza nazionale ed internazionale, nell'ambito della chirurgia assistita al calcolatore**,** delle biotecnologie tissutali**,** della validazione di impianti protesici **e** dell'analisi biomeccanica delle articolazioni**.** Numerose esperienze sono state qui condotte su articolazioni di cadavere per la validazione di modelli, di ipotesi di funzionamento dell'articolazione, per lo studio di singoli tessuti e del loro ruolo, i quali hanno permesso una migliore comprensione di applicazioni cliniche quali il *release* dei legamenti durante l'impianto di protesi, la posizione e l'orientazione dei tunnel nella ricostruzione di legamento crociato anteriore o il disegno protesico individuale. Sono presenti inoltre apparecchiature per RSA (Roentgen Stereophotogrammetric Analysis)**,** tecnica di analisi radiografica dall'elevata accuratezza utilizzabile in campo ortopedico per il calcolo di microspostamenti all'interfaccia osso/protesi o per studi cinematici in generale. Questa tecnologia è utilizzata tuttora sia con set-up tradizionali, per valutare la stabilità di nuove protesi o per fare confronti in termini di stabilità tra diversi design protesici, sia per studi non convenzionali in condizioni non standard. Il database del Laboratorio comprende più di 150 pazienti, con diversi tipi di protesi impiantate ed un range di esami che vanno dal post-operatorio ai 10 anni di follow-up. Recentemente una nuova opzione terapeutica è scaturita dagli studi di bioingegneria tissutale offrendo, tramite trapianto di condrociti autologhi su un nuovo tessuto bioingegnerizzato (Hyalograft C), la possibilità di un trattamento innovativo e promettente, che presenta numerosi vantaggi: è biodegradabile, biocompatibile e grazie alla sua estrema maneggevolezza ha permesso di sviluppare una tecnica di impianto per via artroscopica. La rigenerazione cartilaginea, documentata con second look artroscopica e valutazione istologica, ha dimostrato nell'80% dei casi la guarigione con una nuova cartilagine di tipo ialino.

Infine, in ambito della biomeccanica sportiva, sono stati compiuti passi avanti nell'analisi di soggetti affetti da patologie del ginocchio (utilizzando una macchina isotonica collegata ad un software dedicato atto alla calibrazione dei segnali, al calcolo delle velocità angolari mediante derivazione delle curve relative alla posizione angolare e alla costruzione dei grafici angolo-velocità) e della cinematica del gomito, validando un nuovo metodo per la stima del *carrying angle* in-vivo tramite identificazione di punti di riparo anatomici ottimali ed ausilio di algoritmi numerici appositamente realizzati.

1.8 Obiettivi del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la validazione mediante setup sperimentale di specifiche configurazioni scaffold-magnete che simulano il reale utilizzo *in vivo*. Tali sono state scelte in modo da garantire un effetto positivo in relazione alla fissazione di entrambe le componenti ed alla partecipazione attiva che questa nuova tipologia di innesto può garantire nel processo di rigenerazione e rimodellamento osseo. Nell'analisi delle configurazioni si è tenuto conto della posizione relativa e distanza delle superfici di scaffold e magneti, in modo da assicurare che il flusso magnetico tra di essi sia prima di tutto correttamente direzionato, garantendo così linee di forza che siano realmente utili per la distribuzione e la proliferazione di nuove cellule, ed in secondo luogo che il carico non ecceda la soglia massima oltre la quale si avrebbe un effetto negativo sui tessuti. Il lavoro prevede la verifica delle forze necessarie a garantire la corretta fissazione dello scaffold sia nella regione intrarticolare che nell'osso lungo. Poiché allo stato attuale dell'arte gli scaffold magnetici hanno una possibilità di magnetizzazione molto bassa, i materiali utilizzati (ferromagnetici) vogliono simulare le caratteristiche di magnetizzazione di uno scaffold ideale. Le configurazioni sono state precedentemente simulate, per cui il setup sperimentale ha come ulteriore obbiettivo il confronto delle forze di attrazione generate nelle diverse configurazioni con i risultati ottenuti tramite analisi agli elementi finiti precedentemente implementata in *Comsol 3.5* e la valutazione analitica implementata nel presente lavoro di tesi in *Matlab R2009b*.

1.8.1 Verificare una nuova tipologia di fissazione

L'analisi delle forze d'interazione tra magneti e scaffold-magneti risulta essere di primaria importanza in relazione ad una tipologia alternativa di fissazione dell'innesto/scaffold all'interno del comparto osseo affetto da patologia: anziché l'uso di hardware esterno, se non per evitare che il pieno carico gravi sin dal primo periodo post-operatorio sull'innesto, l'obbiettivo è di ottenere un fissaggio relativo del complesso scaffold-magnete sfruttando le forze magnetiche di attrazione che dovrebbero garantire una migliore stabilità primaria e vincolare i micromovimenti all'interfaccia tra l'osso e lo scaffold stesso.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 Soluzioni di fissazione per scaffold magnetici

Il problema principale legato all'utilizzo di scaffold magnetici riguarda la loro fissazione relativa, cioè la configurazione da adottare per fare in modo che essi generino forze di attrazione sia benefiche per il processo di rigenerazione del tessuto osseo, sia non sufficientemente elevate da provocare movimenti, quali traslazione e rotazioni, una volta posizionati *in situ*.

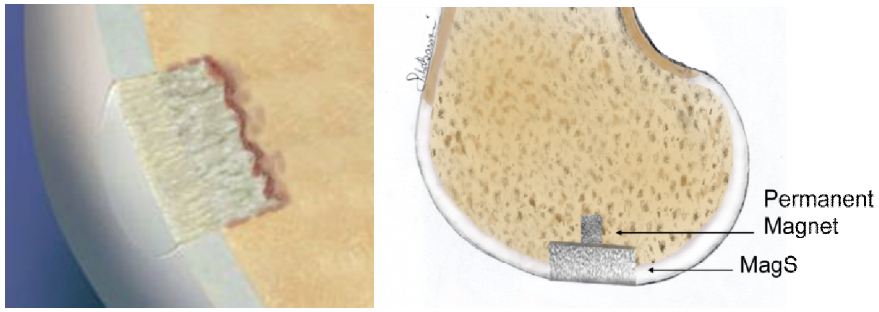


Fig. 2.1: Possibile configurazione di utilizzo di scaffold magnetici per danni intrarticolari.

A tale scopo, due principali classi di simulazioni sono state studiate: la prima riguardante l'utilizzo di scaffold magnetici per il trattamento di danni ai tessuti ossei intrarticolari, la seconda in riferimento ai danni subiti dalle ossa lunghe.

2.1.1 Fissazione scaffold magnetici per danni ossei intrarticolari

Per quanto riguarda l'utilizzo di scaffold magnetici per danni intrarticolari ed osteocondrali (Fig. 2.1, 2.2), le configurazioni analizzate sono state:

- interazione tra magneti cilindrici, realizzati in Neodimio-Boro, aventi le stesse proprietà e geometrie;

- interazione tra magnete cilindrico e foglio di Cobalto, che nella pratica avrebbe il ruolo principale di scaffold magnetico;

- interazione tra magnete cilindrico e pin magnetici, anch'essi in Neodimio-Boro;

- interazione tra foglio di Cobalto e pin magnetici.

Le interazione magnete-magnete sono state utilizzate per verificare i calcoli relativi alle simulazioni effettuate con Comsol e Matlab, in quanto rendono possibile realizzare forze di attrazione maggiori e quindi meno influenzabili dalla calibrazione geometrica del simulatore e dal setup. Da evidenziare il fatto che nel trattamento di queste problematiche non è necessario ricorrere all'utilizzo di dispositivi di fissaggio interni ed esterni poiché il danno è situato solitamente a livello di cartilagine o tessuto subcondrale, quindi lo scaffold può essere fissato attraverso il solo uso di magneti, che dovranno garantire la resistenza al peso dello scaffold imbevuto, oppure con l'uso contemporaneo di colla di fibrina o sutura, posizionando il magnete stesso ad una distanza inferiore ai 10 mm.

2.1.2 Fissazione scaffold magnetici per danni ad ossa lunghe

A differenza del caso precedente, l'impiego di scaffold magnetici per il trattamento di danni ad ossa lunghe presenta alcune problematiche che risultano essere punti critici per il loro impiego (Fig.2.2). Innanzi tutto non si tratta di rigenerare una superficie danneggiata, ma un intero compartimento osseo, perciò sarà necessario l'utilizzo di scaffold aventi dimensioni, geometrie e proprietà sostanzialmente diverse rispetto a quelli normalmente usati.

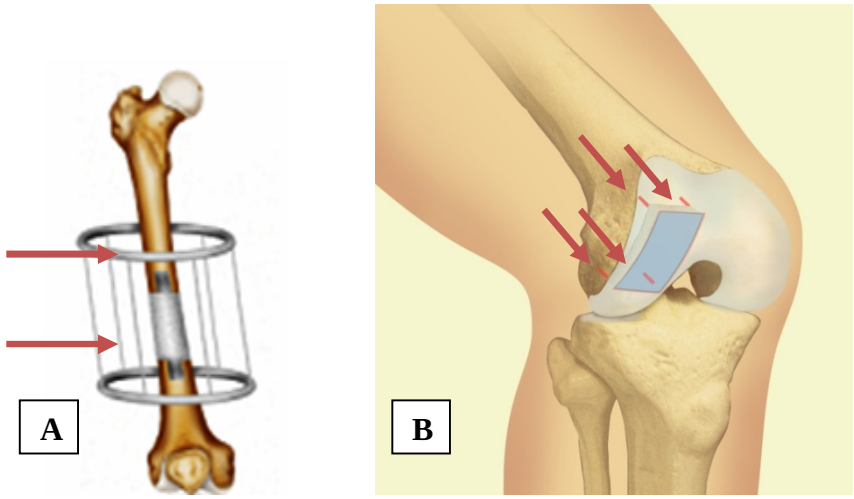


Fig. 2.2: Tecniche di fissazione di scaffold magnetici nel caso di A) danni ad ossa lunghe e B) danni osteocondrali.

In secondo luogo la posizione in cui verrà depositato l'innesto sarà priva di qualsiasi ancoraggio con le parti adiacenti, in quanto mancante un'intera sezione trasversale di tessuto, rendendo obbligatoria l'adozione di dispositivi di fissazione interna, quali placche di bloccaggio, viti e chiodi. Infine, per ottenere un tessuto osseo ed una rigenerazione omogenea, sarà necessario l'utilizzo di due magneti ai capi dello scaffold, con esso in asse, con particolare attenzione al fatto che dovranno avere le stesse caratteristiche e dimensioni per non provocare variazioni sostanziali nella qualità del nuovo tessuto formatosi. In tale ottica, la prova sperimentale effettuata ha lo scopo di determinare le forze laterali che sorgono tra questi componenti (magnete-scaffold-magnete) e, in base ad esse, fissare una soglia massima di carico laterale in grado di provocarne uno spostamento, rendendo problematica la rigenerazione del tessuto a causa del fatto che esso svilupperebbe proprietà non più affini a quelle di un materiale trasversalmente isotropo come l'osso umano.

2.1.3 Simulazione analitica di fissazione tramite Comsol e Matlab

Per convalidare i risultati sperimentali ottenuti nelle varie configurazioni è stato necessario effettuare una simulazione al calcolatore, in modo da poter effettivamente verificare che i dati da noi ottenuti fossero, assetto permettendo, il più simili possibili con quelli analitico-teorici. A tal proposito si è fatto uso sia di programmi in *Comsol 3.5 Multiphysics*, sviluppati dalla Dott.ssa Tatiana Shelyakova del Laboratorio di Nano-Biotecnologie dell' Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, che in *Matlab R2009b* da me stesso realizzati.

$$
\begin{aligned}
&F_a \\
&= 2\pi\mu_0 M_0 \frac{a^2}{4}\left(\frac{(4t+d_a)\sqrt{{d_a}^2+a^2}-d_a\sqrt{(4t+d_a)^2+a^2}}{\sqrt{{d_a}^2+a^2}\sqrt{(4t+d_a)^2+a^2}}\right) \\
&+\frac{3a^6}{32}\left(\frac{(4t+d_a)(d_a^2+a^2)^{5/2}-g((4t+d_a)^2+a^2)^{5/2}}{(d_a^2+a^2)^{5/2}(16t^2+8td_a+d_a^2+a^2)^{5/2}}\right) \\
&+\frac{5a^8}{256}\left(\frac{(4t+d_a)(3a^2-4(4t+d_a)^2)(d_a^2+a^2)^{9/2}+d_a(4d_a^2-3a^2)((4t+d_a)^2+a^2)^{5/2}}{(d_a^2+a^2)^{9/2}((4t+d_a)^2+a^2)^{9/2}}\right)
\end{aligned}
$$

Fig. 2.3: Formula per il calcolo di forze d'attrazione tra magneti cilindrici aventi h=2t, $\emptyset=2a$ e distanti tra loro d_a.

Le simulazioni in Comsol sono riferite alle configurazioni di trazione assiale magnete-magnete, foglio di Cobalto-pin magnetici e laterale magnete-magnete, mentre quelle in Matlab per le configurazioni di trazione assiale e laterale magnete-magnete. Il codice adottato in quest'ultime ha previsto l'uso di una formula (Fig.2.3), tratta da *J.S.Agashe & D.P.Arnold, A study of scaling and geometry effects on the forces between cuboidal and cylindrical magnets using analytical force solutions* [12].

2.2 Protocollo Sperimentale

Nella parte antecedente l'analisi sperimentale, particolare attenzione è stata rivolta all' analisi del simulatore magneto-meccanico in uso presso il Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione Tecnologica / Nano Biotecnologie dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna. Questo simulatore è stato utilizzato per effettuare le prove di stabilità alla fissazione: sono stati analizzati in particolar modo i suoi aspetti meccanici (setup e calibrazione, configurazioni precedentemente adottate ed eventuale sostituzione di materiali non ferromagnetici), che avrebbero potuto falsare i risultati soprattutto quando la distanza tra i materiali è superiore ai 10 mm.
Per quanto riguarda la calibrazione geometrica del simulatore, è stata fatta molta attenzione nel posizionamento delle varie parti, soprattutto del complesso cella di carico-calibro elettronico e supporto, in modo tale che risultassero in asse tra di loro: il corretto posizionamento deve garantire, soprattutto nelle prove di trazione, che i due magneti abbiano le facce principali il più possibile parallele tra loro.
Sono state introdotte inoltre particolari configurazioni del simulatore in grado di valutare le forze laterali agenti sullo scaffold; queste configurazioni possono essere utilizzate nei casi di fissazione di scaffold magnetici per il trattamento di danni alle ossa lunghe come femore e tibia. In particolare è stata ridotta la distanza tra complesso cella calibro e supporto attraverso l'adozione del solo arco di supporto anziché il complesso arco-barre laterali precedentemente utilizzato. Questa scelta ha migliorato la fase di messa in calibrazione, sia per evitare che il magnete subisse spostamenti infinitesimi legati all'insorgere delle forze magnetiche.

In riferimento ai materiali sostituiti, abbiamo scelto di utilizzare giunti in ottone, viti e cilindri in plastica e polietilene, per ottenere i seguenti effetti:

- aumentare la distanza del magnete collegato al complesso cella-calibro dal telaio del simulatore tramite l'uso di giunti e viti; in questo modo siamo riusciti a ridurre l'effetto che il complesso provocherebbe sul magnete, soprattutto se posizionato a brevi distanze;

- permettere, grazie ai gradi di libertà forniti dai giunti, lo scarico da momenti flettenti della parte che collega il magnete al complesso cella-calibro; in questo modo si evita che le forze d'interazione provochino un effetto leva sulla cella di carico, falsando l'analisi;

- migliorare l'interazione tra i magneti, grazie all'utilizzo di particolari contenitori, cilindri e viti in polietilene e plastica, grazie ai quali è stato possibile sia mantenere le superfici di opposta polarità dei magneti il più possibile parallele tra loro, sia fissare nel miglior modo possibile i magneti ai rispettivi supporti, per evitare ogni loro possibile spostamento, con conseguente generazione di forze di taglio non rilevabili con la strumentazione a nostra disposizione.

2.3 Verifica simulazione

Tutte le prove sperimentali sono state effettuate con l'utilizzo di un simulatore magneto-meccanico realizzato con l'assemblaggio di svariati componenti (Fig.2.4). Il telaio della struttura, prodotto da Euromec S.r.l di Modena, è stato realizzato con il proposito di evitare il più possibile l'influenza che avrebbe avuto sui dispositivi magnetici utilizzati. A tale scopo è stato impiegato Acciaio Inossidabile, un materiale poco ferromagnetico.

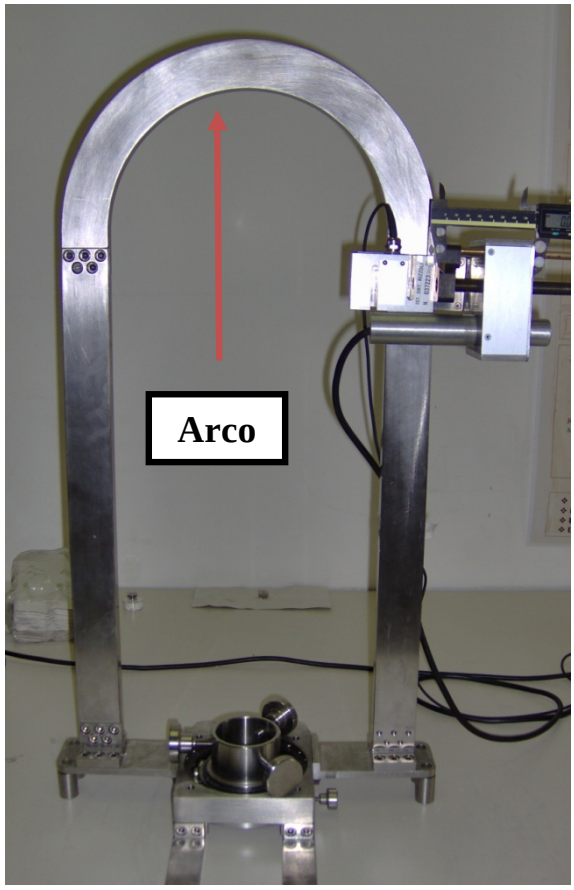


Fig.2.4: Telaio in Acciaio Inossidabile del simulatore magneto-meccanico.

Tale struttura prevede due supporti lineari, utili soprattutto per la valutazione di forze laterali in configurazioni legate alla fissazione di scaffold magnetici in ossa lunghe. Un primo upgrade di questa versione base prevede l'impiego di un meccanismo di traslazione del braccio a cui è collegato uno dei dispositivi magnetici, realizzato con un motore a corrente continua prodotto dalla Maxon Motor AG – Svizzera, ed una testata ad ingranaggi per controllare i micro-spostamenti del motore stesso realizzata da Maxon Motor GmbH – Germania (Fig.2.5). A questa prima parte, avente funzione di supporto e di movimento, sono stati aggiunti successivamente componenti per la misurazione e l'acquisizione dei dati ed infine un particolare sostegno.

2.3.1 Arco

Per congiungere le barre di supporto verticali è stato utilizzato un particolare arco, anch'esso in Acciaio Inossidabile, teoricamente in grado di simulare, attraverso spostamenti ed inclinazioni del braccio opportuni, un movimento di flessione ed estensione della parte centrale del sistema ed una rotazione della parte sottostante, quindi del supporto e di uno dei dispositivi magnetici (Fig.2.4,2.7). La scelta di questo particolare design non è legata al solo fatto di ottenere misure statiche, ma anche alla volontà di tentare una simulazione delle configurazioni che realmente si presenteranno sia *in vitro* che *in vivo*.

2.3.2 Cella di carico

Per poter ottenere una misura delle forze magnetiche d'interazione nelle varie configurazioni è stato necessario l'utilizzo di una cella di carico (Tipo K-25, Cella di Compressione e Tensione, Valore massimo misurabile 20 N, Risoluzione 0.02 N) con output digitale prodotta da Ahlborne, Germania (Fig.2.5).

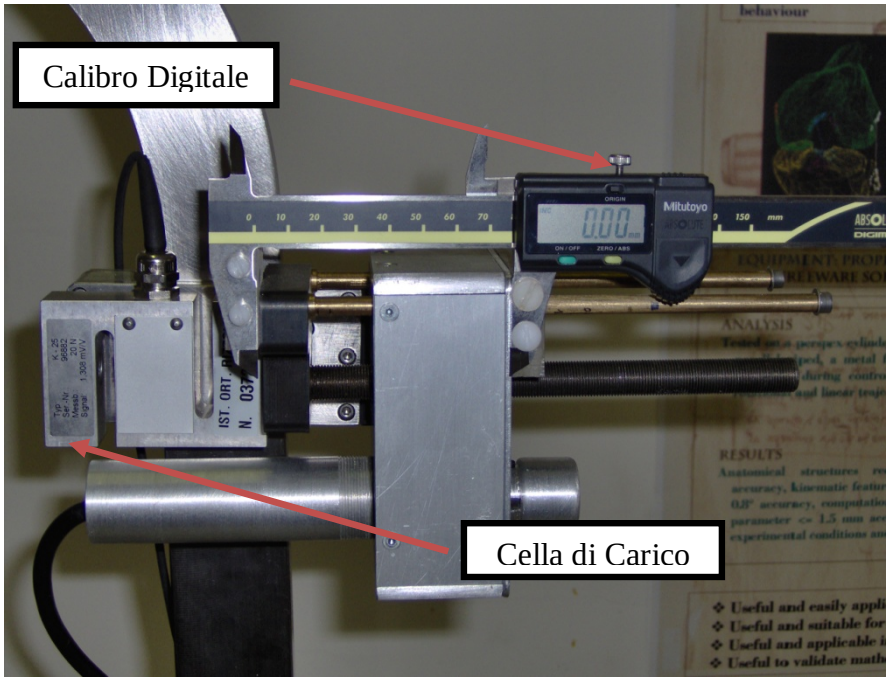


Fig.2.5: Calibro Digitale e Cella di Carico fissati al telaio del simulatore.

Prima di ogni test, si è provveduto ad una fase di azzeramento-reset della cella, in modo che le forze conseguentemente visualizzate in uscita non tenessero conto del peso del complesso giunti, viti, contenitori, magnete necessario per distanziare il dispositivo dal telaio e per consentire un'interazione stabile tra i dispositivi magnetici.

2.3.3 Calibro digitale

Altro punto critico del simulatore è la determinazione delle distanze alle quali l'interazione del complesso scaffold-magnete/i avviene, in modo tale da poter permettere un innesto di tali dispositivi *in situ* alla distanza più congeniale (Fig.2.5).

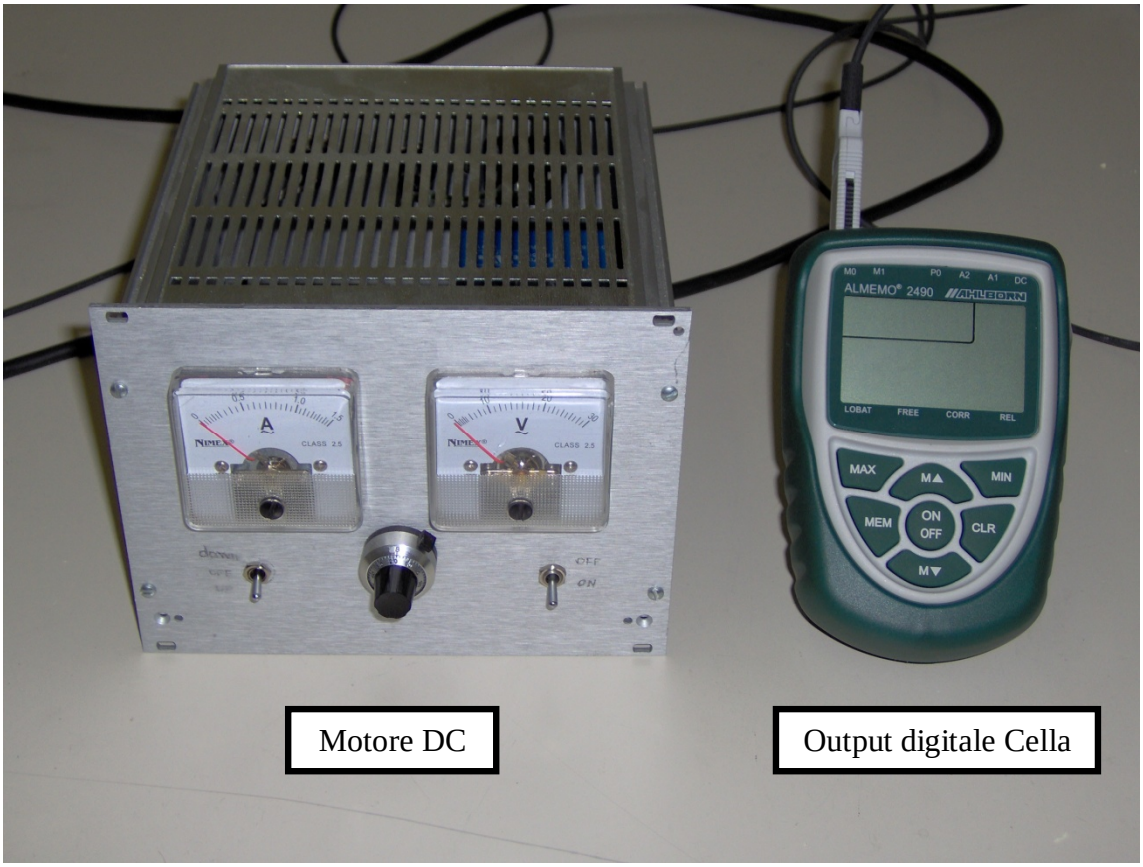


Fig. 2.6: Motore DC e output digitale per la Cella di Carico.

A tale scopo è stato utilizzato un calibro digitale (Tipo 15DCX Digimatic Caliper, Risoluzione 0.01 mm), prodotto da Mitutoyo, Giappone, che collegato al motore DC ed al pattino su cui il complesso supporto-braccio scorre, consente una visualizzazione continua della distanza relativa tra le parti magnetiche.

2.4 Descrizione dei test

2.4.1 Calibrazione del simulatore

Con lo scopo di testare la configurazione adottata del simulatore magneto-meccanico è stato applicato un peso di 193.4893 g, pesato precedentemente con una microbilancia elettronica, ancorato direttamente alla cella di carico, ottenendo in output una forza, corrispondente a quella di gravità, pari a 1.89-1.9 N in opposizione al valore di 1.8962 ottenuto per via analitica, dimostrando cosi la validità della configurazione e degli strumenti adottati.

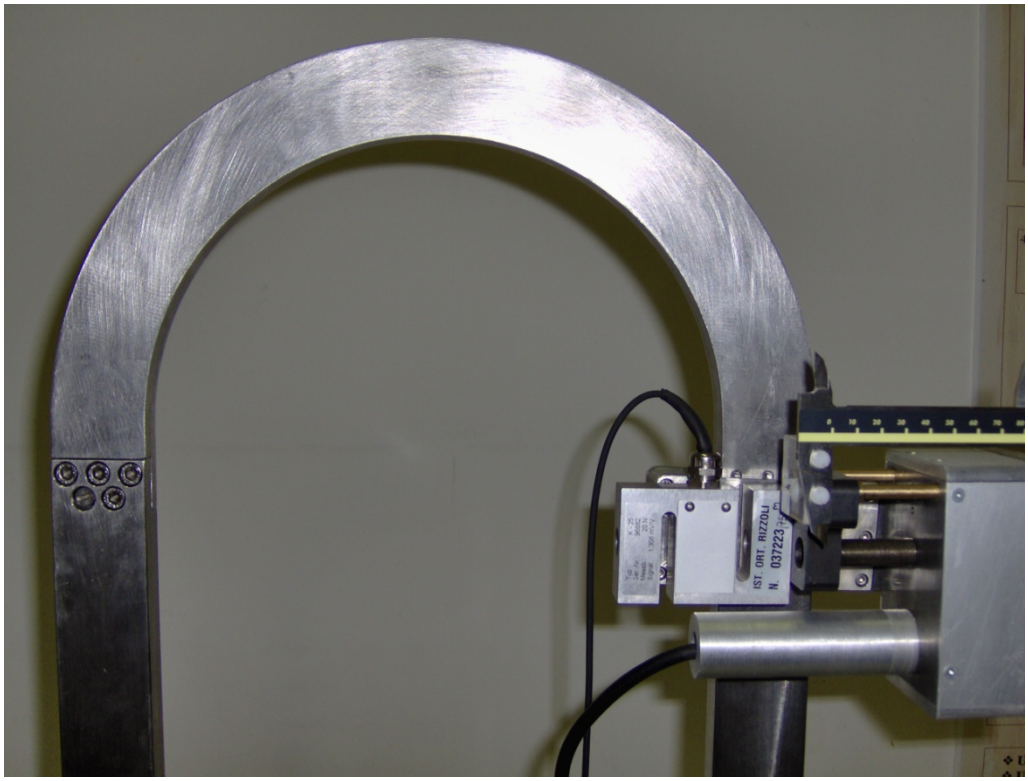


Fig. 2.7: Particolarità dell'arco utilizzato nel simulatore magneto-meccanico.

Prima di ogni misurazione si è provveduto all'azzeramento del calibro, che in caso contrario fornirebbe come output la distanza assoluta di fuoriuscita del braccio, e della cella di carico, in modo da evitare il conteggio del peso del braccio e del complesso viti-giunti-contenitore-magnete, ottenendo una lettura diretta delle forze magnetiche d'interazione.

Un altro aspetto da evidenziare, oltre all'azzeramento elettronico dei componenti, è l'azzeramento fisico del sistema fatto prima di ogni ripetizione: le parti magnetiche sono state poste a contatto tra loro, imponendo tale configurazione come quella di partenza, in modo da misurare distanze e forze tra magneti e scaffold-magneti sia in fase di distacco (allontanamento) che in fase di ricongiungimento (avvicinamento).

2.4.2 Trazione magnete-magnete

Con lo scopo di valutare le congruenze tra dati sperimentali e soluzioni analitiche, è stata effettuata come prima prova la misura di forze magnetiche di trazione agenti tra due magneti permanenti in Neodimio- Boro, con valore di induzione pari a B = 1.2 T ed aventi entrambi dimensioni h = 10 mm, Ø = 10 mm, uno ancorato al braccio del motore tramite asta di alluminio, viti e contenitore cilindrico in plastica, l'altro fissato al supporto inferiore in polietilene con l'adozione di un particolare involucro avente lo spessore di 2 mm per evitare che, data la non banale entità delle forze in gioco, i due magneti restassero uniti tra loro (Fig.2.8).

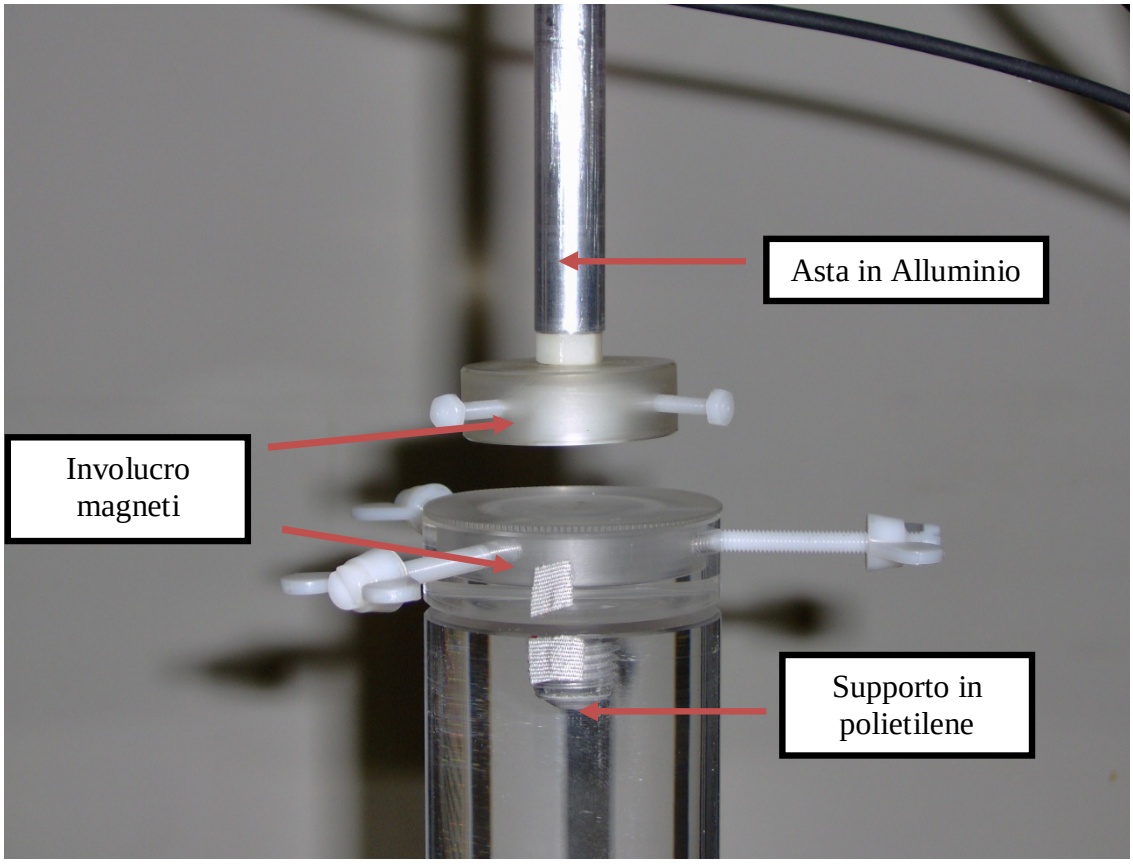


Fig. 2.8: Particolare della configurazione magnete-magnete.

A causa dello spessore di tale involucro lo zero assunto non è il punto di contatto tra i due magneti, ma il punto di contatto del magnete superiore con l'involucro contenente quello inferiore. La prova è stata suddivisa in due parti, una di allontanamento ed una di avvicinamento dei magneti. Data l'elevata entità d'interazione magnetica, è stato deciso di valutare tale forza sino alla distanza relativa di 30 mm, con passo di campionamento di 1 mm.

2.4.3 Trazione magnete-foglio di Cobalto

In questa prova sono stati utilizzati un magnete cilindrico permanente, avente dimensioni h = 10 mm, ∅ = 10 mm, ancorato al braccio del motore in modo analogo all'esperienza precedente, ed una sottile lamina di Cobalto, avente dimensioni 20x20x0.125 mm, fissata al supporto inferiore in polietilene con l'utilizzo di nastro biadesivo (Fig.2.9). La lamina di Cobalto rappresenterà molto probabilmente, sia per dimensioni che per caratteristiche magnetiche, lo scaffold che verrà poi impiantato *in vivo*.

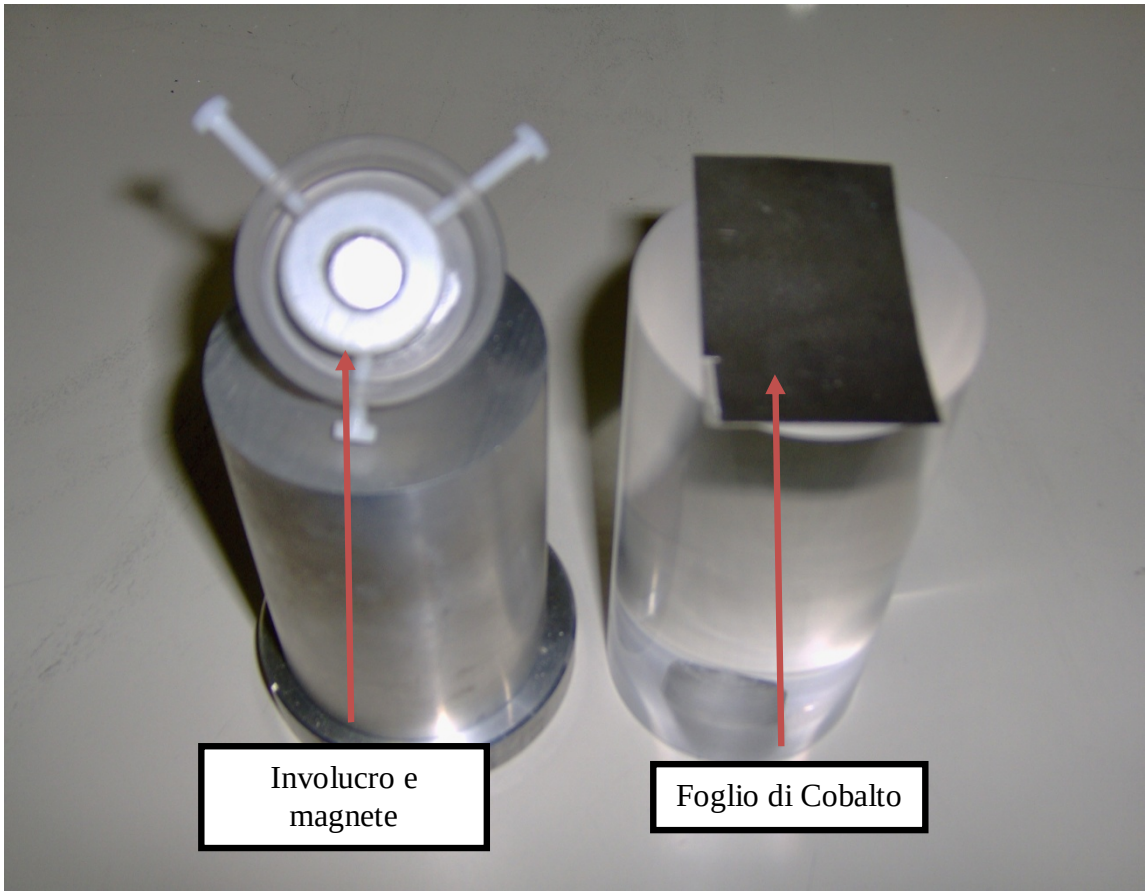


Fig. 2.9: Magnete cilindrico e foglio di Cobalto.

In questo caso lo zero preso come riferimento, data l'assenza del contenitore in quanto le forze in gioco non hanno richiesto l'utilizzo di un ulteriore strato per impedire alle due componenti magnetiche di restare unite, ha coinciso con il punto di contatto tra magnete e foglio Data la minor interazione magnetica che ha caratterizzato questa prova, è stato deciso di raccogliere dati sino alla distanza relativa di 10 mm, con lettura ad ogni millimetro.

2.4.4 Trazione magnete-pin

Questa esperienza ha previsto l'uso, accanto al magnete cilindrico di h = 10 mm e ∅ = 10 mm fissato al supporto inferiore, di cinque pin magnetici al Neodimio (h = 8 mm e ∅= 2 mm) disposti, all'interno di un supporto cilindrico in polietilene, secondo i vertici di un pentagono regolare, ancorando la struttura cosi ottenuta al braccio con giunti in ottone e viti in plastica (Fig.2.10).

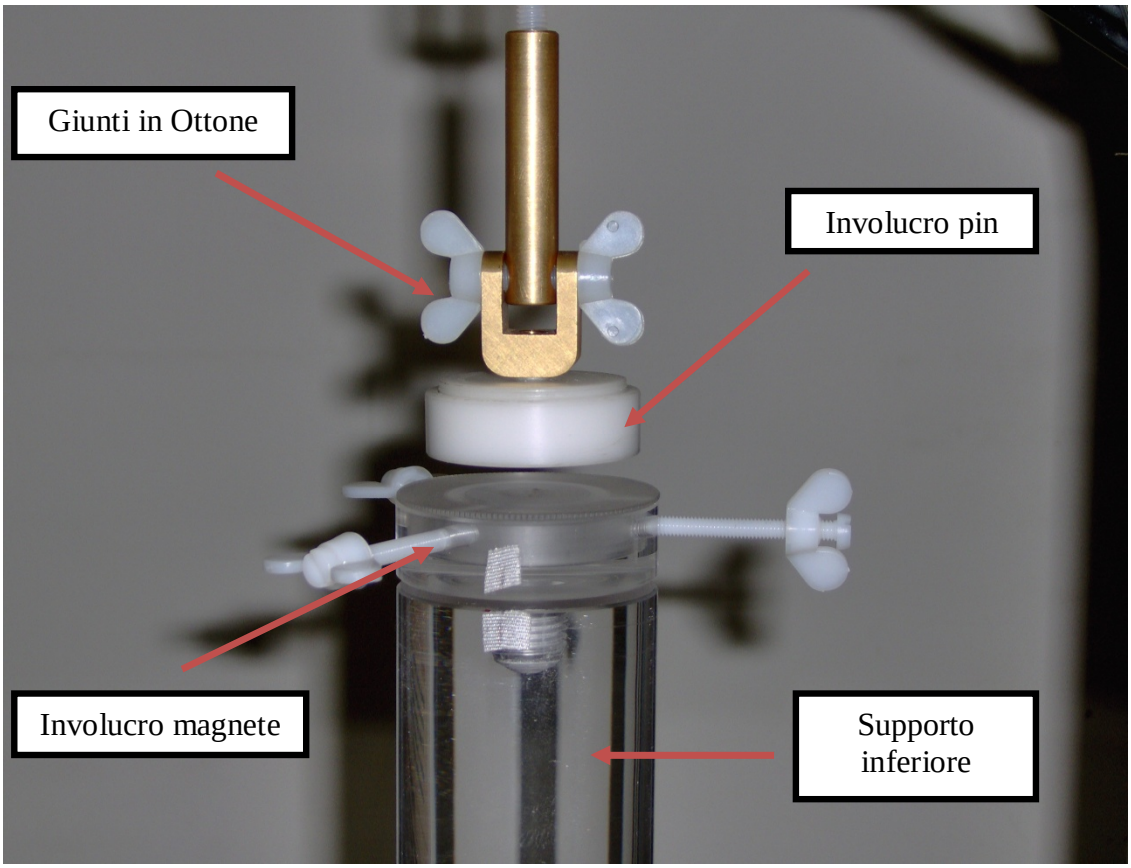


Fig. 2.10 : Particolare della configurazione magnete-pin.

Anche in questo caso tuttavia è stato necessario l'utilizzo di un involucro per il magnete cilindrico a causa del fatto che i flussi generati dai pin non sono risultati essere uniformi e perpendicolari in ogni punto alla superficie del magnete: a tale scopo sono stati di notevole importanza i gradi di libertà forniti dai giunti, che hanno consentito, sia nella fase di allontanamento che in quello di avvicinamento, che le superfici magnetiche fossero tra loro il più parallele possibile.
Questa volta è stato deciso di valutare le forze attrattive sino alla distanza di 10 mm, con passo di campionamento di 1 mm.

2.4.5 Trazione pin-foglio di Cobalto

Un'ulteriore soluzione per l'utilizzo di scaffold magnetici per il trattamento di difetti ossei intramidollari prevede l'utilizzo dello scaffold, ruolo rivestito in questa esperienza dal foglietto di Cobalto di dimensioni 50x30x0.125 mm, e di cinque pin magnetici (h = 8 mm e ∅ = 2 mm) nella configurazione a pentagono regolare (Fig.2.11). Questa configurazione sarà probabilmente una di quelle più utilizzate in condizioni in vivo, in quanto permette di evitare grossi danneggiamenti del tessuto subcondrale garantendo sufficiente forza di fissazione per lo scaffold.

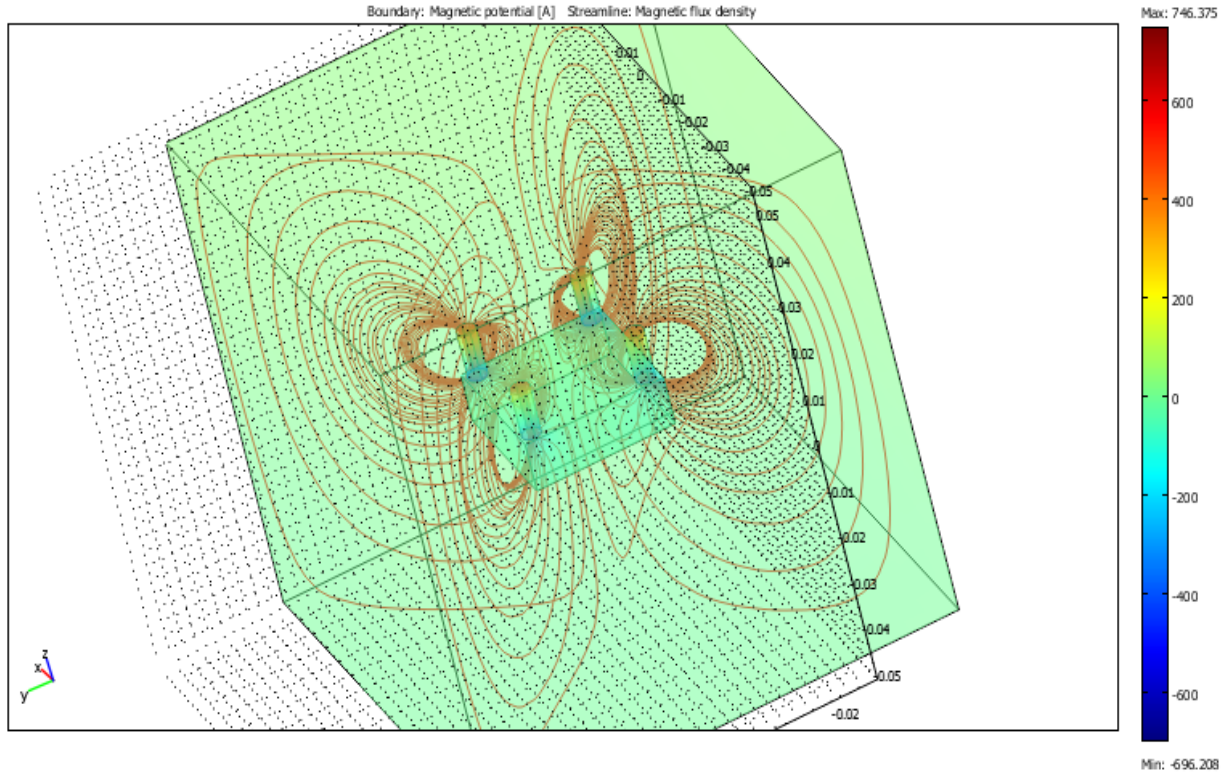


Fig. 2.11 : Simulazione Comsol mostrante l'interazione magnetica pin-foglio di Cobalto

Come nella prova precedente la configurazione dei pin è stata ancorata al braccio scorrevole con un sistema di giunti e viti, mentre il foglietto di Cobalto è stato fissato al supporto inferiore in polietilene con nastro biadesivo (Fig.2.12).

Da evidenziare il fatto che in questa configurazione è stata critica la fase di azzeramento fisico ed elettronico degli strumenti, dove anche se le parti magnetiche erano in contatto tra loro e la cella di carico inizialmente azzerata, un valore pari a 0.39 N rimaneva in output anche dopo distanze relative considerevoli: tale valore è stato provocato dal fatto che le viti inserite nei giunti, avendo frazioni di millimetro per assestarsi, consentivano alla cella una lettura data dall'insorgere della forza peso nella fase di risalita, anche se tale forza era stata resettata prima dello svolgimento della prova.

Per valutare questa problematica è stato pesato, con l'uso di una microbilancia, il complesso giunti-viti-involucro-pin, ottenendo una massa di 39.5 g, a cui corrisponde una forza peso di 0.39 N, valore che, fornendo un'offset alla misura, è stato successivamente sottratto a tutti i risultati sperimentali ottenuti in questa configurazione, sia in fase di allontanamento che in quella di avvicinamento.

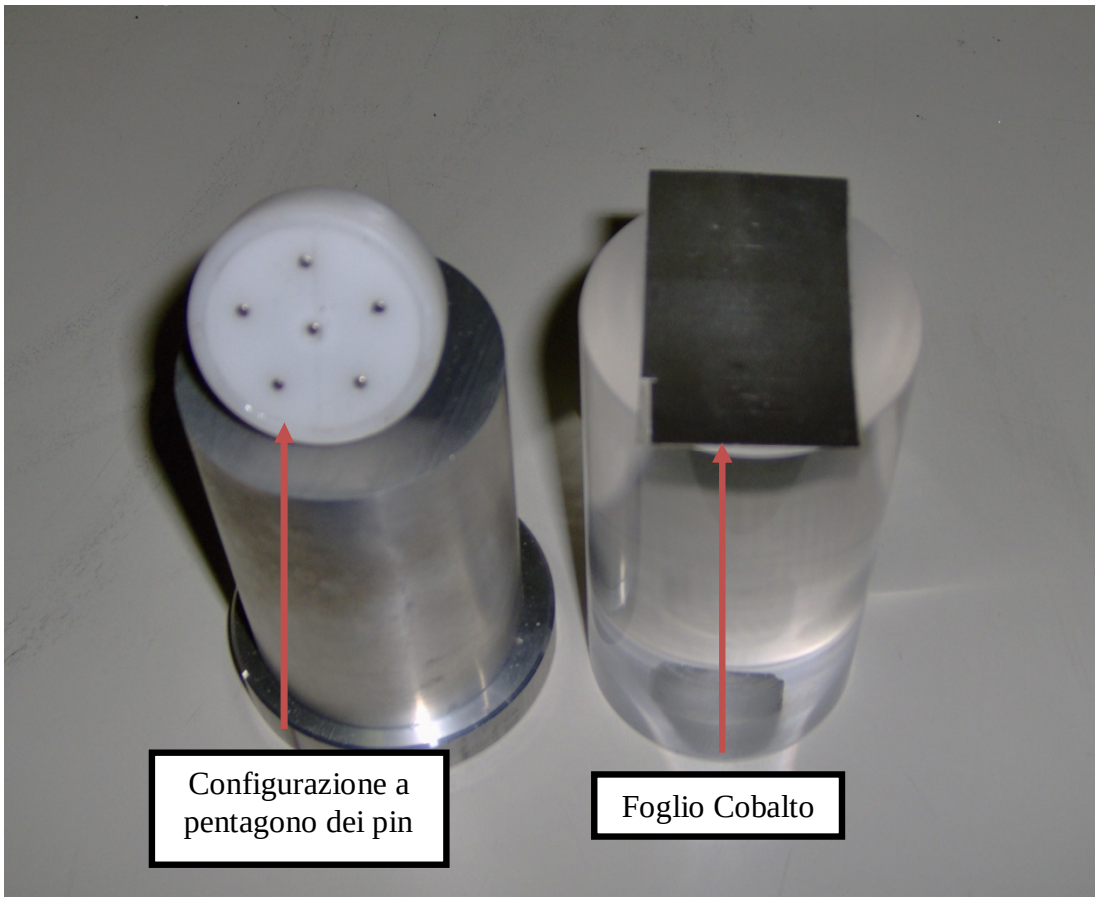


Fig. 2.12: Configurazione pin magnetici-foglio di Cobalto.

A cause delle deboli interazioni sorte in questa prova, è stato deciso di valutare le forze magnetiche in gioco sino alla distanza relativa di 5 mm, con lettura ogni 0.5 mm.

2.4.6 Forze laterali magnete-magnete

Unica configurazione analizzata per i difetti ad ossa lunghe, in questa prova sono state analizzate le forze laterali d'interazione tra magneti cilindrici al Neodimio aventi le stesse geometrie (h = 10 mm, ∅ = 10 mm). L' esperienza è stata svolta facendo scorrere il magnete collegato al braccio mobile sull'altro ancorato al supporto inferiore in plexiglas, da destra a sinistra e viceversa (Fig.2.13). Di notevole importanza è stata la fase di azzeramento e di equilibrio del setup per evitare l'insorgere, durante la prova, di problematiche quali la pressione esercitata dalla parte superiore su quella inferiore e la notevole forza in gioco, in grado di far compiere al supporto inferiore movimenti infinitesimi, con conseguenti errori di misura sia delle forze, che delle distanze.

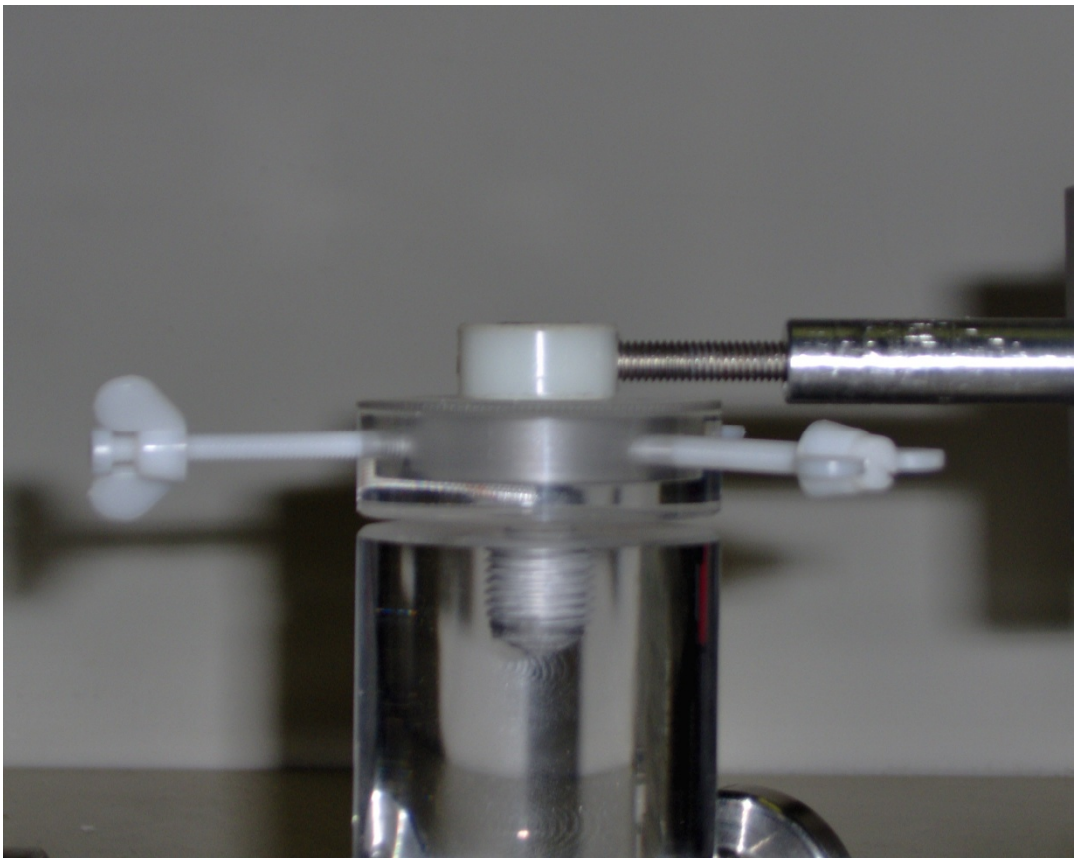


Fig. 2.13: Particolare della configurazione laterale magnete-magnete.

A tale scopo è stata introdotta una nuova configurazione del telaio, rimuovendo le due barre laterali di supporto ed utilizzando come parte superiore l'arco, in modo da ridurre la lunghezza del supporto inferiore in polietilene ed evitando cosi l'effetto leva altrimenti presentatosi. Le forze d'attrazione in gioco in questo caso sono state rilevate per spostamenti laterali, sia verso destra che sinistra, sino ai 10 mm, con passo di campionamento pari a 0.5 mm.

Calcolo coefficiente d'attrito

Nel modello previsto per questa prova, un aspetto cruciale per la comparazione dei dati sperimentali con quelli analitici è stato il calcolo del coefficiente d'attrito tra polietilene e plastica. Per determinarne il valore esatto sono stati rimossi entrambi i magneti e posizionato sul braccio scorrevole costituito da asta, viti e cilindro in plastica, per una massa complessiva di 38 g, un peso di 193.4893 g, che sommati forniscono una massa totale di 234,4893 g a cui corrisponde una forza peso agente perpendicolarmente alla cella di carico pari a 2.4 N (Fig.2.14).

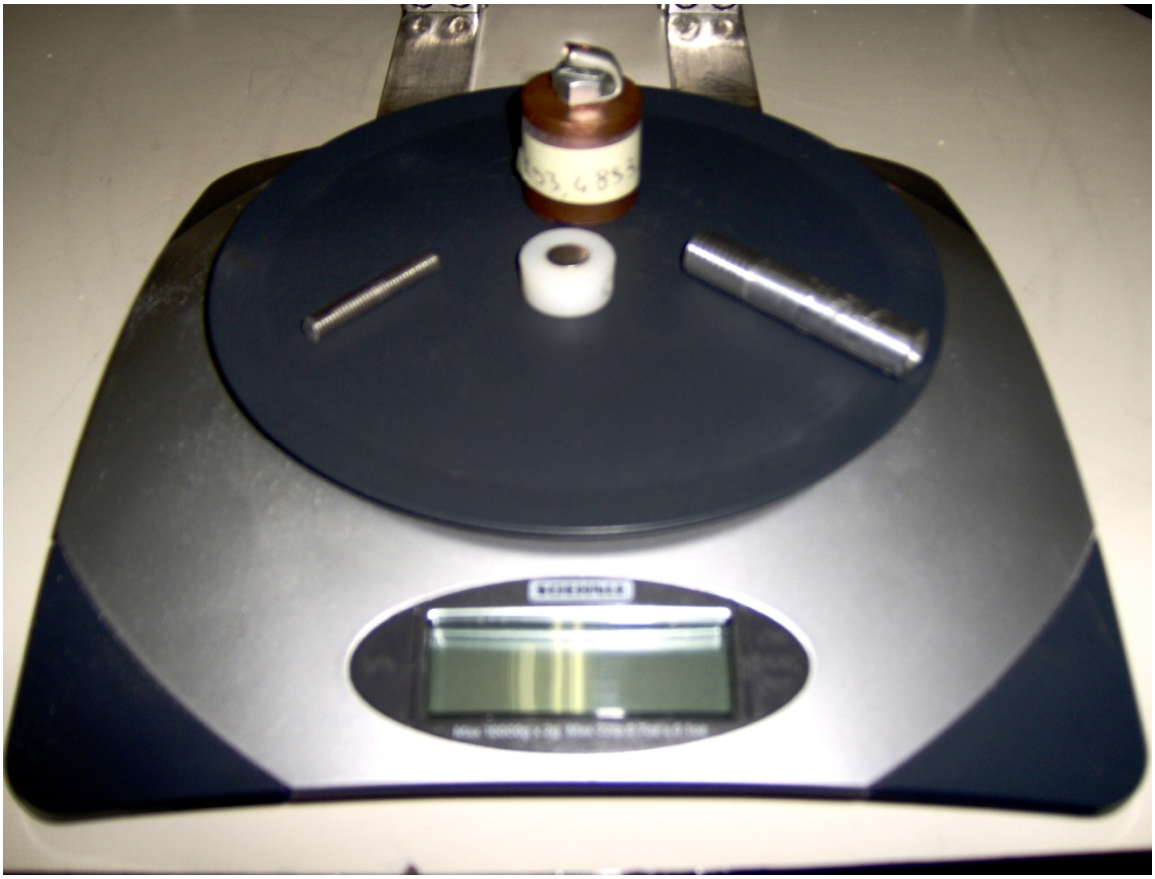


Fig. 2.14: Pesa dei componenti utilizzati nella configurazione laterale.

Tale complesso è stato successivamente traslato in entrambe le direzioni orizzontali per una distanza di 10 mm, con campionamento ogni 0.5 mm. Una media delle misure cosi ottenute è stata realizzata, ottenendo un valore pari a 0.44 N. Il calcolo effettuato per determinare il coefficiente d'attrito è dato dal rapporto tra forza tangenziale ed assiale, che ha fornito un valore pari a 0.193 in linea con lo 0.2 utilizzato nelle simulazioni con Comsol.

2.5 Simulazione fissazione scaffold su osso femorale

Come configurazione conclusiva è stata provata un'applicazione di fissazione di scaffold magnetici su osso femorale (Fig.2.15). A tale scopo è stato utilizzato un modello di femore umano in materiale rigido espanso con anima in poliuretano spugnoso, realizzato da Saw Bones, con sede in Malmö, Svezia.

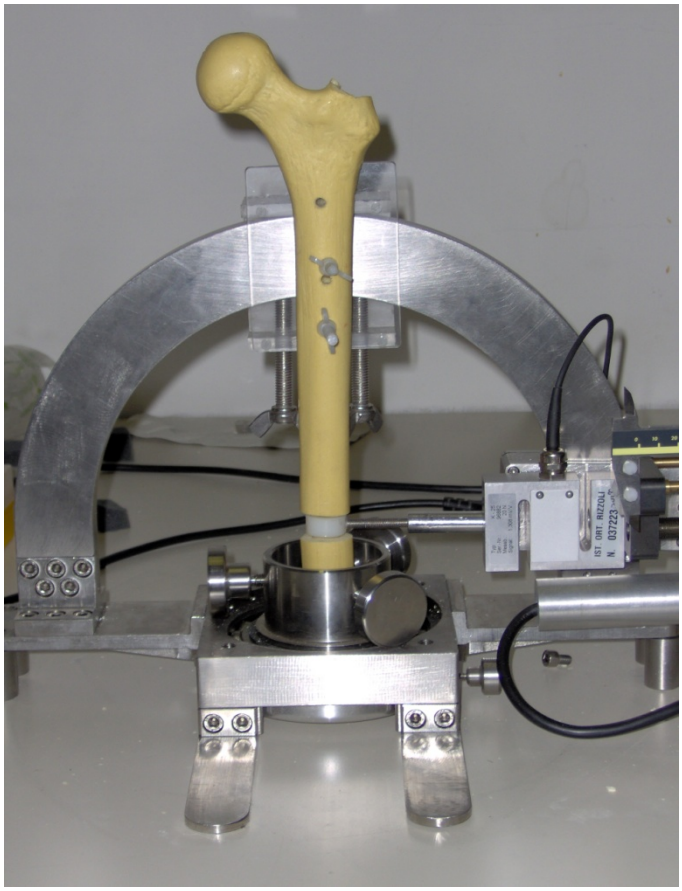


Fig. 2.15: Simulazione fissazione scaffold per osso femorale.

Sul modello è stata asportata una sezione circolare di 2 cm per simulare un danno con assenza di compartimento osseo al tessuto femorale. La parte superiore del femore è stata ancorata all'arco in Acciaio Inossidabile con l'utilizzo di placca in polietilene e viti in plastica, mentre la parte inferiore è stata utilizzata come supporto di base.

Due fori circolari, aventi h = 10 mm e $\emptyset = 22$ mm, sono stati effettuati sulle facce adiacenti delle sezioni ossee superiori ed inferiori, in modo da poter inserirvi i magneti cilindrici al Neodimio (h = 10 mm e $\emptyset = 10$ mm) e i relativi cilindri, in modo da contenere i magneti ed evitare che restino legati tra loro nella fase di spostamento; questi magneti rivestiranno il ruolo dei dispositivi che verranno impiantati nelle sezioni adiacenti al compartimento osseo mancante. Un ulteriore magnete, avente il ruolo di scaffold, è stato collegato al braccio in modo da simularne i possibili spostamenti che il complesso potrà subire *in vivo*.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Discussione risultati

Per ogni configurazione magnetica analizzata sono state effettuate prove ripetute, sia di trazione che laterali. Al termine delle misure di ogni configurazione, sono state fatte delle medie, per entrambe le fasi, con calcolo delle relative deviazioni standard.

I dati cosi ottenuti sono poi stati riportati in grafici, con l'utilizzo di Microsoft Excel, per comparare l'andamento sperimentale con i risultati ottenuti dalle simulazioni effettuate con Comsol e Matlab.

Nelle configurazioni di trazione si è potuto notare che le forze agenti risultano essere inversamente proporzionali al quadrato della distanza, fornendo un output grafico avente l'andamento di una curva logaritmica con base compresa tra zero ed uno.

Per quanto riguarda invece la configurazione laterale, effettuata tramite spostamenti da sinistra a destra e viceversa, sia i dati sperimentali che quelli analitici riportano un andamento delle forze in funzione delle distanze molto simile al ciclo d'isteresi dei materiali magnetici.

Il punto critico in tutte le prove è stato il posizionamento dello zero, cioè della configurazione iniziale da cui partire per ottenere i dati, sia perché spesso sono stati utilizzati materiali per evitare il collegamento diretto tra i magneti, in particolare nelle configurazioni con dispositivi cilindrici, sia perché, soprattutto nelle prove dove l'entità delle forze non era particolarmente rilevante come nel caso pin-foglio di Cobalto, i punti di equilibrio potevano essere molteplici dato che i flussi magnetici non avevano un' andamento puramente perpendicolare alle superfici.

Per ovviare a questa problematica si è cercato di utilizzare come punto zero la situazioni in cui le parti magnetiche erano il più vicino possibile ed in asse tra loro, in assenza di pressione generata dal braccio motore.

3.1.1 Trazione magnete-magnete

Per questa configurazione sono stati effettuate tre prove, ognuna suddivisa per fase di allontanamento e di avvicinamento dei magneti. Le distanze per le quali sono stati rilevati i valori di forze appartengono all'intervallo 0-30 mm. Dal grafico riportante l'andamento medio tra fase di allontanamento ed avvicinamento (Fig.3.1) è possibile notare il caratteristico andamento logaritmico della relazione forza-distanza.

Da evidenziare che in questa tipologia di fissazione si ottengono le maggiori forze d'interazione per le configurazioni analizzate inerenti a difetti ossei osteocondrali ed intramidollari, sia per la geometria dei magneti utilizzati, notevolmente maggiore rispetto alle altre, sia per il materiale utilizzato per la loro fabbricazione, il Neodimio, uno dei materiali più ferromagnetici esistenti ed avente costi inferiori di quelli a base di Samario-Cobalto.

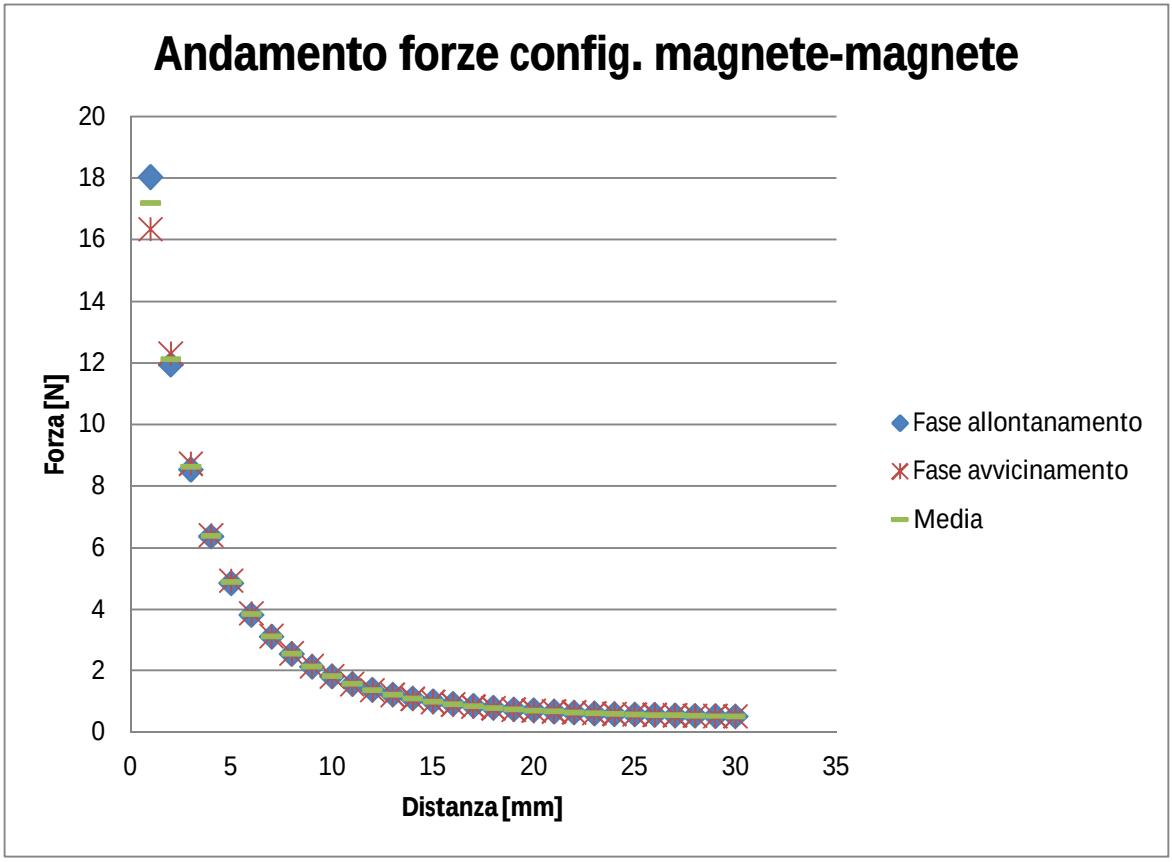


Figura 3.1: Andamento forze config. magnete-magnete

Osservando il grafico riportante la relazione tra media dati sperimentali e analitici (Fig.3.2), si nota che l'andamento risulta essere molto simile, con leggere differenze nella parte iniziale dovute alle problematiche di posizionamento dello zero, alle discrepanze, nell'ordine dei millimetri, relative all'equilibrio del supporto inferiore, ai limiti di risoluzione della cella di carico (0.02 N) ed al fatto che nella fase di avvicinamento si presentano forze d'attrazione inferiori, riducendo i valori medi, rispetto a quelli ottenuti in allontanamento, a causa del braccio meccanico, costituito dalla barra di Alluminio, e del movimento, concorde con il verso delle forze attrattive che spingono al ricongiungimento dei magneti.

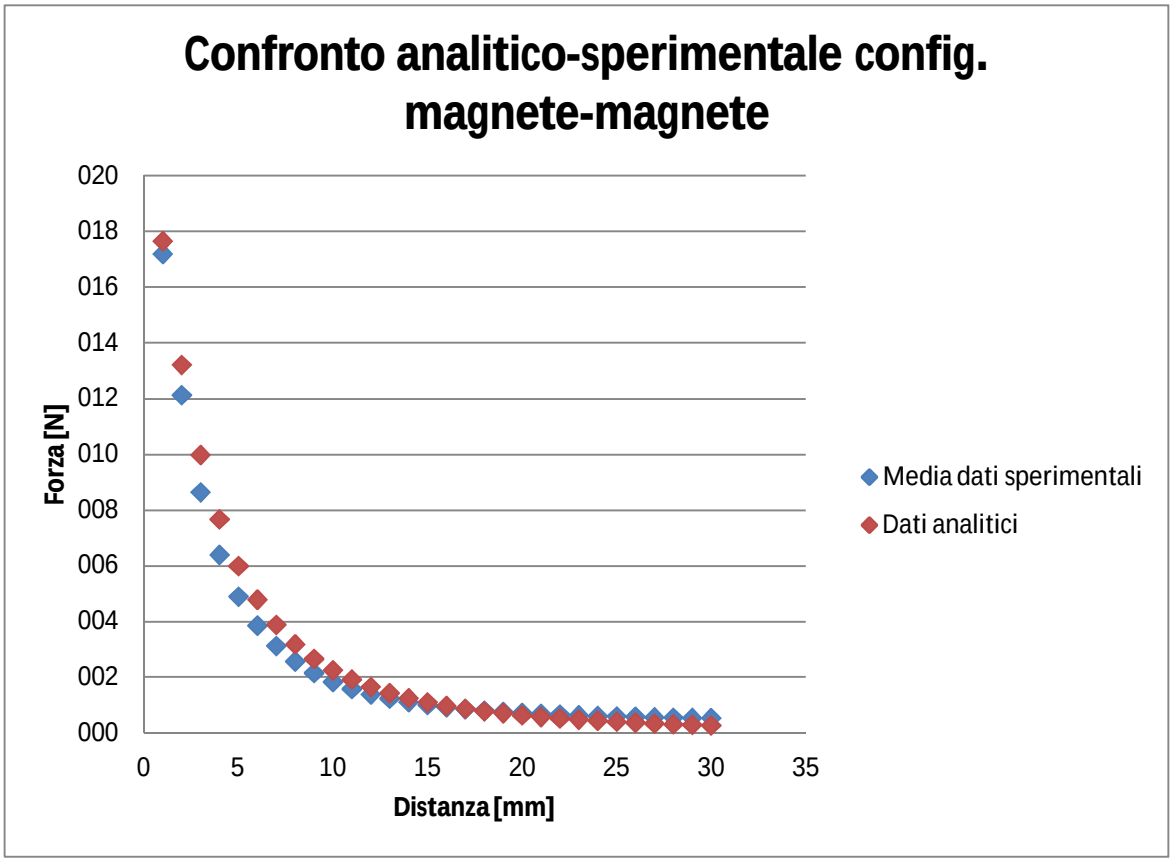


Fig. 3.2: Confronto analitico-sperimentale config. magnete-magnete.

3.1.2 Trazione magnete-foglio di Cobalto

Per questo setup, come per il precedente, sono state ripetute tre prove, ottenendo lo stesso andamento delle forze in funzione della distanza, con eccezione per il fatto che l'entità di tali interazioni è notevolmente minore rispetto a quella tra magneti cilindrici.

Meno critica tuttavia è risultata la fase di azzeramento, come si può notare dal grafico (Fig.3.3), grazie appunto alle lievi forze in gioco, per cui anche le distanze per le quali sono stati rilevati i valori appartengono all'intervallo ridotto 0-10 mm.

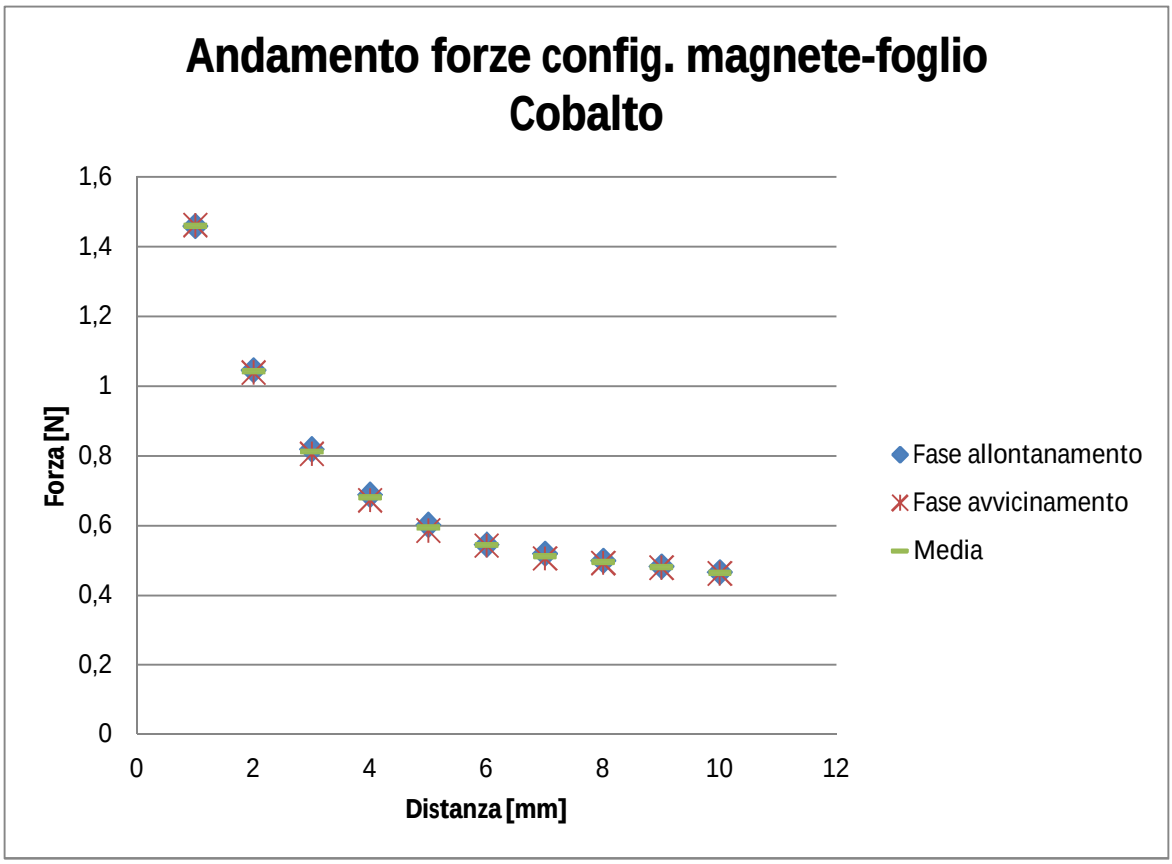


Fig. 3.3: Andamento forze config. magnete-foglio Cobalto.

3.1.3 Trazione magnete-pin

Tre prove sono state effettuate per questa configurazione, dove le distanze a cui sono stati rilevati i fenomeni d'interazione rientrano nell'intervallo 0-10 mm.

Dal grafico (Fig.3.4) si evince che le forze in gioco sono ancora minori rispetto alla configurazione precedente: una possibile spiegazione per tale fenomeno può essere data dal fatto che il flusso magnetico generato dalla particolare geometria dei pin non sia interamente perpendicolare alle superfici, in modo tale che parte di esso viene disperso.

In questo caso, come nel precedente, non è stato possibile effettuare una simulazione al calcolatore a causa della notevole diversità delle geometrie dei dispositivi magnetici.

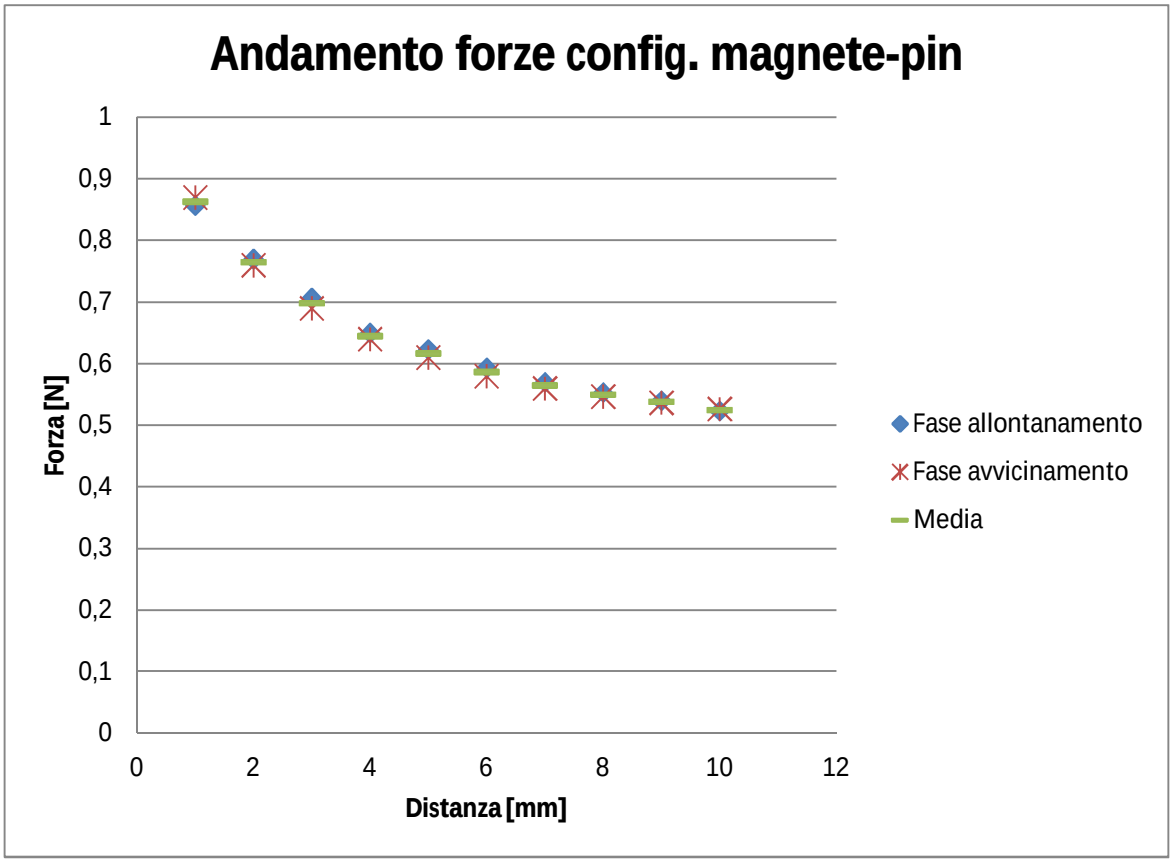


Fig. 3.4: Andamento delle forze in configurazione magnete-pin.

3.1.4 Trazione pin-foglio di Cobalto

In quest'ultima tipologia di fissazione di scaffold magnetici per danni ossei intramidollari, particolare attenzione ha rivestito la fase di posizionamento dello zero, come già espresso nel relativo paragrafo presente nel Capitolo 2, problema che ha richiesto una fase di pre-calcolo prima di ottenere i dati sperimentali veri e propri. Con questa configurazione tuttavia è stato possibile effettuare una simulazione con Comsol, sia per determinare l'entità delle forze in gioco, sia per visualizzare effettivamente le zone in cui esse si concentrano (Fig.3.5, 3.6).

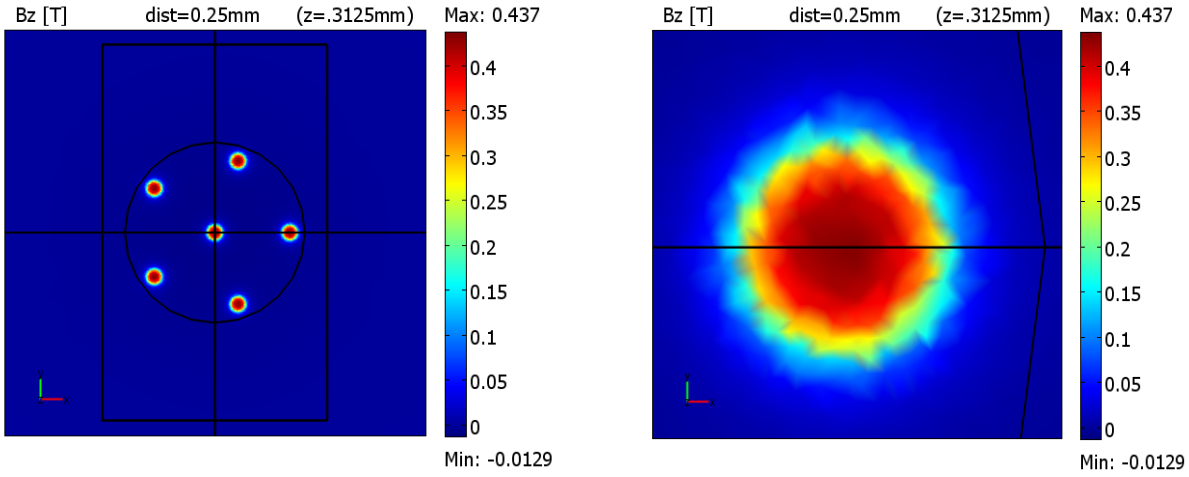


Fig. 3.5 A-B: Posizione dei flussi magnetici sviluppatesi su A) superficie dei pin e su B) superficie del foglietto di Cobalto.

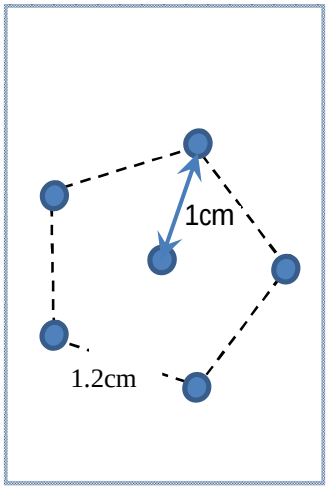


Fig. 3.6: Particolare della configurazione dei pin magnetici.

L’analisi dei dati sperimentali è stata prevista per distanze relative appartenenti all’intervallo 0-5 mm, causa i bassi valori di forze attrattive presenti tra le due parti magnetiche: dall’andamento del grafico è possibile notare una leggera discrepanza di valori nella fase iniziale causata dalla criticità del posizionamento dello zero (Fig.3.7).

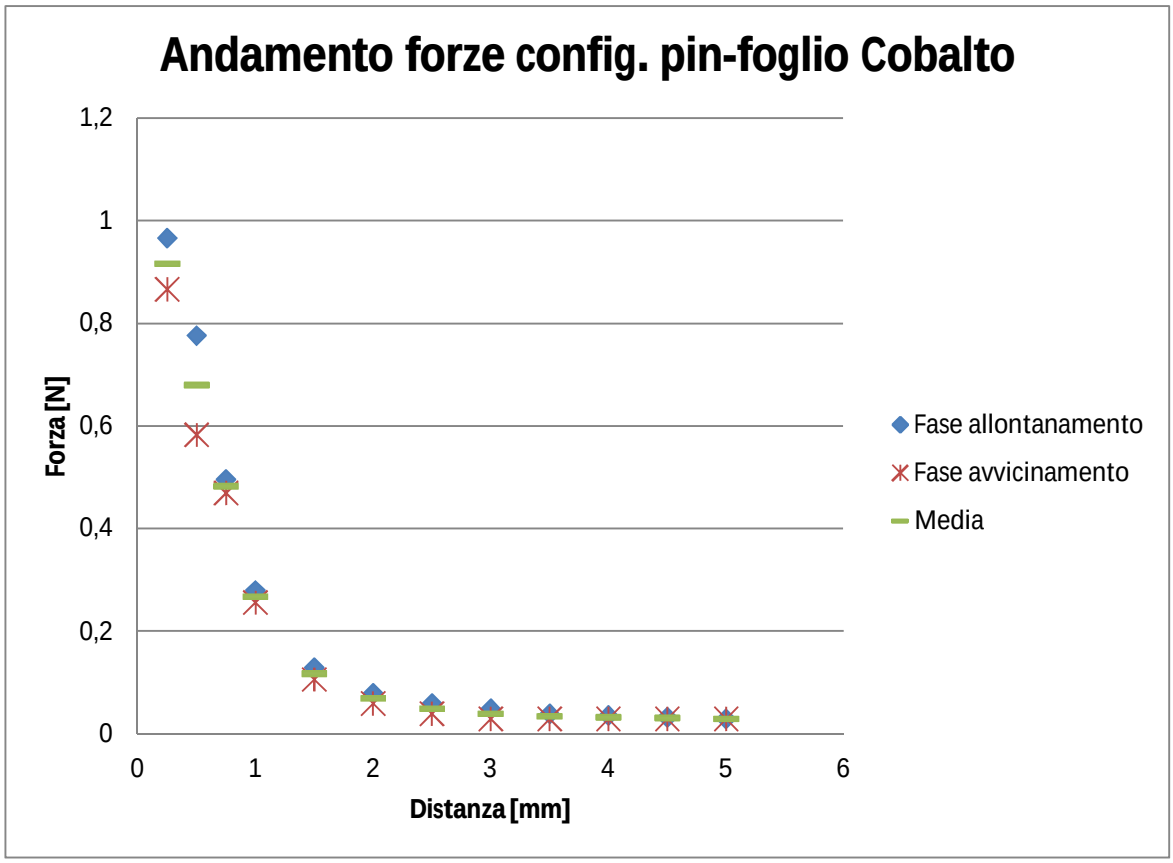


Fig. 3.7: Andamento delle forze in config. pin-foglio Cobalto

Dalla relazione tra dati sperimentali ed analitici (Fig.3.8) è possibile notare, nell'intervallo 0-1 mm, una significativa discrepanza di valori, che può essere spiegata dal fatto che il flusso prodotto dai pin, non perpendicolare alle superfici, in parte venga disperso e dal problema concernente la configurazione viti-giunti, capace di causare un offset delle misure, di entità variabile a seconda della distanza tra le parti magnetiche, causato dal gioco tra viti e fori dei giunti.
.

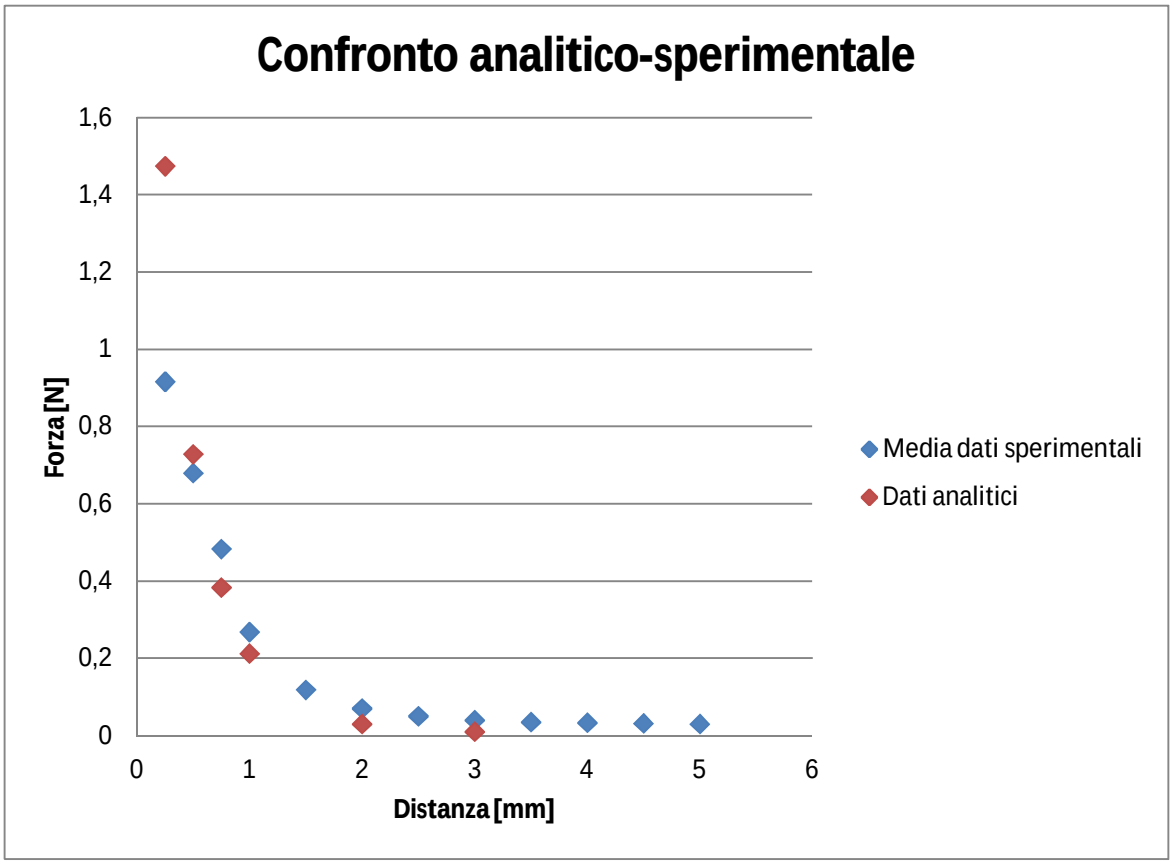


Fig. 3.8: Confronto analitico-sperimentale configurazione pin-foglio di Cobalto.

3.1.5 Forze laterali magnete-magnete

In quest'unica soluzione per la fissazione di scaffold magnetici per difetti delle ossa lunghe è stato deciso di raccogliere dati per distanze appartenenti all'intervallo 0-10 mm per entrambi gli spostamenti orizzontali. In questa configurazione sono stati raggiunti i valori più elevati di forze magnetiche, il che sta a significare che probabilmente è possibile ottenere con tale soluzione risultati significativi nell'ambito della fissazione. Nelle simulazione effettuata con l'utilizzo di Comsol 3.5 si è inizialmente tenuto conto di un ragne di valori che il coefficiente d'attrito (k) avrebbe potuto assumere, il che a portato ad una serie di andamenti diversificati, legati appunto al variare di k.

Da quanto ottenuto è possibile notare che in questo caso i fenomeni d'interesse non hanno assunto un andamento logaritmico, ma caratteristico del ciclo di isteresi del materiale utilizzato, ed influenzato dalle forze d'attrito (Fig.3.9).

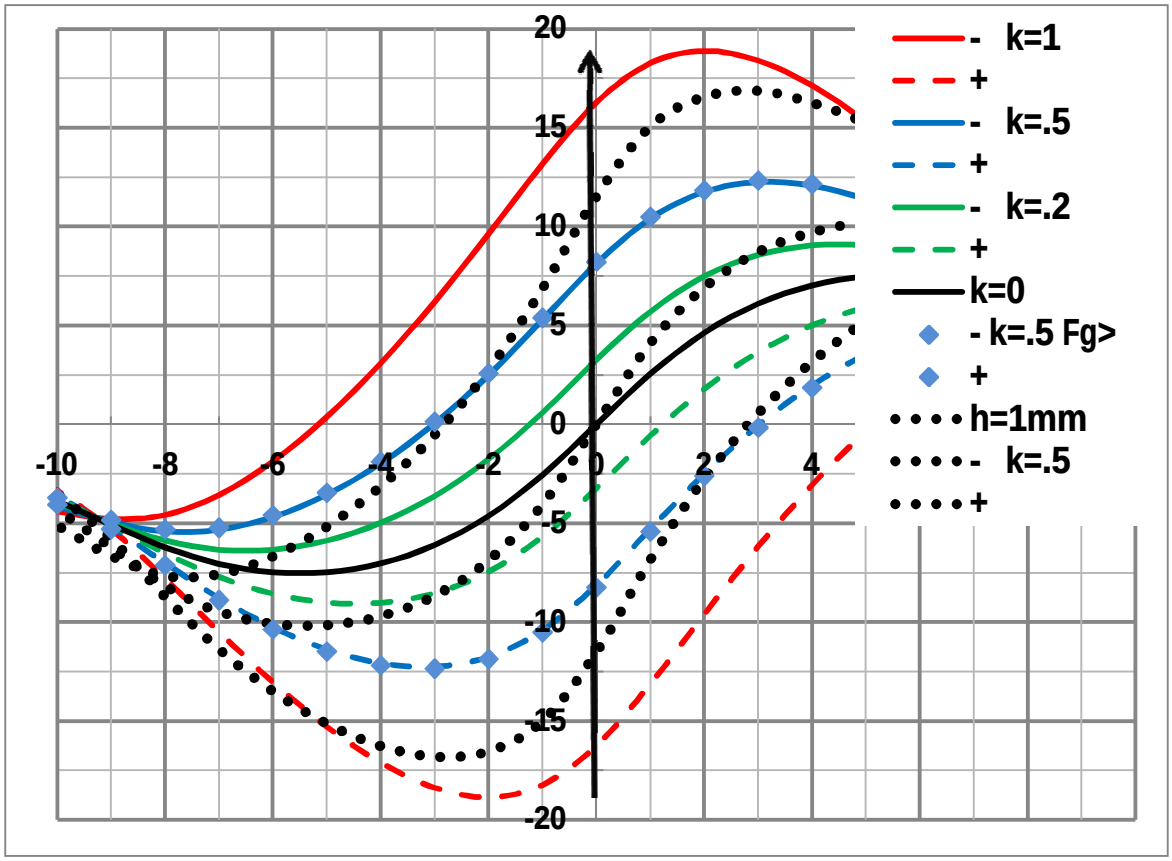


Fig. 3.9: Andamento del legame forza-distanza in configurazione laterale per diversi coefficienti d'attrito.

Le misure ottenute sono state riportate in tabelle e grafici per il confronto con i dati ottenuti analiticamente (Fig.3.10). Dal loro legame è possibile notare che il coefficiente d'attrito associato alla simulazione risulta essere 0.2, in linea con il valore 0.192 ottenuto con un'ulteriore serie di misure e calcolato analiticamente come media complessiva dei valori cosi ottenuti.

L’andamento sperimentale risulta essere molto prossimo a quello analitico, ad eccezione della parte finale associata alla fase di spostamento orizzontale da sinistra a destra. Questa problematica può essere probabilmente dovuta alla presenza di un leggero effetto leva del braccio meccanico che ha provocato un leggero offset sulla cella di carico, sia una variazione del livello delle superfici a contatto, probabilmente riconducibile a macro-difetti dei contenitori cilindrici e dei supporti utilizzati ed alla presenza di polvere e materiali residui generati sulla superficie nel passaggio precedente del magnete (Fig.3.11).

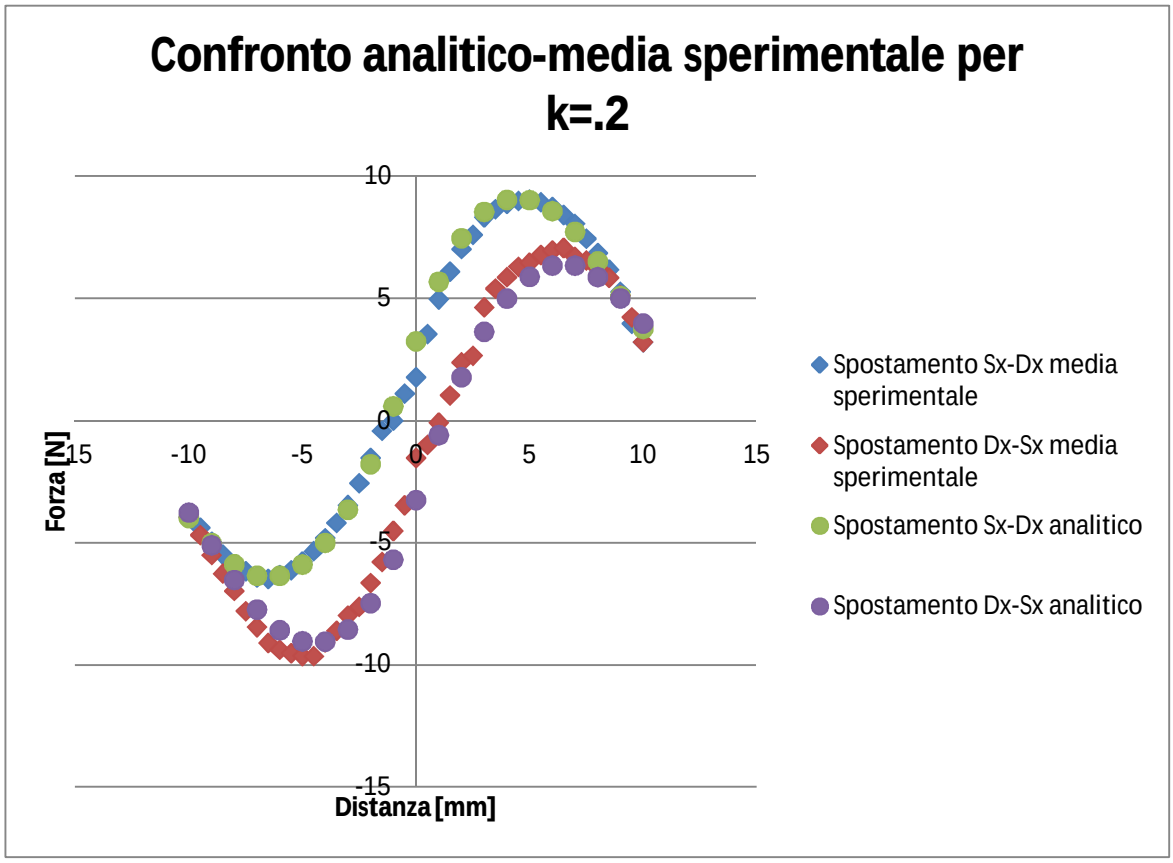


Fig. 3.11: confronto analitico-sperimentale delle forze ottenute in configurazione laterale magnete-magnete.

3.1.6 Simulazione fissazione scaffold su osso femorale

Questa simulazione è stata effettuate, come precedentemente spiegato nel Capitolo 2, per determinare le forze agenti sul modello di scaffold magnetico per difetti ossei femorali e/o tibiali. Data la notevole entità delle forze in gioco, superiori al fondo scala rilevabile dalla cella di carico, si è deciso di valutarne i valori associati per spostamenti, da sinistra a destra e viceversa, appartenenti all'intervallo 0-30 mm. Dal grafico (Fig.3.12) è possibile notare, come nel caso di prove relative alle forze laterali tra magneti cilindrici, il caratteristico andamento simile al ciclo d'isteresi del materiale magnetico utilizzato, connesso alla criticità di questa simulazione: particolarmente ardua è risultata, con i mezzi a nostra disposizione, la fase di azzeramento della configurazione, probabilmente riconducibile alla fissazione variabile, da prova a prova, del frammento osseo sottostante lo scaffold ed ai problemi di attrito tra le diverse interfacce che si sono presentate (magnete-magnete e magnete-plastica).

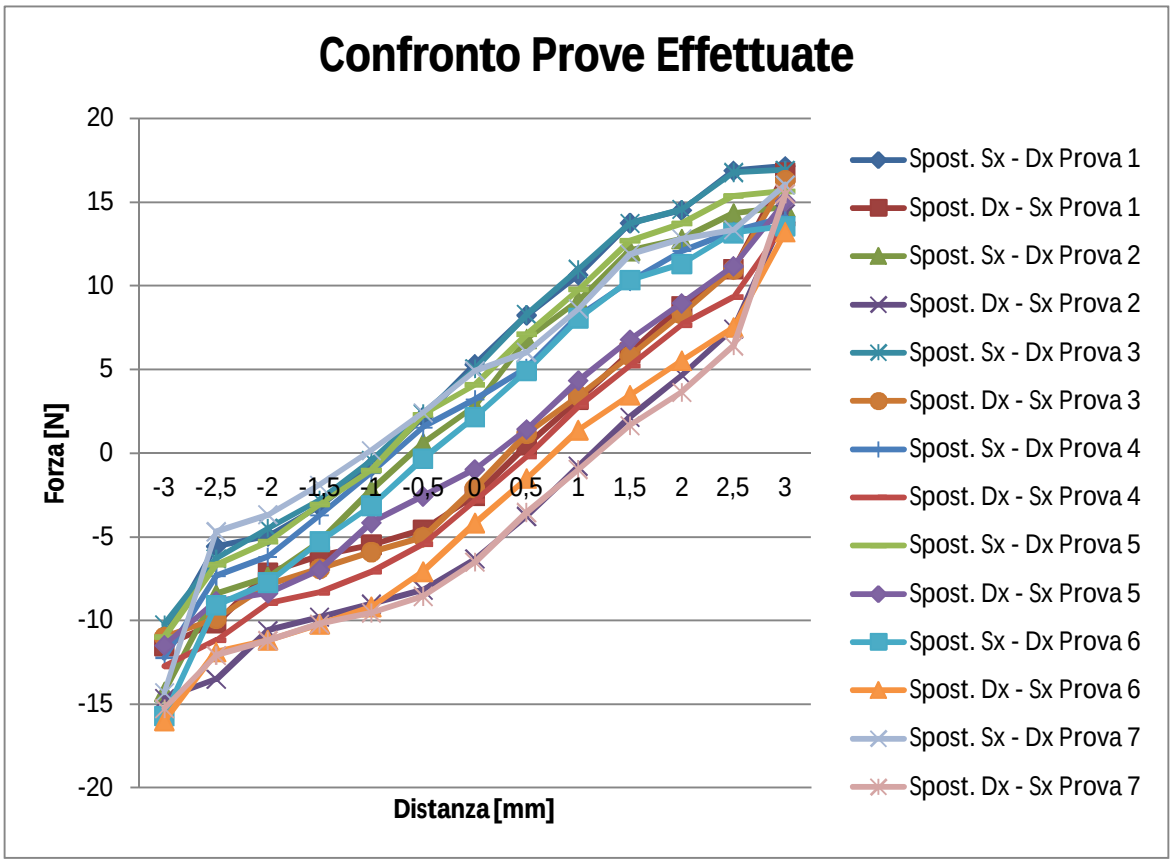


Fig. 3.12: Confronto valori ottenuti nelle varie prove effettuate per la simulazione di fissazione per osso femorale e/o tibiale.

Per determinare i valori massimi necessari per smuovere lo scaffold magnetico dal suo assetto, in asse con il frammento superiore ed inferiore di osso femorale, è stato utilizzato un dinamometro (PCE GROUP, risoluzione 0,01 N, indicatore minimo 0,3 N, portata massima 196,10 N), con il quale, dopo svariate prove, sono stati ottenuti i valori medi di 31,87 N e 30,18 N, rispettivamente di trazione e compressione.

Capitolo 4

Discussione e Conclusione

La nuova prospettiva dell'uso di scaffold magnetici per il trattamento di danni intrarticolari e difetti ossei potrebbe risultare un metodo efficace in ambito chirurgico, essendo in grado di sostituire parzialmente l'utilizzo di apparecchiature e materiali più invasivi, come placche, viti e chiodi in acciaio o altri metalli, che spesso causano infezioni, sepsi e rigetti da parte dell'organismo del paziente.
Un aspetto particolarmente problematico in riferimento a questa nuova tecnica di rigenerazione può essere dato dalla fissazione con cui tali dispositivi vengono posizionati ed ancorati all'interno del sito d'interesse, fissazione che deve essere in grado di consentire da un lato una allocazione stabile e fissa, ma che permetta micromovimenti dello scaffold nel caso di dinamica del corpo umano.
Come dimostrano i risultati ottenuti, la forza di fissazione per difetti ossei risulta essere notevolmente maggiore, da due a venti volte, rispetto alle configurazioni interessanti i danni osteocondrali. Tale risultato è confortante, in quanto le sollecitazioni a cui il tessuto osseo è sottoposto nella fase di rigenerazione risultano essere notevolmente maggiori nel caso di mancanza di compartimenti ossei piuttosto che a difetti superficiali. La validazione delle simulazioni permette di affermare che le forze magnetiche sono sufficienti nella fissazione degli scaffold intrarticolare a vincere il loro peso imbevuti di sangue (~0.10 N). Tuttavia le forze magnetiche agenti, nel caso di configurazioni interessanti difetti ad ossa lunghe, non sembrano essere invece sufficienti
a reggere il carico completo corpo-articolazione, nonostante potrebbero garantire una certa stabilità all'interfaccia osso-scaffold per carichi laterali fino a 30 N.
Per risolvere tale problematica non è da escludere a priori l'adozione, accanto a questa nuova tecnologia, di placche di bloccaggio e viti che, anche se utilizzate in maniera ridotta e molto meno intensiva, potrebbero garantire una fissazione ottimale sin dalla fase postoperatoria, consentendo un ancoraggio assoluto dello scaffold prima che il tessuto osseo di nuova generazione ne provochi un fissaggio, sia interno che esterno, tramite la rigenerazione.
Da evidenziare, per entrambi gli utilizzi di scaffold magnetici, la criticità del posizionamento iniziale, che andrà a coincidere con la fase di posizionamento *in situ* in ambito chirurgico, in quanto risultante ardua l'allocazione del complesso magneti-scaffold, soprattutto nel caso di geometrie rilevanti come per magneti cilindrici, dato che le forze di attrazione, essendo di notevole entità, possono causare un eventuale errore nel corretto inserimento e quindi l'insorgere, nella fase di riabilitazione post-operatoria, interazioni non ottimali al fine del processo di rigenerazione ossea, in grado di produrre un tessuto avente caratteristiche non omogenee e di non consentire l'eventuale corretto assemblaggio della frattura interessata.

Appendice A

Istituto Ortopedico Rizzoli

A.1 Ubicazione

L'Istituto Ortopedico Rizzoli è situato a Bologna, sulle colline, nella zona Sud della città, a circa un chilometro di distanza dai viali che circondano il centro storico fiancheggiando il tracciato delle mura medievali (Fig.A.1, A.2).



Fig. A.1: Istituto Ortopedico Rizzoli.

Tale Istituto è suddiviso in due sedi, Ospedale ed Istituto di Ricerca Codivilla-Putti. L'ospedale è sito in via G.Pupilli 1, mentre l'Istituto di Ricerca si trova in via di Barbiano 1/10.

A.2 Descrizione Struttura

L' Istituto Ortopedico Rizzoli è una struttura ospedaliera e di ricerca altamente specializzata nel campo dell'ortopedia e traumatologia. Dal 1981 è stato dichiarato dal Ministero della Sanità italiano "Istituto di Ricovero e Cura a Carattere scientifico" (IRCCS).



Fig.A.2: Logo Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna.

L'attività dell'istituto si articola in ricerca, cura ed assistenza ed è finalizzata a:

- fornire prestazioni ortopedico-traumatologico-riabilitative urgenti e programmate con utenza nazionale;
- produzione e sviluppo di ricerca biomedica e sanitaria, correlata alla pratica clinica e gestionale;
- contribuire alla formazione e specializzazione delle professioni sanitarie, in stretta relazione con svariati Atenei Universitari Italiani.

I servizi clinici ed assistenziali offerti riguardano l'intero ambito ortopedico-traumatologico (patologie traumatiche e/o degenerative) e delle funzioni riabilitative ad esso correlate. In relazione a tali ambiti sono state sviluppate specifiche aree, tra cui le più importanti risultano essere:

- chirurgia protesica (con particolare interesse in protesi d'anca, ginocchio e spalla);
- chirurgia ortopedica ad indirizzo oncologico e traumatologia vertebrale in elezione;
- ortopedia pediatrica;
- chemioterapia dei tumori muscolo-scheletrici.

Le attività cliniche e di ricovero sono organizzate in 30 unità operative raggruppate in tre dipartimenti (Dipartimento A.Codivilla, Dipartimento I.F.Goidanich, Dipartimento V.Putti).

L'attività chirurgia ortopedica-traumatologica di base non è la sola svolta in questo Istituto, in quanto vengono eseguiti interventi di altissima specializzazione nel trattamento dei tumori dell'apparato muscolo-scheletrico, nelle patologie ortopedico-pediatriche, vertebrali, del piede e arti superiori, nella patologia dello sportivo, degenerativa articolare dell'anca e del ginocchio ed infine anche in riguardo alla diagnosi e trattamento delle malattie genetiche scheletriche. Presso tale struttura è inoltre una Banca del Tessuto Muscolo-Scheletrico, che si occupa della raccolta, conservazione e distribuzione di tali tipologie di tessuto, ed una società "Telemedicina Rizzoli S.p.A." che si occupa di servizi in telemedicina.

A.2.1 Divisioni, servizi e dipartimenti

Dipartimento Alessandro Codivilla

Unità di degenza

VIII Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica pediatrica

Divisione di Chirurgia ortopedica-traumatologica vertebrale

Sezione A di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Sezione B di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Servizi sanitari di supporto

Servizio di Immunoematologia e Medicina trasfusionale

Modulo dipartimentale di Medicina generale

Modulo dipartimentale di Patologia clinica

Modulo organizzativo di Reumatologia

Banca del tessuto muscolo-scheletrico

Laboratori di ricerca

Laboratorio di Immunologia e genetica

Laboratorio di Biologia cellulare e microscopia elettronica

Servizio di Chirurgia sperimentale

Dipartimento Italo Federico Goidanich

Unità di degenza

V Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica ad indirizzo oncologico

Sezione di Chemioterapia dei tumori muscolo-scheletrici

Sezione di Chirurgia generale dell'apparato muscolo-scheletrico

Servizi sanitari di supporto

Servizio di Anatomia ed istologia patologica

Servizio di Farmacia

Servizio di Radiologia e diagnostica per immagini

Modulo dipartimentale Imaging con ultrasuoni e Radiologia interventistica angiografica

Modulo organizzativo di Rigenerazione Tissutale Ossea

Laboratori di ricerca

Laboratorio di Ricerca oncologica

Dipartimento Vittorio Putti

Unità di degenza

I, VI, VII, IX Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Sezione C di Chirurgia ortopedico-traumatologica

Servizio di recupero e rieducazione funzionale

Servizi sanitari di supporto

Servizio di Anestesia-Rianimazione e Terapia intensiva

Modulo dipartimentale di Pronto soccorso

Laboratori di ricerca

Laboratorio di Analisi del movimento

Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione Tecnologica

Laboratorio di Fisiopatologia degli impianti ortopedici

Laboratorio di Tecnologia Medica

A.3 Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica

Il Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica, diretto dal Prof. Maurilio Marcacci, è un ambiente di lavoro multidisciplinare, che si avvale della collaborazione fra chirurghi ortopedici, ingegneri, fisici, informatici e dottori in scienze motorie, creando un supporto teorico e pratico all'attività di ricerca clinica e chirurgica.

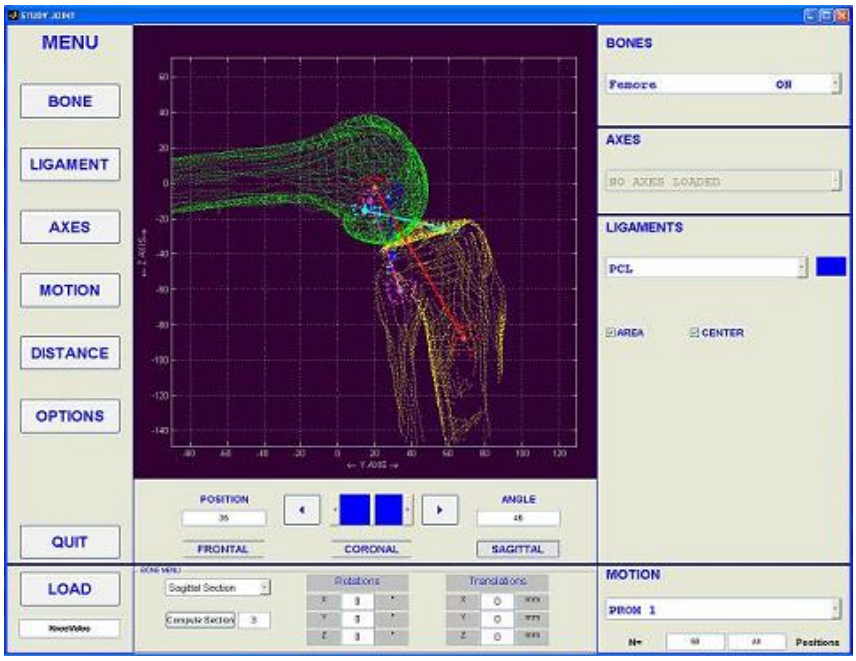


Fig. A.3: Interfaccia principale del software per analisi anatomico-funzionali di articolazioni.

Il Laboratorio, in collaborazione con la Clinica Ortopedica e Traumatologica III, ha acquistato rilevanza internazionale nell'ambito della chirurgia assistita al calcolatore, nelle biotecnologie tissutali, nella validazione di impianti protesici e nell'analisi biomeccanica delle articolazioni (Fig.A.3). Le attività del Laboratorio sono suddivise in cinque aree:

- biomeccanica-cinematica;
- Roentgen Stereophotogrammetric Analysis (RSA);
- navigazione robotica;
- biotecnologie;
- biomeccanica dello sport.

In stretta collaborazione con il Laboratorio di Biomeccanica e Innovazione tecnologica, opera, nell'ambito di svariati e molteplici progetti, anche il Laboratorio NaBi.

A.4 Laboratorio NaBi

Il Laboratorio NaBi si occupa della progettazione e dello sviluppo di moderni approcci nano-biotecnologici in ambito di Medicina Rigenerativa e di Chirurgia Protesica e Traumatologica. Uno degli ambiti di ricerca del Laboratorio è la realizzazione e caratterizzazione di ricoprimenti nano-strutturati e anti-usura per protesi articolari e altri dispositivi impiantabili in Ortopedia e Traumatologia, per la cui deposizione viene utilizzata una tecnologia di ultima generazione, la *Pulsed Plasma Deposition* (PPD, che consente di depositare materiali organici su substrati inorganici e viceversa, realizzando nano-strutture polifunzionali caratterizzate da altissima adesione all'interfaccia. Un ulteriore ramo di ricerca, sul quale si è basata l'attività di Tirocinio, è lo studio di *scaffold magnetici* per la rigenerazione ossea ed osteocondrale con nano-particelle magnetiche opportunamente funzionalizzate con fattori di crescita e e/o cellule (Fig.A.4).



Fig.A.4: Processo di rigenerazione ossea con l'utilizzo di scaffold magnetici.

Tale attività è svolta nell'ambito del Progetto Magister, collaborazione europea tra il Consiglio Nazionale delle Ricerche, Università di Bologna e Zagabria, e partner esperti in magnetismo (ISMN), biologia (BSMU), fisica delle particelle (USC) e tecnologia relativa agli scaffold (ISTEC). Questo studio è supportato da una parte di sviluppo in ambiente virtuale basata su simulazioni matematiche utilizzando un software ad elementi finiti di ultima generazione, *Comsol 3.5 Multiphysics.* Parallelamente, il controllo spaziale e temporale della rigenerazione tissutale sullo scaffold viene testato in vitro con cellule staminali mesenchimali in situazione di coltura statica e dinamica in un bioreattore magnetico. Vengono validate inoltre nuove metodologie di fissazione dei dispositivi ortopedici, grazie allo sviluppo di un simulatore magneto-meccanico.

Bibliografia

[1] Carlo DiBello - *Biomateriali: Introduzione allo studio di materiali per uso biomedico* Pàtron Editore, 2004.

[2] Dott. Luigi Vernaglia Lombardi – Chirurgia e Patologie Ortopediche.

[3] George C. Babis – Bone scaffolds: The role of mechanical stability and instrumentation, *Injury* 2005; S38-S44.

[4] Perren SM. – Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation, *Clin Orthop* 1979; 138:175-96.

[5] Wolf J. – Process of new bone's transformation, Berlin 1892, Verlag von August Hirschwald.

[6] Bauer TW, Muschler GF. – Bone graft materials: an overview of the basic science, *Clin Orthop* 2000; 371:10-27.

[7] J. E. J. Bekkers –Quality of scaffold fixation in a human cadaver knee model, *Osteoarthritis and Cartilage* 2010, 266-272.

[8] Joseph J. Gugenheim – External Fixation in Orthopedics, Fondren Orthopedic Group, LLP, Texas Orthopedic Hospital, Houston.

[9] Thore Zantop, Sandra Zelle – Arthroscopic Tecniques for the Fixation of a Three Dimensional Scaffold for Autologous Chondrocyte Transplantation : Structural Properties in an In Vitro Model, Arthroscopy; *The Journal of Arthroscopic and Surgery* 2007; Vol 23 pp 1073-1078.

[10] Gooding CR – A prospective, randomized study comparing two techniques of Autologous Chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee *Knee* 2006; 13:203-210.

[11] Q. C. Yan – Effects of static field on bone formation of rat femurs, *Medical Engineering & Physics* 1998; 397 - 402.

[12] J.S. Agashe, D.P: Arnold – A study of scaling and geometry effects on the forces between cuboidal and cylindrical magnets using analytical force solutions, *Journal of Physics* 2008.