

**Università degli Studi di Padova – Facoltà di Ingegneria**

---

LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**APATITI BIOMIMETICHE PER SOSTITUZIONE  
E FISSAGGIO OSSEO:  
IL RUOLO DELLE NANOPARTICELLE  
NEL COMPOSITO nHAP-PLLA**

Tesina di Laurea Triennale

**Laureanda:**

Chiara Giordano

**Relatore**

Prof. Andrea Bagno

---

Anno Accademico 2009-2010



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>pag. 5</b>
1.1 Caratterizzazione della problematica.....	pag. 5
1.2 Materiali indagati: struttura e proprietà.....	pag. 7
1.2.1 Idrossiapatite (HAP).....	pag. 8
1.2.2 Poliesteri biodegradabili PLA, PGA.....	pag. 10
1.2.3 Compositi HAP – PLA, PGA.....	pag. 14
<b>2. IL COMPOSITO NANOIDROSSIAPATITE – ACIDO POLILATTICO... ..</b>	<b>pag. 19</b>
2.1 Descrizione .....	pag. 19
2.2 Metodo di preparazione: tecnica della separazione di fase .....	pag. 22
2.3 Proprietà: un confronto diretto con il composito mHAP-PLLA .....	pag. 29
<b>3. SPERIMENTAZIONE IN VIVO : studi su mineralizzazione e osteogenesi di scaffolds in nHAP-PLLA con innesti superficiali di PLLA.....</b>	<b>pag. 37</b>
3.1 Lavoro svolto: preparazione dei materiali e metodologie d'indagine.....	pag. 39
3.2 Risultati.....	pag. 43
3.2.1 Analisi di porosità e al microscopio elettronico SEM dello scaffold....	pag. 43
3.2.2 Analisi post-operatorie: osservazione macroscopica, esame ai raggi X, analisi al SEM, analisi istologiche e discussione dati.....	pag. 47
<b>4. CONCLUSIONE.....</b>	<b>pag. 57</b>
4.1 Vantaggi apportati dalla nano struttura.....	pag. 58
4.2 Possibili applicazioni del composito nHAP-PLLA.....	pag. 61

# SOMMARIO

Questo studio ha come obiettivo analizzare il comportamento dei materiali riassorbibili maggiormente utilizzati per la riparazione di tessuto osseo, in particolare valutando il composito nano idrossiapatite – acido polilattico (nHAP- PLLA) e l'importanza della sua particolare struttura. La ricerca parte da un'analisi delle principali problematiche e dei recenti sviluppi nel settore per poi proseguire con lo studio dei principali materiali biodegradabili e biorassorbibili utilizzati per tali applicazioni, illustrando vantaggi e svantaggi di idrossiapatite (HAP), acidi polilattico, poliglicolico (PLA e PGA) e loro compositi. Successivamente viene largamente descritto il nano composito nHAP/PLLA (struttura, metodo di produzione, proprietà) correlato con analisi di applicazioni in vivo del materiale. Scopo finale del lavoro è quello di mettere in luce i vantaggi apportati dalla nanostruttura del composito rispetto ai materiali precedentemente citati e di valutare possibili applicazioni future.

# 1. INTRODUZIONE

L'ortopedia è un settore medico che, negli ultimi decenni, ha beneficiato in larga misura dei progressi tecnologici apportati dalla bioingegneria. Attualmente uno dei campi in grande sviluppo è quello della riparazione e sostituzione di tessuto osseo danneggiato. Risulta, infatti, piuttosto comune la necessità di ricostruire osso conseguentemente a perdite abbondanti di sostanza causate, ad esempio, da gravi traumi, malformazioni congenite o asportazione di tumori ossei. Sviluppi futuri in tale settore sono strettamente correlati ai biomateriali utilizzati per gli impianti e, in particolare, non possono prescindere dallo studio e sviluppo di nuovi biomateriali atti a migliorare le prestazioni di quelli già in utilizzo.

Obiettivo di questa ricerca è quello di analizzare e valutare il comportamento dei materiali biorisorbibili più usati attualmente in tecniche di rigenerazione ossea, in particolare concentrando l'attenzione sul composito nanoidrossiapatite – acido polilattico (nHAP – PLLA) e sulla sua particolare struttura. Questo composito risulta, infatti, di notevole interesse per le sue ideali proprietà e l'elevata percentuale di successo degli impianti inseriti nelle aree trattate. In particolare, poi, la ricerca vuole mettere in evidenza l'importanza della scelta del tipo di biomateriale usato ma, soprattutto, della dimensione della struttura utilizzata: notevoli sono, infatti, i vantaggi apportati dall'utilizzo di compositi nanostrutturati, simili in misura maggiore alla naturale struttura ossea.

## 1.1 Caratterizzazione della problematica

Tra gli svariati settori nei quali trovano applicazione i dispositivi biomedicali sicuramente risulta di notevole rilievo il campo ortopedico. Numerose e largamente utilizzate sono infatti le applicazioni che la bioingegneria ha messo a disposizione di questo settore: stecche, stampi, apparecchi fissatori, fili, viti, piastre e chiodi vengono quotidianamente utilizzati dai medici ortopedici per sostituire e/o recuperare le funzionalità di tessuto osseo danneggiato da traumi, malattie o invecchiamento [1]. I materiali tradizionalmente impiegati nella fabbricazione di tali dispositivi sono i metallici, fundamentalmente titanio, leghe al titanio e acciai inossidabili poiché essi possiedono elevato modulo elastico, buona duttilità ed elevata resistenza alla fatica, qualità che li rendono ottimi candidati per la costruzione di dispositivi in grado di sostituire i tessuti duri come il tessuto osseo. Oltre però agli innegabili vantaggi apportati, l'utilizzo di questa tipologia di materiali in ortopedia genera anche una serie di

problematiche inerenti la biocompatibilità e il fenomeno dello *stress shielding*. Una prima importante problematica si presenta nel momento in cui gli impianti metallici, venendo a contatto con fluidi biologici fortemente aggressivi, risultino essere soggetti a corrosione: la corrosione, infatti, comporta il rilascio di ioni metallici in ambiente biologico con probabili conseguenze sia per la funzionalità del dispositivo che per la salute del paziente, data la possibile citotossicità degli elementi rilasciati, soprattutto nel caso dei metalli pesanti. Una seconda problematica, la principale nella scelta del biomateriale da utilizzare, è legata alla forte disparità tra il modulo elastico dei metalli e quello del tessuto osseo naturale, che risulta essere 10-20 volte inferiore rispetto al metallico. Nel momento in cui si va ad impiantare il dispositivo all'interno di tessuto osseo si genera, dunque, una forte discordanza tra la rigidità ossea e quella del metallo e, dato che la quantità di stress meccanico supportata è strettamente legata alla rigidità del mezzo, l'osso non risulta caricato in maniera adeguata se rapportato al carico dell'impianto. La conseguenza è una probabile atrofia del tessuto con un anomalo e forte aumento di porosità; il che comporta notevole rischio di cattiva guarigione dell'osso ed esposizione a nuove fratture a seguito della rimozione del dispositivo impiantato. È, dunque, necessario prevenire questo effetto inserendo impianti di rigidità comparabile a quella del tessuto che si va a sostituire. In questo senso sono stati recentemente condotti numerosi studi [2] e, grazie alla crescente sofisticazione ed ai continui progressi nel campo della bioingegneria, è stato possibile sviluppare nuovi progetti che prevedano l'utilizzo di biomateriali che permettano una migliore integrazione con il tessuto osseo ospitante mantenendo, comunque, importanti proprietà meccaniche. Una delle idee che sta prendendo campo in misura sempre maggiore è quella dell'utilizzo di materiali polimerici compositi biorisorbibili per applicazioni ortopediche: essi, infatti, uniscono buone proprietà meccaniche a ottima biocompatibilità ed essendo biorisorbibili ovviano anche alla problematica di sottoporre il paziente ad un secondo intervento chirurgico per la rimozione del fissaggio una volta raggiunta la necessaria stabilità del tessuto osseo danneggiato. I materiali polimerici hanno, infatti, rigidità fortemente inferiore rispetto ai materiali metallici e l'utilizzo di compositi con l'inserimento di elementi di rinforzo nella matrice polimerica permette di unire basso valore di modulo elastico ad elevata resistenza meccanica, proprietà che rendono questa tipologia di materiale ideale per applicazioni ortopediche. Oltretutto, utilizzando materiali compositi, è possibile regolare la volumetria e la disposizione locale delle fibre di rinforzo adeguando ad hoc forma e proprietà dell'impianto. Dispositivi biomedicali prodotti con materiali biorisorbibili forniscono, ancora, una iniziale rigidità e stabilità necessaria al processo di guarigione per poi, essendo riassorbiti, favorire

una graduale sollecitazione meccanica sull'osso trasferendo, mano a mano, il carico al tessuto in via di guarigione. Vi sono poi tutta un'altra serie di ragioni che fanno sì che i compositi polimerici siano scelti in campo ortopedico come, ad esempio, assenza di corrosione, assenza degli effetti della fatica, alta processabilità tecnologica e, data la radiotrasparenza, compatibilità con le moderne tecniche di monitoraggio diagnostico (tomografia computerizzata e risonanza magnetica). Esistono, comunque, delle complicanze associate all'utilizzo di questa tipologia di materiali principalmente legate alla cinetica di degradazione del dispositivo: se la degradazione risultasse troppo veloce e la stabilità dell'impianto fosse persa prima dell'adeguata guarigione ossea, il tessuto potrebbe risultare ancora danneggiato ed essere fortemente esposto a rischio di nuove fratture. La ricerca in questo settore opera tutt'oggi sull'ottimizzazione dei tempi di riassorbimento.

Le nuove applicazioni biomedicali riassorbibili nel campo della riparazione o sostituzione di tessuto osseo sono generalmente basate su due strategie fondamentali. La prima segue la classica strada del fissaggio osseo meccanico e prevede la produzione di chiodi, viti ed altre apparecchiature sopra citate in composito polimerico biorassorbibile (a livello attuale sono a disposizione dei chirurghi chiodini ad espansione, ancorette per sutura, impianti con viti e rondelle biorassorbibili), mentre la seconda si basa sulle nuove tecniche di ingegneria tessutale prevedendo l'impianto di uno scaffold macroporoso al fine di sfruttare la capacità di proliferazione e ricrescita dell'osso naturale [3]. Nel secondo caso, lo scaffold funge da supporto fisico temporaneo e scheletro per l'iniziale adesione cellulare e, grazie alla presenza dei macropori che permettono l'alloggiamento degli osteoblasti, fornisce un microambiente appropriato per un'ulteriore osteogenesi. La scelta di una strategia piuttosto che l'altra si basa generalmente sull'entità del danno riportato dal tessuto e sui mezzi economici disponibili: l'ingegneria tessutale è, infatti, un settore di ricerca emerso recentemente all'interno della scienza dei biomateriali e le terapie attualmente in uso sono ancora estremamente costose.

## **1.2 Materiali indagati: struttura e proprietà**

A livello di scelta progettuale di materiali, le ricerche su applicazioni cliniche di impianti per fissaggio osseo biorassorbibili si sono concentrate per la maggior parte sull'uso di una sottoclasse di polimeri, i poliesteri alifatici lineari, in particolare sugli acidi polilattico (PLA), poliglicolico (PGA) e i loro copolimeri (PLGA). Questi materiali hanno, infatti, ottima biocompatibilità ed elevato tasso di biodegradabilità. La degradazione di tali polimeri è rapida ed avviene principalmente per idrolisi: si ottiene la produzione di monomeri quali acido lattico e acido glicolico, che vengono successivamente metabolizzati nei normali processi

fisiologici del corpo umano, data la naturale presenza di questi monomeri nell'organismo. È così dunque spiegabile la grande biocompatibilità degli alfa poliesteri. In aggiunta, essi hanno grande versatilità di progetto, specie a livello tridimensionale, e possono essere facilmente lavorati in scaffold macroporosi con differenti strutture e forme al variare delle necessità di una specifica applicazione.

Nonostante PLA e PGA siano stati già utilizzati in maniera isolata per la produzione di scaffold, dimostrando l'attuabilità e la potenzialità di questa idea, i risultati ottenuti hanno evidenziato che, individualmente, essi non sono materiali ideali per la produzione di dispositivi biomedicali ortopedici a causa dei loro stessi limiti. Per ovviare a questo problema, PLA e PGA sono invece stati largamente impiegati in associazione tra loro, sotto forma di materiale composito polimerico, con lo scopo di ottimizzare le singole proprietà biochimiche dei polimeri. I compositi più studiati, attualmente ancora oggetto di ricerche, sono materiali con matrice polimerica e innesti di fibre della stessa componente, di dimensione nanometrica o micrometrica, e, in particolare, compositi polimerico-ceramici come, ad esempio, idrossiapatite (HAP) – PLA. Lo sviluppo di materiali compositi di matrice polimerica e fibre ceramiche permette di unire le ottime proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità dei polimeri, nonché la loro svariata processabilità tecnologica, alle proprietà di osteoconduttività dei ceramici. L'idrossiapatite è, infatti, un materiale ceramico molto simile alla maggior componente inorganica della matrice extracellulare del tessuto osseo naturale e proprio la forte somiglianza alla HAP naturale fornisce ottime proprietà osteoconduttive e capacità di legare il dispositivo impiantato con l'osso, portando il miglioramento della stabilità dell'impianto. Attualmente, per somma di tutti i vantaggi citati in precedenza, i compositi HAP- PLA/PGA sono i materiali che attirano maggiore interesse nel campo della ricerca della scienza dei biomateriali.

### **1.2.1. IDROSSIAPATITE**

#### **Generalità**

L'idrossiapatite (HAP) è un minerale della famiglia delle apatiti avente composizione chimica  $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$ . Si tratta di una particolare forma di fosfato di calcio idrato con rapporto  $Ca/P$  di 10:6 che cristallizza in ambiente umido e a temperature inferiori ai 900°C, producendo cristalli molto sottili di forma prismatica a base esagonale. Essa si può trovare molto raramente in natura sotto forma di minerale, di colore tipicamente bianco-giallo pallido,



mentre è principalmente localizzata nel corpo umano dove forma la maggior parte della componente inorganica della matrice extracellulare del tessuto osseo. Data la sua notevole biocompatibilità e bioattività, nel campo della bioingegneria, l'idrossiapatite sintetica è largamente utilizzata, soprattutto per la produzione di osso artificiale e come ricopertura superficiale di impianti di differente materiale da innestare nel tessuto osseo.

### **Proprietà del materiale**

Le proprietà fisiche e meccaniche dell'idrossiapatite dipendono dal tipo di struttura policristallina assunta dal materiale che, a sua volta, dipende dal processo di formazione dei cristalli. In generale comunque si tratta di un materiale di grande durezza, elevata temperatura di fusione e buone proprietà meccaniche (Tabella 1.1). Ha, ancora, buone proprietà tribologiche e bassa densità ma anche fragilità intrinseca e difficoltà di processabilità.

<b>Proprietà</b>	<b>Valore</b>
Modulo di Young (GPa)	40-117
Resistenza alla compressione (MPa)	294
Resistenza alla flessione (MPa)	147
Durezza (scala di Mohs)	5
Densità teorica (g/cm <sup>3</sup> )	3.16

*Tabella 1.1. Proprietà meccaniche del fosfato di calcio (da D.E. Grenoble et al. "The Elastic Properties of Hard Tissues and Apatites, J. Biomed. Mater. Res. , 6, 207-233, 1972)*

L'idrossiapatite sintetica, utilizzata negli impianti biomedicali, ha la medesima composizione chimica dell'HAP naturale ma struttura leggermente differente: essa ha, infatti, un reticolo cristallino di elevata complessità e in fase di produzione industriale possono facilmente crearsi difetti o lacune reticolari che danno origine a strutture meno cristalline dell'originale. Il corrispettivo sintetico mantiene comunque buone proprietà meccaniche ed ottime caratteristiche di biocompatibilità e bioattività che permettono di configurarlo come miglior analogo sintetico dell'osso naturale. Impianti in HAP, infatti, risultano assolutamente non tossici a livello locale e sistemico, non inducono risposta infiammatoria né reazione da corpo estraneo. Inoltre, l'idrossiapatite è un materiale fortemente osteoinduttivo: quando essa entra a contatto con l'ambiente biologico si ricopre di uno strato attivo di microcristalli di HAP e gruppi carbonato, identici dal punto di vista chimico e strutturale a quelli presenti nella matrice extracellulare del tessuto osseo circostante. Si generano, così, forti legami e viene favorito il processo di rimodellamento osseo che porta allo sviluppo di nuovo tessuto.

Altra caratteristica fondamentale dell'idrossiapatite è la bioriassorbibilità. Gli impianti in HAP sono facilmente metabolizzati dall'organismo mediante processi di dissoluzione nei fluidi biologici e fagocitosi con cinetica di riassorbimento che dipende da forma e struttura dell'impianto, pH, temperatura dell'ambiente biologico e dall'estensione della superficie di interfaccia.

### Principali utilizzi

Impianti in idrossiapatite sono ampiamente adoperati in vari settori della medicina. Si possono trovare applicazioni di ortopedia motoria in cui il materiale ceramico viene utilizzato come rivestimento di steli in lega metallica o per produzione di giunti artificiali delle estremità articolari (in particolare la II metatarso-falangea), prodotti per osteosintesi come chiodi o viti, applicazioni con funzione di riempitivi osseo porosi o compatti. L'idrossiapatite è, inoltre, utilizzata per applicazioni cosmetiche e nel settore dell'otorinolaringoiatria per la ricostruzione degli ossicini dell'orecchio interno.

## 1.2.2. POLIESTERI BIODEGRADABILI: PLA E PGA

### ACIDO POLILATTICO (PLA)

#### Generalità

L'acido polilattico o polilattato (PLA) è un poliestere alifatico che si ottiene per reazione di polimerizzazione a partire da molecole di acido lattico. La sintesi avviene per condensazione con formazione temporanea di lattide che si trasforma successivamente, per ulteriore condensazione, in acido polilattico (Figura 1.1). La struttura monomerica di base è una molecola idrofobica contenente tre atomi di carbonio che, data la presenza di un atomo di carbonio chirale, esiste in due forme enantiomeriche (L-D) con soltanto forma L

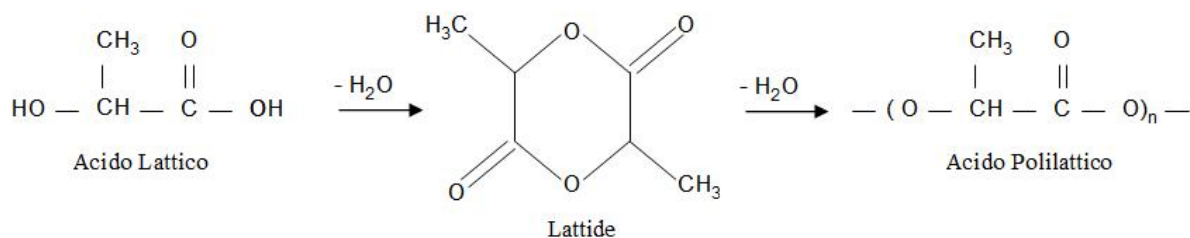


Figura 1.1. Ciclo di polimerizzazione dell'acido polilattico.

biologicamente attiva. L'acido lattico L-polimerizzato produce PLLA, un polimero cristallino che fonde a 180° C ampiamente utilizzato in vari settori della medicina, mentre la forma D origina il PDLA, un polimero racemo e amorfo che non vede impieghi come biomateriale date le sue scarse proprietà.

### **Proprietà del materiale**

Le proprietà dell'acido polilattico variano in un range piuttosto ampio poiché dipendono dal tipo di struttura assunta dal materiale. Composti in cui prevale la forma levogira (PLLA) risultano possedere un maggior grado di cristallinità e attività ottica, mentre composti in cui prevale la forma destrogira sono racemici e fortemente amorfi. In generale, comunque, l'acido polilattico è un materiale con buone proprietà meccaniche (Tabella 1.2) dovute alla disposizione compatta delle catene lineari che formano il polimero: all'elevato impaccamento delle catene consegue, infatti, un aumento di densità, rigidezza, durezza, resistenza all'attrito e all'usura. Il PLA ha, inoltre, temperatura di fusione elevata e comportamento termoplastico.

<b>Proprietà</b>	<b>Valore</b>
Carico di snervamento (MPa)	49
Resistenza alla compressione (MPa)	2.5
Resistenza alla flessione (MPa)	70
Modulo a trazione (GPa)	3.2

*Tabella 1.2. Proprietà meccaniche dell'acido polilattico PLLA. (Appunti di lezione – Prof. Carlo Santulli – Università di Roma, La Sapienza – Dipartimento di Ingegneria Elettrica)*

Dal punto di vista biologico, l'acido polilattico riveste grande interesse per le sue ottime proprietà di biocompatibilità e biorisorbibilità. La degradazione del polimero avviene principalmente per idrolisi con produzione di molecole di acido lattico successivamente incorporate nei naturali processi fisiologici cellulari per ulteriore degradazione. L'eccellente biocompatibilità è spiegabile grazie al fatto che l'acido lattico è normalmente prodotto a livello corporeo alla fine del ciclo glicolitico e, dunque, sono previsti processi fisiologici per la sua metabolizzazione. Soltanto in casi rari si sono verificate reazioni da corpo estraneo e risposte infiammatorie gravi principalmente dovute al tasso di degradazione troppo rapido dell'impianto. Lo step idrolitico porta, poi, alla scissione delle lunghe catene lineari in catene più brevi con diminuzione di peso molecolare e peggioramento delle proprietà meccaniche dell'impianto; si ha dunque una progressiva perdita di funzionalità che porta al successivo e

completo riassorbimento. Il requisito di bioriassorbibilità di questo materiale risulta fondamentale nelle nuove applicazioni di fissaggio osseo, specialmente nei casi in cui l'innesto debba funzionare da materiale osteoinduttore.

### Principali utilizzi

L'idea dell'utilizzo di acido polilattico come biomateriale è nata nei laboratori del CNR francese negli anni '60. Attualmente esso viene usato in vari settori della medicina, in particolare nel campo ortopedico: in PLA si possono trovare sistemi di fissaggio osseo come chiodi, viti e placche; il PLA è usato come materiale per suture riassorbibili, come mezzo per il rilascio controllato di farmaci e, recentemente, in applicazioni di ingegneria tessutale come supporto poroso temporaneo con lo scopo di favorire la rigenerazione dei tessuti.

## ACIDO POLIGLICOLICO (PGA)

### Generalità

L'acido poliglicolico o poliglicolide (PGA) è il più semplice membro della famiglia dei poliesteri lineari alifatici che si può ottenere per reazione di polimerizzazione a partire da molecole di acido glicolico. La sintesi polimerica avviene per condensazione con formazione temporanea di glicolide che si trasforma successivamente, per ulteriore condensazione, in acido poliglicolico (Figura 1.2).

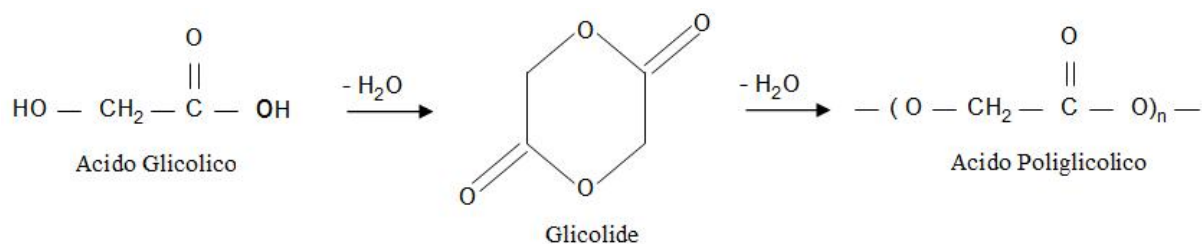


Figura 1.2. Ciclo di polimerizzazione dell'acido poliglicolico.

L'acido poliglicolico è un composto duro, spesso, cristallino di natura più idrofila del PLA. Esso è noto sin dagli anni '60 come polimero lavorabile in fibre molto resistenti, anche se, a causa della sua instabilità idrolitica, il suo uso puro in impianti è fortemente limitato.

## Proprietà del materiale

L'acido poliglicolico si presenta come un composto con buone proprietà meccaniche (Tabella 1.3), elevata temperatura di fusione, grande rigidità (le fibre di PGA hanno valore di modulo di Young pari a 7 GPa) ed elevato grado di cristallinità (45-55%).

Materiale dell'impianto	Diametro (mm)	Modulo di Flessione (GPa)	Forza di Flessione (MPa)	Forza di Taglio (MPa)
Acido poliglicolico auto rinforzato	2	13	320	240
Acido poliglicolico modellato a pressione	2	7	218	95

Tabella 1.3. Proprietà meccaniche del PGA (tratto da "Impianti biorassorbibili in ortopedia: nuovi sviluppi e applicazioni cliniche", William Ciccone II, Cary Motz, Christian Bentley, James P. Tasto).

Il PGA, inoltre, è un polimero altamente idrofilico con una caratteristica peculiare inerente la sua solubilità: la forma ad alto peso molecolare, infatti, risulta insolubile in moltissimi solventi organici di uso comune, mentre catene con un numero ridotto di monomeri (oligomeri a basso peso molecolare) possiedono proprietà fisiche distinte tanto da risultare solubili. In linea generale, comunque, questo polimero non viene utilizzato in forma pura ma vengono creati diversi copolimeri allo scopo di ottenere un prodotto finale con caratteristiche controllate tali da poter essere facilmente lavorato e risultare funzionale all'applicazione desiderata. Per la scienza dei biomateriali l'acido polilattico riveste un ruolo di grande interesse nello sviluppo di impianti biodegradabili, in virtù delle sue ottime proprietà di biocompatibilità e biorassorbibilità. La riassorbibilità è principalmente dovuta all'instabilità idrolitica del PGA, spiegabile con la presenza di legami di natura esterea all'interno della sua struttura. L'acqua presente nei fluidi biologici, infatti, penetra abbondantemente nelle regioni amorfe del polimero e provoca la scissione dei legami estere presenti, esponendo la parte cristallina all'azione erosiva dell'ambiente circostante. Quando anche la struttura cristallina collassa, la catena polimerica si dissolve. Il processo di degradazione, inoltre, è efficacemente favorito dalla presenza di particolari classi di enzimi: le esterasi. Questo spiega facilmente perché la velocità di degradazione dell'acido polilattico sia molto superiore a quella di altri poliesteri.

Dalla decomposizione dell'acido poliglicolico si ottiene il suo monomero, l'acido glicolico, una molecola non citotossica metabolizzabile nel ciclo di Krebs, in conclusione del quale essa viene trasformata in acqua e anidride carbonica. Parte del monomero, inoltre, viene anche

secreto in forma di urina. Per suddette motivazioni, impianti in PGA risultano biocompatibili e mai sono state rilevate reazioni tossiche a livello locale o sistemico.

Esiste, tuttavia un'evidente problematica legata all'utilizzo di acido polilattico come componente pura in applicazioni di fissaggio osseo: la degradazione rapida del materiale provoca, infatti, una precoce perdita di funzionalità dell'impianto e, di conseguenza, perdita di stabilità dello stesso prima dell'effettiva guarigione del tessuto danneggiato. L'osso risulta così indebolito e fortemente esposto a rischio di nuove fratture. Inoltre, proprio l'eccessiva velocità di degradazione non permette l'efficace e completa metabolizzazione del monomero liberato dalla scissione delle catene polimeriche, provocando forti risposte infiammatorie tessutali, in taluni casi a tal punto gravi da costringere all'intervento chirurgico. Per ovviare questa problematica, vengono utilizzati come materiali per fissaggio copolimeri dell'acido poliglicolico, preparati miscelando altri monomeri. In questo maniera, cinetica di degradazione e solubilità dipendono dalle quantità in proporzione e dalle proprietà chimiche dei materiali usati con la possibilità di ottenere materiali con proprietà intermedie e quindi funzionali. I composti più utilizzati sono l'acido poli(lattico-*co*-glicolico) copolimero di acido glicolico e acido lattico, l'acido poli(glicolide-*co*-caprolattone), copolimero di acido glicolico e  $\epsilon$ -caprolattone, e l'acido poli(glicolide-*co*-trimetilene carbonato), copolimero di acido glicolico e trimetilene carbonato.

### **Principali utilizzi**

L'acido poliglicolico fu sintetizzato in laboratorio sin a partire dagli anni '50, ma, in passato, fu poco utilizzato a causa della sua facilità a degradarsi. Attualmente il PGA viene adoperato sottoforma di copolimero come materiale per suture sintetiche riassorbibili, nel campo del fissaggio osseo per produzione di viti, piatti, bacchette e spilli, nel settore del rilascio controllato di farmaci. Applicazioni recenti di grande interesse si hanno nel nuovo campo dell'ingegneria tessutale dove l'acido polilattico viene impiegato nella produzione di supporti sintetici porosi per la formazione di nuovo tessuto.

## **1.2.3. COMPOSITI HAP - PLA, PGA**

### **Generalità**

I materiali compositi idrossiapatite – PLA, PGA sono particolari biomateriali all'interno dei quali si possono trovare due fasi costituenti, una ceramica (HAP) e una polimerica (PLA, PGA). Generalmente, essi presentano una matrice polimerica, semplice o rinforzata mediante

l'utilizzo di fibre della medesima componente, e innesti in materiale ceramico (Figure 1.4 e 1.5). La matrice polimerica rappresenta la fase omogenea del materiale e ha compito di mantenere unita la fase dispersa, garantire bassa densità (dunque leggerezza complessiva dell'impianto) e, soltanto in via secondaria, sostenere il carico applicato. Le inclusioni disomogenee in ceramico possono, invece, avere svariate microstrutture e dimensioni passando da particelle a fibre, lamine o lastre. Esse forniscono rigidità all'impianto e sostengono la maggior parte del carico applicato dall'esterno. La presenza di entrambe le fasi permette l'unione delle migliori caratteristiche dei singoli costituenti e il controllo sulle proprietà macroscopiche dell'impianto: variazioni di porosità, microstruttura, densità e riassorbibilità possono essere ottenute utilizzando differenti quantità percentuali di PLA/PGA. Lo sviluppo di questi materiali compositi è relativamente recente (anni Settanta Ottanta) e svariati sono i processi tecnologici attualmente utilizzati per la sua produzione. Blocchi di HAP – PLA, PGA possono essere ottenuti tramite polimerizzazione di monomeri modificati chimicamente dall'inserimento di idrossiapatite, forgiando compositi di HAP e PLA- PGA ad elevate temperature oppure per sinterizzazione di preparati di HAP e PLA con cloruro di sodio. Una delle tecniche più interessanti di produzione è la compressione a caldo: in questo processo viene inserita idrossiapatite in grani in una soluzione di polimero completamente disciolto; successivamente la soluzione viene fatta evaporare sottovuoto ottenendo la formazione del composito. Il materiale così lavorato è poi pressato ad elevate temperature con formazione finale di un blocco di HAP – PLA, PGA di ottime proprietà meccaniche, ideali per l'utilizzo in applicazioni biomedicali ortopediche di fissaggio osseo.

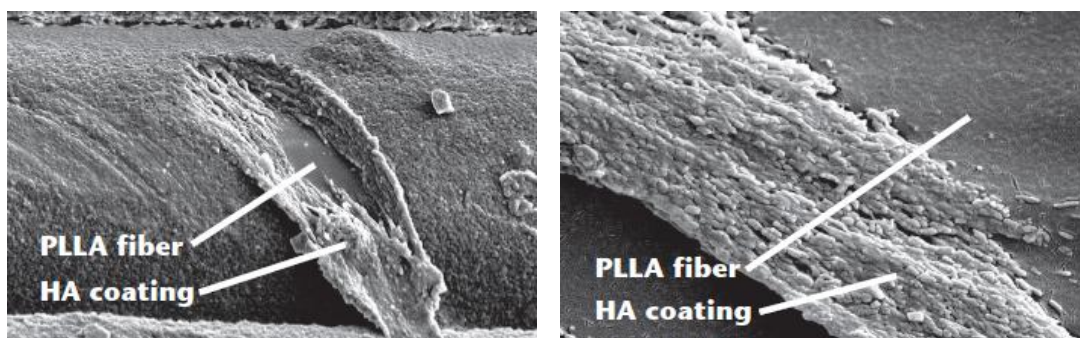


Figura 1.3 – 1.4 Particolari di un composito idrossiapatite - PLLA sviluppato dalla Teleflex Medical OEM® : allineamento di idrossiapatite in fibre di PLLA all'interno di una matrice polimerica (tratto da "Apatite/fiber absorbable composites for load-bearing applications in bone fixation", James R.Olson, Teleflex Medical OEM®)

## Proprietà del materiale

Le proprietà del composito HAP - PLA, PGA variano in un range piuttosto ampio a seconda del rapporto percentuale delle componenti e, in particolare, dalla forma e disposizione delle particelle di fase dispersa. I compositi utilizzati in applicazioni biomedicali sono, generalmente, formati dal 20% di materiale polimerico e dall'80% di materiale ceramico: la scelta di questo rapporto permette di ottenere impianti con interessanti proprietà meccaniche come buona rigidità, dovuta all'inserimento di piastrine nella matrice morbida, bassa densità (che comporta leggerezza dell'impianto), buona resistenza alla compressione, alla trazione e all'usura e sufficiente modulo elastico. In particolare, recenti studi hanno messo in evidenza che composti di HAP – PLLA, ottenuti per compressione a caldo delle componenti alla temperatura di fusione dell'acido polilattico, dimostrano proprietà meccaniche eccellenti con resistenza alla trazione di 140 MPa e modulo elastico di 10 GPa. Proprio quest'ultima caratteristica è di grande interesse per impianti biomedicali endossei: il modulo elastico risulta, infatti, comparabile a quello dell'osso naturale e permette di ovviare a gravi problematiche di stress shielding riscontrate nell'uso di applicazioni in materiali metallici o puramente ceramici (Tabella 1.4).

<b>Materiale</b>	<b>Modulo elastico (GPa)</b>	<b>Resistenza alla trazione (MPa)</b>
Osso Corticale (direzione longitudinale)	17.7	133
Osso Corticale (direzione trasversale)	12.8	52
Dentina	11	39.3
Idrossiapatite	95	50
HAP – PLLA (compressione a caldo)	10	140

Tabella 1.4. Proprietà meccaniche di alcuni tessuti duri e biomateriali ceramici e compositi ( tratto da: Seeram Ramakrishna et al. "An introduction to biocomposites, Volume 1", Imperial College Press, 2004 – pag.7)

L'utilizzo di HAP – PLA, PGA vede, inoltre, numerosi vantaggi apportati dalla struttura composita, che consente di generare impianti con proprietà adattabili alle caratteristiche del tessuto ricevente (fondamentali per impianti custom-made) mediante il controllo della frazione volumetrica occupata dalla fase ceramica e dalla disposizione delle fibre di rinforzo. Altro vantaggio fornito dall'utilizzo di questi compositi è, ancora, la possibilità di fondere le migliori proprietà di ciascun componente ovviando a problematiche, anche importanti, legate all'utilizzo dei singoli costituenti. Da una parte, infatti, l'uso di idrossiapatite permette di



ottenere un composito finale con ottime proprietà di biocompatibilità e bioattività, e risolve il problema della velocità di riassorbimento controllandola e riducendo le reazioni infiammatorie e da corpo estraneo; dall'altra l'uso di PGA e PLA permette leggerezza dell'impianto dovuta ad una minore densità, riduzione di rigidità e fragilità dell'idrossiapatite e garantisce alta processabilità industriale. I compositi HAP – PLA, PGA si configurano, quindi, come materiali ideali per la produzione di impianti per il fissaggio osseo.

Esistono, comunque, degli svantaggi legati all'utilizzo di compositi in HAP- PLA, PGA: in primis è necessario porre attenzione al fatto che l'interfaccia tra i differenti costituenti può rappresentare un punto debole rispetto all'attacco dei fluidi biologici. Sono, dunque, fondamentali controlli durante la fase di produzione industriale che garantiscano un materiale finito non cedevole, senza deformazione, espansione o scollamento delle fibre. L'inserimento di fibre di rinforzo nella matrice polimerica, inoltre, produce una notevole anisotropia del materiale, controllata solo nel caso in cui la fase dispersa abbia morfologia particellare equiassiale. L'anisotropia può, in alcuni casi, rappresentare un vantaggio per il materiale garantendo maggiore rigidità e resistenza rispetto ai compositi isotropi [4] [5]; nonostante ciò, il miglioramento delle proprietà in una particolare direzione dello spazio comporta la riduzione delle stesse nelle altre direzioni con conseguenti rischi di frammentazione del materiale se il carico risultasse applicato nella direzione sbagliata. Un materiale fortemente anisotropo è dunque utilizzato solo nel caso in cui i fenomeni che portano all'applicazione di carico siano noti e facilmente calcolabili.

### **Principali utilizzi**

Impianti in HAP- PLA, PGA trovano ampie applicazioni come sostitutivi del tessuto osseo naturale dovute alla somiglianza chimica e di struttura tra il composito sintetico e l'osso, anch'esso un materiale composito formato da osteociti e matrice extracellulare. Essi sono principalmente utilizzati nelle innovative tecniche di fissaggio osseo interno con produzione di chiodi, viti, placche da innestare nel tessuto danneggiato allo scopo di fornire iniziale rigidità e stabilità all'impianto per poi, essendo riassorbiti, trasferire gradualmente il carico al tessuto in via di guarigione. In particolare, poi, il composito HAP – PLA, PGA suscita grande interesse nel settore dell'ingegneria tessutale, soprattutto per la produzione di osso ingegnerizzato. Interventi di ricostruzione sono, infatti, necessari in caso di ampie perdite di sostanza conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, lesioni derivate da asportazione di tumori ossei, ricostruzione maxillo-facciale e anche in caso di mobilizzazione di impianti ortopedici. I compositi HAP – PLA, PGA sono ampiamente adoperati per la

produzione di supporti porosi temporanei (*scaffolds*) con il compito di fornire sostegno al tessuto danneggiato e, contemporaneamente, favorire la formazione di nuovo tessuto osseo. Per quanto concerne la riparazione tessutale, nuovi studi e ricerche hanno permesso di sviluppare due percorsi alternativi in questo campo: il primo percorso prevede l'utilizzo di HAP – PLA, PGA per la fabbricazione di *scaffolds* tridimensionali riassorbibili modificati mediante semina di cellule osteoprogenitrici autologhe e/o materiali in forma di polveri, molecole, micro particelle segnale con l'obiettivo di generare una differenziazione e sviluppo del tessuto in vivo; il secondo approccio, invece, prevede sistemi acellulari (*matrix based approaches*) in cui la chimica e la struttura dello *scaffold* ha ruolo predominante per la corretta riparazione. Nel caso del tessuto osseo è fondamentale che le protesi in HAP – PLA, PGA siano porose e che le interconnessioni tra i pori siano di dimensioni tali da consentire vitalità e funzioni degli osteoblasti (almeno 150  $\mu\text{m}$ ). Quando *scaffolds* porosi sono impiantati nell'osso, infatti, i pori vengono per prima cosa vascolarizzati e, successivamente, si assiste alla migrazione all'interno degli stessi di cellule progenitrici degli osteoblasti, che si trasformano in trabecole ossee e neotessuto dopo circa 4 – 6 settimane. Il tessuto osseo viene poi rimodellato in base alle sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposto; è dunque fondamentale che l'osso danneggiato supporti un carico adeguato alla sua fase di guarigione e che quindi gli *scaffolds* abbiano anche velocità di riassorbimento controllata.

## **2. IL COMPOSITO NANO IDROSSIAPATITE E ACIDO POLI - L - LATTICO (nHAP - PLLA)**

Tra i vari materiali recentemente proposti in campo biomedicale come sostituto osseo sintetico, risulta di particolare interesse un nuovo composito formato da idrossiapatite di dimensione nanometrica e acido poli - L - lattico (nHAP - PLLA). L'idea guida nello sviluppo di questo particolare materiale è quella di creare un composito versatile che vari le proprietà meccaniche con continuità avvicinandosi, per quanto possibile, al comportamento del tessuto osseo naturale. Al fine di raggiungere tale scopo, diventa fondamentale sviluppare un materiale somigliante anche dal punto di vista morfologico al tessuto. Numerosi e recenti studi hanno infatti dimostrato che HAP sintetiche confrontabili all'analogo biologico dal punto di vista della composizione, dimensione e morfologia permettono di raggiungere una migliore interazione del composito che le contiene con l'ambiente circostante [6]. Poiché l'osso naturale è formato da una componente inorganica (HAP parzialmente carbonata su scala nanometrica) e da una componente organica (fondamentalmente collagene), il composito nHAP - PLLA, con matrice polimerica e rinforzi in HAP, si presenta come materiale ideale per progettare scaffolds 3D da utilizzare nell'ingegneria tissutale ossea. In aggiunta, proprio la dimensione nanometrica dei componenti inseriti risulta fondamentale per migliorare le già ottimali prestazioni fornite da sostitutivi ossei sintetizzati utilizzando micro idrossiapatite e acido poli - L - lattico (mHAP - PLLA).

### **2.1 Descrizione**

Il composito nHAP - PLLA è un materiale di recente sviluppo, biodegradabile e biorisorbibile, ideato e strutturato in maniera tale da riprodurre, quanto più possibile, le proprietà del tessuto osseo naturale. Si tratta di un composito in cui sono presenti due fasi costituenti: una fase polimerica in acido poli - L - lattico (PLLA) che costituisce la matrice e una fase ceramica in nano idrossiapatite (nHAP) che forma gli innesti. In taluni casi è possibile trovare all'interno della matrice delle fibre dello stesso materiale polimerico applicate come rinforzo meccanico in specifiche direzioni. La matrice polimerica è realizzata in acido poli - L - lattico (PLLA).

La scelta dell'utilizzo di questo materiale polimerico è dovuta alle sue ottime proprietà, valutate in vitro ed in vivo; esso, infatti, unisce buone proprietà meccaniche a ottimali prestazioni per quanto concerne la biodegradabilità e la biorisorbibilità. Il PLLA si presenta, tipicamente, con catene laterali impaccate che garantiscono densità del materiale, rigidità e resistenza all'attrito; inoltre, esso degrada in componenti non citotossiche (sono stati riscontrati rari casi di risposte infiammatorie e reazione da corpo estraneo) con velocità di degradazione controllata, permettendo una progressiva perdita di funzionalità che porta al successivo e completo riassorbimento dell'impianto. L'utilizzo del PLLA in questo composito è, quindi, garanzia di ottenimento di una struttura finale leggera ma solida grazie alla ridotta densità del materiale, e garanzia di sostenimento parziale e sempre più secondario del carico applicato, caratteristica estremamente utile per ridurre gli effetti problematici dovuti al fenomeno dello *stress shielding*.

Le inclusioni ceramiche, invece, sono in idrossiapatite di dimensione nanometrica (nHAP). La scelta di utilizzare questo specifico materiale è, ovviamente, dovuta alla sua notevole somiglianza alla componente ceramica presente nell'osso naturale. L'uso di HAP garantisce, infatti, il mantenimento di buone proprietà meccaniche ed ottime caratteristiche di biocompatibilità e bioattività. Impianti in HAP sintetica risultano assolutamente non tossici a livello sia locale che sistemico, mostrano ottima osteoinduttività, elevata capacità di creare legami meccanici con l'osso e sono facilmente metabolizzati dall'organismo mediante processi di dissoluzione nei fluidi biologici. Caratteristica fondamentale di questo particolare composito è, invece, la scelta di utilizzare componenti in HAP di dimensione nanometrica. L'idea fondante nello sviluppo del materiale rimane quella di creare una struttura che interagisca e si integri con il tessuto biologico da sostituire, avendo comportamento e morfologia somigliante all'osso naturale [7]. A tale scopo, l'uso di componenti in nHAP permette di ottenere prestazioni ottimali. In primo luogo, la dimensione dei cristalli gioca un ruolo fondamentale per quanto concerne le proprietà meccaniche del materiale. In natura nell'osso trabecolare sono presenti numerosi cristalli di idrossiapatite di forma piatta o sferica, intrecciati e impaccati nelle fibrille di collagene che compongono le lamelle ossee. Questi minerali, visibili analizzando il tessuto con un microscopio a forza atomica, hanno diametro fortemente variabile con dimensioni caratteristiche tra i 30 e i 120 nanometri. In particolare, recenti analisi ultrastrutturali del tessuto osseo hanno messo in luce che proprio i cristalli di dimensione nanometrica (diametro tipico 25 ÷ 50 nm) caratterizzano l'essenza dell'osso in termini di proprietà meccaniche, avendo un ruolo fondamentale nella formazione del biomminerale. L'utilizzo di inserzioni in nHAP sintetica delle medesime dimensioni permette

dunque, variando quantità e forma della componente ceramica, di ottenere un composito con proprietà meccaniche comparabili alle proprietà meccaniche del tessuto biologico ed, inoltre, avere una struttura morfologicamente simile a quella da sostituire. In secondo luogo, la dimensione dei cristalli è legata anche alla biorassorbibilità e alla osteoinduttività del materiale. Infatti, inserzioni in ceramico di diametro nanometrico diminuiscono il volume della singola inserzione ma, a livello globale, generano un forte aumento della superficie di HAP che può entrare in contatto con i fluidi biologici. Ciò conduce ad un incremento di osteoinduttività: esso è principalmente dovuto all'elevata capacità di HAP di creare legami meccanici con l'osso; un aumento della superficie libera sulla quale creare legami permette, dunque, un aumento del numero di osteoblasti aderiti. In aggiunta, è fondamentale ricordare che, al fine di differenziarsi, una cellula necessita di aderire ad un substrato e che un maggior numero di osteoblasti aderiti implica anche una maggiore probabilità di un corretta neoformazione di tessuto osseo naturale del paziente.

La diminuzione della dimensione dell'inserzione, invece, risulta fondamentale per ottenere migliori prestazioni nel biorassorbimento. Tipicamente HAP è facilmente metabolizzata dall'organismo mediante processi di dissoluzione nei fluidi biologici e fagocitosi. Proprio in quest'ultimo processo, particelle di diametro nanometrico possono penetrare più facilmente all'interno degli osteoclasti mediante processi di fagocitosi (o anche trasporto mediante vescicole rivestite di clatrina) e, quindi, essere più facilmente riassorbite. Inoltre, questo particolato può penetrare, mediante il medesimo tipo di meccanismo, anche all'interno degli osteoblasti stimolandone fortemente crescita e proliferazione. L'origine di quest'effetto è dovuto agli ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) liberati durante la digestione da parte dei lisosomi cellulari. L'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma favorisce la proliferazione ed anche la differenziazione degli osteoblasti amplificando l'aumento delle proprietà osteoinduttive del composito nHAP – PLLA.

Tuttavia, bisogna comunque segnalare la presenza di alcuni svantaggi nell'utilizzo di nHAP. Attualmente il problema principale è, purtroppo, quello di riuscire a produrre nano particelle di dimensioni ben controllate e definite. Recentemente sono state studiate e sviluppate una serie di tecniche di lavorazione efficaci; il problema rimane legato ai costi di produzione del materiale. In conclusione, comunque, si può affermare che, tra i vari materiali proposti come sostitutivo osseo, il composito nHAP-PLLA riveste un ruolo decisamente importante nel settore. La presenza delle due fasi, PLLA e nHAP, permette l'unione delle migliori caratteristiche dei singoli costituenti e il controllo sulle proprietà macroscopiche

dell'impianto: variazioni di porosità, struttura interna, densità e biorisorbibilità possono essere ottenute utilizzando differenti quantità percentuali di nHAP e PLLA.

## **2.2 Metodo di preparazione: la tecnica di separazione di fase termicamente indotta ( TIPS )**

Nel corso degli anni, per la preparazione di materiali compositi microporosi come nHAP-PLLA, sono state proposte e descritte in letteratura numerose tecniche di produzione basate su principi fisici e chimici anche molto differenti tra loro. Ognuna di queste tecniche presenta vantaggi e propri campi di applicazione; purtroppo, nessuna di esse è priva di svantaggi. La scelta della metodologia di produzione viene tipicamente effettuata in base alle caratteristiche specifiche ricercate nel prodotto finale e ai mezzi economici a disposizione.

Tra le più diffuse tecniche di produzione utilizzate per creare strutture microporose impiegate come scaffolds per l'ingegneria tissutale vi è sicuramente la tecnica di separazione di fase termicamente indotta o TIPS (acronimo di *Thermally Induced Phase Separation*). Essa prevede di creare un sistema omogeneo multicomponente che, reso termodinamicamente instabile mediante variazioni di temperatura, tende a separarsi in un sistema multifase con lo scopo di abbassare l'energia libera del sistema stesso. La miscela di partenza, omogenea e multicomponente, viene creata utilizzando un solvente all'interno del quale vengono disciolte le singole componenti che andranno a costituire le fasi del materiale composito finale. In base all'interazione tra quanto disciolto e il solvente si possono distinguere tre differenti tecniche TIPS:

- TIPS solido-liquido, tecnica nella quale il composito cristallizza a partire dalla miscela fusa;
- TIPS liquido-solido, tecnica nella quale vi è prima la cristallizzazione e separazione del solvente seguita dalla successiva cristallizzazione del composito;
- TIPS liquido-liquido, nella quale si ottiene la separazione del sistema in due fasi liquide, una con elevata concentrazione di componenti (*rich phase*) e l'altra con bassa concentrazione di componenti (*lean phase*). Dopo la rimozione del solvente la fase ricca di componenti solidifica formando il composito.

In ognuna delle varianti della tecnica appena proposte il solvente utilizzato deve avere basso punto di fusione; ciò è necessario per ottenere semplicemente la forma liquida e successivamente rimuoverlo per sublimazione. Una sostanza tipicamente utilizzata a tal scopo è il diossano (nella forma isomerica 1,4-diossano), un composto organico formato da quattro

atomi di carbonio e due di ossigeno. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, volatile, dal tenue odore di etere e, caratteristica fondamentale, ha temperatura di fusione pari a 12° C. In aggiunta, il diossano viene largamente impiegato come solvente sia poiché è aprotico (cioè non libera ioni H<sup>+</sup> e non acidifica la soluzione), sia per la sua caratteristica di essere miscibile in ogni proporzione con acqua e di creare in tal modo una soluzione fortemente bassobollente rispetto al diossano puro (T<sub>e</sub> = 101° C). In molte situazioni, infatti, viene sfruttata questa proprietà allo scopo di favorire la separazione di fase diluendo la soluzione multicomponente iniziale con acqua (TIPS liquido-liquido).

Nel caso specifico di sintesi in laboratorio di un composito microporoso in nHAP-PLLA da utilizzare come scaffold per l'ingegneria tissutale ossea, una procedura di produzione tipicamente seguita e basata sulla tecnica di separazione di fase è la seguente: in primo luogo viene utilizzata idrossiapatite sottoforma di polvere nano-cristallina. Tale polvere viene quindi disciolta in una soluzione acqua-diossano (proporzioni spesso descritte in letteratura sono di un rapporto in peso rispettivamente di 13:87 o 15.5:84.5), se possibile, tramite un processo di sonicazione. Il processo di sonicazione consiste nel convogliare verso il preparato ultrasuoni generati da un apparecchio (sonicatore) allo scopo di aumentare la velocità di dissoluzione della polvere di nHAP nel solvente. Questo è possibile poiché il sonicatore utilizza tensione elettrica prelevata da un generatore interno per produrre ultrasuoni che colpiscono la soluzione di acqua e diossano trasmettendo la loro energia alle molecole in soluzione. In particolare, l'energia degli ultrasuoni viene trasmessa sotto forma di energia traslazionale, rotazionale e vibrazionale. Ciò comporta un aumento generale di energia cinetica del particolato in soluzione favorendo e, dunque, velocizzando il processo di dissoluzione. In linea generale è sufficiente sottoporre il sistema per tempi brevi alla sonicazione: a titolo di esempio può essere considerato l'utilizzo di un sonicatore per 30 secondi con potenza data da alimentazione di 15 Watt. Dopo aver disciolto la polvere di nHAP nel diossano, la temperatura del preparato viene aumentata e portata a circa 60° C al fine di sciogliere in esso il PLLA. Ciò che si ottiene è un miscuglio omogeneo fuso con il desiderato rapporto di concentrazioni dei componenti. A questo punto viene indotta la separazione di fase del sistema: utilizzando un bagno d'acqua termostatico o un freezer a temperatura presettata nei quali vengono immersi i campioni preparati, la temperatura è drasticamente diminuita fino ad entrare nella regione termodinamicamente instabile del sistema. Avviene, quindi, la separazione in fasi. La temperatura specifica di raffreddamento che induce il processo dipende fortemente dalle proporzioni di nHAP-PLLA utilizzate: ad esempio, una soluzione contenente il 4% in peso di PLLA e un rapporto acqua-diossano di 13:87 ha regione metastabile situata

tra i 25 e i 35° C; tuttavia essa scende drasticamente a 20÷25° C se invece di puro PLLA viene utilizzato un miscuglio PLLA-PLA con rapporto 95:5. E` dunque necessario settare la variazione adeguata di temperatura in base allo specifico rapporto di concentrazioni del composito da produrre. Mantenendo la medesima temperatura per alcune ore il miscuglio comincia a solidificare. La struttura così ottenuta viene successivamente trasferita in un contenitore per congelamento-asciugatura e, quindi, prima congelata ad una temperatura di circa -20° C tramite un bagno in alcol etilico (o in sale e ghiaccio), poi lavata con acqua deionizzata ed asciugata a temperatura ambiente, sottovuoto, al fine di rimuovere completamente le rimanenti tracce del solvente. Alla conclusione di tutto il procedimento si ottiene una struttura microporosa in nHAP-PLLA con composizione specifica determinata dalle concentrazioni di nHAP e PLLA utilizzate inizialmente per produrre la soluzione.

Ovviamente, quella appena descritta non è la sola procedura utilizzabile per ottenere il composito; non esiste, infatti, una tecnica standard di produzione ma, di volta in volta, i ricercatori rivisitano e rielaborano i singoli procedimenti adattandoli e modificandoli al fine di ottenere il composito con le caratteristiche finali desiderate [8] [9] [10]. In generale, comunque, compositi in nHAP-PLLA sintetizzati utilizzando la tecnica di separazione di fase termicamente indotta presentano elevata porosità, buone proprietà meccaniche e ottime proprietà di biocompatibilità, bioattività e biorisorbibilità derivate dai singoli costituenti del composito. Tutto ciò indica che la TIPS è un'ottima tecnica produttiva per questo tipo di materiali [11].

In particolare, si possono analizzare campioni di nHAP-PLLA ottenuti mediante TIPS definendo alcune grandezze di interesse:

- $\epsilon$  rappresenta la porosità del campione e viene definita come

$$\epsilon = \frac{D_s - D_m}{D_s}$$

in cui  $D_s$  indica la densità dello scheletro e  $D_m$  la densità della matrice del composito;

- $D_m$ , densità della matrice, viene ricavata da volume e massa utilizzando la classica formula

$$D_m = \frac{m}{V}$$

misurando la massa (m) con una bilancia analitica e calcolando diametro ed altezza della matrice al fine di ottenere il volume (V);



- $D_s$ , densità dello scheletro, viene invece ricavata a partire dalle densità di nHAP e PLLA come segue

$$D_s = \frac{1}{\frac{1 - X_h}{D_p} + \frac{X_h}{D_h}}$$

dove  $D_h$  indica la densità della polvere di nHAP ( con un valore di 3.16 g/ml ),  $X_h$  è la percentuale di nHAP presente nel composito, mentre  $D_p$  rappresenta la densità del polimero;

- $D_p$ , densità del polimero è a sua volta calcolata a partire da

$$D_p = \frac{1}{\frac{1 - X_c}{D_a} + \frac{X_c}{D_c}}$$

in cui  $X_c$  indica il grado di cristallinità del polimero,  $D_a$  è la densità di PLLA amorfo (1.248 g/ml) e  $D_c$  rappresenta la densità di PLLA perfettamente cristallino (1.290 g/ml);

- infine  $X_c$ , grado di cristallinità di PLLA, è ottenuto semplicemente dal rapporto

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0}$$

con  $\Delta H_m$  che indica la misura di entalpia del miscuglio fuso e  $\Delta H_m^0$  che indica il valore di entalpia del miscuglio fuso con PLLA 100% cristallino ( $\Delta H_m^0 = 203.4$  J/g).

Assunte tali definizioni si possono facilmente analizzare, anche dal punto di vista quantitativo, le caratteristiche di campioni di nHAP-PLLA sintetizzati; a titolo di esempio si riportano di seguito i risultati ottenuti dall'analisi di campioni preparati utilizzando come solvente diossano puro e indotti alla separazione di fase ad una temperatura di  $-18^\circ$  C (Tabella 2.2.1).

Come si può notare dai dati riportati, i campioni sintetizzati mediante TIPS presentano caratteristiche ideali per l'utilizzo del composito nHAP-PLLA come sostituto osseo biorassorbibile. Per quanto concerne l'aspetto meccanico, il materiale così prodotto ha densità sufficientemente elevate (Tabella 2.2.1) tali da garantire buona resistenza meccanica e cinetica di degradazione controllata dell'impianto. L'inserimento di nHAP tipicamente migliora suddette proprietà: il modulo di resistenza alla compressione aumenta ( in particolare quando il contenuto del ceramico supera il 30%) e la velocità di degradazione nei fluidi biologici diminuisce.

Scaffolds	PLLA:HAP (w/w)	Dp (g/cm <sup>3</sup> )	Ds (g/cm <sup>3</sup> )	Porosity (%)
PLLA	100 : 0	1.2577	0.0881	93.0
PLLA-NHAP	90 : 10	1.3383	0.0971	92.8
PLLA-NHAP	70 : 30	1.5394	0.1176	92.3
PLLA-NHAP	50 : 50	1.7993	0.1475	91.8
PLLA-NHAP	30 : 70	2.1737	0.2304	89.4
PLLA-MHAP	50 : 50	1.7993	0.1505	91.6

Tabella 2.2.1. Densità e porosità di campioni di NHAP-PLLA preparati a partire da soluzioni di diossano e indotti alla separazione di fase ad una temperatura di -18°C (tratto da "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", Guobao Wei, Peter X. Ma – Biomaterials 25 pag. 4749-4757)

Scaffolds	PLLA:HAP (w/w)	Diossano:H <sub>2</sub> O (v/v)	Temperatura di congelamento (°C)	Porosity (%)
PLLA-NHAP	70 : 30	100 : 0	-18	92.3
PLLA-NHAP	70 : 30	95 : 5	-18	91.6
PLLA-NHAP	70 : 30	90 : 10	-18	93.1
PLLA-NHAP	70 : 30	87 : 13	4	94.5
PLLA-NHAP	70 : 30	87 : 13	-18	93.1
PLLA-NHAP	70 : 30	87 : 13	-70	92.8

Tabella 2.2.2. Porosità di campioni di NHAP-PLLA preparati a partire da soluzioni di diossano+acqua in proporzioni variabili e indotti alla separazione di fase a differenti temperature (tratto da "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", Guobao Wei, Peter X. Ma – Biomaterials 25 pag. 4749-4757).

In secondo luogo, dai risultati sperimentali si riscontra un'elevatissima porosità del composito (oltre il 90%) a cui consegue ottima osteoinduttività del materiale: i numerosi pori sono, infatti, in grado di favorire la migrazione di osteoblasti all'interno della struttura e quindi la loro adesione, proliferazione e differenziazione. Ciò permette la formazione di nuovo tessuto osseo naturale che va progressivamente a coprire la lacuna generata dalla precedente asportazione di tessuto danneggiato. Tuttavia, bisogna sottolineare che non tutte le strutture porose sono utilizzabili nel campo dell'ingegneria tissutale: affinché avvenga realmente la migrazione di osteoblasti, un buon sostitutivo osseo deve infatti avere, oltre ad elevata porosità, anche adeguata dimensione ed interconnessione dei micropori, correlate ad una

appropriata morfologia della superficie. Anche in questo frangente la TIPS si conferma essere un'ottima tecnica produttiva. Infatti, controllando le condizioni alle quali è indotta la separazione di fase (Tabella 2.2.2) è possibile variare morfologia e dimensione della microarchitettura del composito. Nel caso precedentemente visto, viene utilizzato puro diossano come solvente per la TIPS e la separazione di fase indotta è del tipo solido-liquido: durante il congelamento il diossano cristallizza mentre il composito nHAP-PLLA è espulso dal fronte di cristallizzazione del solvente; grazie all'aumento di temperatura e alla conseguente sublimazione del diossano, i cristalli di solvente diventano successivamente i pori del composito. La loro morfologia è quindi dipendente dalla forma e dimensione dei cristalli la cui formazione è a loro volta legata alle condizioni di congelamento. Pertanto, controllando tempi e temperatura alle quali avviene la cristallizzazione, l'utilizzo della tecnica di separazione di fase termicamente indotta permette di ottenere la desiderata morfologia dei pori. In particolare, la porosità del materiale risulta legata non solo alle condizioni specifiche di lavoro ma anche alla tipologia di solvente utilizzato. Dati ottenuti sperimentalmente (Tabella 2.2.2) dimostrano infatti che, variando il solvente utilizzato, la porosità del composito prodotto viene modificata. Ciò è spiegabile in relazione al fatto che il tipo di separazione di fase che avviene è differente (solido-liquido / liquido-liquido) poiché esso dipende dalla tipologia di solvente utilizzato per preparare il sistema multicomponente iniziale; ad esempio la TIPS liquido-liquido produce compositi aventi microarchitetture porose con aperture distribuite più uniformemente e maggiormente interconnesse rispetto alla TIPS solido-liquido. Utilizzando dunque come solvente una soluzione di acqua e diossano per ottenere un sistema multicomponente al 5% di PLLA in peso è possibile aumentare la porosità del composito nHAP-PLLA addirittura di qualche punto percentuale (Tabella 2.2.2). In particolare risulta ottimale l'utilizzo di una proporzione diossano e acqua di 87:13. La tecnica di separazione di fase liquido-liquido permette inoltre, se richiesto da particolari applicazioni biomedicali, di ottenere dei campioni in nHAP-PLLA con macropori in aggiunta alla sempre presente microarchitettura porosa. Ciò è possibile grazie all'aumento della percentuale di acqua utilizzata e all'abbassamento della temperatura di congelamento oltre la soglia di separazione di fase: l'effettiva separazione avviene comunque a circa  $-18^{\circ}\text{C}$ ; proseguendo però nell'abbassamento della temperatura si consente al sistema di mantenere attivo un secondo e più grossolano processo di separazione che riduce quanto più possibile l'energia libera presente all'interfaccia delle due fasi del sistema già separate in precedenza. Questo processo comporta la formazione dei macropori.

In conclusione quindi la tecnica di produzione TIPS, sia solido-liquido che liquido-liquido, si presenta come scelta ottimale per la creazione di sostitutivi ossei biorassorbibili: essa è ampiamente utilizzata poiché presenta il grosso vantaggio di poter variare agilmente le condizioni di lavoro ottenendo campioni di nHAP-PLLA con le caratteristiche desiderate. Tuttavia la TIPS, come ogni tecnica di produzione, non è perfetta; i compositi così sintetizzati presentano comunque delle limitazioni. Purtroppo il processo di separazione di fase è soltanto teoricamente perfettamente controllabile; in realtà la separazione avviene naturalmente e, nonostante la dipendenza da parametri controllabili, il processo non lo risulta altrettanto. In molti casi, si riescono a creare strutture altamente porose ma non a raggiungere sufficiente interconnessione dei pori. Per risolvere questo inconveniente sono recentemente state studiate delle varianti alla tecnica di produzione classica con lo scopo di migliorare il controllo della struttura 3D dei campioni così sintetizzati [12]. Una delle proposte più interessanti prevede l'utilizzo di una sorta di scheletro dei pori successivamente sciolto per creare gli effettivi pori interconnessi: la soluzione multicomponente iniziale viene realizzata in maniera analoga a quanto visto in precedenza ma, invece che essere direttamente indotta alla separazione di fase, essa viene prima inserita all'interno di un provino che presenta uno scheletro di zucchero. Una volta inserita la soluzione, applicando vuoto spinto affinché ogni spazio venga riempito, questa viene indotta alla separazione di fase. Dopo aver rimosso per sublimazione il solvente, la struttura così ottenuta viene lavata con acqua distillata e lo scheletro di zucchero viene sciolto e rimosso lasciando al suo posto pori interconnessi e di geometria controllata. Il risultato è la produzione di un materiale altamente poroso e con pori ben interconnessi. Questa variante della classica TIPS è molto interessante poiché efficace e di semplice realizzazione: lo scheletro viene agilmente creato a partire dalla fusione di microsferiche di zucchero (diametro  $180 \div 600 \mu\text{m}$ ) ottenendo una struttura con geometria controllata; la scelta specifica dello zucchero, invece, deriva dal fatto che esso è un materiale biocompatibile e soprattutto non dannoso per il corpo qualora accadesse che tracce dello scheletro non vengano adeguatamente rimosse rimanendo all'interno del prodotto finito.

Un'altra strada percorsa per cercare di superare i limiti della TIPS è quella di affidarsi all'utilizzo di software per design e manifattura computer assistiti, CAD/CAM, e altre tecniche di prototipizzazione rapida attualmente diffuse nella moderna industria manifatturiera [13]. Queste tecniche prevedono l'utilizzo di particolari scanner per acquisire dati relativi all'istologia del paziente e specifici software che elaborano i dati ricavati permettendo la creazione di scaffolds che imitano, a vari livelli (dall'architettura della matrice extracellulare, ai micro/macro pori, alle forme anatomiche) lo specifico tessuto da sostituire.

Attualmente l'unione della moderna tecnologia al classico processo produttivo TIPS rappresenta la nuova frontiera di sviluppo del settore, ancora poco esplorata. Tecniche CAD e CAM sono procedure tecnologicamente avanzate che forniscono grandi possibilità di sviluppo ma richiedono macchinari e software costosi, pertanto la loro diffusione è ancora limitata.

### **2.3 Proprietà: un confronto diretto con il composito micro idrossiapatite e acido poli-L-lattico (mHAP-PLLA)**

Un metodo efficace per comprendere quali siano i vantaggi effettivi apportati al composito nHAP-PLLA dall'inserimento di idrossiapatite di dimensione nanometrica è sicuramente quello di mettere in confronto diretto le caratteristiche del materiale con altri compositi di medesima costituzione ma differenti per dimensione dei componenti. A tal scopo sono stati analizzati due campioni del tutto analoghi per geometria, sintetizzati con la medesima tecnica di produzione e alle medesime condizioni rispettivamente in micro HAP-PLLA ed in nano HAP-PLLA, studiando in particolare il comportamento dell'idrossiapatite. Di seguito sono riportati i dati sperimentali relativi a provini realizzati nei laboratori dell'università del Michigan che hanno permesso di eseguire il suddetto confronto (tutti i dati utilizzati derivano dal lavoro del gruppo di ricerca di Guobao Wei e Peter X. Ma e sono tratti dall'articolo *"Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering"* pubblicato in *Biomaterials* 25, anno 2004, pag. 4749-4757).

Scaffolds	PLLA:HAP (w/w)	Dp (g/cm <sup>3</sup> )	Ds (g/cm <sup>3</sup> )	Porosity (%)
PLLA – nHAP	50 : 50	1.7993	0.1475	91.8
PLLA – mHAP	50 : 50	1.7993	0.1505	91.6

I campioni in questione sono stati entrambi sintetizzati con acido poli-L-lattico ed idrossiapatite in proporzioni del 50:50 in peso, mediante TIPS solido-liquido a partire da soluzioni di diossano indotte alla separazione di fase ad una temperatura di -18°C. Di questi se ne è valutata densità dello scheletro, densità del polimero e porosità. Tutti i parametri sono stati calcolati come in precedenza descritto.

## **DENSITA` E POROSITA`**

Una prima analisi dei dati indica che passando dal composito contenente mHAP a quello contenente nHAP le caratteristiche macroscopiche del provino sintetizzato variano in minima misura; i campioni presentano, infatti, simili densità e porosità, con una leggera variazione per quanto riguarda la densità dello scheletro del composito e una più importante variazione della porosità del materiale. Per quanto concerne la densità dello scheletro, essa risulta maggiore nel caso del composito mHAP-PLLA. Ciò è probabilmente spiegabile in relazione alla minore cristallinità della polvere di micro-idrossiapatite utilizzata che porta ad ottenere un valore  $D_s$  più elevato; tuttavia la variazione è piccola a tal punto da poter essere ritenuta non rilevante. Per quanto riguarda la porosità della struttura, invece, l'utilizzo di nano-idrossiapatite genera un aumento della suddetta proprietà. Ciò è dovuto al fatto che, durante il processo di separazione di fase, l'introduzione di HAP di dimensioni inferiori nella soluzione di PLLA e diossano perturba la cristallizzazione del solvente in minor misura producendo una struttura finale con pori più regolari e presenti in numero maggiore. L'aumento della porosità del composito nHAP-PLLA è una caratteristica estremamente desiderabile poiché necessaria per facilitare la migrazione, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti in vivo, assicurando la formazione di nuovo tessuto. In particolare, incrementi di porosità in misura ancora maggiore si possono ottenere utilizzando altre proporzioni di nHAP e PLLA per preparare il composito: ad esempio, campioni sintetizzati alle medesime condizioni con percentuali di composizione di nHAP e PLLA del 30:70 o del 10:90 presentano valori di porosità che salgono al 92-93% (Tabella 2.2.1). Un primo vantaggio apportato dalla dimensione nanometrica delle inserzioni in ceramico è, dunque, quello di aumentare la porosità del materiale.

## **MORFOLOGIA E ANISOTROPIA**

Esaminando i campioni dal punto di vista micrografico mediante l'utilizzo di un microscopio a scansione elettronica (SEM), si può notare che la microstruttura presentata dai due compositi a confronto è differente (Figura 2.3.1): il provino in nHAP-PLLA ha una struttura porosa con morfologia interna dei pori regolare e a scaletta, simile a quella degli scaffolds realizzati in puro PLLA. Tale morfologia è quella tipicamente generata durante il processo di separazione di fase termicamente indotto solido-liquido. Le particelle nanometriche di HAP sono distribuite in maniera uniforme senza creare larghi aggregati all'interno dei pori e le loro pareti sono solide e lisce. Nel provino realizzato in mHAP-PLLA, invece, la presenza di piastrelle di HAP di lunghezza compresa tra i 10 ai 50  $\mu\text{m}$  è più diffusa: si trovano sia

piastrine distribuite uniformemente all'interno della matrice in acido polilattico, sia inglobate nelle pareti dei pori, ma anche alcune impaccate fittamente tra loro e situate tra un poro e l'altro o all'interno del poro stesso. Globalmente la dimensione dell'architettura porosa del composito mHAP-PLLA varia tra i 50 e i 100  $\mu\text{m}$ . Dalle analisi della morfologia dei provini in nHAP-PLLA e m-HAP-PLLA si possono trarre delle conclusioni piuttosto interessanti. Innanzitutto, si possono fare delle valutazioni per quanto concerne le proprietà meccaniche dei materiali. In particolare: la dispersione maggiore delle piastrine di micro HAP nel composito mHAP-PLLA evidenzia l'ottenimento di una struttura porosa fortemente irregolare e pertanto isotropa. Successive prove meccaniche dimostrano, infatti, che le proprietà del materiale non risultano influenzate dalla direzione di indagine.

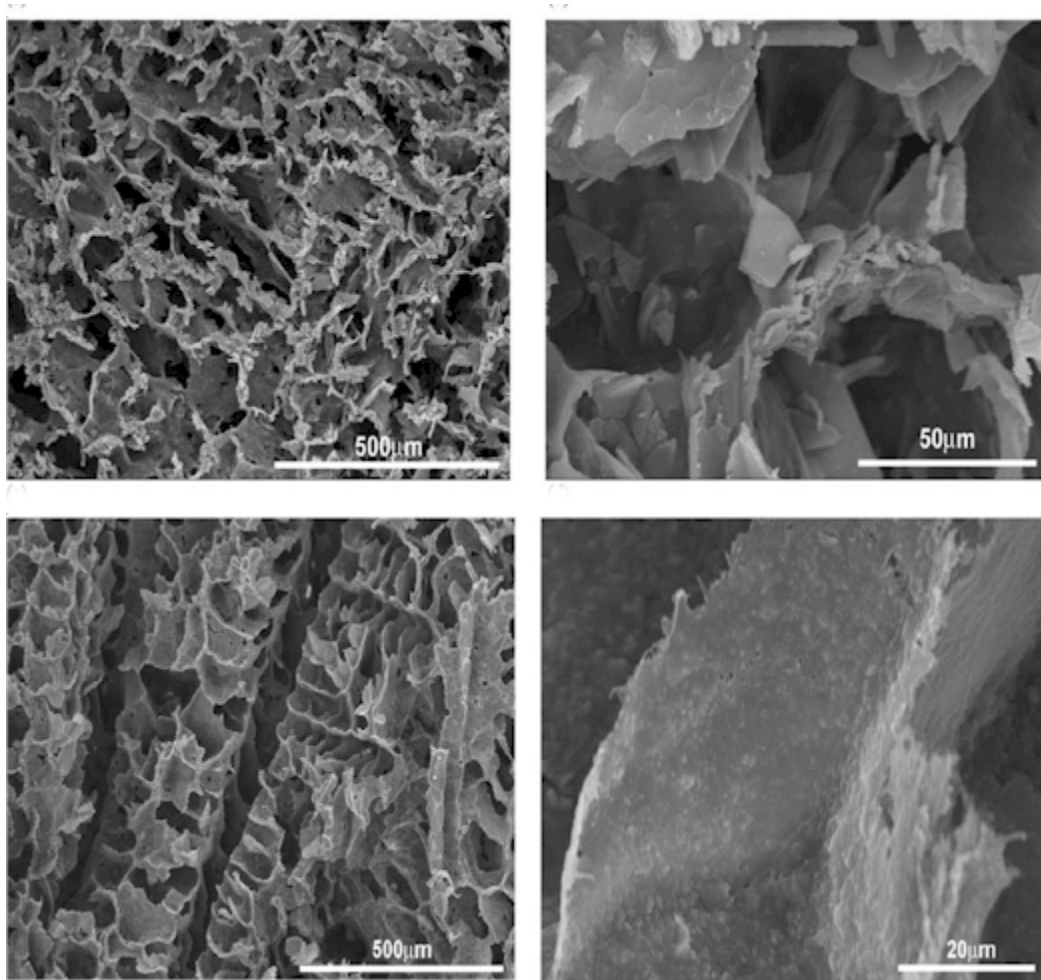


Figura 2.3.1. Immagini derivate da scansioni SEM di campioni di mHAP-PLLA (in alto, sx e dx) e nHAP-PLLA (in basso, sx e dx) preparati a partire da soluzioni di diossano e indotti alla separazione di fase ad una temperatura di  $-18^{\circ}\text{C}$  (tratto da "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", Guobao Wei, Peter X. Ma – *Biomaterials* 25 pag. 4749-4757).

Ciò però è un grosso limite per il composito mHAP-PLLA poiché questa proprietà collide con le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo naturale che risulta invece fortemente anisotropo. Ad esempio, se si considera l'osso corticale, per esso è possibile definire una caratteristica meccanica di ortotropia evidenziando tre piani ortogonali di anisotropia dove, tipicamente, il modulo elastico è fortemente distinguibile. Esso prevale lungo una delle tre direzioni e ciò è fondamentale per la funzionalità del tessuto stesso. In questo senso, l'inserimento di idrossiapatite di dimensione nanometrica è fondamentale per superare questa limitazione. Durante il processo di separazione di fase infatti, la perturbazione introdotta al sistema PLLA-diossano è molto minore, anche nei casi in cui la percentuale di nHAP utilizzata sia elevata (50 ), e ciò proprio grazie alle ridotte dimensioni dell'idrossiapatite. Il risultato finale è l'ottenimento di un provino in nHAP-PLLA che mantiene le proprietà di anisotropia tipiche dei materiali sintetizzati con TIPS liquido-solido. Variando le condizioni alle quali avviene la cristallizzazione del diossano è perciò possibile modificare l'anisotropia del materiale con la possibilità di studiare varianti della tecnica che permettano di ottenere dei sostitutivi ossei con caratteristiche di anisotropia simili a quelle dei tessuti danneggiati da sostituire [14].

Un secondo vantaggio apportato dalla dimensione nanometrica delle inserzioni in ceramico è, dunque, quello di garantire la possibilità di ottenere un sostitutivo osseo anisotropo, somigliante al tessuto osseo da sostituire.

## **PROPRIETA` MECCANICHE**

Proseguendo nel confronto delle proprietà meccaniche dei due compositi mHAP-PLLA e nHAP-PLLA, sono stati analizzati i valori dei rispettivi moduli di elasticità sottoponendo i materiali a carico compressivo. Per avere un quadro più completo della situazione, in relazione agli altri provini è stato scelto di analizzare anche un campione di puro PLLA sintetizzato con la medesima tecnica di produzione e alle medesime condizioni. Come si può notare dai dati riportati nel diagramma (Figura 2.3.2), esso presenta un modulo di elasticità di 4.3 MPa. L'introduzione di nHAP o mHAP nella struttura fa salire di molto il valore del modulo, fino a raggiungere un picco di 8.3 MPa nel caso del composito nHAP-PLLA con rapporto di composizione 50:50. Per l'analogo in mHAP-PLLA, invece, il valore scende al di sotto degli 8 MPa. Risulta quindi evidente che le proprietà meccaniche dei compositi dipendono, come già citato, dalle proporzioni di HAP e PLLA usate per la sintesi dei materiali ma anche dalla dimensione delle inserzioni in HAP introdotte. In particolare, il modulo di elasticità aumenta in maniera all'incirca proporzionale all'aumentare del contenuto



di nHAP o di mHAP nel composito, mentre il confronto diretto nHAP-PLLA e mHAP-PLLA indica che, a parità di rapporti dei costituenti, il primo presenta un modulo di elasticità maggiore rispetto al secondo, più vicino ai valori caratteristici del tessuto osseo naturale. La dimensione di HAP gioca quindi un ruolo importante per quanto concerne le proprietà meccaniche del materiale. Utilizzando inserzioni in nHAP è, infatti, possibile sintetizzare un composito che simuli in maggior misura il comportamento dei nano cristalli di HAP impaccati nelle trabecole ossee naturali, ottenendo una struttura con proprietà meccaniche confrontabili a quelle del tessuto biologico. Un grande vantaggio apportato dalla dimensione nanometrica delle inserzioni in ceramico è, dunque, quello di permettere la sintesi di impianti biomedicali con proprietà meccaniche migliori rispetto al composito mHAP-PLLA poiché simili in maggior misura alle caratteristiche del tessuto osseo naturale [15] [16].

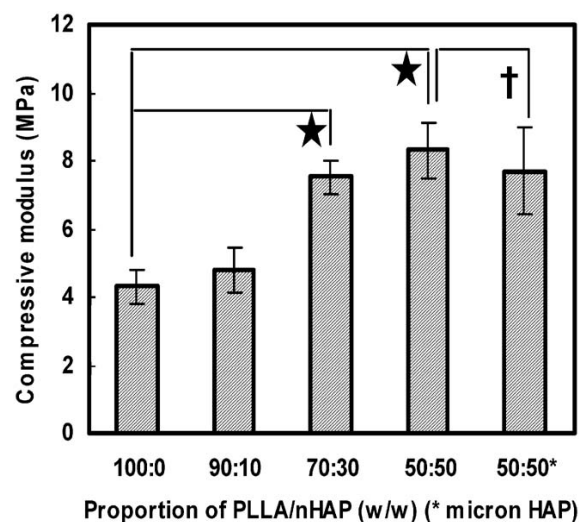


Figura 2.3.2 Effetti del contenuto di HAP nel modulo di compressione di compositi in nHAP-PLLA e mHAP-PLLA (tratto da "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", Guobao Wei, Peter X. Ma – Biomaterials 25 pag. 4749-4757).

## ATTIVITA' BIOLOGICA

Per approfondire ulteriormente il confronto tra il composito mHAP-PLLA e nHAP-PLLA, sono state eseguite indagini al fine di valutare anche l'attività in vitro dei suddetti materiali e le rispettive capacità di instaurare dei legami con l'ambiente biologico circostante. In particolare, l'analisi si è concentrata sullo studio di bioattività ed osteoinduttività dei compositi valutando prima l'adsorbimento proteico e poi il comportamento in vitro all'esposizione ad osteoblasti umani (MG-63). L'importanza di studiare il pre-adsorbimento

del substrato nasce dal fatto che questo fenomeno influenza fortemente la migrazione e l'adesione degli osteoblasti allo scaffold, diventando un parametro importante per valutare la bioattività di un materiale: in particolare, maggiore è il quantitativo di proteine adsorbite e maggiore risulta essere il numero degli osteoblasti successivamente aderiti.

Nel caso preso in analisi, la valutazione dell'adsorbimento proteico dei campioni in mHAP-PLLA e nHAP-PLLA è stata eseguita immergendo e incubando a 37° C i materiali in una soluzione PBS (Phosphate Buffered Saline)/FBS (Fetal Bove Serum) e calcolando le variazioni di concentrazione di proteine in soluzione a intervalli predeterminati. Tutto il sistema di analisi è stato costruito al fine di ricreare in vitro un ambiente con comportamento quanto più possibile vicino a quello dei fluidi biologici corporei: la PBS/FBS è, infatti, una soluzione acquosa salina contenente cloruro di sodio (NaCl), fosfato di sodio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), cloruro di potassio (KCl) e fosfato di potassio (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) che mima la componente acquosa dei fluidi biologici (pH 7.4, stessa osmolarità e concentrazione ionica), nella quale viene introdotto siero fetale bovino allo scopo di imitare il comportamento delle proteine della matrice extracellulare del tessuto osseo. Come si può verificare dai risultati della sperimentazione, il quantitativo proteico adsorbito cresce in concomitanza dell'aumento del quantitativo di HAP contenuta nel provino (Figura 2.3.3/b): campioni in nHAP-PLLA 50:50 e nHAP-PLLA 70:30 adsorbono rispettivamente 2.4 e 3.2 volte la concentrazione di proteine di campioni in puro PLLA. Tale fenomeno è spiegabile da una parte grazie alla maggior affinità dell'idrossiapatite verso le proteine, dall'altra poiché l'inserimento di HAP altera la morfologia della superficie dei pori generando strutture predisposte maggiormente all'adsorbimento proteico. Inoltre, per quanto riguarda campioni in nHAP-PLLA, i dati mettono in evidenza un particolare andamento del processo (Figura 2.3.3/a): l'adsorbimento cresce visibilmente durante le prime ore di incubazione per poi raggiungere l'equilibrio dopo circa 25 h oltre le quali non si presenta più alcun segno di incremento. Ciò indica che al fine di confrontare l'effettiva bioattività dei materiali è interessante considerare il quantitativo proteico da essi adsorbito nelle prime 24 h e le sue variazioni. Nelle ore successive esso rimane costante poiché si raggiunge la saturazione: tutta la superficie d'interfaccia impianto-ambiente è già interessata dal fenomeno che raggiunge un punto di equilibrio.

Un'ultima ma importante osservazione permessa dai risultati sperimentali è che, anche per quanto riguarda la bioattività, la dimensione delle inserzioni ceramiche influenza il comportamento del composito che le contiene. L'adsorbimento proteico dipende, infatti, dal tipo di idrossiapatite presente nel materiale (Figura 2.3.3/c): a parità di composizione, campioni in nHAP-PLLA adsorbono un maggior numero di proteine rispetto a campioni in

mHAP-PLLA ed in particolare questo fenomeno diventa evidente se il quantitativo di nHAP contenuto nel composito è elevato (oltre il 50%); le differenze sono meno visibili se, invece, il

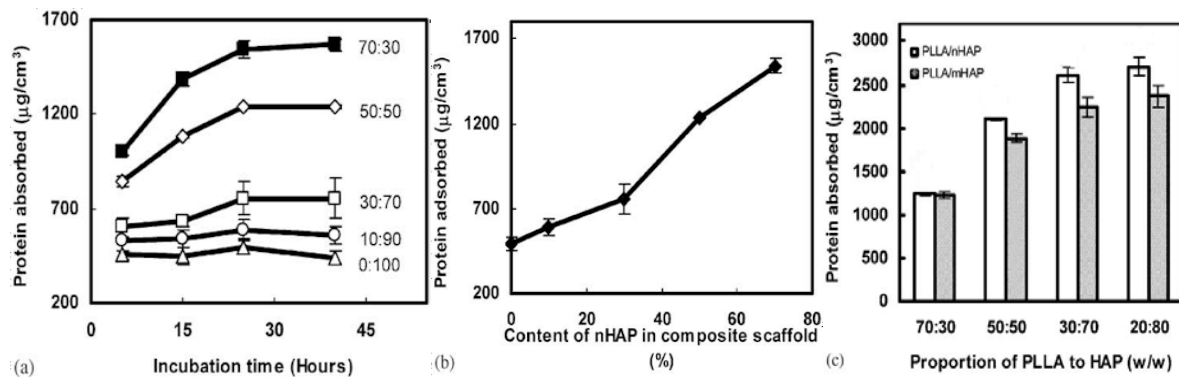


Figura 2.3.3. Adsorbimento proteico, in funzione di differenti parametri, su scaffolds porosi in nHAP-PLLA e mHAP-PLLA incubati in soluzione FBS/PBS (tratto da “Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering”, Guobao Wei, Peter X. Ma – Biomaterials 25 pag. 4749-4757).

contenuto del nano ceramico è ridotto. Esse poi diminuiscono in accordo alla diminuzione della percentuale di nHAP fino a divenire statisticamente non rilevanti (Figura 2.3.3/c). Tale comportamento è spiegabile ipotizzando che l'effetto dell'inserimento di nHAP sia effettivamente visibile solo se un numero molto elevato di particelle del nano ceramico si trovano esposte sulla superficie delle pareti dei pori, andando ad interagire con le proteine in soluzione. In caso contrario, il quantitativo presente non è sufficiente a generare una variazione significativa nel comportamento del composito. Considerati i dati è tuttavia possibile concludere che la nano HAP sintetica ha maggiore affinità proteica rispetto alla micro HAP, dovuta proprio alla caratteristica dimensione che è la medesima della idrossiapatite contenuta nel tessuto osseo naturale [17] [18] [19].

Un altro vantaggio apportato dalla dimensione nanometrica delle inserzioni in idrossiapatite è, dunque, quello di consentire un aumento di bioattività del composito e, poiché gli osteoblasti sono cellule ancoraggio-dipendenti, un conseguente aumento di osteoinduttività del materiale.



### **3. SPERIMENTAZIONE IN VIVO studi su mineralizzazione e osteogenesi di scaffolds in nano HAP-PLLA con innesti superficiali di PLLA**

Il composito nHAP-PLLA è stato finora considerato un materiale ideale, e dunque fortemente consigliato per la produzione di sostitutivi ossei sintetici, sulla base delle sue notevoli proprietà di biocompatibilità e bioattività, nonché importanti caratteristiche di struttura che lo rendono sicuro, efficiente ed ottimale per l'applicazione in questi particolari dispositivi medici. Tali caratteristiche sono state ampiamente studiate da numerosi gruppi di ricercatori che, tramite sperimentazioni effettuate su modelli in vitro, hanno permesso di mettere in luce vantaggi e punti deboli della struttura del composito nHAP-PLLA e fare una prima valutazione sui suoi possibili utilizzi. Tuttavia, tali test non sono ancora sufficienti per realizzare un'analisi completa ed approfondita del comportamento del composito.

In generale, infatti, lo studio di un qualsiasi biomateriale non si può e non si deve fermare (come finora invece fatto) all'elaborazione di dati ricavati esclusivamente da test in vitro, poiché questa tipologia di indagine fornisce una valutazione solo parziale e preliminare del funzionamento del materiale. Gli studi in vitro sono, senza ombra di dubbio, step fondamentali e necessari, ma utilizzano modelli troppo semplificati che permettono di analizzare funzioni e meccanismi di una sola linea cellulare alla volta, l'una indipendentemente dalle altre. Tutto ciò, se preliminarmente risulta vantaggioso poiché permette di studiare accuratamente gli specifici comportamenti di una cellula, in seguito si scontra con una realtà biologica estremamente più complessa e, soprattutto, dinamica ponendo un grossissimo limite all'utilizzo di questi modelli. Inoltre, la simulazione troppo semplificata del funzionamento dei tessuti biologici può generare il rischio di estrapolazioni ed interpretazioni erranee dei risultati così ottenuti. Pertanto, allo scopo di svolgere un'analisi profonda, completa e corretta del comportamento del biomateriale composito nHAP-PLLA è necessario integrare quanto finora valutato con dati ricavati da sperimentazioni su modelli animali, poiché questa tipologia di indagine fornisce una spiegazione più adeguata dei meccanismi biologici reali, lavorando in un ambiente più complesso, interattivo e dinamico.

L'utilizzo di animali per sperimentazioni scientifiche apre, tuttavia, una questione estremamente delicata riguardo la legittimità di tali esperimenti. Come spiegato in precedenza, purtroppo, i test in vitro forniscono informazioni limitate sul comportamento di un materiale in ambiente biologico, non sono sufficienti a garantire l'efficacia degli impianti biomedicali realizzati e soprattutto non permettono di lavorare in piena sicurezza del paziente. La sperimentazione su modello animale diventa quindi scientificamente fondamentale poiché permette di ottenere le necessarie garanzie di affidabilità del materiale. Tuttavia, non possono essere tralasciate raccomandazioni e precauzioni etiche al fine di operare quanto più correttamente possibile ed evitare lo sfruttamento di esseri viventi: innanzitutto devono essere valutate le motivazioni e gli obiettivi della sperimentazione; poi va determinato il minor numero possibile di test animali che permettano di ottenere dati statisticamente rilevanti e una soglia o limite di tollerabilità della sofferenza animale, cioè il grado di proporzionalità tra i benefici previsti (soprattutto se incerti) e i danni o disagi eventualmente provocati. Delle linee guida da seguire per ridurre l'impatto della sperimentazione animale furono proposte già nel 1959 da Russel e Burch ed esse sono tuttora seguite e comunemente note come la regola delle 3R:

1. Rimpiazzamento (*Replacement*)
2. Riduzione (*Reduction*)
3. Raffinamento (*Refinement*)

dove con rimpiazzamento si intende la sostituzione dell'animale con l'utilizzo di metodi alternativi; con riduzione si intende la riduzione del numero di animali usati o l'aumento di informazioni ottenute con lo stesso numero di animali; con raffinamento si intende il miglioramento delle tecniche sperimentali in modo da ridurre la sofferenza.

Ovviamente la sperimentazione animale in ogni paese è regolata a livello legislativo poiché è assolutamente necessario che vengano seguite delle direttive e misure precise e che siano previste delle sanzioni per i trasgressori. In Italia la regolamentazione è principalmente basata sul Decreto Legislativo n. 116 del 27 gennaio 1992 "*Attuazione della direttiva (CEE) n.609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici*" a cui sono seguite delle circolari attuative più recenti, che sviluppano alcuni punti del precedente decreto scendendo più nel dettaglio. Risulta regolamentata anche l'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale con la Legge n.413 del 12 ottobre 1993 "*Norme sull'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale*".

### **3.1 Lavoro svolto: preparazione dei materiali e metodologie di indagine**

Obiettivo di questo lavoro è svolgere un'analisi profonda, completa e corretta del comportamento del biomateriale composito nHAP-PLLA, valutandone possibili applicazioni come sostitutivo osseo artificiale. È pertanto necessario espandere lo studio finora svolto ed indagare la risposta del materiale anche su modello animale, confrontando le prestazioni fornite dal composito nHAP-PLLA in vitro e quelle fornite invece in un ambiente più complesso e con dinamiche simili alle presenti nel corpo umano.

Per tale motivo sono stati analizzati i risultati forniti da uno studio svolto nel 2008 da Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen e Xiabin Jing, ricercatori della Jilin University di Changchun (Cina), collaboratori dell'istituto di chimica applicata di Changchun (Institute of Applied Chemistry) e membri dell'Accademia delle Scienze (Chinese Academy of Sciences) [20]. In tale lavoro, campioni di nHAP-PLLA/PLGA vengono impiantati in cavie, per via intramuscolo, come sostitutivi del radio al fine di studiare in vivo gli effetti della mineralizzazione e dell'osteogenesi degli scaffolds. La sperimentazione in questione è il proseguimento di una serie di altri studi svolti dai medesimi ricercatori nei quali si propongono una nuova tecnica per sviluppare il nano-composito nHAP-PLLA tramite innesti superficiali di PLLA eseguiti sulla stessa nano-idrossiapatite. L'idea innovativa consiste nel forzare la formazione di legami chimici tra i gruppi idrossilici presenti sulla superficie del ceramico e molecole di acido polilattico, inserendo poi la struttura così legata nella matrice polimerica (Figura 3.1.1). Tale meccanismo permette di incrementare la forza di adesione che si sviluppa all'interfaccia tra le due componenti e, dunque, migliorare le prestazioni del composito nHAP-PLLA in termini di proprietà meccaniche come resistenza alla trazione, resistenza alla flessione ed impatto [21] [22]. Poiché, se sottoposto a test in vitro, il composito g-nHAP-PLLA (g indica l'innesto, in inglese *grafting*) mostra interessanti ed estese potenzialità come materiale per fissaggio e sostituzione ossea, diventa importante valutare la risposta dello stesso ad applicazioni in vivo. Nel caso in questione, il materiale utilizzato per la produzione degli scaffolds è un particolare miscuglio di nano idrossiapatite innestata (g-nHAP) al 10% in peso e PLLA-PLGA in rapporto di 80:20. Come si può notare, all'interno della matrice polimerica vi è l'inserimento di una porzione di PLGA. Tale inserimento, infatti, permette di controllare con maggior precisione la cinetica di degradazione del composito (tempi di riassorbimento fissati a 5-6 mesi dall'impianto) mantenendo comunque inalterate le

principali caratteristiche della matrice polimerica, dato che il PLLA rimane l'elemento costituente preponderante.

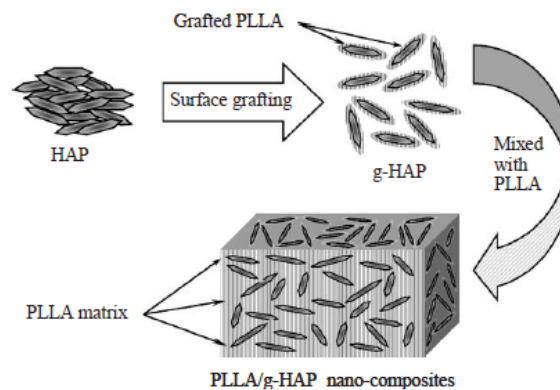
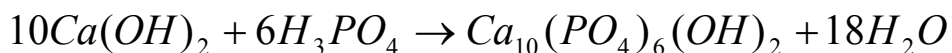


Figura 3.1.1 – Schematizzazione delle tappe di produzione del composito gHAP-PLLA (tratto da “Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility” di Zhongkui Honga, Peibiao Zhanga, Chaoliang Hea, Xueyu Qiua, Aixue Liua, Li Chena, Xuesi Chena, Xiabin Jinga – *Biomaterials* 26 - (2005) 6296–6304).

La preparazione di nano HAP innestata, invece, si ha a partire dalla reazione:



sviluppata ad una temperatura di 60-80 °C.

Il prodotto così ottenuto presenta cristalli aciclici di circa 100 nm di lunghezza e 20 - 40 nm di spessore, con un rapporto atomico Ca/P  $\approx$  1.67. Successivamente avviene l'innesto di PLLA: l'anello di l-lattide, ottenuto dall'acido lattico, viene aperto e fatto polimerizzare per produrre PLLA direttamente sulla superficie delle particelle di HAP grazie alla presenza di ottoato stannoso [Sn(Oct)<sub>2</sub>], un catalizzatore che permette di ottenere gHAP secondo la reazione di Figura 3.1.2:

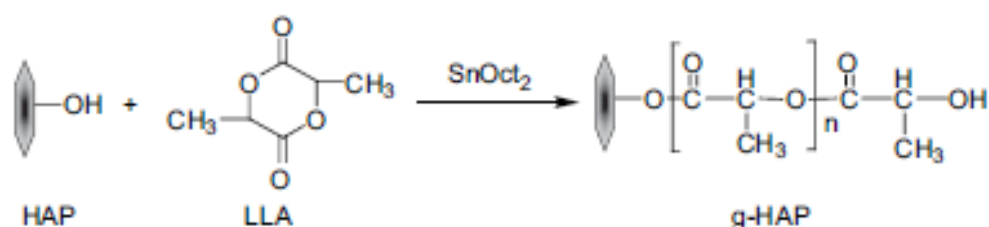


Figura 3.1.2 – Innesto di acido poli-L-lattico sulla superficie di idrossiapatite (tratto da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).



La quantità totale di polimero innestato sulla superficie di g-HAP corrisponde all'incirca al 5.0% in peso ed è determinata tramite termogravimetria (misura della variazione di massa al variare della temperatura), tecnica tipicamente utilizzata per valutare la composizione minerale delle rocce. Una volta preparate matrici ed innesti, si procede dunque alla produzione dei compositi g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA. I materiali sono sintetizzati utilizzando la tecnica di fusione del solvente e dissoluzione del particolato (*solvent casting & particulate leaching method*): particelle di nano-idrossiapatite vengono presospese in un certo volume di cloroformio e miscelate in una soluzione di PLGA-PLLA-cloroformio al 10% con l'aiuto di agitazione magnetica e trattamento ad ultrasuoni. Il contenuto di g-nHAP o nHAP risulta del 10% rispetto al composito. L'ottenimento della struttura porosa è realizzato, invece, mediante utilizzo di uno scheletro zuccherino successivamente rimosso, secondo la metodologia in precedenza descritta in questo stesso lavoro (si veda il paragrafo 2.2). Allo scopo di realizzare i micropori, le particelle di saccarosio vengono ridotte a diametro di 100 - 450  $\mu\text{m}$  tramite l'uso di specifici setacci; in seguito esse vengono mescolate nella soluzione di g-nHAP-PLLA/PLGA, nHAP-PLLA/PLGA e PLLA/PLGA. La miscela è fusa e colata negli stampi in vetro e quindi asciugata a temperatura ambiente per tre giorni. Successivamente, le particelle di saccarosio vengono eliminate tramite lavaggio con acqua distillata e i compositi asciugati sotto vuoto. In conclusione, i campioni vengono preparati per le analisi preliminari, tagliati in barre sottili di 0.3 cm di spessore e 2.0 cm di lunghezza e sterilizzati ai raggi UV. Il risultato finale è quello di produzione di scaffolds porosi con macropori e micropori, aperti ed interconnessi, che si presentano come ottimali per permettere la migrazione e l'adesione degli osteoblasti al loro interno.

Prima di procedere all'impianto chirurgico dei campioni è comunque fondamentale realizzare una serie di indagini preliminari sulla composizione e struttura degli stessi allo scopo di caratterizzare meccanicamente e chimicamente gli scaffolds prodotti ed eliminare eventuali campioni difettosi. Tra le caratteristiche valutate è di notevole interesse studiare la porosità dei materiali: in particolare, in questa sperimentazione viene misurata tramite spostamento di liquido (come già proposto e illustrato da precedenti studi). Tale tecnica prevede di immergere un campione di peso  $W$  in un cilindro graduato contenente un volume ben noto  $V_1$  di etanolo. Vengono quindi realizzati una successione di brevi cicli di depressurizzazione e ripressurizzazione al fine di forzare l'etanolo all'interno dei pori del campione immerso. Tali cicli non vengono interrotti finché non si osservano bolle d'aria emergere dalla soluzione. Il volume totale di etanolo sommato al volume dello scaffold impregnato di etanolo viene registrato come  $V_2$ . In seguito il campione viene rimosso delicatamente dal cilindro e il

volume rimanente di etanolo indicato come  $V_3$ . Quindi è facile dedurre che il volume di etanolo contenuto nei pori (determinato come il volume contenuto nei vuoti dello scaffold) è dato dalla differenza  $V_1 - V_3$ , mentre il volume totale dello scaffold e dei pori sarà ottenuto dalla differenza  $V_2 - V_3$ . La porosità del campione è quindi calcolata come segue:

$$\varepsilon = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3)$$

$\varepsilon$  è, dunque, dato dal rapporto tra il volume dei pori e il volume totale dello scaffold e dei pori. In associazione a questo tipo di indice, rappresentante la porosità dal punto di vista quantitativo, risulta interessante studiare anche qualitativamente la struttura dei pori e delle pareti degli scaffolds. A tal scopo si procede con l'analisi dei campioni tramite microscopia SEM (*Scanning Electron Microscopy*) e con la valutazione delle immagini così ottenute.

In seguito, una volta terminati gli studi preliminari, gli scaffolds porosi vengono impiantati intramuscolo per le analisi sulla biodegradazione in vivo e valutazione della mineralizzazione. I campioni sterilizzati (0.3 cm di spessore e 2 cm di lunghezza) vengono inseriti, per mezzo di intervento chirurgico, nel muscolo dorsale di 18 conigli nei quali sono in precedenza creati dei difetti critici bilaterali nel radio di ciascuno degli arti anteriori. Tali difetti vengono generati per asportazione ossea rimuovendo 2.0 cm di osso diafisario come illustrato in figura 3.1.3. Gli scaffolds porosi, in precedenza trattati con proteine (immersione a 4° C in una soluzione PBS e 100 ng /ml di BMP-2 per tutta la notte), vengono successivamente inseriti all'interno dei difetti. Al fine di compiere confronti e valutazioni parallele, nella medesima cavia sono impiantati tre campioni per ogni tipo di materiale previsto (g – nHAP – PLLA/PLGA, nHAP – PLLA / PLGA, PLLA / PLGA ). Al termine dell'intervento, le ferite vengono richiuse con fili di seta a strati e i conigli riportati alle loro gabbie e lasciati liberi di muoversi. Tutte le cavie vengono quindi sottoposte ad una iniezione di penicillina intramuscolare giornaliera (dose di 200 unità a testa per tre giorni). È da segnalare che in tale sperimentazione nessuna cavia ha riportato complicazioni post operatorie; si può invece notare un graduale rimarginamento delle ferite e conseguente riattivazione dei conigli.

Come previsto dallo studio, a seguito dell'operazione le cavie vengono sacrificate con un'iniezione ad aria, rispettivamente alla 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> settimana di osservazione per valutare biodegradazione e mineralizzazione in funzione del tempo di permanenza dell'impianto. I campioni vengono quindi estratti ed osservati macroscopicamente per poi procedere con le analisi al SEM e radiografia computerizzata (CR). La mineralizzazione in vivo e l'osteogenesi

dei difetti riparati viene esaminata a tempo prestabilito: 4, 8, 12 settimane dopo l'intervento. I conigli sono esposti ai raggi X in posizione prona e sotto anestetico.

Gli altri campioni prelevati con biopsia vengono, invece, preparati e trattati per le analisi istologiche. Esse vengono realizzate a 8 settimane dall'intervento. I campioni sono preparati con paraformaldeide al 4%, decalcificati al 10% per 2-4 settimane, conservati in paraffina e tagliati in sottili strisce di 5  $\mu\text{m}$  di spessore per sezione. Tali sezioni vengono quindi analizzate al microscopio.



Figura 3.1.3 - Difetti critici bilaterali generati per asportazione di osso diafisario nel radio di ciascuno degli arti anteriori delle cavie (tratto da "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)" Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

## 3.2 Risultati

### 3.2.1 Analisi di porosità e al microscopio elettronico SEM dello scaffold

Per quanto concerne lo sviluppo di applicazioni biomedicali per sostituzione e fissaggio osseo, è fondamentale che gli scaffolds progettati a tale scopo siano fortemente porosi e che le interconnessioni tra i pori siano di dimensioni tali da consentire vitalità e funzioni degli osteoblasti. Quando strutture porose sono impiantate nel tessuto osseo, infatti, i pori vengono per prima cosa vascolarizzati e, successivamente, si assiste alla migrazione all'interno degli stessi di cellule progenitrici degli osteoblasti, che si trasformano in trabecole ossee e neotessuto. Per tale motivo, prima di procedere alla sperimentazione in vivo, è necessario analizzare la porosità degli scaffolds considerandola come un buon parametro indicatore della bioattività del materiale studiato; dunque, come precedentemente illustrato, si procede al calcolo della porosità  $\epsilon$  e per spostamento di fluido: la Tabella 3.2.1 riporta i valori così ottenuti

Materiale	Minimo	Massimo	Media	Deviazione standard	Percentuale
g-nHAP e PLLA/PLGA	50.5	448.1	152.5	76.1	86.6 + 0.9%
nHAP e PLLA/PLGA	51.6	446.0	146.9	65.4	85.9 + 4.6%
PLLA/PLGA	35.0	442.5	137.3	53.2	83.6 + 2.4%

Tabella 3.2.1 – Dimensione dei pori ( $\mu\text{m}$ ) di scaffolds porosi in g-nHAP-PLLA/PLGA, nHAP-PLLA/PLGA e PLLA/PLGA fabbricati con la tecnica di fusione del solvente e dissoluzione del particolato (dati tratti da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

Come si può notare dai dati riportati, non sono presenti significanti differenze per quanto riguarda le dimensioni medie dei pori nei differenti materiali e anche per quanto concerne la percentuale di porosità, essa risulta essere elevata in ogni caso, con valori superiori agli 80 punti percentuali. Ciò indica che il grado di porosità, la dimensione dei pori e la loro interconnessione non sono strettamente legati al materiale utilizzato per la sintesi dello scaffold ma, piuttosto, dipendono dalla tecnica di produzione utilizzata: valutando le alte percentuali di porosità, le buone dimensioni medie dei pori e la loro interconnessione, si può dunque dedurre che il metodo di fusione del solvente e dissoluzione del particolato, qui utilizzato per la preparazione dei materiali, è un ottima tecnica produttiva che consente di ottenere scaffolds con potenziale elevata bioattività.

Esaminando i campioni dal punto di vista micrografico mediante l'utilizzo di un microscopio a scansione elettronica (SEM), si può notare che tutti gli scaffolds fabbricati hanno macropori irregolari e ben interconnessi (Figura 3.2.1). La topografia della superficie delle pareti dei pori, invece, risulta diversificata in base al tipo di materiale esaminato (Figura 3.2.2). Nel composito g-nHAP-PLLA/PLGA le pareti si presentano piuttosto ruvide, presumibilmente a causa dell'idrossiapatite innestata con PLLA contenuta all'interno della matrice polimerica; per quanto riguarda i campioni in nHAP-PLLA/PLGA, la distribuzione dei grani si mostra molto meno uniforme rispetto al precedente composito e le dimensioni delle particelle aggregate, all'incirca 2 - 5  $\mu\text{m}$  di diametro, risultano maggiori. Infine, in comparazione ai nano compositi appena valutati, nel composito PLLA/PLGA puramente polimerico sono presenti pori di forma più allungata e piatta, mentre le pareti sono piuttosto lisce. Tali analisi risultano essere in accordo con quanto finora valutato in questo studio: nei nano compositi g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA l'introduzione di idrossiapatite permette di creare microstrutture più stabili con conseguente produzione di macro e micro pori di forma più regolare e distribuiti più uniformemente, migliori per facilitare la migrazione, ancoraggio e

proliferazione di osteoblasti al loro interno. Ancora una volta si evidenzia come l'utilizzo di idrossiapatite di dimensione nanometrica permetta di migliorare le proprietà di bioattività di un composito.

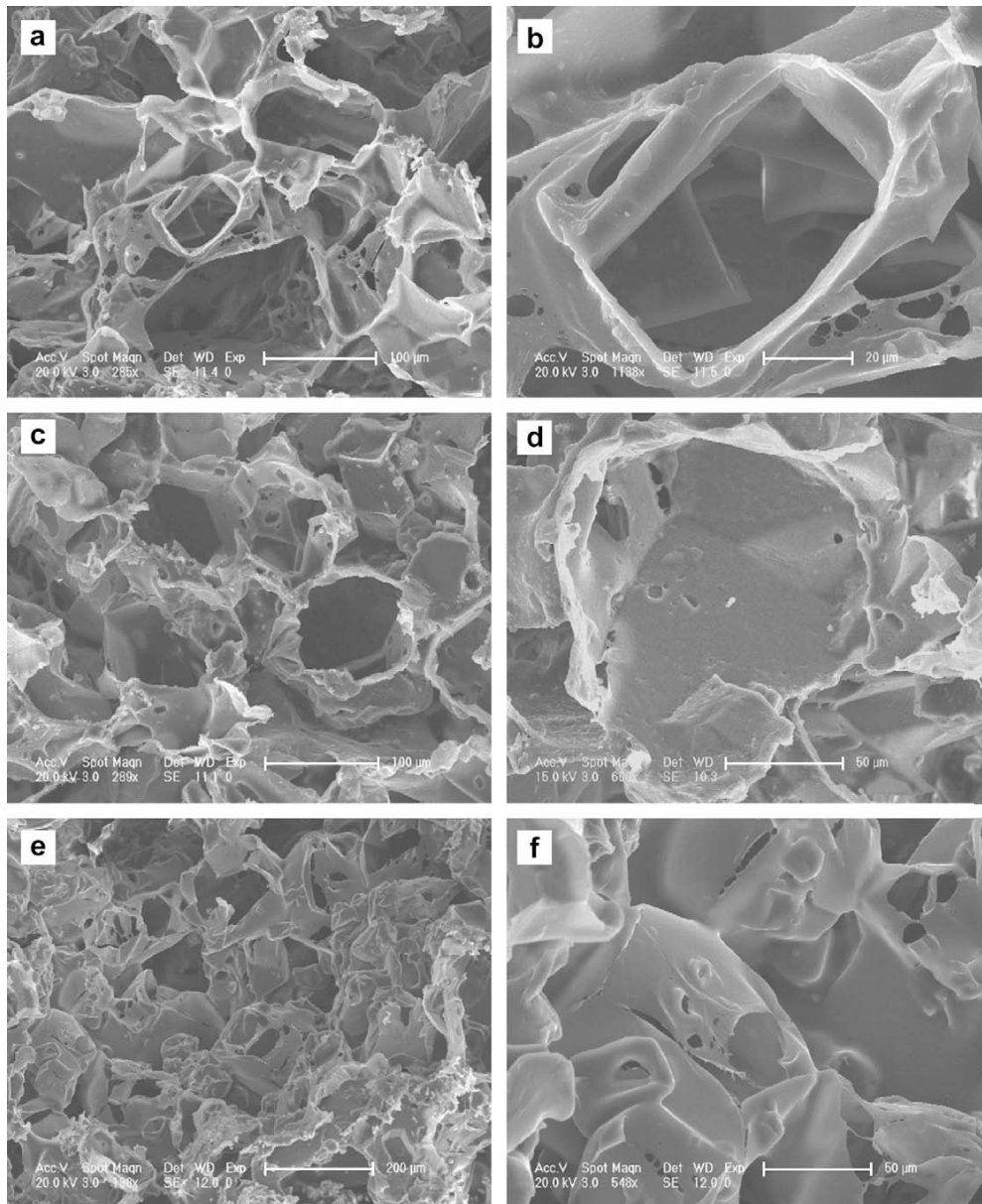


Tabella 3.2.1 – Immagini SEM di scaffolds porosi in g-nHAP-PLLA/PLGA (a-b), nHAP-PLLA/PLGA (c-d) e PLLA/ PLGA (e-f) fabbricati con la tecnica della fusione del solvente e dissoluzione del particolato. Le lunghezze delle barre sono 200 mm (e), 100 mm (a- c), 50 mm (d- f) e 20 mm (b). (dati tratti da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

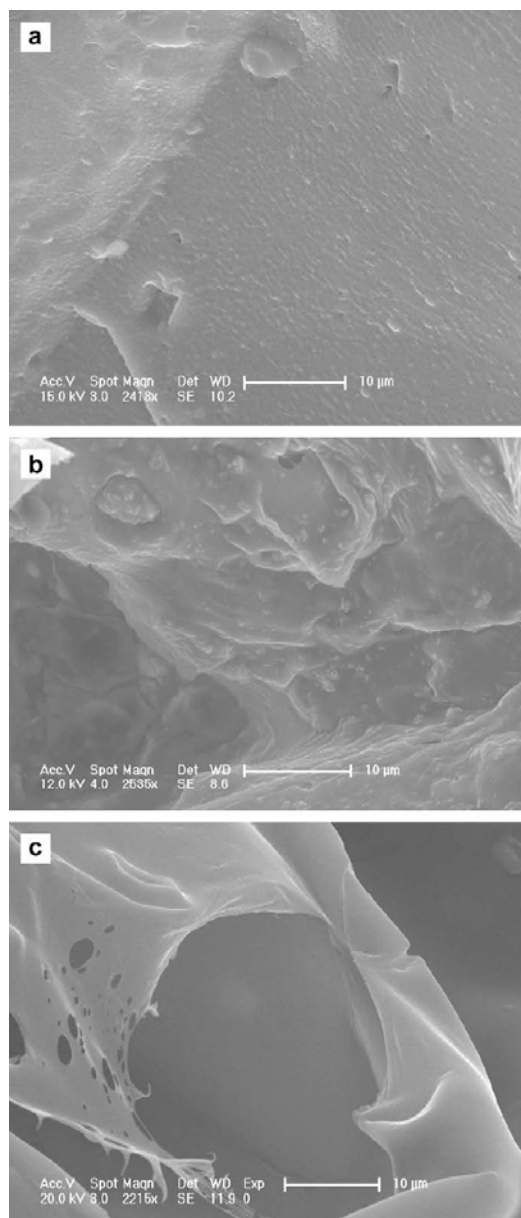


Figura 3.2.2 Immagini SEM della topografia delle pareti dei pori del composito g-nHAP-PLLA/PLGA a), nHAP-PLLA/PLGA (b) e PLLA/PLGA (c) dati tratti da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

Inoltre, un'altra questione da analizzare con notevole interesse è l'effetto apportato dalla modifica della superficie del composito nHAP-PLLA/PLGA mediante l'innesto di PLLA sulla nano idrossiapatite (g – nHAP). Si può notare che l'utilizzo di nano-drossiapatite innestata migliora la distribuzione delle particelle sulla superficie delle pareti dei pori rendendole più omogenee rispetto a quelle degli scaffolds non innestati ed in aggiunta ne aumenta la rugosità. Tutto ciò comporta un ulteriore miglioramento delle proprietà di

bioattività del composito portando a concludere che l'introduzione di g-nHAP sia una tecnica ancora più efficace e potente per produrre sostitutivi ossei sintetici che imitano il comportamento del tessuto biologico naturale.

### **3.2.2 Analisi post-operatorie: osservazione macroscopica, esame ai raggi X, analisi al SEM, analisi istologiche e discussione dei dati**

Come regolarmente previsto dalla sperimentazione, alcuni campioni sterilizzati di g-nHAP-PLLA/PLGA, nHAP-PLLA/PLGA e PLLA/PLGA (0.3 cm di spessore e 2 cm di lunghezza) vengono impiantati nel muscolo dorsale di 18 conigli ed in seguito rimossi rispettivamente alla 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> settimana dalla data dell'intervento al fine di valutare la biodegradazione e la mineralizzazione degli scaffolds in funzione del tempo di permanenza all'interno dei corpi delle cavie. La prima analisi da effettuare sui campioni estratti è un'indagine macroscopica dei materiali, consistente nella descrizione qualitativa di quanto estratto e sull'elaborazione dei dati così ricavati. In particolare, si può osservare che otto settimane dopo la chirurgia tutti gli impianti intramuscolari, sia in g-nHAP-PLLA/PLGA, sia in nHAP-PLLA/PLGA che in PLLA/PLGA, mantengono la loro forma originaria non presentando alcun segno di biodegradazione. I materiali estratti sono di color carne, indice che vi è un primo tentativo di vascolarizzazione delle strutture, ed inoltre risultano essere strettamente connessi ai tessuti muscolari limitrofi. A prima vista non sono visibili tessuti connettivi avvolti intorno agli impianti. Alla dodicesima settimana dopo la chirurgia, si presentano le prime differenze di comportamento dei materiali: gli impianti in nano composito g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA diventano di dimensioni leggermente inferiori rispetto alle iniziali ma non eccessivamente ridotte, mentre gli impianti in puro polimerico risultano estremamente sottili a causa della degradazione, a tal punto da fratturarsi in pezzi distinti. Alla ventesima settimana dopo l'intervento, nel caso di PLLA/PLGA gli scaffolds sono quasi completamente riassorbiti. Per quanto riguarda, invece, sia il composito g-nHAP-PLLA/PLGA che il composito nHAP-PLLA/PLGA, uno dei tre impianti si presenta in parte o completamente mineralizzato mentre gli altri spariscono, principalmente a causa della biodegradazione. L'impianto mineralizzato diventa duro e rigido e risulta difficile separarlo dai tessuti limitrofi (Figura 3.2.3).

Dall'analisi della morfologia dei campioni estratti si possono ricavare delle valutazioni piuttosto interessanti sui materiali: in primo luogo vengono confermati, anche da sperimentazione su modello animale, i vantaggi derivati dall'introduzione di nano-

idrossiapatite nei compositi [23] [24]. Nei casi studiati, infatti, l'inserimento del ceramico permette di ottenere scaffolds con ottime proprietà di biocompatibilità e bioattività, velocità di

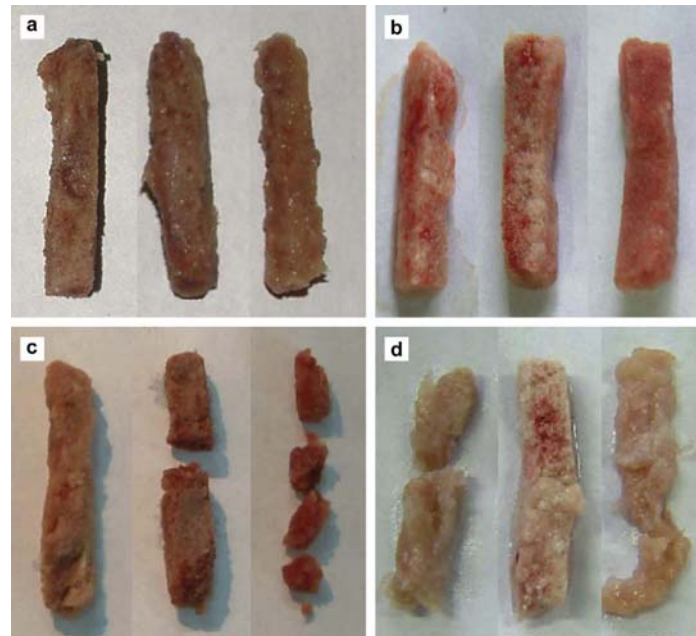


Figura 3.2.3 – Osservazione macroscopica di impianti in g-nHAP-PLLA/PLGA (primo a sinistra dei tre), nHAP-PLLA/PLGA (centrale) e PLLA/PLGA (ultimo a destra) estratti 4 (a), 8 (b), 12 (c) e 20 (d) settimane dopo l'intervento (dati tratti da "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)" Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

degradazione controllata ed elevata capacità osteoinduttiva. In particolare, tutti gli impianti rispondono bene dal punto di vista funzionale: essi vengono vascularizzati, mineralizzati e quindi degradati per lasciar posto a neoformazione ossea; si generano forti legami con i tessuti muscolari limitrofi e gli scaffolds risultano ben integrati ed accettati dall'ambiente biologico. Inoltre, è importante segnalare che non si riporta alcun caso di reazione infiammatoria né alcun caso di reazione da corpo estraneo nelle cavie e che le ferite si rimarginano gradualmente senza creare particolare danno. In aggiunta, la degradazione dei compositi viene visibilmente rallentata dal contenuto in nano HAP evitando la precoce perdita di funzionalità dell'impianto e, di conseguenza, perdita di stabilità dello stesso prima dell'effettiva guarigione del tessuto danneggiato, fatto che, purtroppo, si verifica nel caso dei campioni in polimerico PLLA/PLGA.

A livello macroscopico non si evidenziano differenze significative nel comportamento dei compositi g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA, tuttavia va sottolineato un



comportamento comune piuttosto strano ed interessante: in questo gruppo di campioni, solo uno dei tre impianti inseriti viene completamente mineralizzato (grazie all'attività degli osteoblasti) mentre gli altri due degradano all'interno dei fluidi biologici. Presumibilmente ciò è legato al numero di osteoblasti attivati che nel secondo caso sono insufficienti a garantire la mineralizzazione della struttura. Tuttavia l'indagine macroscopica è troppo limitata per dare una risposta concreta a tale fatto. Bisogna quindi proseguire con un'osservazione più approfondita dei campioni per valutare cosa accade alla struttura a livello microscopico.

Prima di procedere con tali indagini però, allo scopo di acquisire ulteriori informazioni, gli impianti intramuscolo in g-nHAP-PLLA/PLGA, nHAP-PLLA/PLGA e PLLA/PLGA vengono esaminati tramite radiografia computerizzata (CR) alla 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> settimana dopo l'intervento chirurgico. La Figura 3.2.4 mostra le radiografie dei tre impianti paralleli inseriti per ciascun materiale a differenti tempi di osservazione. Come si può notare dalle immagini radiografiche, alla quarta, ottava e dodicesima settimana dopo la chirurgia, gli impianti in g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA sono chiaramente visibili e mantengono la loro forma originaria. Tuttavia, in questi campioni non si notano segnali di evidente mineralizzazione. Si possono vedere solamente delle piccole formazioni ossee nelle zone danneggiate, in differenti gradi di mineralizzazione; il maggior quantitativo di nuovo osso formato si ha comunque nel gruppo di campioni sintetizzati in g-nHAP-PLLA/PLGA. In seguito, alla ventesima settimana dopo l'operazione, solo uno dei tre impianti esibisce chiari segni di mineralizzazione mentre gli altri perdono la forma originaria e diventano deboli a causa della degradazione all'interno dei fluidi biologici. Invece, per quanto riguarda i campioni in polimerico PLLA/PLGA, la forma degli impianti cambia leggermente dopo le prime otto settimane e palesemente alla dodicesima settimana dopo l'intervento chirurgico. Alla ventesima settimana l'effetto della degradazione biologica è preponderante: i campioni diventano incredibilmente deboli e poco visibili. Non sono mai evidenti segni di mineralizzazione: solo le aree dell'impianto vicine al tessuto limitrofo mostrano in alcuni casi un lievissimo e temporaneo irrigidimento. Tali comportamenti sono più chiaramente interpretabili valutando in associazione ad essi i risultati ottenuti dall'analisi mediante l'utilizzo di un microscopio a scansione elettronica (SEM). Come illustrato da Figura 3.2.5, otto settimane dopo l'intervento chirurgico tra l'impianto inserito e il tessuto muscolare limitrofo è ancora presente un vuoto chiaramente visibile in tutti e tre i tipi di materiale sperimentati.

Si possono però notare delle interessanti differenze di microstruttura: i campioni dei compositi g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA si presentano con una microstruttura

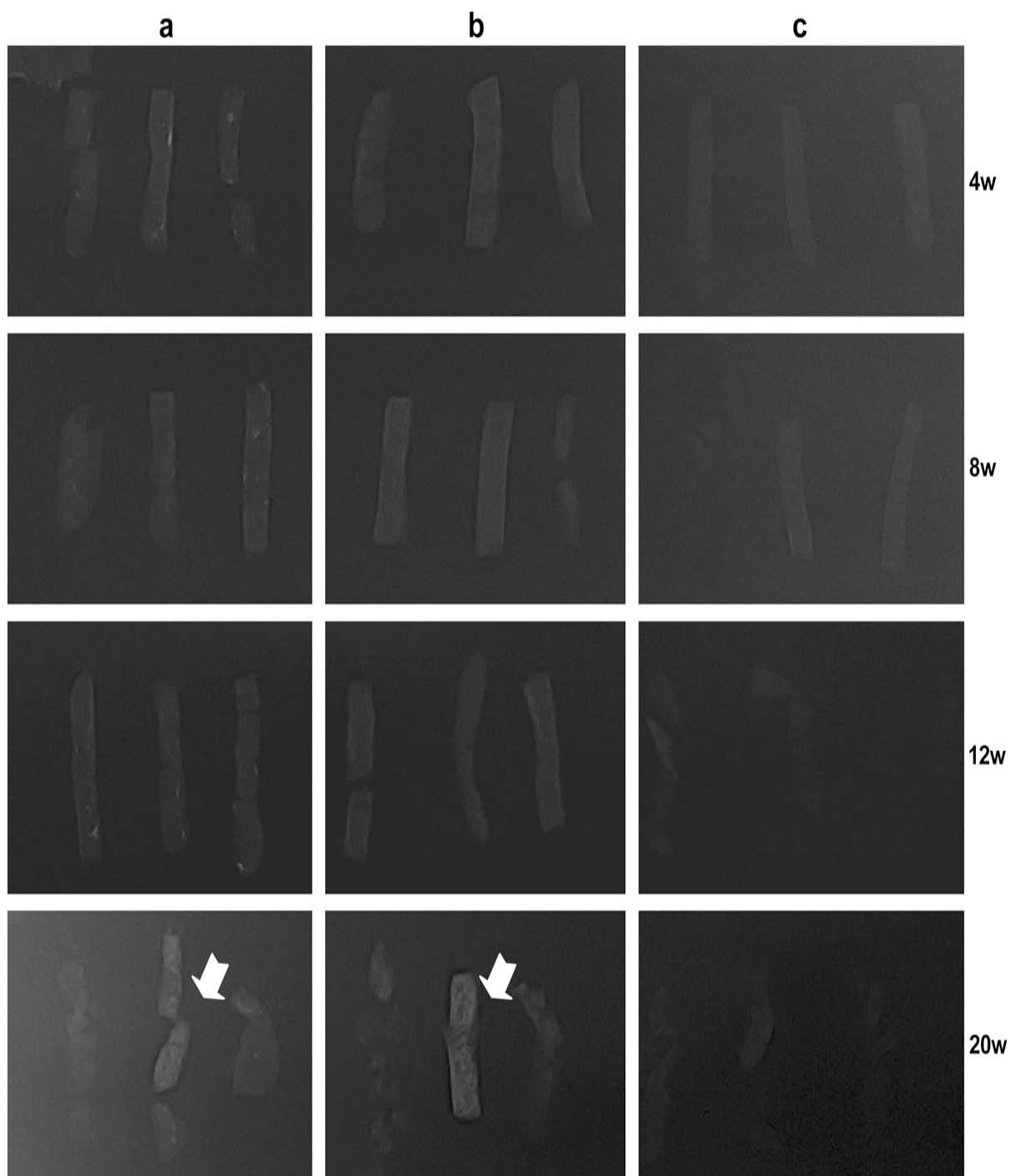


Figura 3.2.4 –Radiografie computerizzate che illustrano la mineralizzazione e l’osteogenesi degli impianti in g-*nHAP-PLLA/PLGA* (a), *nHAP/PLGA* (b) e *PLLA/PLGA* (c) a 4, 8, 12 e 20 settimane dalla chirurgia. Le frecce bianche indicano l’impianto mineralizzato del gruppo (dati tratti da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

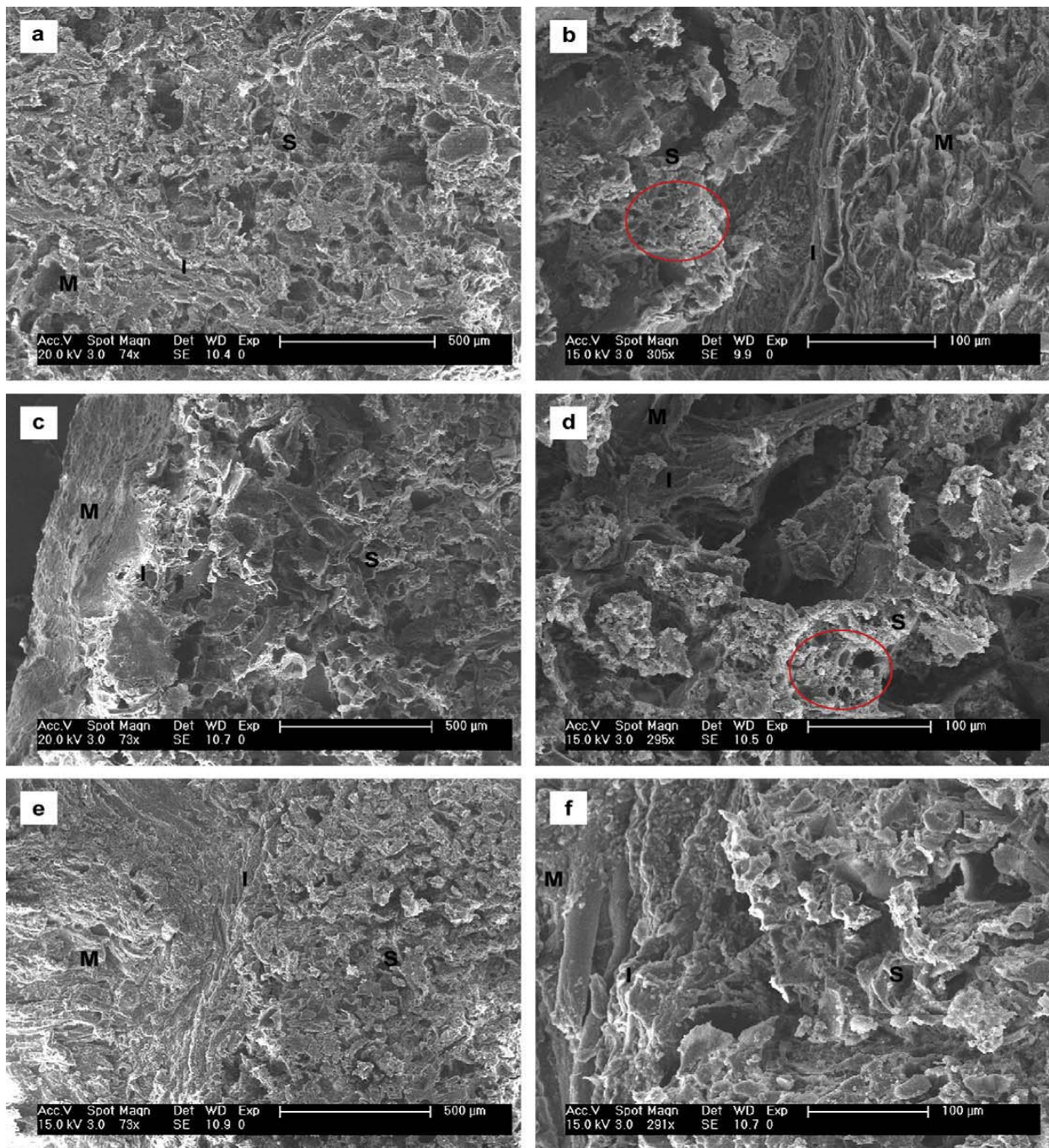


Figura 3.2.5 – Immagini SEM degli scaffolds porosi in g-nHAP-PLLA/PLGA (a;b), nHAP-PLLA/PLGA (c;d) e PLLA/PLGA (e;f) impiantati nelle cavie per otto settimane. La lettera S in figura indica l'area dell'impianto dello scaffold, M è l'area del tessuto muscolare e I rappresenta l'interfaccia tra impianto e tessuto. I cerchi rossi nelle immagini (b) e (d) evidenziano le aree di mineralizzazione. La lunghezza delle barre è 500 μm (a;c;e) e 100 μm (b;d;f) (dati tratti da "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)" Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

meno degradata rispetto al puramente polimerico PLLA/PLGA ed in particolare nel composito g-nHAP-PLLA/PLGA si possono contare un maggior numero di pori che

mantengono intatta la forma originaria. I pori degli scaffolds in PLLA/PLGA, invece, si deformano notevolmente e spesso spariscono a causa della biodegradazione. Inoltre, nei campioni in g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA si può notare una maggior deposizione minerale e una più larga area mineralizzata rispetto ai campioni in PLLA/PLGA. Sono presenti aree osteogeniche di mineralizzazione, caratterizzate da una struttura a nido d'ape con pochi macropori ( $> 5 \mu\text{m}$ ) e un'abbondanza di micropori ( $< 1 \mu\text{m}$ ). Ulteriori indagini sul livello di calcio e fosforo indicano che la concentrazione di queste sostanze in queste aree è significativamente più elevata rispetto ad altre aree. Tali zone non sono invece presenti nei campioni in PLLA/PLGA.

Le indagini CR e SEM svolte sostanzialmente confermano il comportamento dei materiali in precedenza valutato a livello macroscopico. Anche in questo caso, si può affermare che l'inserimento di g-nHAP e nHAP migliora fortemente la stabilità della matrice polimerica in PLLA/PLGA, permette una migliore integrazione dello scaffold all'interno dell'ambiente biologico e prolunga i tempi di degradazione dell'impianto, evitando problemi di perdita di funzionalità e instabilità del sito. L'idrossiapatite è assolutamente non tossica a livello locale e sistemico, non induce risposta infiammatoria né reazione da corpo estraneo ed è un materiale fortemente osteoinduttivo: essa entra a contatto con l'ambiente ricoprendosi di uno strato biologicamente attivo che genera forti legami e favorisce il processo di rimodellamento osseo. Ritornando ai dati, in vivo non si riscontrano evidenti differenze nel comportamento dei compositi g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA; tuttavia si ripresenta la strana mineralizzazione di un singolo impianto dei tre presenti nel muscolo e la dissoluzione dei rimanenti nei fluidi biologici. La risposta a tale particolare comportamento si può ottenere esaminando più accuratamente i campioni, tramite analisi istologiche svolte sugli impianti intramuscolari a otto settimane dall'operazione utilizzando due tipi di colorazione: ematossilina ed eritrosina (H&E) e tricromica di Masson.

Nelle indagini istologiche svolte con colorazione H&E, la struttura dei pori degli scaffold è chiaramente visibile in tutti gli impianti indipendentemente dal tipo di materiale in cui sono sintetizzati. Nei campioni in g-nHAP-PLLA/PLGA si può notare la presenza di un elevato numero di cellule giganti polinucleate situate sia sul margine che sulla superficie centrale degli impianti. All'interno dei pori e disposte a formare delle strisce attorno alle loro pareti si trovano, invece, cellule con nuclei densi e rotondi e nucleoli ben visibili, che si assemblano l'una con l'altra per formare una sorta di isolotti. Per quanto concerne gli impianti in nHAP-PLLA/PLGA, vi sono il medesimo tipo di cellule giganti polinucleate ma esse presentano, in generale, un maggior grado di necrosi. In alcuni punti sono infatti visibili nuclei irregolari e

indistinti. Nel caso del PLLA/PLGA, tali cellule non sono presenti del tutto. Nelle indagini con colorazione tricromica di Masson, invece, vengono poste ben in evidenza le componenti organiche della matrice extracellulare.

È interessante notare che nei campioni sintetizzati in g-nHAP-PLLA/PLGA sono presenti un maggior numero di fibre di collagene (colorate in verde scuro) rispetto ai campioni sintetizzati negli altri due materiali (Figure 3.2.6 e 3.2.7).

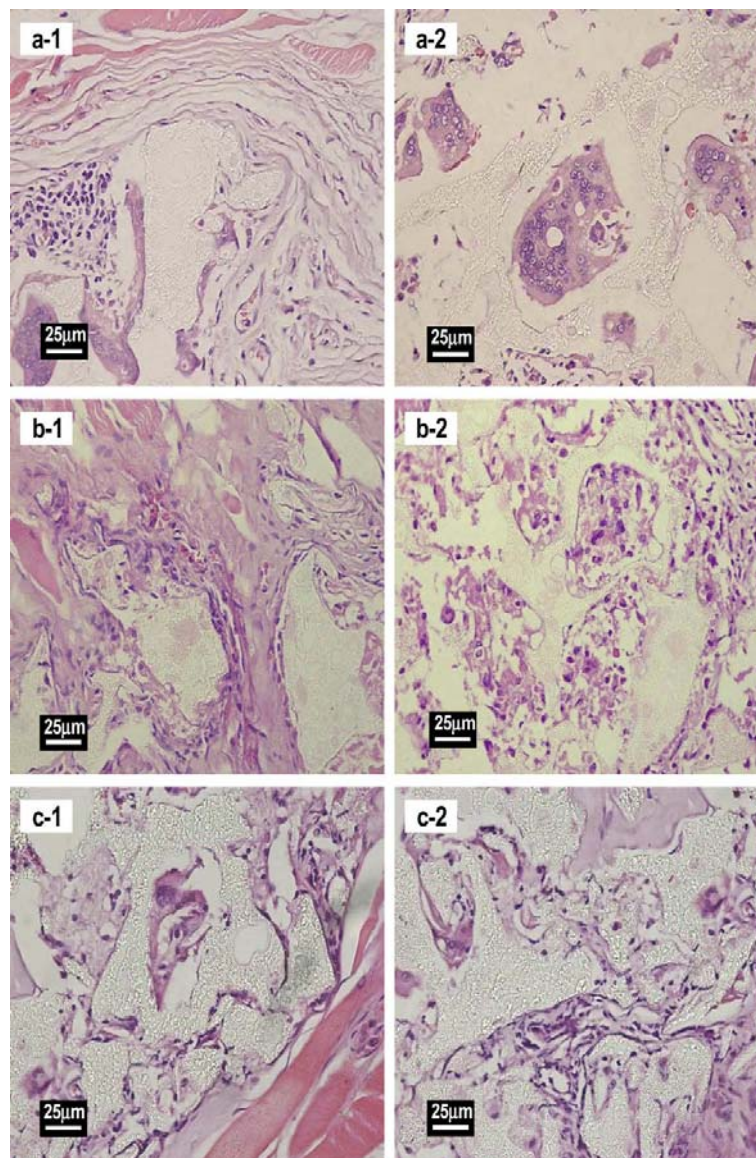


Figura 3.2.7 – Analisi istologiche realizzate con colorazione tricromica di Masson. G-nHAP-PLLA/PLGA (a, b), nHAP-PLLA/PLGA (c, d) e PLLA/PLGA (e, f). Il colore rosso indica il tessuto muscolare, il verde scuro le fibre di collagene e il giallo le cellule del sangue (dati tratti da “In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)” Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

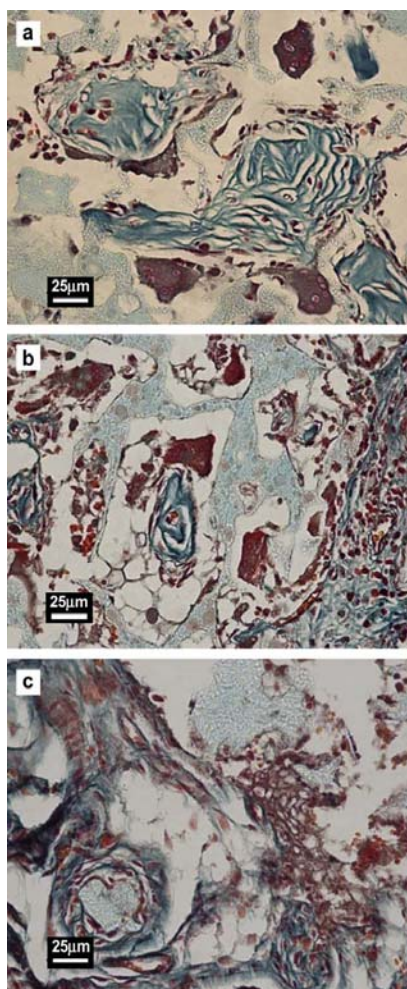


Figura 3.2.6 – Analisi istologiche di campioni in g-nHAP-PLLA/PLGA (a-1 ; a-2), nHAP-PLLA/PLGA (b-1 ; b-2) e PLLA/PLGA (c-1 ; c-2) impiantati intramuscolo per due mesi. Le immagini di sinistra (a-1, b-1, c-1) mostrano l'area adiacente all'impianto, mentre le immagini di destra (a-2, b-2, c-2) mostrano l'area centrale. La colorazione utilizzata è di tipo H&E (dati tratti da "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)" Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).

I risultati forniti dalle analisi istologiche permettono di elaborare interessanti valutazioni sui materiali: innanzitutto è possibile ottenere una motivazione più concreta e comprovata del particolare comportamento dimostrato da alcuni impianti in g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA in fase di mineralizzazione. Di tali impianti soltanto uno presenta evidenti segni del processo mentre i rimanenti risultano degradati dai fluidi biologici. Per motivare ciò è necessario ricordare che i fenomeni di dissoluzione e mineralizzazione sono legati alla presenza nel sito danneggiato di osteoblasti e osteoclasti attivi: gli osteoclasti sono sincizi polinucleati di grandi dimensioni che una volta attivati hanno il compito di riassorbire il tessuto osseo danneggiato mediante dissoluzione e fagocitosi; gli osteoblasti, invece, sono cellule tondeggianti di grande dimensione, contenenti un solo nucleo e numerosi organelli,

con il compito di sintetizzare la parte organica della matrice extracellulare del nuovo tessuto osseo e, una volta terminato il compito, differenziarsi in osteociti che andranno a comporre il nuovo tessuto.

Le analisi istologiche svolte sugli impianti mettono in evidenza la presenza sparsa di osteoclasti, mentre la presenza di osteoblasti risulta molto più limitata: in particolare essi si situano all'interno dei pori o in zone limitrofe. Una motivazione plausibile al particolare comportamento di alcuni impianti citato in precedenza, è data quindi dal fatto che per tali campioni non vi è il numero sufficiente di osteoblasti necessario ad attivare il processo di mineralizzazione; prevale dunque l'azione degli osteoclasti e gli impianti vengono riassorbiti. Inoltre, si può notare che la presenza di osteoclasti attivi è ben visibile negli impianti sintetizzati con materiali contenenti nano-idrossiapatite, mentre non vi è traccia della loro presenza negli impianti realizzati in composito puramente polimerico PLLA/PLGA. Ciò indica che in questi ultimi il processo di rimodellamento osseo non è attivo e che dunque impianti in materiale puramente polimerico non possiedono capacità osteoinduttive tali da garantire lo sviluppo di nuova formazione ossea, perlomeno in tempi brevi (osservazione avvenuta ad otto settimane dall'intervento chirurgico). Viene nuovamente comprovato che è proprio la presenza di nano-idrossiapatite a migliorare drasticamente le prestazioni del materiale: in particolare, esaminando le neoformazioni ossee prodotte nei siti danneggiati e riparati con sostitutivi in g-nHAP-PLLA/PLGA e nHAP-PLLA/PLGA, si può notare che il nuovo osso formato è effettivamente sano. Esso infatti possiede la tipica struttura dell'osso lungo, composto da uno stelo tubulare avente una corteccia continua e spessa e una cavità midollare riempita da midollo osseo per tutta la lunghezza dello stelo (Figura 3.2.8). Si può dunque concludere che l'introduzione di nano idrossiapatite consente di migliorare drasticamente le proprietà di bioattività del composito e, poiché gli osteoblasti sono cellule ancoraggio-dipendenti, porta anche ad un conseguente aumento di osteoinduttività del materiale [25]. Le inserzioni in ceramico permettono infatti di evitare l'immediata degradazione della struttura porosa degli scaffolds, favorendo la migrazione, adesione e proliferazione degli osteoblasti all'interno dei pori, la cui morfologia risulta poco alterata. Inoltre, la nano idrossiapatite è in grado di richiamare osteoblasti ed osteoclasti presenti nel tessuto limitrofo anche in virtù della stretta somiglianza alla componente ceramica dell'osso naturale; tuttavia la scelta di composizione percentuale fatta in questa sperimentazione (10% in peso di nHAP rispetto al peso totale) penalizza i risultati. Un quantitativo di ceramico superiore sarebbe stato sufficiente ad ottenere una migliore mineralizzazione degli impianti intramuscolari inseriti.

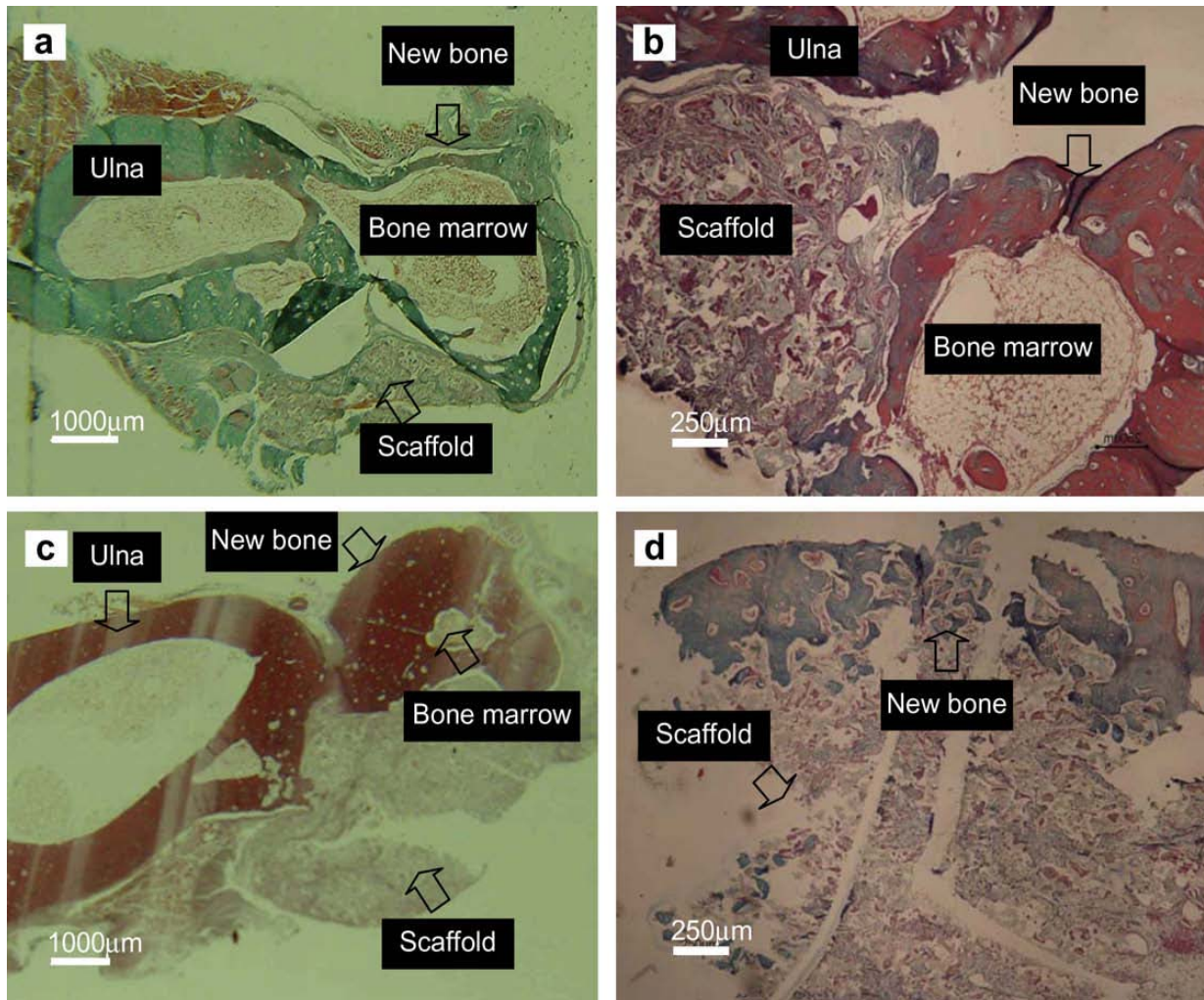


Figura 3.2.8 – Microfotografia in sezione verticale dei siti ossei danneggiati del radio impiantati con g-nHAP-PLLA/PLGA trattato con BMP-2 (a), g-nHAP-PLLA/PLGA (b), nHAP-PLLA/PLGA (c) e PLLA/PLGA (d) a 8 settimane dopo la chirurgia. La freccia più grande indica l'interfaccia tra lo scaffold e la neoformazione ossea; la freccia più piccola rappresenta invece l'orientazione degli assi del nuovo osso formato. La colorazione utilizzata è la tricromica di Masson (dati tratti da "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)" Peibiao Zhang, Zhongkui Hong, Ting Yu, Xuesi Chen, Xiabin Jing – *Biomaterials* 30(2009) 58-70).



## 4. CONCLUSIONE

Obiettivo dell'analisi svolta è quello di studiare dettagliatamente il comportamento, in vitro ed in vivo, del composito biorassorbibile nano idrossiapatite – acido polilattico (nHAP-PLLA) al fine di valutare sue possibili applicazioni nel campo biomedicale della riparazione di tessuto osseo. Considerando i risultati forniti dai test in laboratorio e dalle sperimentazioni su modello animale si possono trarre alcune conclusioni: in particolare, tutti i dati analizzati mettono chiaramente in evidenza il fatto che il composito nHAP-PLLA è un efficiente e sicuro candidato per la produzione di dispositivi per sostituzione e fissaggio di ossa. Esso, infatti, possiede tutti i requisiti richiesti e permette di ovviare alle principali problematiche riscontrabili in tale tipologia di applicazioni biomedicali.

Innanzitutto, scaffold in nHAP-PLLA sono estremamente efficienti poiché possiedono ottime proprietà fisiche e meccaniche: se vengono utilizzate tecniche di produzione adeguate (es. TIPS, tecnica di fusione del solvente e dissoluzione del particolato, ecc. ), si ottengono dispositivi che garantiscono solidità e stabilità degli impianti e allo stesso tempo, grazie alla bassa densità del materiale, leggerezza degli stessi. Dispositivi in nHAP-PLLA hanno buona resistenza alla compressione, alla trazione, all'usura e, soprattutto, modulo elastico comparabile a quello del tessuto osseo naturale (Tabella 4.1). Nel momento in cui si va ad impiantare il materiale all'interno del tessuto non si genera, quindi, una forte discordanza tra la rigidità ossea e quella dell'impianto e, dato che la quantità di stress meccanico supportata è strettamente legata alla rigidità del mezzo, l'osso risulta caricato in maniera adeguata. I risultati della sperimentazione in vivo concordano con quanto appena affermato: in tutti i casi valutati gli impianti risultano ben integrati e legati ai tessuti naturali limitrofi e, in particolare, non si verificano problemi di mobilizzazione asettica derivati da *stress shielding*, né casi di atrofizzazione delle neoformazioni ossee.

	Modulo elastico	Resistenza alla trazione
Osso Corticale	17.7 GPa	133 MPa
nHAP – PLLA	10.0 GPa	140 MPa

Tabella 4.1 - Proprietà meccaniche dell'osso corticale e del composito nHAP-PLLA a confronto (tratto da: Seeram Ramakrishna et al. "An introduction to biocomposites, Volume 1", Imperial College Press, 2004 – pag.7).

In aggiunta, efficienza e sicurezza di dispositivi realizzati in nHAP-PLLA sono garantite da ottimali caratteristiche di biocompatibilità, riassorbibilità e attività biologica. Come confermato dai test in vitro ed in vivo, gli scaffold sono facilmente metabolizzati dall'organismo mediante processi di dissoluzione nei fluidi biologici, con cinetica di riassorbimento controllata (all'incirca 5-6 mesi) che dipende da composizione, forma, struttura ed estensione della superficie di interfaccia dell'impianto. In particolare, il composito nHAP-PLLA innestato degrada in componenti assolutamente non citotossiche, a livello sia locale che sistemico, e in nessuno dei casi studiati si sono riscontrate risposte infiammatorie o reazioni da corpo estraneo. Non vi è, inoltre, produzione di strati fibrosi attorno agli impianti ma, anzi, essi forniscono risposta funzionale ottima: vengono vascolarizzati, mineralizzati e quindi degradati per lasciar posto a neoformazione ossea; si generano forti legami con i tessuti limitrofi e gli scaffold risultano ben integrati ed accettati dall'ambiente biologico (si ricorda che affinché tutto ciò avvenga è necessario che il quantitativo di nano HAP usato nel composito sia sufficientemente elevato).

Infine, il composito nHAP-PLLA fornisce anche una serie di vantaggi strettamente legati alla sua componente polimerica: in particolare, si possono verificare assenza di corrosione, assenza degli effetti della fatica, alta processabilità tecnologica e, data la radiotrasparenza, compatibilità con le moderne tecniche di monitoraggio diagnostico (tomografia computerizzata e risonanza magnetica).

Concludendo dunque, valutate le suddette proprietà fisiche, chimiche, meccaniche, la biocompatibilità e quanto finora riportato, è possibile affermare che il composito biorassorbibile nHAP-PLLA è uno tra i migliori materiali, attualmente sperimentati, per la produzione di dispositivi biomedicali per sostituzione e fissaggio del tessuto osseo danneggiato.

#### **4.1 Vantaggi apportati dalla nano struttura**

La principale peculiarità del composito nHAP-PLLA è rappresentata dalla scelta di utilizzare componenti in idrossiapatite di dimensione nanometrica in fase di produzione del materiale. Tale idea nasce allo scopo di creare una struttura biorassorbibile che interagisca e si integri con il tessuto biologico danneggiato, avendo comportamento e, soprattutto, morfologia somigliante all'osso naturale. In tal senso, l'uso di componenti in nano idrossiapatite permette di raggiungere gli obiettivi prefissati e migliorare sensibilmente le già ottimali prestazioni fornite da sostitutivi ossei prodotti in micro idrossiapatite e acido poli-L-lattico.

Un primo ed importante vantaggio garantito dall'introduzione di nano HAP all'interno del composito è dato dalla possibilità di sintetizzare dispositivi biomedicali con ottime proprietà fisiche, chimiche ed in particolare meccaniche, tali da emulare l'aspetto dell'osso biologico (forma e dimensioni della struttura) e, in certa misura, il comportamento meccanico del tessuto. L'ottenimento di dispositivi con queste fondamentali ed interessanti caratteristiche è permesso dalla banale imitazione di alcune delle peculiarità stesse dell'organismo: in natura, infatti, intrecciati e impaccati nelle fibrille di collagene che compongono le lamelle ossee, sono presenti numerosi cristalli di idrossiapatite di forma piatta o sferica con dimensioni caratteristiche comprese tra i 30 e i 120 nanometri; la presenza di suddetti nano minerali risulta fondamentale a determinare il comportamento dell'osso in termini di proprietà meccaniche e possiede un ruolo fondamentale nel processo di rimodellamento del tessuto. Dunque, l'introduzione di nano idrossiapatite sintetica nel composito, proprio perché essa possiede le medesime dimensioni del ceramico naturale, permette di produrre strutture con simili caratteristiche, sia morfologiche che meccaniche. Il risultato finale di tale applicazione è un miglioramento generale della capacità di integrazione degli impianti con l'ambiente circostante: essi vengono accettati in maggior misura da parte dell'organismo e, dal punto di vista meccanico, permettono il superamento di importanti problematiche causate da sensibili differenze nel comportamento di quanto impiantato e tessuti limitrofi (ad esempio il fenomeno dello stress shielding e la mobilitazione asettica).

Proseguendo nell'analisi delle caratteristiche del materiale, un altro vantaggio apportato dall'inserimento di idrossiapatite di dimensione nanometrica nel composito è un notevole miglioramento delle proprietà di bioattività e di osteoinduttività della struttura. La variazione della dimensione dei cristalli di ceramico risulta, infatti, inscindibilmente legata alle suddette caratteristiche e, di conseguenza, ne comporta delle fondamentali modifiche. In particolare, l'utilizzo di nano componenti in idrossiapatite permette di diminuire il volume della singola particella inserita con la conseguente generazione, a livello globale, di un forte aumento della superficie di ceramico in contatto con i fluidi biologici. Ciò induce un notevole incremento di bioattività del composito: la nano idrossiapatite è, infatti, in grado di creare legami meccanici tra materiale impiantato ed osso limitrofo ed un aumento della superficie libera sulla quale creare tali legami comporta, di conseguenza, un aumento del numero degli stessi. In generale, dunque, si ottiene un miglioramento della bioattività della struttura. In particolare poi, dato che i legami meccanici avvengono soprattutto con gli osteoblasti presenti all'interno del tessuto osseo limitrofo all'impianto, all'incremento di bioattività consegue anche un incremento di osteoinduttività del materiale. Si ha, infatti, un maggior numero di osteoblasti

che aderiscono al substrato impiantato: essi si attivano e si differenziano in quantità superiori, favorendo così il processo di neoformazione ossea naturale nel paziente. Il risultato finale è, quindi, quello di avere una stimolazione del processo di rimodellamento osseo che permette l'autoriparazione della lesione da parte dell'organismo.

Vi è poi una serie di ulteriori vantaggi dovuti all'utilizzo di nano idrossiapatite nel composito nHAP-PLLA: innanzitutto, la diminuzione della dimensione dell'inserzione risulta fondamentale per ottenere migliori prestazioni nel biorisorbimento. Tipicamente la HAP è facilmente metabolizzata dall'organismo mediante processi di dissoluzione nei fluidi biologici e fagocitosi per mezzo degli osteoclasti. Proprio in quest'ultimo processo, le nano particelle penetrano più agevolmente all'interno delle cellule, sia mediante fagocitosi che per pinocitosi con trasporto all'interno dell'osteoclasto mediante vescicole rivestite di clatrina. Di conseguenza, quindi, esse vengono facilmente e completamente riassorbite dall'organismo. Tale fenomeno è estremamente interessante poiché permette di studiare la produzione di impianti in nHAP-PLLA con cinetica di riassorbimento controllata, più veloce della micro idrossiapatite ma più lenta della cinetica del puro polimero. Possono così essere sviluppati dispositivi che degradano dopo 5-6 mesi di permanenza all'interno dell'organismo, garantendo che la struttura ossea da riparare risulti caricata sempre in maniera adeguata con una quantità di stress meccanico proporzionale allo step di guarigione dell'osso.

In aggiunta, la riduzione delle dimensioni del particolato favorisce anche crescita e proliferazione degli osteoblasti. Mediante il medesimo tipo di meccanismo descritto per gli osteoclasti, la nano idrossiapatite può infatti penetrare anche all'interno degli osteoblasti stimolandone l'attività biologica. L'origine di quest'effetto è dovuta agli ioni calcio ( $Ca^{2+}$ ) liberati durante la digestione da parte dei lisosomi cellulari: lo ione  $Ca^{2+}$  ha un importante ruolo di secondo messaggero nella cellula ed in generale un aumento della sua concentrazione citoplasmatica favorisce i processi di eccitazione cellulare ed attività. Tuttavia, quantità eccessive di calcio intracellulare attivano una cascata enzimatica che distrugge il citoscheletro portando alla morte della cellula; dunque, va prestata attenzione al fatto che la quantità di nano idrossiapatite inserita nel composito nHAP-PLLA deve essere sufficientemente elevata da produrre effetto ma non a tal punto da danneggiare gli osteoblasti del tessuto osseo del paziente.

Ulteriori vantaggi apportati dall'utilizzo di nano idrossiapatite nel composito sono legati, ancora, alla porosità e anisotropia della struttura così sintetizzata. Infatti, in particolare nelle tecniche di produzione del materiale che utilizzano la fusione dei singoli componenti e la loro successiva cristallizzazione (metodologie tipicamente usate per la creazione di scaffolds per

ingegneria tissutale), la dimensione nanometrica del particolato genera un miglioramento delle suddette proprietà. Per quanto riguarda l'aumento di porosità della struttura, esso è dovuto al fatto che l'introduzione di HAP di dimensioni ridotte perturba la cristallizzazione del materiale in minor misura, producendo una struttura finale con pori più regolari e presenti in numero maggiore. L'aumento della porosità del composito nHAP-PLLA è una caratteristica estremamente desiderabile poiché necessaria per facilitare la migrazione, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti in vivo, assicurando la formazione di nuovo tessuto. Un'elevata porosità è dunque buon indice di bioattività ed osteoinduttività del materiale. In aggiunta, la dimensione delle particelle di idrossiapatite è legata anche all'anisotropia del composito. Ipotizzando di utilizzare una tecnica di produzione che permetta di sintetizzare dispositivi con proprietà di spiccata anisotropia (es. metodo TIPS liquido-solido), durante il processo produttivo le dimensioni inferiori dell'idrossiapatite sono in grado di garantire una drastica riduzione della perturbazione apportata al sistema (ciò anche nei casi in cui la percentuale di nHAP utilizzata sia elevata); viene in tal modo prodotto un materiale che risulta essere effettivamente anisotropo con proprietà dipendenti dalla metodologia di produzione utilizzata. In particolare, è interessante notare che, variando le condizioni alle quali avviene la cristallizzazione del materiale, è possibile modificare le caratteristiche di anisotropia del prodotto finale, ottenendo la possibilità di sintetizzare materiali con ortotropia simile a quella dei tessuti ossei che essi andranno a sostituire. Un grande vantaggio apportato dalla dimensione nanometrica delle inserzioni in ceramico è, quindi, quello di garantire la possibilità di ottenere un sostitutivo osseo ortotropo, con anisotropia somigliante a quella del tessuto osseo biologico.

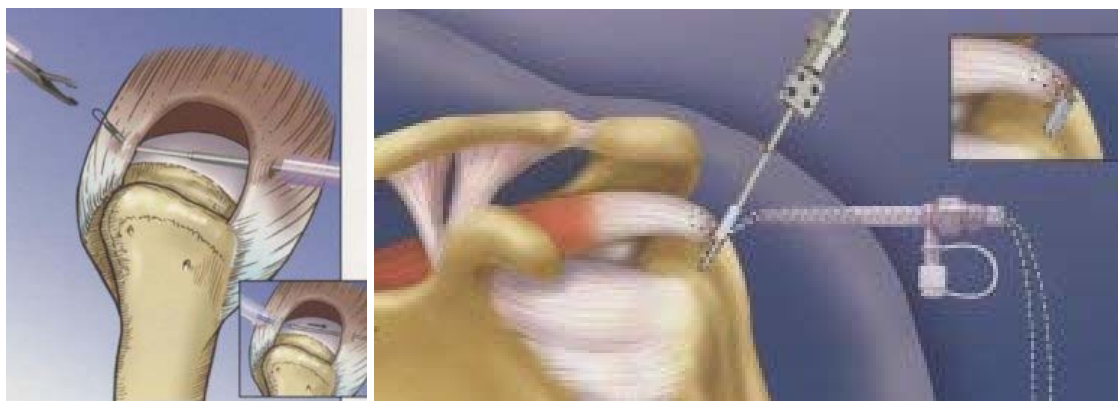
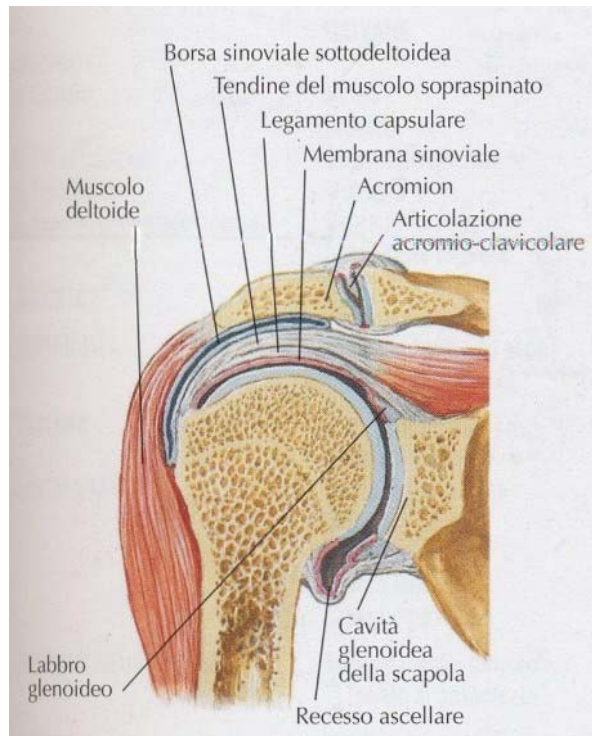
Valutando quanto finora riportato, in conclusione, si può dunque affermare che l'uso di componenti in nano idrossiapatite all'interno composito biorassorbibile nHAP-PLLA permette di produrre dispositivi biomedicali per sostituzione e fissaggio ossei che garantiscono efficienza, sicurezza e prestazioni ottimali in termini di proprietà fisiche, chimiche, meccaniche e di biocompatibilità del composito. Tale grado di ottimizzazione dipende proprio dalle dimensioni delle inserzioni in idrossiapatite utilizzate la cui dimensione nanometrica risulta essere fondamentale e caratterizzante per il comportamento del materiale.

## **4.2 Possibili applicazioni del composito nHAP-PLLA**

Il composito biorassorbibile nHAP- PLLA trova ampio utilizzo nel settore delle applicazioni biomedicali ortopediche. Esso risulta largamente adoperato, sia come composito che nelle sue singole componenti, per fissaggio e sostituzione del tessuto osseo danneggiato grazie alle

garanzie fornite dal materiale in termini sicurezza del paziente, efficienza dei dispositivi nelle aree trattate e prestazioni ottimali per quanto concerne proprietà fisiche, chimiche, meccaniche e di biocompatibilità. In particolare, si possono distinguere due principali settori di applicazione ortopedica del composito: in primo luogo esso viene utilizzato nelle innovative tecniche di fissaggio osseo interno con produzione di chiodi, viti e placche da innestare nel tessuto danneggiato allo scopo di fornire iniziale rigidità e stabilità all'impianto per poi, essendo i fissaggi riassorbiti, trasferire gradualmente il carico al tessuto in via di guarigione. In secondo luogo, il composito nHAP-PLLA suscita grande interesse nel settore dell'ingegneria tissutale, soprattutto per la produzione di osso ingegnerizzato. Esso viene utilizzato come sostitutivo artificiale in interventi di ricostruzione in caso di ampie perdite di sostanza conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, lesioni derivate da asportazione di tumori ossei, ricostruzione maxillo-facciale e anche in caso di mobilizzazione di impianti ortopedici [26] [27].

Per quanto concerne la prima tipologia di dispositivi, un nuovo campo in cui si sta attualmente sperimentando l'uso di nHAP-PLLA ed in cui si prevedono innovativi sviluppi è quello della produzione di dispositivi biomedicali con il compito di collegare e fissare i tessuti molli all'osso. In particolare, l'utilizzo di nano-idrossiapatite sembra aprire interessanti scenari soprattutto nel trattamento delle lesioni di tendini e legamenti nella spalla e nella ricostruzione del legamento crociato anteriore del ginocchio. Ad esempio, nel settore ortopedico della spalla, una tra le innovative idee che stanno lentamente prendendo piede è quella di utilizzare nHAP-PLLA per lo sviluppo di ancorette di sutura biorassorbibili atte a facilitare la riparazione e la ricostruzione di lesioni labiali e della cuffia dei rotatori (Figura 4.2.1). Tali dispositivi possono rappresentare, infatti, una valida alternativa all'uso di chiodini e viti in metallo attualmente adoperati per il fissaggio della componente tendinea innestata sull'osso. In particolare, le ancorette in nHAP-PLLA eliminano la necessità della realizzazione di suture passanti attraverso tunnel ossei, alleggerendo l'impatto dell'intervento chirurgico sul paziente, e l'innovazione apportata dall'inserimento di nano-idrossiapatite garantisce ottima biocompatibilità ed attività biologica dell'impianto con una conseguente migliore integrazione e produzione di neoformazione ossea che stabilizza la struttura. Ulteriori vantaggi offerti dall'utilizzo delle ancorette in nHAP-PLLA sono dati, ancora, dal riassorbimento delle stesse che rende la chirurgia di revisione meno complicata, poiché non risulta più necessario rimuovere il mezzo di sintesi precedentemente impiantato. Inoltre, il fissaggio osseo realizzato in tal modo non oscura l'anatomia della struttura, come evidenziato



*Figura 4.2.1 – Sopra: anatomia dell'articolazione della spalla; la cuffia dei rotatori è l'insieme dei tendini che si inseriscono sulla testa omerale e lavorano nello spazio sottostante. Sotto: immagini schematiche della riparazione artroscopia della lesione della cuffia dei rotori, spalla. (tratto da [www.hesperia.it](http://www.hesperia.it) – informazioni divulgate dal comitato scientifico dell'ospedale).*

dalle radiografie, ed è pertanto compatibile all'utilizzo dei moderni strumenti diagnostici di risonanza magnetica e tomografia computerizzata, qualora risultasse necessaria una valutazione post-operatoria dell'articolazione colpita. In caso di errore di posizionamento del dispositivo durante l'intervento chirurgico, le ancorette biorassorbibili in nHAP-PLLA possono semplicemente essere estratte anziché svitare o fatte passare attraverso il foro, come è invece necessario nel caso delle viti metalliche ed infine, in questo tipo di dispositivi, le sollecitazioni vengono trasferite gradualmente ai tessuti in via di guarigione mentre viene stimolata la produzione di neoformazione ossea che stabilizza l'interfaccia osteo-tendinea.

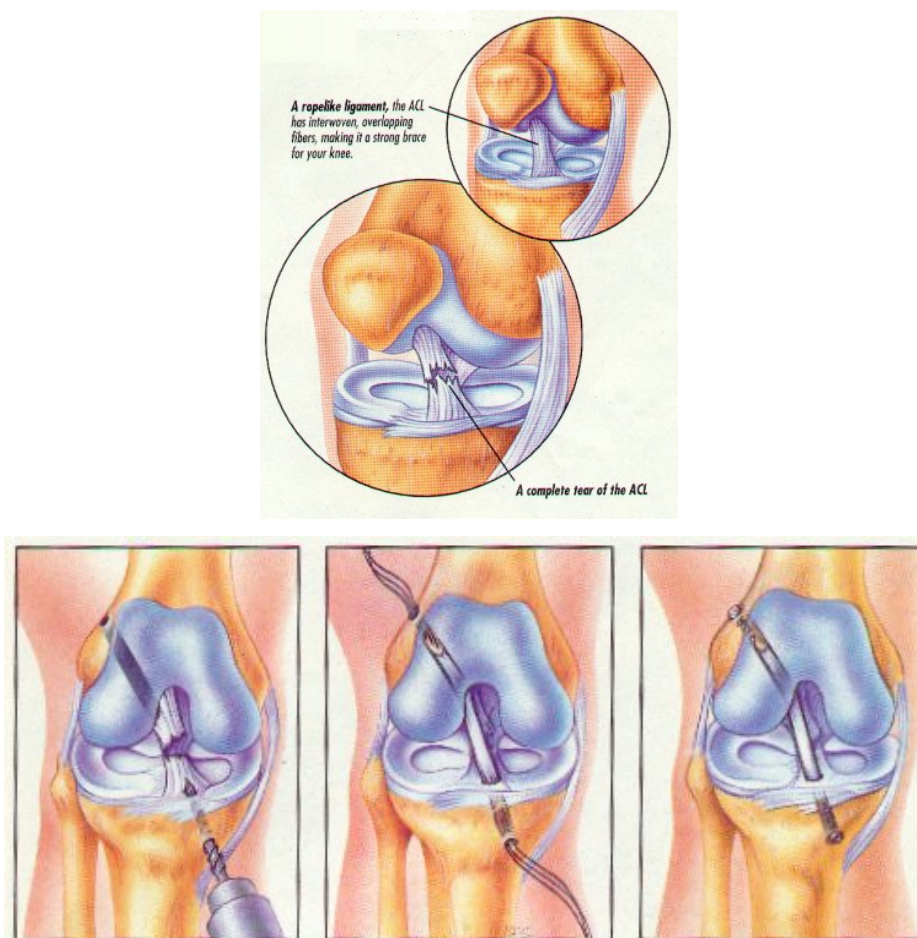
L'utilizzo di nHAP-PLLA sembra quindi essere una possibilità particolarmente interessante per tali applicazioni.

Rimanendo nell'ambito del settore della chirurgia della spalla, con l'obiettivo di riparare più agilmente lesioni della cuffia dei rotatori, oltre alle ancorette per sutura, recentemente sono stati messi a disposizione dei medici anche viti e rondelle in composito biorassorbibile nHAP-PLLA. L'idea innovativa nell'utilizzo del materiale è quella di arrivare ad una riparazione tendine-osso in completa assenza di sutura, allo scopo di ridurre le complicazioni dovute alla formazione di punti deboli nell'interfaccia con il tendine. Infatti, passando dal tessuto molle all'osso (mezzi con caratteristiche meccaniche estremamente differenti) la distribuzione delle tensioni risulta essere molto elevata, a tal punto da generare il possibile cedimento della sutura e quindi il fallimento del fissaggio. L'impianto di viti e rondelle in nHAP-PLLA offre il vantaggio di aumentare la superficie di contatto tra il tendine e l'osso e di stimolare la mineralizzazione della struttura, fenomeno che può rappresentare un importante aiuto nella stabilizzazione dell'interfaccia. Tuttavia, a livello attuale, non sono ancora disponibili risultati di studi su larga scala di tale applicazione. Viti e rondelle sono invece commercializzate ed utilizzate in puro materiale polimerico con risultati interessanti delle applicazioni ma non ancora ottimizzati (ad esempio viti Bio-Headed Corkscrew, Arthrex; Biocuff Screw, Bionx; Biotwist, Linvatec, Naples, Fla).

Ulteriori proposte innovative riguardanti applicazioni di dispositivi biomedicali in nHAP-PLLA sono state avanzate nel campo ortopedico del ginocchio, per quanto concerne la ricostruzione del legamento crociato anteriore (Figura 4.2.2). In passato, in tale campo i dispositivi atti a fissare l'innesto per la ricostruzione del legamento venivano fabbricati con materiali non biorassorbibili, come metalli e plastiche; recentemente si è invece compreso che l'utilizzo di un composito biorassorbibile, come ad esempio nHAP-PLLA, permette di ovviare alle problematiche introdotte dall'utilizzo dei precedenti materiali. Innanzitutto, applicazioni in nHAP-PLLA sono radiotrasparenti: diventa, dunque, piuttosto semplice valutare lo stato post-operatorio delle lesioni del legamento mediante strumenti diagnostici come la risonanza magnetica e la tomografia computerizzata. Inoltre, il riassorbimento elimina il problema della successiva rimozione del fissaggio che costringe invece il paziente a sottoporsi ad un secondo e fastidioso intervento chirurgico. In aggiunta, l'introduzione di nHAP all'interno delle viti permette di aumentare la forza di fissaggio dell'innesto all'osso e garantisce una fondamentale caratteristica di stabilità nel periodo iniziale, degradandosi lentamente fino ad arrivare all'integrazione ossea dell'innesto. Studi svolti da ricercatori dimostrano che questo periodo varia da 6 settimane, nelle quali avviene la fissazione osso-



tendine e rotuleo-osso, a circa 12-16 settimane, nelle quali avviene la stabilizzazione dei muscoli posteriori della coscia. Le viti devono, dunque, mantenere potenzialmente tutta la loro integrità strutturale durante l'intero lasso di tempo. Ciò è permesso proprio dall'introduzione della nano idrossiapatite: essa rallenta la cinetica di degradazione dell'acido polilattico ed, inoltre, migliora la bioattività e l'osteoinduttività del dispositivo di fissaggio, garantendo una migliore integrazione con la struttura ossea circostante. In particolare, la composizione delle viti va studiata in maniera tale da realizzare impianti con forze di tensione iniziali di circa 500 N, tipicamente generate nelle attività quotidiane.



*Figura 4.2.2 – Sopra: anatomia schematizzata del ginocchio con lesione del legamento crociato anteriore. Sotto: classico trattamento chirurgico per una lesione legamentosa: ricostruzione artroscopica con trapianto autologo. L'innesto passa attraverso tunnel ossei (femorale e tibiale) ed è fissato saldamente alle estremità con viti. Al termine dell'intervento viene applicato un tutore da mantenere per circa 3-4 settimane (tratto da [www.orthosurgery.it](http://www.orthosurgery.it) – Dottor Fabio Bertaiola, Medico Chirurgo, specialista in Ortopedia e Traumatologia )*

Attualmente, sono commercializzati svariati tipi differenti di viti e rondelle per fissaggio di legamenti. Esse, tuttavia, vengono ancora prodotte in materiale puramente polimerico,

variando principalmente per forma, modello e proporzione delle componenti. La maggior parte dei dispositivi sono realizzati in PLLA, che viene lavorato ed adoperato assieme ad un suo copolimero allo scopo di rallentare la cinetica di degradazione della struttura. Tale composizione presenta, però, una serie non trascurabile di punti critici e pertanto risulta poco utilizzata nella pratica chirurgica ospedaliera: innanzitutto dispositivi realizzati in materiale puramente polimerico possono condurre a un ritardo di integrazione ossea, negando in tal modo il beneficio principale della stabilizzazione biorisorbibile. Inoltre, un'altra problematica è legata alla perdita di resistenza alla tensione delle viti causata dall'idrolisi, caso piuttosto comune nel momento in cui i dispositivi siano immagazzinati per un periodo di tempo lungo prima dell'utilizzazione nel paziente. In questo senso, l'introduzione di nano-idrossiapatite si presenta come innovazione ideale per permettere di eliminare i problemi riscontrati durante l'uso di dispositivi puramente polimerici. La componente ceramica, infatti, fornisce la resistenza meccanica adeguata agli impianti ed inoltre, grazie alla spiccata osteoinduttività, stimola il processo di rimodellamento osseo, la mineralizzazione e la stabilizzazione delle aree trattate. L'utilizzo di nHAP-PLLA si presenta quindi, anche in tale tipologia di applicazioni, con interessanti prospettive. Più in generale, comunque, i vantaggi e le potenzialità offerti dalla nano-idrossiapatite non vanno sottovalutati e potrebbero condurre, in un futuro prossimo, ad un radicale cambiamento delle comuni pratiche chirurgiche.

Un altro settore in cui il composito nHAP-PLLA vede largo impiego è quello dell'ingegneria tissutale ossea: in tale campo vengono realizzate delle applicazioni biomedicali completamente differenti da quanto precedentemente proposto, mediante l'utilizzo di tecniche e materiali innovativi e tecnologicamente sofisticati; in particolare, il composito biorisorbibile nHAP-PLLA risulta ampiamente adoperato per la produzione di innesti ossei da applicare come sostituti del tessuto nel caso di danni dovuti a malformazioni congenite, eventi traumatici, avulsioni o lesioni derivate da asportazione di tumori ossei.

Una delle più comuni applicazioni del composito nHAP-PLLA, attualmente disponibile sul mercato, è la produzione di compresse, totalmente riassorbibili in 8-10 mesi, con il compito di rigenerare e correggere difetti dell'osso mandibolare e mascellare e di mantenere il volume nel caso di avulsioni con formazione di lacune. Le compresse in nHAP-PLLA fungono da innesto: esse vengono inserite nel sito osseo difettoso mediante intervento chirurgico e, lentamente, si assiste al loro riassorbimento con la contemporanea stimolazione del processo di rimodellamento osseo e conseguente ricostituzione del tessuto mancante. Tipicamente in tali applicazioni la parte polimerica del composito viene sfruttata come carrier per il rilascio continuo e prolungato di antibiotico. Le compresse vengono imbevute di farmaco e hanno la

capacità di rilasciare gradualmente l'antibiotico per circa dieci giorni; tali caratteristiche risultano estremamente vantaggiose poiché permettono di utilizzare gli innesti anche in presenza di siti infetti e di somministrare una minima quantità antibiotica che agisce effettivamente solo a livello locale. Conseguentemente, l'utilizzo delle compresse è particolarmente indicato in pazienti per i quali è sconsigliabile il massiccio impiego di antibiotici per via sistemica (ad esempio bambini, anziani o pazienti affetti da particolari patologie).

L'utilizzo del composito biorisorbibile nHAP-PLLA va però ben oltre a questa particolare e comunque interessante applicazione. La perdita di sostanza ossea costituisce, infatti, uno dei maggiori e più comuni problemi affrontati dai chirurghi ortopedici nel corso della pratica clinica, presentandosi, purtroppo, anche in punti estremamente diversificati dell'organismo. In ingegneria tissutale, innesti in composito biorisorbibile nHAP-PLLA vengono utilizzati in vasta misura per ogni tipo di ricostruzione ossea: si possono trovare applicazioni nel settore odontoiatrico per la riparazione di mandibole, mascelle e radici dentarie, ma il medesimo materiale viene utilizzato anche per la produzione di endoprotesi acustiche, protesi oculari, ricostruzioni maxillofacciali, fissazione di giunture, tendini e legamenti. Attualmente, in tale già ampissimo campo, i ricercatori continuano instancabilmente ad operare e ad offrire nuovi panorami applicativi. Fondendo le recenti conoscenze di fisica, ingegneria, chimica e biologia con le più moderne e sofisticate tecnologie industriali vengono prodotti dispositivi in grado di ripristinare in sempre maggiore misura le funzionalità danneggiate dell'organismo, indirizzandolo all'autorigenerazione. In tal senso, ogni innovazione rappresenta una sfida scientifica stimolante che ha come obiettivo la produzione di materiali "bioispirati" che siano precocemente riconosciuti e meglio integrati dai tessuti viventi.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Ciccone WJ II, Motz C, Bentley C, Tasto JP. « *Impianti biorassorbibili in ortopedia: nuovi sviluppi e applicazioni cliniche.* » Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 9 (2001) pp. 280 - 288, Edizione Italiana.
- [2] Ma PX. « *Biomimetic Materials for Tissue Engineering.* » Advanced Drug Delivery Reviews 60 (2008) pp. 184 - 198.
- [3] Ma PX. « *Scaffolds for tissue fabrication.* » Materials Today 7 (2004) pp. 30 – 40.
- [4] Jose MV, Thomas V, Johnson KT, Dean DR, Nyairo E. « *Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering.* » Acta Biomaterialia 5 (2009) pp. 305 - 315.
- [5] Olson JR, Wei M, Shaw M. « *Apatite/Fiber absorbable Composites for load-bearing Applications in Bone Fixation.*» Teleflex Medical OEM - preliminary research report (2009).
- [6] Schneider OD, Weber F, Brunner TJ, Loher S, Ehrbar M, Schmidlin PR, Stark WJ. « *In vivo and in vitro evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitute material for complex defects.* » Acta Biomaterialia 5 (2009) pp. 1775 - 1784.
- [7] Shi Z, Huang X, Cai Y, Tang R, Yang D. « *Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells.* » Acta Biomaterialia 5 (2009) pp. 338 – 345.
- [8] Budyanto L, Ooi CP, Goh YQ. « *Fabrication and Characterization of Porous Poly (L-lactide) (PLLA) Scaffolds Using Liquid-liquid Phase Separation.* » Journal of Biomedical Materials Research 21 (2008) pp. 322 - 325.
- [9] La Carrubba V, Carfi Pavia F, Brucato V, Piccarolo S. « *PLLA/PLA scaffolds prepared via Thermally Induced Phase Separation (TIPS): tuning of properties and biodegradability.* » International Journal of Material Forming 1 (2008) pp. 619 - 622.
- [10] Zhang R, Ma PX. « *Processing of polymer scaffolds: phase separation.* » Atala A, Lanza R, editors. Methods of tissue engineering. Academic Press San Diego CA (2001) pp. 715 –724.
- [11] Wei G, Ma PX. « *Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering.* » Biomaterials 25 (2004) pp. 4749 - 4757.

- [12] Wei G, Ma PX. « *Macroporous and nanofibrous polymer scaffold and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres.* » *Journal of Biomedical Materials Research* 78 (2006) pp. 306 – 315.
- [13] Uskoković DP, Ignjatović NL, Suljovrujić E, Stojanović Z. « *Structure and Characteristics of the Hot Pressed Hydroxyapatite/ Poly-L-Lactide Composite.* » *Science of Sintering* 34 (2002) pp. 79 - 93.
- [14] Tanaka H, Tanaka M, Hojo M, Adachi T, Hyon S, Konda M. « *Evaluation of Anisotropic Deformation and Fracture Properties in Extruded HAp/PLLA Composites.* » 13<sup>th</sup> European Conference on Composite Materials, Stockholm – Sweden (2008).
- [15] Uskoković DP, Ignjatović NL, Delijić K, Vukcević M. « *Microstructure and Mechanical Properties of Hot-Pressed Hydroxyapatite/ Poly-L-Lactide Biomaterials.* » *Bioceramics* 13, Key Engineering Materials 192-195 (2001) pp. 737 - 740.
- [16] Hong ZK, Zhang PB, He CL, Qiu XY, Liu AX, Chen L, et al. « *Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility.* » *Biomaterials* 26 (2005) pp. 6296 – 6304.
- [17] Zhao Y, Zhang Y, Ning F, Guo D, Xu Z. « *Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of HAP with different nanocrystal morphology.* » *Journal of Biomedical Materials Research* 83 (2007) pp. 121 – 126.
- [18] Guo X, Gough JE, Xiao P, Liu J, Shen Z. « *Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response.* » *Journal of Biomedical Materials Research* 82 (2007) pp. 1022 – 1032.
- [19] Washburn NR, Yamada KM, Simon CG, Kennedy SB, Amis EJ. « *High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation.* » *Biomaterials* 25 (2004) pp. 1215 - 1224.
- [20] Hong ZK, Zhang PB, Yu T, Chen X, Jing X. « *In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide).* » *Biomaterials* 30 (2009) pp. 58 – 70.
- [21] Hong ZK, Qiu XY, Sun JR, Deng MX, Chen XS, Jing XB. « *Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystal.* » *Polymer* 45 (2004) pp. 6705 – 6713.
- [22] Hong ZK, Zhang PB, Liu AX, Chen L, Chen XS, Jing XB. « *Composites of poly(lactide-co-glycolide) and the surface modified carbonated hydroxyapatite nanoparticles.* » *Journal of Biomedical Materials Research* 81 (2007) pp. 515 – 522.

- [23] Najman S, Đorđević Lj, Savić V, Ignjatović N, Plavšić M, Uskoković D. « *Changes of HAP/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation.* » *Facta Universitatis - series Medicine and Biology* - 10 (2003) pp. 131 – 134.
- [24] Bedini R, Ioppolo P, Filippini P, Nastasi V, Caiazza S, Bianco A, Ortolani E, Barra P. « *Studio in vitro e in vivo della biointegrazione di impianti dentali.* » Istituto Superiore di Sanità (2004), 30 p. Rapporti ISTISAN 04/2.
- [25] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, et al. « *The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture.* » *Biomaterials* 26 (2005) pp. 4847 – 4855.
- [26] Uskoković DP, Ignjatović NL. « *Synthesis and Application of Hydroxyapatite/Poly(lactide) Composite Biomaterial.* » *Applied Surface Science* 238 (2004) pp. 314 - 329.
- [27] Uskoković DP, Ignjatović NL, Delijić K, Vukčević M. « *The Designing of Properties of Hydroxyapatite/Poly(L)lactide Composite Biomaterials by Hot Pressing.* » *Zeitschrift für Metallkunde* 92 (2001) pp. 145 - 149.