# **POLITECNICO DI TORINO**

# Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

# Controllo dell'angiogenesi mediante vetri e vetroceramici bioattivi



### Relatori

Dr. Francesco Baino

Candidato

Simone Salerno

Dr.ssa Marta Miola

Dicembre 2020

# INDICE

### Abstract

# **Capitolo 1**

- 1.1 Il sistema circolatorio e i vasi sanguigni
- 1.2 Vasculogenesi
- 1.3 Angiogenesi
- 1.4 Stimolazione ed inibizione dell'angiogenesi

# Capitolo 2

- 2.1 Biomateriali
- 2.2 Biocompatibilità
- 2.3 Bioattività

# Capitolo 3

- 3.1 Introduzione ai biovetri
- 3.2 L'applicazione principale dei biovetri: la rigenerazione ossea
- 3.3 Metodi di produzione
- 3.4 Tecnica fusione-colata
- 3.5 Tecnica Sol-Gel

- 3.6 Vetri bioattivi mesoporosi (MBG)
- 3.7 Confronto tra fusione-colata e sol-gel
  - 3.7.1 Caratterizzazione dei materiali: analisi termiche
  - 3.7.2 Diffrazione ai raggi X (XRD)
  - 3.7.3 Analisi morfologiche e composizionali (prima del test di bioattività in vitro)
  - 3.7.4 Analisi della porosità e della SSA
  - 3.7.5 Test di bioattività in vitro
  - 3.7.6 Analisi morfologiche e composizionali (dopo il test di bioattività in vitro)
- 3.8 Bioactive glass-scaffold

## Capitolo 4

- 4.1 Stimolazione dell'angiogenesi tramite vetri bioattivi
- 4.2 Il ruolo degli ioni inorganici nel metabolismo osseo
- 4.3 Vetri silicati ottenuti per fusione
  - 4.3.1 4585 Bioglass®
  - 4.3.2 Confronto tra 4585 Bioglass® e Cu-doped 4585 Bioglass®
  - 4.3.3 Nb-doped 4585
- 4.4 Vetri borati e borosilicati ottenuti per fusione
- 4.5 Vetri Sol-Gel e mesoporosi (MBG)
  - 4.5.1 Cu-doped MBG
  - 4.5.2 Co-doped MBG

## Capitolo 5

- 5.1 Ingegneria tissutale
- 5.2 Ingegneria tissutale ossea

#### 5.3 - Wound healing

- 5.3.1 Meccanismi di legame tra vetri bioattivi e tessuti molli
- 5.3.2 Applicazioni BG: rigenerazione del tessuto epiteliale
- 5.4 Impianti orbitali
- 5.5 Ingegneria tissutale cardiaca
- 5.6 Loop arterovenoso

### Conclusioni

## **Referenze** bibliografiche

### Abstract

Nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale, il controllo della risposta dell'organismo tramite la progettazione opportuna di un biomateriale è fondamentale per ottenere i risultati desiderati e per evitare effetti collaterali, anche molto severi, come ad esempio la non integrazione del materiale nell'organismo oppure gravi infiammazioni. Altro elemento essenziale è il controllo delle fasi successive all'impianto del biomateriale, in cui questo dovrebbe correttamente stimolare i processi fisiologici atti a ripristinare le funzioni originali del tessuto.

Questo lavoro di tesi ha previsto l'analisi approfondita della letteratura scientifica inerente ai vetri bioattivi, con particolare riferimento alla loro capacità di interagire con i tessuti viventi e modulare l'angiogenesi. Questo secondo tema è particolarmente innovativo ed è stato sviluppato nel corso di ricerche nate nell'ultimo decennio. I risultati riportati nei diversi studi sono stati esaminati e confrontati criticamente, evidenziando i punti di forza o le limitazioni di ogni materiale analizzato. Per la ricerca bibliografica è stata utilizzata principalmente la banca dati Scopus.

Particolare attenzione è stata dedicata al tema del controllo dell'angiogenesi mediato da questa classe di materiali, approfondendo come il rilascio ionico da vetri bioattivi possa influenzare in maniera positiva la formazione di nuovi vasi sanguigni.

La trattazione dell'argomento è iniziata introducendo proprio il concetto di angiogenesi, dopo una breve panoramica sul sistema circolatorio, si sono analizzati i metodi attuali per inibire o stimolare questo processo biologico.

Prima di esaminare nel dettaglio le proprietà dei vetri bioattivi, è stato inserito un capitolo dedicato alla comprensione del concetto di biomateriale, dove sono state evidenziate le caratteristiche principali che connotano un biomateriale, analizzando quindi il concetto di biocompatibilità e bioattività.

Dopo questa sezione introduttiva, il discorso è stato orientato verso la trattazione di cosa sia un vetro bioattivo, descrivendone le caratteristiche chimico-fisiche principali, i metodi di produzione più utilizzati e analizzando i fattori che rendono questa classe di materiali fondamentali nel settore dell'ingegneria tissutale, come ad esempio la loro abilità di creare legami con i tessuti viventi.

A questo punto del lavoro, le due macro-tematiche della tesi (vetri bioattivi e angiogenesi) sono state affrontate in un unico capitolo, analizzando come con questa tipologia di materiali si possano ottenere eccellenti risultati per il processo angiogenico; sono stati quindi trattati i principali vetri bioattivi utilizzati per questo scopo.

L'ultima sezione è invece dedicata alle applicazioni dei vetri bioattivi, dove sono stati evidenziati quei casi in cui il comportamento pro-angiogenico dei vetri bioattivi risultava essenziale per ottenere migliori risultati in termini di rigenerazione tissutale. Il capitolo è stato sviluppato dividendo la ricerca in base ai vari settori applicativi (tessuto osseo, wound healing, impianti oculari, applicazione nella cura dei tumori), inserendo sia studi effettuati *in vitro* che studi effettuati *in vivo*.

Tutti i risultati analizzati e discussi all'interno di questa ricerca dimostrano l'importanza applicativa dei vetri e dei vetro-ceramici bioattivi, che sono in grado di integrarsi in maniera efficace con i tessuti, sia molli che duri, e di promuovere il processo angiogenico, fondamentale per lo sviluppo di un nuovo tessuto e rivascolarizzazione dei tessuti. Questi materiali riceveranno sicuramente sempre più attenzione da parte dei ricercatori nel prossimo futuro.

### **CAPITOLO 1**

#### 1.1-Il sistema circolatorio e i vasi sanguigni

L'apparato circolatorio è l'insieme degli organi deputati al trasporto di fluidi, quali il sangue e la linfa, che hanno il compito primario di apportare alle cellule dell'organismo gli elementi necessari al loro sostentamento. Nell'essere umano e in tutti i vertebrati, il cuore è l'organo propulsore del sangue e costituisce l'elemento centrale dell'apparato, che comprende anche i vasi sanguigni e i vasi linfatici. Nei diversi gruppi di animali multicellulari la circolazione assicura la sopravvivenza del microrganismo e il metabolismo di ogni singola cellula del corpo, fornisce le sostanze chimiche e mantiene le proprietà fisiologiche.



Figura 1.1 Schema della circolazione sanguigna negli esseri umani con rappresentazione del cuore, della piccola circolazione e della grande circolazione.

Come è visibile dalla figura 1.1, la circolazione è costituita dal cuore e dai vasi sanguigni; i vasi che portano il sangue al cuore sono chiamati vene, quelli che lo portano lontano dal cuore arterie. Allontanandosi dal cuore i vasi si ramificano e si riducono progressivamente di diametro; in primis abbiamo le arterie, con pareti robuste ed elastiche, che trasportano il sangue ad elevata pressione; poi ci sono le arteriole, con una parete che consente variazioni di calibro, che controllano il passaggio del sangue ai capillari; si hanno poi i capillari, con pareti sottili e permeabili, che permettono lo scambio di plasma. Sono proprio i capillari che consentono lo scambio di materiale tra il sangue e le cellule; le venule raccolgono il sangue refluo dai capillari per poi passare alle vene, anche loro dotate di pareti sottili ed elastiche dotate di una componente muscolare che consente una variazione di calibro. In figura 1.2 possiamo analizzare i dettagli dimensionali e le componenti cellulari che compongono questi vasi:

	Mean diameter	waii thickness	Endothellum Elastic Lissue Smooth musci Fibrous lissue	
Artery	4.0 mm	1.0 mm		
Arteriole	30.0 µm	6.0 μm	-	
Capillary	8.0 µm	0.5 μm	-	
Venule	20.0 µm	1.0 µm		
Vein	5.0 mm	0.5 mm	~ • •	

Figura 2.2 schematizzazione delle principali caratteristiche delle diverse tipologie di vasi.

L'importanza funzionale del sistema circolatorio è un dato di fatto noto all'uomo ormai da secoli, ma oltre al trasporto di ossigeno e di moltissime altre sostanze che utilizzano proprio il network vascolare per spostarsi da un punto all'altro dell'organismo, i vasi sanguigni sono implicati, anche se non direttamente, in altre situazioni, non sempre positive: è ormai certo a tutta la comunità scientifica che l'insorgenza di un tumore è spesso accompagnata da un aumento della vascolarizzazione; un altro esempio possiamo ritrovarlo nei tessuti ischemici, dove una non corretta rivascolarizzazione impedisce la totale guarigione del soggetto. Prima di analizzare come si formano e si sviluppano i vasi sanguigni, sono presenti in seguito alcuni accenni storici per inquadrare al meglio l'argomento.

I vasi sanguigni sorsero durante l'evoluzione per trasportare ossigeno agli organi distanti; i vasi sono cruciali per la crescita degli organi nell'embrione e per la riparazione di tessuti danneggiati nell'adulto, e uno squilibrio nella crescita dei vasi sanguigni contribuisce alla patogenesi di numerosi disturbi. Risulta quindi necessario comprendere quelli che sono i meccanismi chiave che regolano la nascita e lo sviluppo del plesso vascolare prima di introdurre i progressi ottenuti dalla ricerca scientifica negli ultimi anni in questo settore.

In animali primitivi, come il verme *Caenorhabditis elegans* o il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, l'ossigeno può diffondersi a tutte le cellule attraverso il loro piccolo corpo; in altre specie, che si sono sviluppate più tardi durante il percorso evolutivo e che hanno una dimensione maggiore, l'ossigeno viene distribuito alle cellule distanti tramite un network vascolare: solo nel 1628 William Harvey(1578-1657) [1] scoprì che il cuore pompa il sangue nel corpo tramite le arterie e ritorna al cuore tramite le vene; prima di questa data l'ipotesi più accreditata era che il sangue non circolasse nel corpo, ma che il corpo stesso lo rigenerasse localmente quando le scorte erano state consumate dagli organi, come ipotizzato da Galeano (129-201) nel secondo secolo dopo Cristo. Pochi decenni dopo la scoperta di Harvey, Marcello Malpighi (1628-1694) identificò i capillari come i più piccoli vasi che chiudono il loop circolatorio tra arterie e vene.

Andremo ora ad analizzare come si forma e si sviluppa il plesso vascolare.

#### 1.2-Vasculogenesi

Nell'embrione i vasi sanguigni forniscono ossigeno agli organi in sviluppo, ma oltre alla loro funzione nutritiva, forniscono una serie di segnali che promuovono la morfogenesi degli organi.

Il primo plesso vascolare si forma dal mesoderma tramite la differenziazione degli angioblasti (cellule endoteliali vascolari che non hanno ancora formato un lume), che in seguito generano un network vascolare primitivo formato da piccoli capillari. Il meccanismo molecolare responsabile di questo processo è chiamato vasculogenesi [2]; già in questa fase il destino venoso o arterioso dei capillari appena formati è deciso, indicando che le specifiche delle cellule vascolari sono di origine genetica e non solo determinate dalle forze idrodinamiche [3].

#### 1.3-Angiogenesi

Durante la fase dell'angiogenesi, il plesso vascolare si espande progressivamente tramite il processo di sprouting vascolare e si riorganizza in una rete in cui i vasi di maggiore dimensione si diramano in vasi più piccoli; i canali nascenti composti da cellule endoteliali vengono ricoperti da periciti e da cellule muscolari lisce, che permettono ai vasi di generare forze così da poter regolare la perfusione dei vasi; quest'ultimo processo è noto con il termine di arteriogenesi.

Gli studi effettuati negli ultimi due decenni su topi, pesci zebra e girini, hanno reso più chiari i meccanismi che regolano la crescita di vasi sanguigni in embrioni: sappiamo che il VEGF (vascular endothelial growth factor) è il regolatore dello sprouting vascolare, mentre i fattori di crescita derivanti dalle piastrine del sangue (PDGF) e l'angiopoiteina-1 reclutano le cellule murali (insieme di periciti e cellule della muscolatura liscia) attorno ai canali endoteliali.



Figura 3.3 Illustrazione riassuntiva delle varie fasi di sviluppo del sistema vascolare [3].

Si può quindi affermare che la formazione dei vasi sanguigni è un processo complesso, che richiede un bilanciamento molto preciso tra segnali stimolatori ed inibitori, come integrine, angiopoietine, chemochine, molecole di giunzione, sensori di ossigeno, inibitori endogeni e molti altri.

Dopo la nascita, l'angiogenesi continua a contribuire allo sviluppo degli organi ma, durante l'età adulta, la maggior parte dei vasi sanguigni rimane quiescente e l'angiogenesi avviene solo durante il ciclo ovarico e nella placenta durante la gravidanza. Tuttavia, le cellule endoteliali mantengono la loro abilità di dividersi rapidamente in risposta a stimoli fisiologici, come ad esempio l'ipossia. L'angiogenesi viene inoltre riattivata durante le fasi di guarigione e riparazione delle ferite, ma in alcuni disturbi, questo stimolo diventa eccessivo, e il bilanciamento tra stimolazione ed inibizione

salta: alcuni esempi in cui questo avviene sono i tumori, disturbi oculari e infiammatori, obesità, asma, diabete, cirrosi, sclerosi multipla, infezioni batteriche e malattie autoimmuni. In altre malattie, come malattie cardiache ischemiche o preeclampsia, l'angiogenesi è insufficiente, causando disfunzioni delle cellule endoteliali, malformazioni o regressione dei vasi.

L'angiogenesi è implicata in più di 70 malattie, e la lista sta continuando a crescere anno dopo anno; proprio per questo motivo, nel corso dell'ultima decade, sforzi importanti sono stati fatti per sviluppare strategie terapeutiche atte a promuovere la rivascolarizzazione dei tessuti ischemici o, al contrario, per inibire l'angiogenesi nel cancro, nei disordini oculari, delle articolazioni e della pelle.

#### 1.4-Stimolazione ed inibizione dell'angiogenesi

I primi pionieri della ricerca nel campo dell'angiogenesi si accorsero, circa un secolo fa, che la crescita di masse tumorali è spesso accompagnata da un aumento della vascolarizzazione; nel 1971 [4] ipotizzarono che l'angiogenesi, anzi, l'anti-angiogenesi, fosse una strategia efficace per combattere il cancro, così la ricerca si mosse in questa direzione, ricercando fattori in grado di indurre o di inibire l'angiogenesi.

Nel febbraio del 2004 la FDA approvò il bevacizumab, un anticorpo monoclonale anti-VEGF, per il trattamento del cancro colorettale metastatico in combinazione con cicli di chemioterapia; nel dicembre dello stesso anno la FDA approvò il pegaptiniv, un aptamero che blocca i 165 amminoacidi del VEGF-A, per il trattamento della degenerazione maculare legata all'età. Questi risultati hanno validato il concetto che l'angiogenesi è un target importante per la cura del cancro e di altre malattie.



Figura 4.4 Rappresentazione di alcuni fattori cellulari e molecolari presenti nel microambiente tumorale [78].

Nonostante questi passi in avanti, sono ancora molti i punti da chiarire in merito a questi trattamenti; ad esempio bisogna capire come è possibile ottenere i migliori risultati combinando agenti antiangiogenici con la chemioterapia o altri agenti biologici e come si possono selezionare i pazienti che reagiscono meglio ai trattamenti. Un'altra problematica che sta sorgendo è la resistenza alle terapie anti-angiogeniche. L'altra faccia della medaglia è ancora più emblematica: la speranza che le terapie angiogeniche potranno fornire trattamenti per la cura di malattie ischemiche non si è ancora trasformata in realtà, nonostante gli innumerevoli lavori svolti in fase preclinica e clinica.

Bisogna sicuramente individuare gli attori principali nel pathway angiogenico prima di poter parlare di come "manipolare" questo processo biologico; abbiamo già chiarito che è un processo basato sulla coordinazione di fattori di crescita e molecole di adesione cellulare nelle cellule endoteliali e nelle cellule murali, ma il pathway di segnalazione più compreso e meglio caratterizzato è quello del VEGF-A e dei sui recettori: la perdita di un singolo allele del VEGF-A porta alla morte dell'embrione. Questo pathway è anche essenziale per la riproduzione e per l'angiogenesi ossea. Molte ricerche hanno inoltre affermato che questo fattore di crescita ha un ruolo chiave nell'angiogenesi tumorale.

Il VEGF-A si lega a due recettori, VEGFR-1 e VEGFR-2; fanno entrambi parte della famiglia dei recettori tirosin chinasici. Si è ormai d'accordo sul ruolo del VEGFR-2, classificandolo come il mediatore più importante per gli effetti del VEGF-A in ambito mitogenico, angiogenico e per l'aumento della permeabilità dei vasi; il ruolo del VEGFR-1 nella regolazione dell'angiogenesi è invece più complesso: in alcune circostanze può funzionare da recettore esca per prevenire l'interazione del VEGF con il VEGFR-2; ci sono inoltre diverse prove che attestano il ruolo centrale del VEGFR-1 nell'ematopoiesi e nel reclutamento di cellule derivanti dal midollo osseo che possono promuovere l'angiogenesi. In alcuni casi questo recettore può essere espresso dalle cellule tumorali e può mediare segnali chemiotattici per far crescere la massa tumorale.

Altre molecole che hanno un ruolo molto importante per lo sviluppo e per la differenziazione dei vasi sono i fattori di crescita derivanti dalle piastrine (PDGF-B/PDGFR- $\beta$ ) e le angiopoietine (Ang), ligandi del recettore Tie2. PDGF-B è necessario per il reclutamento dei periciti e per la maturazione della microvascolatura. L'inibizione del suo recettore PDGFR- $\beta$  fa sì che il network microvascolare sia particolarmente dipendete dai segnali di sopravvivenza mediati da VEGF; quindi i vasi appena formati, che siano associati ad un tumore o meno, sono particolarmente vulnerabili al blocco di VEGF-A, mentre i vasi maturi, coperti da matrice extracellulare e dai periciti, possono resistere all'inibizione del fattore di crescita e ad altri fattori anti-angiogenici. Recenti studi hanno anche enfatizzato il fatto che in una massa tumorale PDGF e i suoi recettori giocano un ruolo fondamentale nel reclutamento di cellule stromali che producono VEGF-A e altri fattori angiogenici: la

combinazione di inibitori di PDGF e VEGF può quindi risultare in una strategia antivascolare e antitumorale.

Negli embrioni in cui manca l'Ang-1 o il suo recettore Tie2 si sviluppa una vascolarizzazione primaria praticamente normale, ma non in grado di rimodellarsi. Recenti studi hanno dimostrato che Ang-2 ha un ruolo positivo nell'angiogenesi tumorale: la somministrazione di inibitori di Ang-2 in topi ha portato ad un annullamento della crescita tumorale e alla riduzione della proliferazione delle cellule endoteliali; quindi, gli inibitori di Ang-2 potrebbero essere degli ottimi candidati per i test clinici futuri.

Ancora oggi è invece aperto il dibattito per chiarire se le cellule progenitrici endoteliali derivanti dal midollo osseo abbiano o no un ruolo nell'angiogenesi; si pensa che esse partecipino, perlomeno, come fonte di fattori angiogenici, anche se ancora non è chiaro come questi processi avvengano. Quindi anche queste cellule possono essere un target per le terapie anti-angiogeniche.

Essendo quindi diversi i fattori che partecipano al processo di angiogenesi, è assolutamente necessario agire su pathway multipli per far sì che il trattamento sia efficace.



Figura 5.5 Differenti strategie per inibire il segnale del VEGF [78].

Diversi studi dimostrano che la combinazione di agenti anti-angiogenici con i convenzionali agenti citotossici o con la radioterapia comporta un effetto antitumorale maggiore; Non è ancora chiaro però quali siano le combinazioni più efficaci. Browder and Klement proposero che la chemioterapia, accompagnata dall'inibizione del VEGF-A, può ampliare l'effetto causato dall'agente citotossico

portando ad un maggiore numero di cellule cancerogene uccise. Un effetto simile si ottiene combinando la chemioterapia con il farmaco bevacizumab.

Le terapie combinatorie non devono però per forza includere la chemioterapia: diversi prove precliniche e cliniche stanno testando la combinazione di diversi agenti anti-angiogenici con altre terapie mirate, come ad esempio inibitori di EGFR, di PDGFR, di proteasi o inibitori di integrine.

Attualmente sono diversi gli inibitori angiogenici testati in prove cliniche; i più avanzati da un punto di vista clinico sono gli inibitori del pathway del VEGF, e il bevacizumab è l'unico trattamento antiangiogenico approvato da FDA per la terapia contro il cancro. I benefici clinici di questo trattamento sono stati osservati in ogni soggetto ma, anche se generalmente ben tollerato, alcuni casi di tossicità sono stati riscontrati: il bevacizumab è associato a perforazione gastrointestinale e a complicanze nella rigenerazione delle ferite in circa il 2% dei pazienti; in aggiunta, le complicanze tromboemboliche arteriose raddoppiarono rispetto all'utilizzo della sola chemioterapia. Oltre a questo farmaco, altri inibitori del VEGF sono stati testati: diverse molecole inibitrici di RTK con target i recettori di VEGF sono state sviluppate; la più avanzata è SU11248, che inibisce i recettori di VEGF, di PDGF, c-kit e Flt-3; i risultati dimostrano che ha un effetto considerevole sui tumori gastrointestinali stromali.

Molti pazienti trattati con inibitori di VEGF possono sopravvivere a lungo, specialmente se gli inibitori vengono associati a cicli chemioterapici, ma alcuni possono anche morire per la loro malattia. Questo evidenzia il fatto che il VEGF-A può essere rimpiazzato da altri agenti angiogenici con il progredire della malattia: questi possono essere pathway non riguardanti i VEGF oppure pathway mediati da altri membri della famiglia dei VEGF, come ad esempio VEGF-C e VEGF-D, che possono legarsi ai VEGFR-2 dopo la scissione proteolitica; anche il reclutamento di cellule derivanti dal midollo osseo può fornire un meccanismo per evadere alle strategie anti-angiogeniche. In più, studi recenti hanno dimostrato che le cellule endoteliali associate ad un tumore non sono stabili geneticamente e possono resistere alle terapie anti-angiogeniche.

Oltre alle terapie anti-angiogeniche, il mondo della ricerca sta valutando e testando anche delle strategie in grado di ottenere il risultato opposto, ossia quello di promuovere l'angiogenesi in tessuti caratterizzati da una perfusione inadeguata, poiché spesso non esistono altre soluzioni per trattare questi tessuti, se non procedure di ricostruzione chirurgica. Molti fattori angiogenici sono attivi in diversi modelli animali di ischemia coronarica o di arti; sulla base di questi dati preclinici, sono diversi i fattori angiogenici che sono stati testati su pazienti con ischemia miocardica o di un arto. Sebbene inizialmente furono riportati risultati interessanti, nessuna delle prove con un controllo-

placebo fino ad allora condotte con proteine ricombinanti o con terapia genica ha riportato risultati positivi convincenti. Fu provato che l'effetto placebo in queste prove era considerevolmente maggiore di quanto inizialmente ipotizzato; si è dimostrato in seguito che le cellule endoteliali in pazienti con malattie arteriosclerotiche estese potevano essere resistenti all'azione di fattori angiogenici. Un'alternativa all'utilizzo di fattori angiogenici che ha generato interesse nei ricercatori è il trapianto di cellule angiogeniche dal midollo osseo o dal sangue periferico. Questa terapia ha promosso la proliferazione vascolare, portando ad un aumento significativo della pressione dell'ossigeno transcutaneo, ridotto il dolore a riposo e aumentato il tempo di cammino senza dolore in 22 pazienti con ischemia alla gamba. Non si può però escludere che questo tipo di terapia possa portare ad effetti negativi a lungo termine, ma solo la sperimentazione potrà risolvere questo dilemma.

Un ulteriore soluzione per stimolare il processo angiogenico è l'utilizzo di ioni, quali silicio, magnesio, calcio, cobalto e rame, per citarne alcuni, che si sono rivelati pro-angiogenici. Infatti, alcuni di questi ioni svolgono un ruolo fondamentale in diversi step del processo angiogenico. Lo ione Cu<sup>2+</sup> è considerato un promotore dell'angiogenesi, anche se non è ancora possibile comprendere nel dettaglio il pathway coinvolto in questo processo [125]. Gli ioni rame sono in grado di attivare i fattori di crescita pro-angiogenici come il VEGF, il FGF-1 (fibroblast growth factor 1) e il FGF-2. Il rame, così come lo ione cobalto, è anche necessario per l'attivazione del HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), uno dei principali fattori regolatori dell'espressione di VEGF [126].

Nei capitoli successivi quest'ultimo argomento verrà ripreso ed approfondito, mostrando i risultati ottenuti utilizzando questi ioni pro-angiogenici sia *in vitro* che *in vivo*.

### **CAPITOLO 2**

#### 2.1-Biomateriali

Nel corso dell'ultimo secolo sono state presentate più definizioni per descrivere un biomateriale; in linea generale, un biomateriale è un materiale che si interfaccia con i tessuti viventi. Vediamo ora l'evoluzione di questa definizione nel tempo:

• 50'-70' Prima generazione, materiali INERTI

I biomateriali venivano scelti in funzione della loro bio-inerzia. Si utilizzavano materiali come l'avorio e tutti quei materiali che fossero privi di effetti di corrosione.

• 70'-90' Seconda generazione, materiali BIOATTIVI

Negli anni 70', con la nascita dei biovetri c'è stata la prima evoluzione del concetto di biomateriali: si usano materiali bioattivi, ossia materiali che a contatto con il corpo si modificano reagendo con l'ambiente in cui si trova.

• 90'- oggi, Terza generazione, materiali BIOMIMETICI

Vengono chiamati biomateriali tutti quei materiali, bio-riassorbibili, funzionalizzati in superficie, capaci di stimolare la rigenerazione tissutale funzionale.

In figura 2.1 viene riassunta questa evoluzione.



FIGURA 2.1 Evoluzione dei biomateriali dagli anni 50' fino ai giorni nostri [79]

Nell'ambito della bio-medicina si possono applicare diverse tipologie di materiali:

- Materiali polimerici;
- Materiali metallici;
- Materiali ceramici, vetrosi e vetroceramici;
- Materiali compositi;
- Materiali di derivazione biologica;



FIGURA 2.2 Percentuali di utilizzo delle diverse tipologie di materiali.

Un altro concetto molto importante legato ai biomateriali è il concetto di biocompatibilità, inizialmente legato alla similitudine tra tessuti e materiali; successivamente si è passati a concepire la biocompatibilità come inerzia, passando poi per il concetto di stabilità chimica fino ad arrivare alla definizione ancora oggi in uso: "la biocompatibilità è la capacità di un materiale di esplicare la propria funzione con un'appropriata risposta da parte del sistema vivente che lo ospita".

Per risposta appropriata si intende che la risposta del biomateriale deve essere appropriata al tessuto/distretto corporeo nel quale viene introdotto.

I materiali inseriti nall'interno del corpo umano si possono dividere in due categorie:

- 1. Tossici;
- 2. Biocompatibili, che possono essere divisi in:
  -materiali inerti -> nessuna reazione, possono formarsi tessuti fibrosi;
  -materiali bioattivi -> legame tra impianto e tessuto;
  -materiali biorisassorbibili -> dissoluzione e sostituzione con tessuto sano;
  -materiali biomimetici -> scambio di segnali tra materiale ed organismo;

#### 2.2-Biocompatibilità

L'interazione tra materiali e sistemi biologici avviene attraverso interazioni chimiche a livello microscopico tra la superficie del solido e le cellule viventi. Quindi, quando si parla di biocompatibilità si intende la risposta biologica successiva all'interazione tra un materiale e il corpo umano. La risposta biologica si esprime sia osservando quello che si verifica sul materiale sia osservando quello che si verifica all'organismo. Bisonga quindi distinguere la risposta del materiale dalla risposta dell'organismo.

La risposta del materiale può essere di tre tipologie:

- 1. Inerte -> biocompatibile;
- 2. Reattivo -> tosssico, bioattivo e bioriassorbibile;
- Tossico -> il materiale, a contatto con i tessuti viventi rilascia sostanze chimiche in quantità sufficienti ad uccidere le cellule, direttamente o indirettamente (tramite inibizione dei percorsi metabolici chiave). Può generare apoptosi delle cellule limitrofe, può enrare in circolo e innescare reazioni nel corpo.

La superficie di un materiale ha un'influenza critica sulla risposta biologica. Sono diversi i fattori che influenzano la reattività della superficie di un solido: origine del materiale, presenza di contaminanti e grado di contaminazione, cristallinità e piani cristallini esposti, composizione e topografia superficiale, grado di rugosità superficiale, idrofilicità/idrofobicità della superficie.

A contatto con i tessuti viventi possono avvenire diverse modifiche superficiali:

- Ossidazione o riduzione;
- Adsorbimento di acqua o ioni idrati -> idrolisi;
- Diffusione di ioni dai fluidi biologici alla superficie del materiale;
- Rilascio di ioni metallici, di monomeri o di radicali liberi;
- Degradazione del materiale;
- Riarrangiamento di gruppi superficiali ;
- Reazione a forze meccaniche;

La risposta del materiale induce a sua volta <u>la risposta dell'organismo</u>. Si possono scatenare una serie di eventi, tra cui:

- membranosi ed emolisi: alterazione della permeabilità delle membrane cellulari, portando allo squilibrio dei gradienti di concentrazione intra ed extracellulari ;
- citotossicità: interferenza nelle normali funzioni della cellula-> alterazioni del metabolismo;

- morte cellulare, necrosi: infiammazioni, variazioni morfologiche, danni cellulari irreversibili;
- proliferazione cellulare: le interazioni tra le cellule e il materiale sono differenti se le cellule sono in divisione;
- rilascio di mediatori: ad esempio, mediatori di risposte infiammatorie;
- alterazioni genetiche: mutagenicità o carcinogenicità;



FIGURA 2.3 Rappresentazione della risposta dell'organismo a contatto con un biomateriale.

Quando un materiale entra in contatto con un tessuto si verificano interazioni a causa della natura reattiva e aggressiva dei fluidi biologici, dovuta all'intimo contatto fra questi e il materiale estraneo che si protrae anche per lunghi periodi. Data l'elevata ostilità dei mezzi biologici alla maggior parte dei materiali e data l'elevata capacità del corpo di difendersi dall'invasione di corpi estranei, quasi tutti i materiali, a parte quelli estremamennte inerti, subiscono una significativa e rapida degradazione. Il meccanismo di difesa dell'organismo è l'infiammazione.

È la risposta del tessuto che determina le prestazioni a lungo termine del "sistema" pazientedispositivo. La risposta locale del tessuto può essere vista come un prolungamento del normale processo di guarigione di una ferita in quanto, allo scopo del impiantare un materiale all'interno di un tessuto ,è necessario intervennire chirurgicamente.

Il processo di risposta locale del tessuto prevede in generale due fasi:

- 1. Infiammazione, con variazione locale della vascolarizzazione e della composizione cellulare (vengono reclutati fibroblasti per la cicatrizzazione futura);
- 2. Riparazione del danno: l'organismo tenta di ripristinare la struttura e la funzionalità della parte danneggiata.

In seguito all'impianto di un materiale estraneo, la risposta biologica è del tutto simile alla risposta che si avrebbe in seguito ad una lesione priva di corpi estranei: presenza di macrofagi, capillari, fibroblasti e collagene. Essi si concentrano all'interfaccia con il materiale estraneo. Esaminiamo ora nel dettaglio cosa si verifica in seguito all'impianto di un materiale estraneo all'interno dell'organismo:

- 1. Impianto del biomaterile;
- 2. Adsorbimento di proteine;
- 3. Adesione di cellule (macrofagi); le prime tre fasi sono illutrate in figura 2.4.



#### FIGURA 2.4

 I macrofagi non riescono a "digerire" l'impianto, si fondono per dare origine a cellule giganti, ma l'impianto è comunque troppo grande. Le cellule giganti producono messaggeri chimici (citochine) affinché vengano reclutate nuove cellule (fig.2.5);





5. Arrivano i fibroblasti e cominciano a sintetizzare collagene (fig.2.6);



FIGURA 2.6

6. Alla fine l'impianto è chiuso in una capsula di collagene, priva di cellule e non vascolarizzata, che ingloba i macrofagi, come mostrato in figura 2.7;



FIGURA 2.7

In 4-8 settimane il tessuto ha stabilizzato la sua risposta e attorno all'impianto si è formata una struttura simile ad una cicatrice che prende il nome di capsula fibrosa. Questa capsula degrada le performance dell'impianto poiché impedisce il contatto diretto tra il device e i tessuti; può ad esempio mobilizzare una protesi ossea, inibire il successo di un graft vascolare, produrre opacizzazione di impianti oculari, produrre l'espulsione di impianti percutanei, produrre calcificazione di impianti, causare discomfort verso le lenti a contatto e in generale produrre complicazioni. Abbiamo già chiarito il concetto che la risposta minima si ottiene con materiali perfettamente inerti, tuttavia è raro trovare materiali con questa caratteristica, e la reattività chimica non è l'unico fattore che regola la

risposta dei tessuti. Se il materiale va incontro a degradazione, i prodotti di degrado che entrano in circolo possono influenzare l'attività cellulare ed avere effetti sul sistema immunitario, favorendo infezioni secondarie (esempio: metallosi).

Nell'interazione all'interfaccia con il biomateriale, un ruolo fondamentale è dato dalle proteine: non appena un materiale viene posto nell'organismo si forma un'interfaccia con i tessuti dove il ruolo dominante viene svolto dai fluidi biologici, soprattutto quelli sanguigni, con conseguente assorbimento delle proteine del sangue. Questo influenza la coagulazione e l'adesione di batteri e cellule. L'adsorbimento proteico è regolato da interazioni con il materiale che possono essere di natura:

- Elettrica: le proteine hanno caratteristiche ambivalenti (polari/non polari) e possono concentrarsi all'interfaccia tra un fluido e un solido;
- Chimica: le proteine sono scarsamente solubili e l'adsorbimento aumenta con il diminuire della solubilità;
- Termodinamica: il processo di adsorbimento delle proteine in condizioni fisiologiche è correlato ad una diminuzione dell'energia libera del sistema;

Il tipo di legame che si instaura con le proteine dipende dalle specifiche caratteristiche della superficie de materiale a livello nanometrico. L'interazione proteina-superficie è correlata alla struttura primaria della proteina, cioè alla sua seguenza di amminoacidi: infatti proteine più grandi interagiscono maggiormente con la superficie del materiale perche hanno un maggior numero di siti. L'adsorbimento di proteine dai fluidi circostanti sulla superficie di un biomateriale è un processo rapido, nel quale le proprietà e la topografia di superficie determinano il tipo, la quantità e la conformazione delle proteine adsorbite. Per cui, per controllare questa fase della risposta dell'organismo, occorre sviluppare materiali con superfici tali da controllare la conformazione e l'orientamento delle proteine con precisione, in modo da permettere all'organismo di riconoscerle in modo specifico. Per riconoscere e pilotare bene la risposta dell'organismo a livello cellulare e proteico bisogna:

- Conscere i principi base della biologia, specialmente quelli legati ai processi di guarigione, di difesa e di riparazione dei tessuti;
- Inibire i processi aspecifici di adsorbimento proteico;
- Preparare la superficie di un materiale affinché non venga riconosciuto come corpo estraneo;

A seconda delle applicazioni sono necessarie differenti proprietà di adesione; ad esempio, gli impianti ossei o dentali richiedono una buona adesione di proteine in modo da consentire la crescita dell'osso

e la formazione di un'interfaccia stabile e forte tra l'impianto e i tessuti. Al contrario, l'adesione di proteine deve essere bassa nel caso di cateteri o lenti a contatto, casi in cui è richiesta una scarsa adesione con i tessuti. Nel caso dei biosensori le proteine adsorbite devono rimanere biologicamente attive.

Nei primi nanosecondi successivi all'impianto le molecole d'acqua presenti nei fluidi biologici raggiungono la superficie e formano un mono o doppio strato; l'acqua interagisce e si lega alla superficie in modi diversi a seconda delle proprietà di superficie del materiale. In questo strato idrato possono essere presenti ioni o biomolecole idrosolubili (fig. 2.8).



FIGURA 2.8 Prime interazioni tra superficie del biomateriale e le molecole d'acqua presenti nei fluidi biologici [80].

Il film d'acqua sulla superficie influenza l'interazione con le proteine, nell'arco di micro o millisecondi, e continuano per tempi più lunghi. Può ad esempio determinare la denaturazione o meno delle proteine, il loro orientamento o la loro capacità di aderire (fig. 2.9).



FIGURA 2.9 Pochi millisecondi dopo inizia l'adsorbimento delle proteine [80].

Le cellule che giungono successivamente vedono uno strato di proteine. La loro interazione con la superficie dipende da questo strato, le cui proprietà a loro volta dipendono dallo strato idrato e dalle caratteristiche superficiali del materiale impiantato (fig. 2.10).



FIGURA 2.10 Rappresentazione di un interazione corretta (dx) e scorretta (sx) tra cellule e biomateriale [80].

Quindi, quando si parla di interazioni cellule-superficie, occorre ricordare che l'interazione è fra le cellule e le proteine o altre biomolecole, legate ad essa. Le interazioni tra biomolecole e superfici artificiali possono essere sfruttate per la funzionalizzazione dei biomateriali, allo scopo di guidare la risposta dell'organismo all'impianto del biomateriale. In figura 2.11 possiamo visualizzare lo schema dell'interfaccia tra un impianto dentale e l'osso a diversi ingrandimenti:



FIGURA 2.11 Rappresentazione dell'interfaccia tra un impianto dentale e l'oso circostante [80].

Le interazioni principali sono tra la superficie dell'impianto (strato di ossido) e i fluidi corporei. Qualora si verifichi qualche tipo di reazione all'interfaccia, con il rilascio di prodotti di reazione nei tessuti, tali prodotti possono diffondere attraverso i tessuti a causa dei gradienti di concentrazione, specialmente gli ioni metallici. Componenti solubili possono avere rapido accesso all'apparato circolatorio e raggiungere in questo modo altri tessuti o organi. In alcuni casi i prodotti di rilascio vengono metabolizzati ed espulsi tramite le vie naturali, in altri vengono accumulati. In caso di accumulo può non insorgere alcun problema, se non vengono superati i livelli di tolleranza da parte dell'organismo, oppure possono innescarsi effetti sistemici. Alcuni esempi possono essere:

• Fibre di carbonio utilizzate in alcuni casi di riparazione di legamenti possono frammentarsi e venire trasportate dal sistema linfatico, accumulandosi nei linfonodi;

- Monomeri residui della polimerizzazione *in situ* del PMMA (polimetilmetacrilato) possono avere accesso al sistema vascolare e causare abbassamenti anche fatali della pressione sanguigna;
- Ioni metallici rilasciati da artoprotesi sembrerebbero accumularsi in varie regioni dell'organismo, con effetti tossici;

#### 2.3-Bioattività

Il concetto di bioattività nasce dalla seguente ipotesi:

"la bioattività di un materiale per impianti è ottimale se il materiale stimola la formazione di tessuto normale sulla sua superficie e, inoltre, se è in grado di generare un'interfaccia capace di sopportare le sollecitazioni che normalmente agiscono localmente".

Questo concetto, secondo il quale la bioattività è un'estensione della biocompatibilità, è applicabile a tutti i materiali che inducono attivamente una risposta specifica da parte dell'organismo, tale da portare ad un legame chimico con i tessuti, tipicamente nel campo delle sostituzioni ossee. Infatti, la bioattività può essere vista come la modalità con la quale un biomateriale, in particolare per sostituzioni ossee, risponde al momento in cui viene impiantato in un organismo. Appartenono a questa classe di materiali quattro categorie:

- 1. Ceramici a base di fosfati di calcio (apatiti);
- 2. Vetri e vetroceramici bioattivi;
- 3. Compositi bioattivi;
- 4. Metalli bioattivi;

Il comportamento dei materiali bioattivi è intermedio tra quello dei materiali bioinerti e quello dei materiali bioriassorbibili. Un materiale bioattivo è in grado di creare un ambiente compatibile con la crescita di tesuto sano dando luogo ad un'interfaccia mineralizzata che fa da giuzione naturale tra tessuto e materiale. I meccanismi, i tempi e la forza di legame, così come lo spessore dell'interfaccia, sono differenti a seconda del tipo di materiale.

La velocità di formazione del legame all'interfaccia si può correlare con il livello di bioattività del materiale: "il livello di bioattività di un materiale specifico può essere messo in relazione con il tempo necessario a far si che il 50% dell'interfaccia sia legata in odo efficacie con i tessuti".

Proprio a questo scopo è stato introdotto l'indice di bioattività: IB = 100/t 0,5bb, dove t 0.5bb è il tempo necessario affinché il 50% della superficie dell'impianto sia legata con i tessuti.

Con l'indice di bioattività e osservando come varia la cinetica di interazione con i tessuti, sono state sviluppate diverse classificazioni di materiale. Se osserviamo lo spettro di bioattività (fig.2.12) di vari materiali bioceramici si può vedere come ci siano numerose sovrapposizioni tra le varie tipologie di materiale:



FIGURA 2.12 Rappresentazione dello spettro di bioattività di diverse bioceramici [81].

I materiali bioattivi possono essere classificati in due categorie:

1. Classe A, materiali osteoproduttivi;

L'osteoproduzione è il meccanismo attraverso il quale una superficie bioattiva viene colonizzata da cellule osteogeniche presenti nell'ambiente biologico che circonda il difetto, in seguito ad un interveto chirurgico -> stimolano l'osso a crescere. Tali materiali possono legarsi sia ai tessuti molli che ai tessuti duri (esempio: la maggior parte dei vetri bioattivi).

2. Classe B, materiali osteoconduttivi;

l'impianto protesico fornisce semplicemente un'impalcatura sulla quale l'osso può crescere attraverso meccanismi meno specifici dei precedenti (esempio: impianti in idrossiapatite).

Nel prossimo capitolo verrà introdotta una classe di biomateriali, i vetri bioattivi, analizzandone le caratterisctiche principali.

### **CAPITOLO 3**

#### 3.1-Introduzione ai biovetri

Nel capitolo precedente è stato spiegato che qualsiasi materiale, che sia di origine naturale o artificiale, che venga utilizzato per rimpiazzare o supportare le funzioni di un tessuto vivente, è noto come biomateriale [5].

I biomateriali vengono solitamente classificati come polimeri naturali o sintetici, metalli, compositi e ceramici (biovetri), come mostrato in figura 3.1.



Figura 3.1 Classificazione schematica dei biomateriali [83].

I materiali polimerici hanno una flessibilità di composizione in grado di fornire loro caratteristiche uniche, ma le loro proprietà meccaniche non sono sufficienti in molte applicazioni; i metalli hanno un'elevata resistenza all'usura, forza e duttilità. Tuttavia, il loro elevato tasso di corrosione e la loro bassa biocompatibilità rendono difficile l'integrazione con i tessuti viventi; in più l'alto tasso di diffusione di ioni metallici possono portare a reazione allergiche. I materiali ceramici, invece, possiedono una buona biocompatibilità e un'ottima resistenza alla corrosione e alla compressione. Sfortunatamente questa classe di materiali è molto fragile.

L'utilizzo di scaffold composti da materiali polimerici per la rigenerazione ossea è limitato, poiché nei polimeri verrà a mancare la fase inorganica biocompatibile composta da idrossiapatite (HA) [6]; gli scaffold fabbricati con materiali inorganici o da bioceramici come ad esempio i vetri bioattivi solitamente forniscono proprietà meccaniche migliori.

I vetri bioattivi/biovetri sono materiali molto interessanti per la produzione di scaffold, per realizzare rivestimenti (coating), micro e nano particelle, impianti solidi, polveri e granulati destinati alla rigenerazione ossea grazie alle loro proprietà versatili, che possono essere modificate in base alla loro composizione. Ma cosa sono?

I vetri bioattivi sono vetri a base di ossidi. La composizione tipica è costituita da 4 ossidi:

- SiO<sub>2</sub>
- CaO
- Na<sub>2</sub>O
- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

È possibile identificare tre categorie di ossidi all'interno della struttura di un vetro bioattivo:

- Ossidi formatori, con numero di coordinazione pari a 3 o 4 (Si, B, P, Ge, As) Formano la struttura vetrosa a partire dalla fase liquida;
- Ossidi modificatori, con numero di coordinazione ≥ 6 (Na, Ca, Ba, K) Vengono aggiunti per diminuire la viscosità e per permettere la lavorazione a più basse T;
- Ossidi intermedi, con numero di coordinazione compreso tra 4 e 6 (Al, Li, Zn, Mg, Pb, ...) Si comportano come ossidi formatori di reticolo se aggiunti ad ossidi formatori;

Il primo vetro bioattivo fu sintetizzato circa 50 anni fa da Hench et al. [7] e apparteneva al sistema SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Bioglass®). Hench et al. si accorsero che alcune composizioni di vetri avevano un'eccellente biocompatibilità e un'ottima capacità di creare legami chimici con l'osso; ed è proprio su questo che si basa il concetto di bioattività di un vetro bioattivo, ossia alla sua capacità di formare HA se immerso in una soluzione fisiologia simulata, capacità che hanno molti biovetri ma non tutti. I biovetri capaci di produrre HA sono quei vetri che contengono la giusta quantità di ossidi modificatori (ossido di calcio, ossido di sodio oppure entrambi), mentre più si va verso la silice pura più ci si discosta dalla caratteristica bioattiva fino ad ottenere vetri non bioattivi, come possiamo vedere dal diagramma di fase (Fig.3.2) proposto da Hench:



Figura 3.2 Diagramma di fase di un biovetro silicato [83].

La capacità di formare HA è molto spiccata al centro del diagramma sopra riportato, mentre lo è poco se si va verso la silice; avvicinandosi invece verso l'ossido di sodio si osservano vetri riassorbibili, ossia capaci di dissolversi nei fluidi biologici. Sempre nel diagramma si osserva una zona cerchiata che contiene tutte le composizioni maggiormente bioattive, dove all'interno vi sono anche i vetroceramici in grado di produrre HA.

La bioattività di questi materiali si manifesta attraverso una modificazione della superfice dipendente dal tempo. Tale modifica può avvenire a contatto con soluzioni fisiologiche simulate *in vitro* oppure a contatto con fluidi biologici *in vivo*: il risultato *in vivo* è la completa integrazione con i tessuti calcificati (osteointegrazione): è proprio la formazione di idrossiapatite sulla superficie del biovetro il criterio basilare per stabilire la bioattività del materiale *in vivo*.

Analizziamo il meccanismo di bioatività proposto da Hench.

La formazione di uno strato di idrossiapatite avviene in seguito alla dissoluzione del vetro; l'accumulazione dei prodotti di dissoluzione causano un cambiamento che riguarda sia la composizione chimica che il pH della soluzione, fornendo così una superficie adatta alla nucleazione dell'HA. Ci sono 5 fasi proposte per la formazione di HA nei fluidi corporei *in vivo* o in SBF *in vitro*:  Rapido scambio ionico di Na<sup>+</sup> e/o Ca<sup>2+</sup> con ioni H<sup>+</sup> provenienti dalla soluzione, segue la creazione di silanoli (Si-OH) sulla superficie del vetro;

Nella prima fase il pH della soluzione aumenta e nei pressi della superficie del vetro si forma una regione ricca di silice.

2. Rilascio di silice solubile in soluzione nella forma di Si(OH)4;

La silice solubile abbandona il vetro ma sulla superficie continuano ad essere presenti i silanoli, poiché non tutte le unità strutturali sono così gravemente attaccate da passare in soluzione.

3. Condensazione dei gruppi silanoli superficiali e polimerizzazione;

Nel terzo stadio i silanoli superficiali condensano tra di loro e polimerizzano formando silice idrata, ossia gel di silice in superficie; nello strato appena formato si ha prevalentemente silice, non si hanno più ioni calcio, ioni fosfato e ioni modificatori.

4. Migrazione di ioni Ca<sup>2+</sup> e ioni fosfato dalla soluzione alla superficie;

Nello strato di gel cominciano a diffondere altri ioni presenti in soluzione; il gel si arricchisce quindi di questi ioni ma continua a rimanere in fase amorfa.

 Cristallizzazione del layer superficiale tramite l'incorporazione di OH<sup>-</sup> e ioni carbonato dalla soluzione;

Quando la concentrazione di fosfato di calcio è sufficientemente elevata il film di gel si riorganizza tanto da cristallizzare formando cristalli di idrossicarbonatoapatite (nei fluidi corporei simulati si hanno anche ioni carbonato).



Figura 3.3 Raffigurazione del meccanismo di bioattività proposto da Hench

Un biovetro dovrebbe essere progettato in modo che esso possa fornire una compatibilità strutturale appropriata senza causare effetti dannosi per i tessuti viventi. Adattando la composizione iniziale del biovetro e modificando i processi di produzione, è possibile progettare un vetro bioattivo idoneo ad una specifica applicazione; un'altra caratteristica importante di un vetro bioattvo, che gli permette di svolgere al meglio il suo ruolo nell'ingegneria tissutale ossea, è la sua abilità nel migliorare la rivascolarizzazione, l'adesione degli osteoblasti, l'attività enzimatica e la capacità di far differenziare le cellule staminali mesenchimali [8]. Oltre a questo, i vetri bioattivi possono agire anche da materiali riempitivi e/o di rivestimento per strutture polimeriche.

Sono comunque diverse le caratteristiche di un biovetro da tenere sotto controllo per permetterne il miglior funzionamento una volta inserito in un tessuto: prima di ogni cosa la forma e le dimensioni delle particelle che lo compongono, poiché variando queste ultime variano in maniera significativa le proprietà del materiale; anche il rischio di tossicità va preso in considerazione durante la progettazione di un materiale bioattivo, valutando minuziosamente che il rilascio di elementi presenti all'interno del materiale sia sotto le soglie di sicurezza biologiche e quindi che non sia citotossico o lo sia in maniera trascurabile.

Grazie alle caratteristiche elencate in precedenza, sono state effettuate una mole enorme di ricerche per sviluppare vetri bioattivi a base di silicio, di boro e vetri fosfati. Anche alcuni vetri metallici sono stati presi in considerazione per scopi biomedici: alcuni oligoelementi sono stati incorporati nel network vetroso per ottenere proprietà desiderate, che hanno effetti benefici per il rimodellamento osseo e per l'angiogenesi, come vedremo in seguito.

Ma quali sono le proprietà fondamentali che si ricercano in un vetro o in vetroceramico bioattivo?

Partiamo chiarendo la differenza tra le due classi di materiali sopraelencati: un vetro bioattivo è un materiale con struttura completamente amorfa, mentre il vetroceramico ha una struttura parzialmente cristallina. I vetroceramici si ottengono attraverso un processo in cui il vetro viene riscaldato ad una temperatura fissa in atmosfera controllata. Il vetroceramico ottenuto in seguito a questo ciclo di riscaldamento avrà caratteristiche meccaniche superiori rispetto al vetro di partenza per quanto riguarda comportamento viscoso, tenacità e durezza; d'altro canto, la cristallizzazione del vetro influenza in maniera negativa la sua bioattività, come mostrato da alcuni ricercatori [9].

Le proprietà che rendono un vetro bioattivo o un vetroceramico adatto a funzionare come biomateriale sono le seguenti [10]:

- biocompatibilità, devono essere non tossici e anzi promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare;
- 2. la fase cristallina eventualmente presente non deve indurre effetti citotossici e non deve alterare in modo significativo i processi fisiologici delle cellule o del tessuto;
- quando in contatto con SBF i vetri/vetroceramici devono essere progressivamente rivestiti da uno strato di HA;
- 4. non devono far scaturire alcun processo infiammatorio;
- 5. devono avere proprietà meccaniche adeguate agli sforzi ai quali questi materiali verranno sottoposti in modo da prevenire fallimenti strutturali;
- 6. per la commercializzazione, il biovetro deve essere conveniente e contemporaneamente deve mantenere le caratteristiche desiderate;

#### 3.2-L'applicazione principale dei biovetri: la rigenerazione ossea

L'applicazione più importante per i ceramici bioattivi è la guarigione di difetti ossei, che possono essere stati causati da traumi, da difetti congeniti o da malattie, quali osteoporosi o rimozione di tumori. Attualmente l'autotrapianto, tecnica utilizzata per trapiantare parti di ossa, nella zona interessata, provenienti da altre zone del paziente, solitamente il bacino, è la soluzione più utilizzata per la riparazione dei difetti ossei.

L'osso è uno dei tessuti più comunemente trapiantati, secondo solo al sangue [11]. Gli svantaggi principali dell'autotrapianto risiedono nella scarsa disponibilità e nel fatto che la maggior parte dei pazienti patiscono moltissimo il dolore nel sito donatore; è quindi necessaria un'alternativa sintetica, dato che operazioni di trapianto che vengono svolte ogni anno sono circa un milione [12].

L'idea della rigenerazione ossea tramite l'utilizzo di uno scaffold è quella di utilizzare un template tridimensionale temporaneo per indirizzare correttamente la fase di riparazione dell'osso: idealmente lo scaffold dovrebbe stimolare il naturale meccanismo di rigenerazione del corpo umano; esso deve quindi reclutare le cellule, come ad esempio cellule staminali del midollo osseo, e stimolarle a formare nuovo osso. All'interno dello scaffold devono penetrare anche i vasi sanguigni se vogliamo far sì che la nuova frazione di osso appena formatosi possa sopravvivere. Nel tempo poi dovrebbe anche degradarsi, dando la possibilità al nuovo osso di rimodellarsi naturalmente.

Dal punto di vista della scienza dei materiali, l'osso è un nanocomposito con struttura gerarchica, la cui componente organica è composta da collagene (35%) mentre la componente inorganica è composta principalmente da fosfati di calcio in forma di cristalli di idrossiapatite. L'osso spongioso

ha invece una struttura composta un network interconnesso di pori, la cui dimensione è in media superiore ai 500  $\mu$ m (vedi figura 3.4).



Figura 3.4 Microstruttura dell'osso spongioso [82].

Per un ingegnere, lo scaffold ideale dovrebbe essere duro e bioattivo e dovrebbe avere una struttura simile a quella dell'osso spongioso; però le esigenze dei chirurghi non sempre combaciano con quelle dell'ingegnere: il chirurgo desidererebbe un materiale poroso ma con le caratteristiche meccaniche simili a quelle dell'osso corticale, che possa essere tagliato e modellato in sala operatoria e che possa anche essere pressato all'interno di difetti ossei, così che possa poi espandersi e riempire il difetto, o che possa addirittura essere iniettato dentro il difetto.

Il biovetro 45S5 è stato utilizzato con più di un milione di pazienti per riparare i difetti ossei nella mascella e in ortopedia [13]; usato in questo modo, il biovetro si dissolve e stimola la naturale rigenerazione ossea. Considerando le proprietà di questo materiale e la sua età, si può affermare tranquillamente che i vetri bioattivi non hanno ancora espresso tutto il loro potenziale nel campo della rigenerazione ossea. Il suo più grande successo commerciale lo ha ottenuto in forma di agente di rigenerazione attivo in un dentifricio, chiamato NovaMin® (GlaxoSmithKline,UK). Gli studi clinici hanno dimostrato che questo dentifricio è in grado di mineralizzare i piccoli buchi nella dentina, riducendo la sensitività del dente.

Prima di affrontare le principali applicazioni cliniche dei biovetri, è necessario soffermarsi sui metodi di produzione che ci permettono di ottenere questa classe di materiali, analizzando come la differente tecnica utilizzata possa influenzare le caratteristiche del prodotto finale.

#### 3.3-Metodi di produzione

Lo sviluppo di biomateriali è attualmente l'area di ricerca più attiva nel campo dell'ingegneria biomedica. Come abbiamo già affermato, i vetri bioattivi possiedono un enorme potenziale per essere il biomateriale ideale grazie alla loro grande capacità di adattarsi all'ambiente biologico e anche perché le loro proprietà possono essere modificate facilmente. Da secoli la produzione di vetri si è evoluta attraverso tecniche differenti, e ora l'industria del vetro domina gran parte dell'economia americana ed europea [14]. Il vetro è un materiale indispensabile per applicazioni sofisticate nell'optoelettronica, nell'ingegneria biomedica, nella fotonica e nelle biotecnologie. In generale, le tecniche classiche utilizzate per preparare i vetri sono due (figura 3.5)

- Fusione-colata (melt-quenching): il vetro è ottenuto tramite la fusione di una miscela di materie prime, tipicamente polveri inorganiche (ossidi e carbonati), e la successiva colata e solidificazione.
- Tecnica sol-gel: precursori liquidi (alcossidi) ed inorganici (sali) vengono utilizzati per effettuare la sintesi per via umida, che prevede fasi di gelificazione ed essiccamento, per preparare vetro amorfo.



FIGURA 3.5 Sintesi dei passaggi dei processi fusione-colata e sol-gel [84].

#### 3.4-Tecnica fusione-colata

Il modo più comune per ottenere un vetro è tramite la fusione di due o più ossidi seguita da un trattamento di tempra, che può avvenire su piastra, in stampo o in acqua. Il processo inizia preparando un mix di ingredienti, calibrando in maniera accurata la frazione in peso degli stessi; in seguito questa

combinazione di ingredienti viene macinata per rompere ogni agglomerato di particelle e quindi per ottenere una polvere uniforme; per ottenere particelle di dimensione omogenea, la miscela viene trasferita al mulino a sfere e macinata per due ore in ambiente umido, ad esempio in acetone. La miscela risultante viene poi essiccata in aria così da far evaporare l'acetone. Ora le polveri macinate devono essere trasferite in un crogiolo in allumina o in platino e fuse ad alta temperatura in una fornace. Il crogiolo in allumina può essere utilizzato per i vetri che fondono a bassa temperatura poiché, a temperature elevate, l'alluminio diffonde dal crogiolo all'interno della composizione del vetro, alterandola e diminuendo la bioattività. Quindi, per la realizzazione di vetri che hanno alte temperature di fusione, viene utilizzato un crogiolo in platino. La miscela di vetro dovrebbe essere calcinata a circa 500°C per 2 ore [14] così che tutte le sostanze gassose possano essere rilasciate dalla composizione. Le temperature nella fornace possono variare; ad esempio per certe composizioni alluminosilicate possono salire fino a 1500°C, mentre composizioni a base di boro o di fosfato fondono alla temperatura di 1200-1300°C. Ma, prima della fusione, bisogna assicurarsi che la miscela di vetro venga portata alla temperatura di fusione per almeno un'ora per facilitare una fusione uniforme e quindi ottenere materiali fusi in maniera omogenea. Il vetro fuso viene versato in uno stampo di grafite preriscaldato e il fuso rimanente viene versato su una lastra piana in rame e temprato da un'altra piastra di rame in aria per ottenere le fritte. Si possono ottenere vetri con la forma o le dimensioni desiderate utilizzando stampi aventi le forme volute.

Nella maggior parte dei casi, i vetri vengono temprati in aria per evitare fenomeni di cristallizzazione; tuttavia, se sono necessarie velocità di raffreddamento più elevate, i vetri possono subire il processo di raffreddamento in liquidi come l'acqua, l'azoto liquido o il mercurio. Per ottenere un raffreddamento ultraveloce il vetro viene messo a contatto con materiali solidi con un'elevata conduttività termica, come ad esempio il rame.

Per rimuovere gli stress residui generati durante il processo di tempra, il vetro ottenuto precedentemente viene ricotto a 500°C (temperatura inferiore alla temperatura di transizione vetrosa) per 12 ore in aria in un forno a pozzo.

I vari passaggi sopraelencati sono riassunti in figura 3.6:



FIGURA 3.6 Passaggi tecnica fusione-colata schematizzati.

Nel 1963, Pietrokowsky sviluppò un dispositivo [15] nel quale le gocce di fuso espulse dal crogiolo vengono pressate tra due piastre metalliche, come mostrato in figura 3.7:



FIGURA 3.7 Schema dispositivo di Pietrokowsky [85].

Con questo dispositivo si ottiene una velocità di raffreddamento pari a 10^5°C/s.
Nel 1967, Zarzycki e Naudin [16] produssero scaglie di vetro a base di boro raffreddando le gocce di fuso tra due rulli in acciaio rotanti (fig.3.8).



FIGURA 3.8 Schema dispositivo di Zarycki e Naudin [86].

# **3.5-Tecnica sol-gel**

La dispersione di particelle colloidali (diametro compreso tra 1-100 nm) in un liquido è chiamato sol [17]. Un gel è un network rigido composto da pori interconnessi e catene polimeriche. L'idrolisi e la policondensazione di un precursore organometallico porta alla formazione di un network 3D, che successivamente forma un gel.

I gel possono essere suddivisi in tre classi, che sono alcogel, xerogel e aerogel (Fig.3.9).



FIGURA 3.9 Illustrazione dei tre tipi di gel ottenibili.

Nell'alcogel il mezzo di dispersione è alcolico; lo xerogel è un colloide solido ottenuto essiccando un gel a temperature non superiori a 100°C, con una conseguente contrazione strutturale finale; l'aerogel è invece una miscela simile ad un gel costituita da una sostanza allo stato solido e un gas, per cui rispetto al gel il componente liquido è sostituito con un gas.

Il primo step nel processo sol-gel è la miscelazione dei precursori alcossidi o organometallici; il secondo step comporta l'idrolisi dei precursori con l'acqua de-ionizzata: quando un alcossido di silicio viene idrolizzato dall'acqua dà origine ai gruppi silanolo; questi gruppi silanolo interagiscono tra di loro formando legami Si-O-Si ed eventualmente danno origine al network di silice tramite un processo di policondensazione, durante il quale l'acqua viene espulsa come sottoprodotto.

I processi di idrolisi e policondensazione sono illustrati in figura 3.10:



FIGURA 3.10 Schematizzazione dei processi di idrolisi e policondensazione [14].

A causa dell'elevata forza di campo del  $Si^{4+}$ , gli ioni ossidrilici, fortemente nucleofili, tendono ad attaccare gli ioni silicio.

L'idrolisi e la policondensazione sono processi simultanei e la loro cinetica può essere influenzata da diversi fattori, quali pH, composizione, temperatura, precursori alcossidi, pressione e concentrazione delle differenti specie ioniche.

Dopo che il sol si è formato, segue il processo di gelificazione; il sol ha una viscosità molto bassa, ma durante la gelificazione si osserva un brusco aumento della viscosità. Il punto di gelificazione  $(t_G)$  è il punto durante il quale il gel si comporta come un solido elastico dato che sempre più particelle diventano interconnesse.

Il tempo di gelificazione dipende dalla concentrazione, dalla natura dei gruppi alcossidi e dalla quantità d'acqua utilizzata per l'idrolisi: il tempo di gelificazione è maggiore per i gruppi alcossidi pesanti e allo stesso tempo aumenta con l'aumentare della quantità d'acqua utilizzata per l'idrolisi.

Lo step successivo è la sineresi/invecchiamento del gel, durante il quale si può osservare una diminuzione della porosità e quindi un aumento nella forza strutturale dovuto al continuo processo di policondensazione e precipitazione del gel.

La trasformazione di fase può avvenire anche durante il processo di invecchiamento. Un trattamento idrotermale può accelerare il processo di di invecchiamento. Quest'ultimo step mostra anche effetti marcati sulle proprietà fisiche come ad esempio il volume dei pori, l'area superficiale e la densità del gel e quindi del vetro risultante.

L'ultimo step consiste nell'essiccazione del gel invecchiato per rimuovere ogni traccia di liquido dal network solido tridimensionale; durante il processo di essiccazione, il gel deve essere abbastanza forte da resistere a qualsiasi rottura catastrofica, che possono essere causate dagli stress capillari dovuti al processo di invecchiamento. I passaggi della tecnica sol-gel sono riassunti in figura 3.11:



FIGURA 3.11 Passaggi della tecnica sol-gel schematizzati.

#### 3.6-Vetri bioattivi mesoporosi (MBGs)

Come vedremo in seguito, la struttura nano-porosa è una caratteristica intrinseca dei materiali ottenuti tramite il processo sol-gel. Il sistema IUPAC classifica i materiali porosi in materiali microporosi, quando la dimensione dei pori è inferiore a 2 nm, materiali mesoporosi, con porosità tra 2 e 50 nm, e materiali macroporosi, aventi pori dalla dimensione maggiore di 50 nm. I materiali a base di silice ottenuti dalla "convenzionale" tecnica sol-gel sono tipicamente caratterizzati da pori di dimensione tra i 10 e i 50 nm; è possibile ottenere una struttura mesoporosa con pori di dimensione inferiore, e soprattutto con pori orientati ed ordinati, combinando la tecnica sol-gel con l'utilizzo di surfattanti: i vetri bioattivi mesoporosi (MBG) sono stati sviluppati utilizzando questa combinazione nel 2004 da Yu et al. [23].



FIGURA 3.12 Illustrazione del comportamento di molecole surfattanti e della loro disposizione in ambiente acquoso.

Per ottenere particelle di vetro mesoporoso bisogna quindi utilizzare un agente template in grado di autoassemblarsi in micelle dalla forma cilindrica (figura 3.12) quando immersi in un solvente. L'agente surfattante è formato da una testa idrofila e una coda idrofobica; se vengono aggiunti in concentrazioni appropriate all'interno di soluzioni acquose si organizzano in strutture ordinate orientando le loro teste e code: nello specifico, quando nella soluzione viene raggiunta la prima concentrazione micellare critica essi formano delle micelle sferiche, quando superano la seconda concentrazione critica si autoassemblano per formare strutture cilindriche [24] (figura 3.13).



FIGURA 3.13 Grafico concentrazione-temperatura dei surfattanti.

Una delle tecniche maggiormente utilizzate per la sintesi dei vetri bioattivi mesoporosi è la tecnica di autoassemblaggio indotto da evaporazione (EISA). Si utilizza l'evaporazione di un solvente per raggiungere la concentrazione micellare critica dei tensioattivi e quindi consentire la formazione di una fase liquido-cristallina. A seguito di tale processo avviene la condensazione del precursore del vetro di silice intorno alla struttura micellare. Tramite un trattamento termico di calcinazione viene infine rimosso il surfattante.

I vetri bioattivi mesoporosi così ottenuti hanno una struttura porosa molto ordinata, con dimensione dei pori compresa tra 5 e 20 nm; essi presentano numerosi vantaggi rispetto ai vetri bioattivi tradizionali, ad esempio sono dotati di una maggiore area specifica superficiale e ciò si riflette in una più spiccata bioattività. Studi recenti hanno anche dimostrato la possibilità di indirizzare la bioattività verso una specifica risposta biologica incorporando all'interno del reticolo dei MBG ioni terapeutici come lo stronzio, lo zinco, il rame e il cobalto, come vedremo nel prossimo capitolo. Proprio grazie ai motivi citati, questa classe di materiale ha destato grande interesse nel campo dell'ingegneria tissutale.

## **3.7-Confronto tra fusione-colata e sol-gel**

In base all'utilizzo clinico finale, un vetro bioattivo può essere processato in forma di monolite, in forma particellare o come scaffold tridimensionale atto a mimare l'architettura dell'osso trabecolare. Tuttavia, a causa della mancanza di norme internazionali in merito all'utilizzo di scaffold 3D a base di biovetro, per i difetti di piccole dimensioni si continuano ad utilizzare vetri bioattivi in forma

granulare e particellare. Rispetto agli scaffold porosi ottenuti tramite la sinterizzazione di polveri vetrose, le particelle di vetro in genere esibiscono una più elevata area superficiale specifica (SSA), ottimo per aumentare i siti di nucleazione e quindi il rateo di crescita di idrossiapatite sulla superficie.

Per aumentare la cinetica delle reazioni dei vetri in ambiente fisiologico si può intervenire principalmente sulla composizione iniziale del vetro e sulla scelta del metodo di produzione; sappiamo, per esempio, che le polveri di biovetro possono essere ottenute sia con la tecnica di fusione-colata sia che tramite il processo sol-gel. Va però sottolineato che la maggior parte dei vetri derivanti da fusione hanno una serie di limitazioni. Prima su tutte, richiedono una temperatura molto alta per far sì che i precursori possano fondere; in più, la bioattività in questo tipo di biovetri è possibile solo in un range limitato di composizioni, dato che una quantità di SiO<sub>2</sub> maggiore del 60% mol. rende il materiale praticamente inerte a contatto con i fluidi corporei.

Rispetto al metodo di fusione-colata, il processo sol-gel offre la possibilità di ottenere materiali reattivi in un più ampio range di composizione grazie alle proprietà strutturali, come la nano porosità intrinseca, derivante direttamente dal processo di sintesi.

Il vetro bioattivo 45S5 Bioglass è stato realizzato utilizzando entrambe le tecniche di produzione. Cacciotti [18] dimostrò che la cristallinità, il meccanismo di bioattività e la cinetica delle reazioni in un vetro 45S5 ottenuto tramite tecnica sol-gel potessero essere modulate tramite trattamenti termici dopo la sintesi del materiale. Fuare et al. [19] ha invece osservato in suo studio un aumento nell'area superficiale del vetro ottenuto tramite processo sol-gel rispetto a quello ottenuto tramite tecnica fusione-colata; l'abilità di formare HA è risultata invece paragonabile nei due vetri.

La letteratura scientifica mostra come la maggior parte dei vetri presenti ottenuti tramite sol-gel appartenga a sistemi binari come il SiO<sub>2</sub>-CaO o a sistemi ternari come SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Questo perché, al contrario di quanto accade con i vetri ottenuti tramite fusione, non è necessario utilizzare una quantità elevata di ossidi modificatori per abbassare la temperatura di processo dato che la formazione di vetro tramite tecnica sol-gel avviene a temperatura ambiente. È stato comunque dimostrato che l'aggiunta di alcuni elementi può portare grandi vantaggi per migliorare la bioattività e la risposta biologica del materiale; alcuni esempi possono essere l'ossido di calcio e l'ossido di magnesio, che svolgono un ruolo importante nella formazione di nuovo osso e per l'adesione delle cellule ossee; l'argento viene invece addizionato alla composizione iniziale per conferire al vetro proprietà antibatteriche.

Per poter confrontare in maniera diretta gli effetti delle due tecniche di produzione sulle caratteristiche del vetro ho preso in considerazione uno studio svolto al Politecnico di Torino [20], uno dei pochi

studi presenti in letteratura in cui vengono confrontati due vetri ottenuti si con due le due tecniche differenti, ma aventi la stessa composizione nominale.

La composizione in questione è SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O. Questo è stato anche il primo lavoro in cui si è sintetizzato tramite processo sol-gel un materiale bioattivo composto da sei ossidi. Rivediamo brevemente come sono stati ottenuti i vetri dai ricercatori del Politecnico.

• fusione-colata

è stato ottenuto il vetro bioattivo 47.5B con composizione 47.5SiO<sub>2</sub>-20CaO-2.5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-10MgO-10Na<sub>2</sub>O-10K<sub>2</sub>0 tramite la tradizionale tecnica di fusione-colata. In breve, una miscela di ossidi e carbonati è stata riscaldata fino a 1000°C (12°C/min) in un crogiolo in platino per decomporre termicamente i precursori vetrosi. Poi la temperatura è stata alzata fino a 1500°C (15°C/min). Dopo 30 minuti, il fuso è stato versato in acqua distillata così da ottenere fritte di vetro. Le polveri di vetro sono state ottenute tramite mulino a sfere e setaccio per avere particelle finali con dimensione inferiore ai 32 μm. Il biovetro così ottenuto, chiamato MD-47.5B, è stato utilizzato come controllo in questo studio.

• Sol-gel

Ortosilicato tetraetile (TEOS), trietile fosfato (TEP), nitrato di calcio tetraidrato, nitrato di sodio, nitrato di magnesio esaidrato e nitrato di potassio sono stati usati come precursori per i rispettivi ossidi. È stata preparata una soluzione composta da 10mL di acido nitrico e 60 mL di acqua distillata; l'acido serve come catalizzatore per la reazione di idrolisi del TEOS. A questo punto il TEOS viene aggiunto alla soluzione, miscelata tramite agitazione magnetica per 15 minuti. Tutti gli atri reagenti vengono in seguito aggiunti alla soluzione, la quale viene miscelata per altri 45 minuti fino ad ottenere una fase sol omogenea. La gelificazione avviene a temperatura ambiente e continua per 72 ore, dopo di che si passa all'invecchiamento, sempre per 72 ore, in un forno a 60°C. Il trattamento si svolge con con la boccetta contenente la soluzione chiusa per evitare la dispersione di elementi volatili. Il trattamento di essiccazione avviene invece aprendo leggermente la boccetta, permettendo una lenta evaporazione della fase alcolica liquida (T=120°C per 48 ore).

Parte del gel essiccato viene macinato e stoccato in un essiccatore per evitare l'assorbimento di umidità (campione DG-120), mentre la parte rimanente del gel viene calcinata a 625°C (TS1)(campione SG-625) o a 800°C (TS2)(campione SG-800). I materiali calcinati vengono poi triturati e setacciati per ottenere particelle con caratteristiche simili a quelle ottenute con il MD-47.5B.

#### 3.7.1-Caratterizzazione dei materiali: analisi termiche

L'analisi termica differenziale (DTA) è stata eseguita sui campioni di MD-47.5B e DG-120 per confrontare i comportamenti termici dei due materiali, in particolare per quanto riguarda la temperatura di transizione vetrosa (Tg), la temperatura di inizio cristallizzazione (Tx) e il massimo tasso di temperatura di cristallizzazione (Tc). Per l'analisi, le polveri dei due campioni sono state riscaldate fino a 1200°C (10°C/min) in un crogiolo di platino. Utilizzando le stesse condizioni e lo stesso equipaggiamento, sul campione di DG-120 è stato effettuato contemporaneamente un'analisi termogravimetrica (TGA) per valutare la perdita di massa nel materiale mentre viene riscaldato.



FIGURA 3.14 Risultati analisi DTA sui due campioni analizzati [20].

Nel grafico presente in figura 3.14 sono presenti i risultati ottenuti dalla DTA: i picchi nel verso delle y positive sono stati associati a reazioni esotermiche, mentre quelli nel verso delle y negative alle reazioni endotermiche.

La DTA sul campione di MD-47.5B ha rivelato le caratteristiche cercate, mostrando una Tg=550°C, Tx=700°C e Tc=750°C. L'ampia finestra (Tx-Tg = 150°C) di questo vetro permette che la sinterizzazione avvenga senza indurre cristallizzazione nella matrice amorfa; questo è un vantaggio per quanto riguarda la creazione di scaffold con questo materiale.

Per quanto riguarda il DG-120, la TGA ha mostrato una perdita in peso par al 50% a 800°C; non è stato possibile definire una finestra di lavorabilità come per il MD-47.5B; gli autori hanno scelto due temperature di calcinazione, TS1 e TS2: TS1=625°C è la temperatura minima in grado di assicurare la decomposizione termica della maggior parte dei nitrati e altri componenti organici; TS2=800°C corrisponde invece alla temperatura in cui si ha la massima perdita in peso del sistema.

## 3.7.2-diffrazione ai raggi X (XRD)

L'analisi XRD è stata effettuata sui campioni di MD47.5B, DG-120, SG-625 e SG-800 per valutare le caratteristiche microstrutturali e per identificare la presenza di fasi cristalline dovute ai trattamenti termici. L'analisi è stata effettuata utilizzando una camera di Bragg-Brentano. L'angolo 29 è stato nel range 10°-70°; il voltaggio e la corrente sono state imposte rispettivamente a 40kV e 30mA.



FIGURA 3.15 Risultato analisi XRD del MD-47.5 [22].

Il pattern XRD del MD-47.5B è caratterizzato da un alone amorfo tra i 25° e i 35° [21], tipico dei vetri silicati (figura 3.15).



FIGURA 3.16 Pattern XRD dei materiali ottenuti tramite tecnica sol-gel. a) DG-120, b) SG-625, c) SG-800 [20].

La figura 3.16 mostra i pattern XRD dei materiali derivanti dalla tecnica sol-gel in fasi differenti del processo di sintesi. Il pattern del DG-120 (figura 4.12a) rivela la presenza di NaNO<sub>3</sub>, che deriva dal precursore di Na<sub>2</sub>O introdotto durante il processo sol-gel: questo dimostra che la fase di essiccazione è stata svolta ad una temperatura troppo bassa, non in grado di decomporre i nitrati nel gel.

Al contrario del MD-47.5B che si presenta come amorfo, il SG-625 e SG-800 mostrano una cristallinità dopo la calcinazione, come confermato dal pattern XRD presente in figura 4.12b e 4.12c. Il pattern XRD del SG-625 appare come quello di un tipico materiale vetro ceramico.

## 3.7.3-analisi morfologiche e composizionali (prima del test di bioattività in vitro)

La morfologia e la composizione dei campioni sono state valutate sia prima che dopo i test di bioattività in vitro, di cui parleremo in seguito. Le analisi sono state effettuate tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettrografia a dispersione di energia (EDS) per valutare l'evoluzione della superficie del materiale durante le reazioni di processo causata dall'interazione tra il materiale

e la soluzione fisiologica in cui è stato immerso. Il voltaggio utilizzato durante i test è stato pari a 15kV.



FIGURA 3.17 Valutazione morfologica dei tre biovetri tramite SEM [20].

In figura 3.17 vengono mostrati i risultati dell'analisi SEM dei campioni DG-120, SG-625 e SG-800. Nel primo dei tre campioni elencati si possono osservare granuli grossolani di circa 100  $\mu$ m di diametro; questo fatto è dovuto al comportamento igroscopico di questo materiale, che tende a formare aggregati e rende difficile ed inefficiente il setacciamento. Negli altri due campioni si osservano, utilizzando un ingrandimento maggiore, particelle più fini e con una dimensione più uniforme, risultato diretto del processo di setacciamento.

Cosi come è già stato osservato tramite DTA e XRD, anche l'analisi EDS, effettuata sul DG-120 e SG-625, ha confermato la presenza di azoto nella composizione dei campioni derivante dai precursori

utilizzati per la sintesi del materiale; non è stata invece trovata alcuna traccia di questo elemento chimico all'interno del campione di SG-800. I risultati dell'analisi EDS sono visibili in figura 3.18.



(a)DG-120, (b)SG-625, (c)SG-800

FIGURA 3.18 Risultati analisi EDS dei campioni analizzati [20].

## 3.7.4-analisi della porosità e della SSA

Per valutare e comparare le proprietà strutturali dei materiali e per identificare un possibile effetto su queste dovuto al metodo di sintesi, è stata utilizzata la porosimetria ad assorbimento-desorbimento N<sub>2</sub>. La SSA è stata valutata applicando la teoria di Brunauer-Emmett-Teller (teoria BET) [22]. I risultati sono mostrati in tabella 3.1.

Tabella 3.1 Risultati analisi BET [20].

Material	Class	Calcination Temperature (°C)	SSA (m <sup>2</sup> /g)	Pore Volume (cm3/g)
MD-47.5B	Glass	As-quenched	0.6379	0.001304
SG-625	Glass-ceramic	625	2.2330	0.016708
SG-800	Glass-ceramic	800	1.2307	0.002727

I campioni di SG-600 e SG-800 mostrano un'area superficiale specifica maggiore paragonati al campione di MD-47.5B, il che conferma il ruolo chiave del processo di sintesi nelle proprietà strutturali dei materiali. Possiamo anche notare che la SSA decresce di un fattore 2 se la temperatura di calcinazione cresce da 625°C ad 800°C dato che la nanoporosità del materiale, intrinseca al

processo sol-gel, decresce con l'aumentare della T. Si è osservato un trend simile anche per il volume dei pori.

In generale, i valori di SSA dei due campioni calcinati sono sensibilmente inferiori a quelli osservati in altri biomateriali ottenuti tramite processo sol-gel; ulteriori studi serviranno per spiegarne il motivo.

## 3.7.5-test di bioattività in vitro

L'abilità di formare apatite dei tre campioni presi in esame è stata valutata immergendo i materiali in SBF (simulated body fluid, pH=7.4 a temperatura corporea). Il pH della soluzione è stato poi monitorato dopo 6, 24, 48, 72, 168 e 336 ore per valutare lo scambio ionico tra la superficie del materiale e la soluzione (fig.3.19). Il pH cresce nel tempo proprio a causa dello scambio ionico.



FIGURA 3.19 Valutazione del pH in seguito allo scambio ionico tra superficie del materiale e soluzione [20].

Possiamo osservare che il sistema che ha raggiunto il più alto valore di pH, ossia il SG-625, è anche lo stesso sistema in cui si è misurato il più alto valore di SSA: questo suggerisce che ci possa essere una relazione diretta tra il valore di SSA e la reattività del materiale in soluzione. Per questo sistema vetroso, il valore di pH si è stabilizzato dopo 48 h attorno al valore di 7.95, mentre per gli altri due sistemi si è registrato un incremento continuo per due settimane dopo l'immersione in SBF: questo può suggerire che la maggior parte delle reazioni per la bioattività in vitro del SG-625 avviene entro i primi due giorni di test. Possiamo notare ancora che le due curve di incremento di pH dei campioni

MD-47.5B e SG-800 sono simili, mostrandoci come il rateo delle reazioni sia simile tra i due campioni in SBF.

#### 3.7.6-analisi morfologiche e composizionali (dopo il test di bioattività in vitro)

Una volta effettuati i test di valutazione del pH, i campioni sono stati prelevati dal fluido e fatti asciugare per 48 ore prima di essere analizzati tramite SEM per quantificare la formazione di HA. Questa analisi ha rivelato un'eccellente abilità di formazione di apatite in tutti e tre i campioni analizzati, indipendentemente dalla tecnica utilizzata per produrre il campione in questione o dalla temperatura di calcinazione utilizzata.



FIGURA 3.20 Immagini SEM dei campioni analizzati dopo 48 ore, 7 e 14 giorni di immersione in SBF [20].

Come possiamo vedere in figura 3.20, agglomerati di fosfato di calcio sono stati osservati sulla superficie del MD-47.5B dopo solo 48 ore di immersione nel SBF, confermando l'elevata bioattività del materiale in questione, usato come controllo in questo studio. Dopo due giorni di immersione, strutture simili a quelle dell'apatite sono state osservate anche sugli altri due campioni vetro-ceramici: sulla superficie del SG-800 si osserva uno strato sottile di apatite, mentre sulla superficie del SG-625 si sono formati agglomerati di fosfati di calcio più grandi. Possiamo quindi confermare che la presenza delle fasi cristalline non ha inibito il meccanismo di bioattività dei due materiali. Dopo due settimane di immersione nel SBF, il coating di fosfato di calcio composto da agglomerati globulari

nanostrutturati, con morfologia molto simile a quella dell'idrossiapatite, è stato osservato su tutti e tre i campioni analizzati.

L'analisi EDS ha confermato una progressiva deposizione di calcio e fosforo sulla superficie dei materiali. Alla fine del test, il rapporto Ca/P per MD-47.5B, SG-625 e SG-800 è rispettivamente pari a 1.65, 1.63 e 1.48. Il rapporto Ca/P per MD-47.5B e SG-625 è molto simile al rapporto stechiometrico dell'idrossiapatite (Ca/P=1.67).

Possiamo quindi concludere affermando che:

- il metodo di produzione ha effetti più che chiari sulle proprietà strutturali di un materiale, come ad esempio per la SSA dei materiali derivanti da processo sol-gel, aventi valori di SSA dalle due alle quattro volte maggiori rispetto al materiale ottenuto tramite fusione-colata;
- 2. i materiali sol-gel basati sul 47.5B continuano comunque ad esibire una buona bioattività malgrado la formazione di fasi cristalline, presenza che, nei materiali ottenuti tramite fusione-colata, è spesso associata ad una drammatica diminuzione nell'abilità di formare apatite.

#### **3.8-Bioactive glass-scaffold**

Il metodo più comune per la preparazione di scaffold porosi a base di vetri bioattivi è quello di utilizzare particelle o piccole fibre di vetro, ottenute tramite il processo fusione-colata, all'interno di costrutti aventi la geometria e l'architettura desiderata. Questo verrà in seguito sinterizzato per legare le particelle in un network 3D con porosità interconnessa. Nella tabella 1 possiamo osservare i metodi usati per creare scaffold a base di vetri bioattivi e le caratteristiche degli scaffold così ottenuti [59]:

Tabella 3.2 Metodi utilizzati per produrre scaffold a base di vetri bioattivi e loro principali caratteristiche [59].

Method	Glass	Porosity (%)	Pore size (µm)	Strength <sup>*</sup> (MPa)
Thermal bonding of				
Particles	13-93	40-45	100-300	22 ± 1
Short fibers	13-93	45-50	>100	5
Polymer foam replication	45\$5	89-92	510-720	$0.4 \pm 0.1$
~ ~	13-93	75-85	100-500	11 ± 1
	13-93B3	80-85	100-500	$5 \pm 0.5$
Sol-gel foam	70S30C	82	500 (100)**	2.4
Unidirectional freezing of suspensions	13-93	53-57	90-110	25 ± 3
	13-93	50-55	60-120	27 ± 8
	13-93	50	50-150	47 ± 5
Solid freeform fabrication				
Selective laser sintering	13-93	58-60	700-1000	15 ± 1
Freeze extrusion fabrication	13-93	50	300	$140 \pm 70$
Robocasting	6P53B	60	500	$136 \pm 22$

Come possiamo vedere dalla tabella 3.2, sono diversi i metodi utilizzati, e ogni metodo porta alla produzione di scaffold aventi architettura dei pori differente, come possiamo vedere in figura 3.21.

Per un dato scaffold, la porosità, la dimensione dei pori e l'interconnessione tra i pori sono fattori cruciali. In generale, pori interconnessi con un diametro medio di 100 µm è il requisito minimo richiesto per permettere al tessuto di svilupparsi all'interno dello scaffold [60].



Figura 3.21 Microstruttura di scaffold a base di vetri bioattivi ottenuti tramite differenti metodi di produzione [59].

Il metodo descritto in precedenza, ossia la sinterizzazione di particelle o fibre di biovetro in uno stampo (fig.3.21 A e 3.21 B), è uno dei metodi più semplici. La principale limitazione di questo metodo è la bassa porosità ottenibile (40-50%) e la mancanza di interconnessione tra i pori. In figura 3.21 C possiamo osservare uno scaffold ottenuto tramite replicazione in schiuma polimerica, tecnica che può fornire allo scaffold una microstruttura simile a quella dell'osso trabecolare umano. Proprio utilizzando questa tecnica sono stati realizzati scaffold a base di vetri silicati, borosilicati e borati aventi una porosità nel range tra 60-90% [61,62]. Il congelamento di soluzione acquose e di sospensioni è stato utilizzato per preparare materiali polimerici e ceramici con una struttura macroporosa disordinata [63]. Applicando il processo di congelamento in maniera controllata, così da far crescere la fase ghiacciata in una direzione preferenziale, sono stati prodotti scaffold porosi con una microstruttura orientata [64]. Un beneficio della microstruttura orientata è la maggiore forza meccanica dello scaffold lungo la direzione di orientamento rispetto ad uno scaffold con microstruttura disordinata [64]. Gli scaffold ceramici ottenuti a partire dalla sospensione acquosa hanno spesso una struttura lamellare in cui la piccola larghezza dei pori (10-40 μm) risulta non

favorevole al supporto della crescita del tessuto. Questo particolare può essere migliorato aggiungendo alla soluzione una fase organica (ad esempio canfene) che verrà rimosso in seguito tramite trattamenti termali. Possiamo osservare il risultato di questo procedimento in figura 6.1 D e 6.1 E, in cui sono presenti scaffold con microstrutture ordinate e diametro dei pori di 100-150  $\mu$ m; sono stati così ottenuti due costrutti che, oltre ad avere una forza meccanica elevata, hanno mostrato l'abilità di supportare la proliferazione e la differenziazione cellulare *in vitro* e l'infiltrazione tissutale *in vivo* [65].

I metodi di prototipazione rapida o di SFF (solid freedom fabrication) offrono la possibilità di produrre scaffold con forma esterna personalizzabile e microstruttura interna predefinita. Questi metodi sono basati sulla costruzione di scaffold 3D layer by layer utilizzando modelli generati al computer tramite software dedicati (CAD). I dati ottenuti tramite TAC o risonanza magnetica possono essere utilizzati per la creazione di un modello CAD, così da poter fabbricare uno scaffold che possiede dimensioni esterne precise richieste per la riparazione del tessuto danneggiato. SFF è stata ampliamente utilizzata per la fabbricazione di scaffold a partire da polimeri biodegradabili (PLGA, PCL) e da materiali a base di fosfati di calcio (HA, TCP). La fabbricazione di scaffold compositi contenenti vetri bioattivi (PLA/45S5, PCL/45S5) usando questa tecnica è già presente in letteratura [66]. Tramite il metodo robocasting, uno dei metodi di prototipazione rapida utilizzabili, lo scaffold viene realizzato stampando una sospensione (un inchiostro) attraverso un piccolo ugello su un substrato utilizzando uno strumento di deposizione robotico. Dopo l'essiccamento, il costrutto viene riscaldato lentamente per far sì che la fase organica dell'inchiostro si decomponga e per legare termicamente le particelle. In figura 6.1 F possiamo osservare uno scaffold ottenuto tramite questa tecnica, avente una porosità del 60%, strutture cilindriche ordinate con diametro pari a 500 µm e pori larghi circa 500 µm, ma sia la porosità che la dimensione dei pori possono essere controllati modificando i parametri di deposizione dell'inchiostro. In questo scaffold possiamo notare un denso network tridimensionale di vetro bioattivo e una microstruttura uniforme.

I processi sol-gel, che coinvolgono una schiuma di sol e l'aggiunta di un agente surfattante, seguiti da reazioni di condensazione e gelificazione, sono stati utilizzati per la preparazione di scaffold porosi di pochi vetri bioattivi, come ad esempio il vetro 58S [67]. Lo scaffold cosi ottenuto ha una microstruttura simile a quella dell'osso trabecolare, ma la struttura dei pori è gerarchica, consistendo in macropori interconnessi (>100  $\mu$ m) e nanopori (poche decine di nm di diametro), tipici del processo sol-gel. Questa struttura gerarchica dei pori dello scaffold è utile e funzionale per stimolare le interazioni scaffold-cellule dato che mima la struttura gerarchica del tessuto naturale. Grazie ai nanopori presenti, questi scaffold hanno una elevata SSA (100-200 m<sup>2</sup>/g) e come risultato, gli scaffold si degradano e si convertono in HA più velocemente rispetto agli scaffold ottenuti a partire da vetri

derivanti da fusione. Comunque, i sol-gel scaffold hanno caratteristiche meccaniche inferiori e possono quindi essere utilizzati sono come sostituti per difetti non caricati particolarmente fa forze esterne.

Un ulteriore sviluppo nel settore dell'ingegneria tissutale basata sugli scaffold è avvenuto grazie all'utilizzo della tecnica di elettrospinning per creare scaffold nano-fibrosi composti da polimeri biodegradabili in grado di mimare la struttura fibrosa della matrice extra cellulare [68]. Questa tecnica è stata anche applicata per la creazione di fibre con diametri alla micro o nano-scala e per la fabbricazione di scaffold nano-fibrosi a base di biovetri [69]. Anche in questo caso, come per gli scaffold sol-gel, l'elevata SSA fa sì che il costrutto degradi velocemente convertendosi in HA. Altro aspetto in comune con gli scaffold sol-gel è che la bioattività di questi scaffold rimane inalterata anche per elevate quantità di ossido di silice. Possiamo osservare due esempi di questi scaffold nano-fibrosi in figura 3.22.



Figura 3.22 Immagine SEM di nanofibre di vetri bioattivi a)13-93B1, b) vetro bioattivo ottenuto per fusione [59].

# **CAPITOLO 4**

## 4.1- Stimolazione dell'angiogenesi tramite vetri bioattivi

È ormai chiaro il concetto di bioattività legato ai vetri bioattivi, ossia la capacità di legarsi ai tessuti viventi creando un'interfaccia stabile tra tessuto e materiale, tramite la formazione di uno strato di idrossicarbonatoapatite (HCA) una volta a contatto con fluidi biologici *in vivo* o con SBF *in vitro*.

È stato anche affrontato il concetto che la bioattività di un vetro dipende sia dalla sua composizione che dalla sua struttura.

In medicina rigenerativa, questa classe di materiali è stata largamente utilizzata per applicazioni riguardanti i tessuti duri, dato che i vetri bioattivi soddisfano i tre requisiti chiave per supportare una buona rigenerazione ossea: osteoconduttività, osteoinduttività e capacità osteointegrativa. I biovetri sono stati introdotti sul mercato in varie forme e dimensioni, e si stima un numero di pazienti entrati in contatto con il 45S5 Bioglass® pari ad 1.5 milioni fino al 2016. Questo è stato il primo materiale inorganico costruito dall'uomo in grado di legarsi ai tessuti duri, ma presto i ricercatori hanno capito che, modificando la percentuale degli ossidi presenti all'interno del 45S5 o aggiungendone di nuovi, si potessero ottenere nuovi materiali in grado di soddisfare specifiche richieste terapeutiche. Nella tabella 4.1 possiamo vedere quelli che sono i biovetri più utilizzati disponibili sul mercato:

Glass name	Composition	Commercial products and notes	Manufacturers
45S5 Bioglass <sup>®</sup>	45SIO <sub>2</sub> -24.5CaO-24.5Na <sub>2</sub> O-6P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (w1%)	NovaBone <sup>®</sup> putty and NovaBone <sup>®</sup> dental putty: moldable glass-based paste injectable into the bone/dental defect site by a syringe NovaBone <sup>®</sup> particulate (90–710 μm) for orthopedics NovaBone <sup>®</sup> Morsels (porous granulate) PerioGlas <sup>®</sup> particulate (90–710 μm) for repairing jaw bone defects NovaBone <sup>®</sup> porous blocks Biogran <sup>®</sup> particulate (300–360 μm) NovaMin <sup>®</sup> particulate and BioMin for tooth enamel remineralization and dentinal hypersensitivity prevention	Novabone (USA), Mo-Sci (USA), Biomet 3i (USA), BioMin Technologies (UK)
	45S5 Bioglass <sup>®</sup> + polyethylene	Medpor-Plus <sup>TM</sup> (porous orbital implant)	Porex Surgical (USA)
TheraGlass <sup>®</sup>	70SiO2-30CaO (mol%)	Sol-gel powders	MedCell (UK)
S53P4 (BoneAlive®)	53SIO <sub>2</sub> -20CaO-23Na <sub>2</sub> O-4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (wt%)	Particulate and custom-made monolithic plates (repair of orbital floor fractures)	Abmin Technologies/Vivoxid (Finland); Mo-Sci (USA)
13-93	53SiO <sub>2</sub> 6Na <sub>2</sub> O-12 K <sub>2</sub> O- 5MgO-20CaO-4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (w1%)	Cast monolithic implants, quenched frit, rods, fibers, disks, granules, and micro-sized powders for bone repair	Mo-Sci (USA)
S55F5	52SiO <sub>2</sub> 11.7CaO19.6Na <sub>2</sub> O5.8P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 10.9CaF <sub>2</sub> (wt%)	Cast monolithic implants, quenched frit, rods, fibers, disks, and micro-sized powders	Mo-Sci (USA)
SP-17Sr-17Ca (StronBone®)	44.5SiO <sub>2</sub> -4Na <sub>2</sub> O-4 K <sub>2</sub> O- 7.5MgO-17.8CaO- 4.5P <sub>2</sub> O <sub>6</sub> -17.8SrO (mol%)	Powders and porous granules	RepRegen (UK)
13-93B3	$53B_2O_36Na_2O12~K_2O~5MgO20CaO4P_2O_6$ (wt%), optionally doped with up to 1 wt% of Cu	Cotton-candy fibrous scaffolds (DermaFuse <sup>TM</sup> /Mirragen <sup>TM</sup> ) for wound healing	Mo-Sci (USA), Avalon Medical (USA)

Tabella 4.1 Raccolta dei vetri bioattivi più utilizzati presenti sul mercato[50].

Sono stati introdotti anche i principi fondamentali del processo angiogenico, soffermandoci su quanto fosse importante nella terapia rigenerativa stimolare una corretta vascolarizzazione per supportare la crescita di nuovo tessuto e mantenerlo attivo durante il suo intero percorso biologico. L'angiogenesi dovrebbe quindi essere presa in considerazione nel momento della progettazione e durante la fabbricazione di un materiale atto a sostituire un tessuto. Sono già presenti alcune strategie per cercare di superare questo problema, come ad esempio la trasfezione di geni codificanti le proteine angiogenici all'interno di scaffold. Bisogna però sottolineare che tutte le terapie geniche soffrono di serie limitazioni come ad esempio l'induzione di risposte tumorigeniche; il trasporto di fattori di crescita angiogenici tramite biomateriali sintetici non è ancora riuscito a superare tutte le difficoltà tecniche che gli si presentano davanti, una su tutte l'utilizzo di alte temperature durante la fase di sintesi del materiale, temperatura che può denaturare i fattori di crescita.

Proprio a causa di queste limitazioni, gli approcci basati sulla modifica delle proprietà fisico-chimiche dei vetri bioattvi stanno emergendo come nuova strategia per promuovere l'angiogenesi; queste modifiche possono includere l'incorporazione di ioni specifici all'interno della struttura del vetro e il dopaggio con specifici elementi (Tabella 4.2).

Element	Angiogenic effects
Silicon	Inducing endothelial cell (EC) homing, cell polarization, and migration Inducing angiogenic differentiation and neo-blood vessel sprouting
Phosphorus	Stimulation of pro-angiogenic FOXC2, osteopontin, and VEGF $\alpha$ Stimulation of migration and tube formation in the HUVEC model
Calcium	Increasing <b>platelet-derived growth factor</b> (PDGF), EGF, IGF-I, bFGF, and VEGF Inducing EC proliferation
Boron	Stimulating proliferation and migration of HUVECs Increasing VEGF and TGF-β1
Copper	Chemotactic attraction, and inducing proliferation and migration of ECs Mediating vascular EC proliferation in culture Activating proangiogenic factors VEGF, bFGF, TNF-α, and IL-1 Facilitating capillary progression, particularly <i>in vivo</i>
Magnesium	Stimulating the proliferation and migration of microvascular cells Enhancing the mitogenic response to angiogenic factors
Cobalt	Inducing HIF and thereby the overexpression of angiogenic factors VEGF and bFGF Enhancing tubule formation
Europium	Overexpression of angiogenic genes encoding CD31, MMP9, VEGFR1/2, and PDGFR $\alpha/\beta$ in HUVECs Promoting endothelial cell proliferation <i>in vitro</i> and vascular sprouting <i>in vivo</i>
Niobium	Promotion of angiogenesis in vitro (enhanced secretion of VEGF)

 Tabella 4.2 Principali ioni utilizzati per scopi proangiogenesi e i loro effetti[50]

#### 4.2-Il ruolo degli ioni inorganici nel metabolismo osseo

L'osso è un tessuto dinamico, altamente vascolarizzato, capace di rimodellarsi nel corso della vita regolando l'attività di formazione ossea e di riassorbimento osseo. Questi due processi sono regolati da fattori sistemici e locali, quali fattori di crescita, ormoni e stress fisici; oltre a questi, anche ioni inorganici come calcio (Ca), fosforo (P), silicio (Si), stronzio (Sr), zinco (Zn), boro (B), cobalto (Co) e magnesio (Mg) sono coinvolti nel metabolismo osseo e hanno un ruolo chiave nell'angiogenesi, nella crescita e nella mineralizzazione del tessuto osseo. Gli ioni metallici influenzano il pathway di segnalazione e stimolano gli effetti metabolici durante la formazione del tessuto [33]. Proprio questi effetti rendono gli ioni metallici interessanti per il loro uso come agenti terapeutici nell'ingegneria tissutale dei tessuti molli e duri (figura 4.1).



Figura 4.1 Il ruolo degli ioni nel corpo umano [87].

Calcio e fosforo sono i due componenti principali dell'apatite biologica, la fase inorganica dell'osso umano, e hanno quindi un ruolo essenziale nel rimodellamento osseo. È molto importante conoscere le concentrazioni specifiche di questi ioni nella matrice extracellulare ossea e il meccanismo tramite il quale interagiscono con le cellule ossee per comprendere il modo in cui stimolano la formazione ossea. Questa conoscenza potrà permetterci di costruire scaffold avanzati con proprietà personalizzabili di rilascio ionico, controllando quindi in maniera più specifica le risposte biologiche nell'ambiente fisiologico. È già noto, ad esempio, che il calcio influenza le cellule osteoblastiche in vitro. Maeno et al. [34] si accorsero che concentrazioni basse (2-4 mmol) e medie (6-8 mmol) di calcio favoriscono la proliferazione, la differenziazione e la mineralizzazione della ECM, mentre

concentrazioni più elevate (>10 mmol) sono citotossiche. È stato recentemente dimostrato che il fosforo stimola l'espressione della MGP (matrix Gla protein) nelle cellule osteoblastiche, un regolatore molto importante della formazione ossea [35].

Oltre a calcio e fosforo, diversi ioni sono considerati ottimi agenti utili ad aumentare l'abilità di formazione ossea di materiali impiantabili e scaffold, raggiungibile controllando il rilascio di questi ioni durante la dissoluzione in vivo dello scaffold. Questi ioni includono Si, Sr, Zn, Cu, Mg e B.

Brevemente, il silicio gioca un ruolo fondamentale nella formazione e calcificazione del tessuto osseo. Lo stronzio, molto simile chimicamente al calcio, può accumularsi nelle ossa scambiandosi con gli ioni calcio nei cristalli di HA. Diversi studi mostrano che lo stronzio ha effetti benefici per il metabolismo osseo. Lo zinco è invece conosciuto, oltre che per il suo ruolo nel metabolismo osseo, per i suoi effetti antinfiammatori; in più questo ione stimola la formazione ossea in vitro attivando la sintesi di proteine nelle cellule osteoblastiche e inibisce il riassorbimento osseo inibendo la formazione di cellule osteoclastiche. È stato dimostrato che il rame ha un ruolo importante nell'angiogenesi [36]; il magnesio stimola la formazione ossea; studi recenti hanno mostrato come una mancanza di ioni Mg risultino in una crescita ossea non ottimale. In fine, è stato dimostrato che il boro influenza la sintesi di RNA nei fibroblasti: una mancanza di boro può quindi alterare il processo dinamico di rimodellamento osseo inibendo la formazione ossea.

Tutti gli ioni metallici menzionati hanno un alto potenziale per essere usati come agenti terapeutici rilasciati da biomateriali per aumentare l'osteogenesi e in alcuni casi l'angiogenesi. Analizzeremo ora una serie di biovetri e valuteremo gli effetti strutturali e biologici che scaturiscono dall'inserimento di ioni metallici all'interno del loro network vetroso.

## 4.3-Vetri silicati ottenuti per fusione

#### 4.3.1-45S5 Bioglass®

Da quando il 45S5 è stato inventato da Hench nel 1969, i biovetri a base di silice sono stati usati in clinica come materiali per la rigenerazione ossea per decenni, grazie alla loro abilità di creare un legame con l'osso. Il nome del 45S5 Bioglass® deriva dalla sua composizione chimica (45%SiO<sub>2</sub>-24.5%Na<sub>2</sub>O-24.5%CaO-6%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); SiO<sub>2</sub> è il componente principale e funge anche da ossido formatore; la parte di nome "45S5" suggerisce che il vetro contiene il 45% in peso di SiO<sub>2</sub> e che il rapporto molare tra Ca e P è 5:1.

Dal suo primo utilizzo clinico nel 1985, questo vetro è stato utilizzato per numerosissime applicazioni e, anche dopo 40 anni di ricerca sui vetri bioattivi, nessun'altra composizione si è dimostrata più bioattiva del 45S5 Bioglass®. La forte bioattività di questo materiale, naturalmente di classe A, è dovuta a due meccanismi:

1. Il biovetro sviluppa rapidamente un layer di idrossicarbonatoapatite che promuove l'attaccamento e la proliferazione delle cellule osteogeniche;

2. La dissoluzione ionica prodotta dal BG influenza l'espressione genica nelle cellule osteoblastiche stimolando e promuovendo il metabolismo cellulare portando ad una rapida rigenerazione dell'osso [25];

La dissoluzione ionica descritta nel secondo punto, oltre a stimolare i processi osteogenici, stimola anche altri processi, tra cui il processo angiogenico. L'introduzione all'interno del vetro di piccole quantità di elementi come cobalto, rame, zinco o magnesio possono aumentare le risposte biologiche; in particolare, gli ioni rame stimolano la proliferazione di cellule endoteliali, la formazione di un network di capillari e la vascolarizzazione in vivo di uno scaffold. Comunque, se la concentrazione di rame supera un livello massimo, il suo effetto può risultare citotossico, generando radicali liberi e aumentando il rischio di malattie neurodegenerative.

Per dimostrare il comportamento pro-angiogenico del 45S5 (BG), un team di ricerca [51] ha fabbricato una serie di scaffold compositi formati da PDLLA e BG, dedicando particolare attenzione alla dimensione delle particelle e alla concentrazione di BG disperse nella matrice polimerica, per valutare nel dettaglio come questi parametri influenzano la neo-vascolarizzazione. Per questo scopo, sono state utilizzate in questo esperimento sia microparticelle che nanoparticelle di 45S5 Bioglass®. Le microparticelle di BG, ottenute tramite fusione-colata, hanno una forma irregolare, dimensione media di 4.3 µm e SSA pari a 2.7 m<sup>2</sup>/g; le nanoparticelle, ottenute tramite *flame synthesis* [52], hanno un diametro di 35-40 nm e una SSA pari a 79 m<sup>2</sup>/g. I film compositi sono stati prodotti disciogliendo il PDLLA in DMC e aggiungendo una quantità di BG utile ad ottenere sospensioni di PDLLA contenenti il 5,10 e il 20% wt di m-BG e n-BG. Le sospensioni sono state poi disposte in 24 pozzetti. Dopo l'evaporazione del solvente, avvenuta a temperatura ambiente, sul fondo del pozzetto sono presenti film dallo spessore di 25-40 µm. In figura 4.2 possiamo analizzare l'immagine SEM dei film contenenti solo PDLLA (a), PDLLA/m-BG (b) e PDLLA/n-BG (c).



Figura 4.2 Immagine SEM dei film ottenuti. In B) e C) la percentuale di BG presente è pari al 10% wt. [51].

La componente cellulare dell'esperimento è invece composta da fibroblasti umani del colon, coltivati in EMEM a 37°C. La secrezione di VEGF all'interno del mezzo di coltura è stata valutata attraverso l'analisi ELISA;

Scaffold porosi tridimensionali compositi contenenti il 20% wt di n-BG o m-BG sono stati preparati utilizzando come template temporaneo grani di zucchero, che viene poi miscelato a 1.5 mL di PDLLA o PDLLA/BG per ottenere una pasta viscosa. La pasta è stata poi compressa manualmente usando un perno in acciaio, ottenendo così degli scaffold con diametro pari a 10 mm. I costrutti sono stati fatti essiccare in incubatore a 37°C; i template essiccati sono stati poi tagliati in piccoli cilindri aventi uno spessore di circa 4-6 mm e immersi in 1 L di acqua deionizzata per far avvenire la completa dissoluzione dello zucchero. Gli scaffold così ottenuti sono stati poi impiantati nell'addome di topi da laboratorio e analizzati 2, 4, e 8 settimane dopo l'impianto.

In tabella 3 possiamo analizzare come cambia la porosità nel corso delle settimane nei due materiali compositi e nel materiale di controllo (PDLLA puro):

Scaffold	Implantation time					
	2 weeks	4 weeks	8 weeks			
	Porosity [%] and (pre-implantation volume [mm <sup>3</sup> ])					
PDLLA	80.9 ± 1.5 (384.2 ± 18.7)	86.9 ± 1.6 (375.4 ± 55.2)	$88.2 \pm 0.2 \ (381.8 \pm 52.8)$			
20 m-BG	$82.3 \pm 2.4 ~(370.0 \pm 33.7)$	85.2 ± 2.5 (361.6 ± 48.0)	$85.4 \pm 2.0 \ (367.0 \pm 32.7)$			
20 n-BG	$91.9 \pm 1.6 ~ (372.7 \pm 31.7)$	$90.0 \pm 2.5~(388.9 \pm 28.2)$	$88.0 \pm 0.3 \ (360.9 \pm 6.4)$			

Tabella 4.3 Valutazione della porosità dopo 2, 4 e 8 settimane di impianto dei tre scaffold [51].

Come possiamo vedere dalla tabella 4.3, gli scaffold analizzati esibiscono una elevata porosità, con pori di 200-750 µm. Le proprietà meccaniche, presenti in tabella 4.4, sono nel range delle proprietà meccaniche dell'osso trabecolare, ma considerevolmente inferiori a quelle dell'osso corticale.

Tabella 4.4 Caratteristiche meccaniche degli scaffold analizzati [51].

Sample	Porosity [%]	Compressive strength [MPa]	Compressive modulus [MPa]	Permeability constant k [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> ]
PDLLA	$85.9\pm1.2$	$0.78 \pm 0.26$	$0.85\pm 0.45~(1.34\pm 0.42)$	$8.60 \pm 0.73$
10 m-BG	$87.3\pm3.8$	$1.04\pm0.32$	$1.53 \pm 0.96 \ (1.02 \pm 0.29)$	$5.40\pm0.68$
20 m-BG	$85.3\pm3.4$	$1.59\pm1.06$	$1.80\pm0.90$	n.a.
20 n-BG	$93.4\pm1.8^{a}$	$0.38\pm0.16^{a}$	$0.36\pm0.18^{\rm a}$	n.a.
Trabecular bone	75 – 95	0.38 - 7.5 <sup>b</sup>	75 – 285	5.1 - 7.2

Dopo 2, 4 e 8 settimane dall'impianto, tutti gli scaffold sono stati colonizzati da cellule e vasi sanguigni, confermando l'alta permeabilità e l'interconnessione dei pori dello scaffold. Il volume totale dei vasi sanguigni (Vtot BV) è aumentato in maniera significativa per entrambi i materiali compositi rispetto al materiale di controllo dopo 8 settimane dall'impianto. Il rilascio di VEGF da parte dei fibroblasti è stato 5 volte più alto per i fibroblasti coltivati sui materiali compositi rispetto a quelli coltivati sui film di PDLLA puri. In questo studio non sono state osservate significative differenze tra m-BG e n-BG per quanto riguarda la secrezione di VEGF; al contrario, la vitalità cellulare dei fibroblasti a contatto con i n-BG è inferiore a causa delle condizioni di pH indotte dal rilascio ionio prodotto dalle particelle nanometriche molto reattive (SSA = 79 m<sup>2</sup>/g). Infatti, avendo una maggiore area superficiale, aumentano le reazioni superficiali e le cinetiche di rilascio ionico, portando ad un innalzamento del pH.

#### 4.3.2-Confronto tra 45S5 Bioglass® e Cu-doped 45S5 Bioglass®

Sono stati recentemente sviluppati scaffold composti da Cu-doped 45S5, con percentuale di rame pari a 2.5 wt%, ma per ottimizzare questi materiali è necessario esaminare attentamente gli effetti dosedipendenti del rilascio ionico sulle cellule endoteliali. Nello studio esaminato [37] sono state preparate tre culture cellulari 3D esposte ad un costante rilascio ionico da parte del vetro dopato con il rame (Cu-BG), dal vetro non dopato (BG) e da una dose equivalente di soli ioni rame, per distinguere gli effetti causati dal rame e dagli altri ioni presenti nel reticolo vetroso. Nell'analisi di questo studio, saranno valutate principalmente le cinetiche di rilascio ionico, tralasciando le modifiche strutturali causate dall'inserimento di ioni rame all'interno del reticolo vetroso, analizzate in uno studio successivo. Entrambi i vetri sono stati ottenuti tramite tecnica fusione-colata e le particelle di vetro bioattivo ottenute dopo la macinazione hanno diametro pari a 5 µm. La composizione nominale dei due vetri è quella presente nella tabella 4.5:

Tabella 4.5 Composizione nominale dei due vetri bioattivi [37].

Glass code	Components (wt.%)					
	SiO <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> O	$P_2O_5$	CaO	CuO	
BG	45	24.5	6	24.5	-	
Cu-BG	45	24.5	6	22	2.5	

La concentrazione di ioni rame, silicio e calcio risultanti dalla dissoluzione dei due vetri nel mezzo di coltura possiamo osservarle in figura 4.3: il rilascio di ioni rame aumenta con la concentrazione di vetro e con il tempo di dissoluzione, ma sembra raggiungere la saturazione quando viene analizzata la più alta concentrazione. Il rilascio di ioni silicio aumenta costantemente con la concentrazione del vetro. Per il BG, quando la concentrazione è pari a 6.4 mg/mL, la concentrazione di ioni silicio in soluzione è circa il 30% inferiore rispetto agli ioni silicio rilasciati dal Cu-BG.



Figura 4.3 Rilascio degli ioni in soluzione. Dall'altro verso il basso: Cu, Si e Ca [37].

È interessante notare come il livello di ioni calcio, già presenti all'interno del mezzo di cultura, diminuisca; il consumo di calcio è dovuto alla formazione di fosfati di calcio sulla superficie dei vetri. Per concentrazioni elevate di BG e Cu-BG si osserva un consumo di calcio già presente nel mezzo di coltura, mentre un leggero rilascio di questo ione si può osservare con concentrazioni pari a 0.4 e 1.6 mg/mL di Cu-BG; questo fatto può essere spiegato tramite la relazione reciproca tra reazioni di dissoluzione e variazioni del pH: la dissoluzione del Bioglass® comporta un aumento del pH dovuto all'immediato scambio ionico tra soluzione e superficie del vetro, specialmente ioni Na<sup>+</sup>; un pH maggiore favorisce la precipitazione di fosfati di calcio sulla superficie. Dato che la silice è un ossido formatore, il rilascio di silicio ci fornisce una misura della dissoluzione complessiva del vetro. Si può notare che la dissoluzione del Cu-BG è avvenuta entro i primi giorni di test. Il rilascio di silicio e il consumo di calcio sono stati maggiori nel Cu-BG rispetto al BG. Questo può essere dovuto ad un indebolimento della struttura vetrosa, e quindi ad una maggiore reattività del Cu-BG, come indicato dalla minore temperatura di transizione vetrosa. Questi ultimi due punti verranno analizzati nel prossimo studio, dedicato alle modifiche strutturali dovute all'inserimento di ioni rame.

Per valutare gli effetti sulla struttura del network vetroso in seguito all'inserimento di ioni rame, un team di ricerca [38] ha sviluppato una serie di Cu-doped bioglass variando il contenuto di rame. I vari biovetri 45S5 sono stati preparati tramite fusione-colata, aggiungendo carbonato di rame come precursore, appunto, del rame. Le materie prime sono state fuse all'interno di un crogiolo in platino a 1450°C per 45 minuti. Anche in questo caso le particelle di vetro ottenute alla fine del processo hanno un diametro pari a 5 µm. Le composizioni nominali sono mostrate nella tabella 4.6:

Glass	Composition in wt%						
	SiO <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> O	$P_2O_5$	CaO	CuO		
4585	45	24.5	6	24.5	_		
45S5-0.1Cu	45	24.5	6	24.4	0.1		
45S5-1Cu	45	24.5	6	23.5	1		
45S5-2.5Cu	45	24.5	6	22	2.5		

Tabella 4.6 Composizione nominale dei vetri bioattivi derivanti dal 4585 con contenuti di rame differenti [38].

Partendo da questi biovetri, gli autori hanno ottenuto gli scaffold tramite tecnica di replica in schiuma [39]: una schiuma di poliuretano viene immersa in un impasto contenente il 60 wt% di particelle di BG e 1.1 wt% di PVA (alcool polivinilico, usato come legante). Il tutto viene essiccato a 60°C per 24 ore e poi sinterizzato a 1050°C per 2 ore (per i primi tre vetri in tabella, 1000°C per il 45S5-2.5Cu).

I campioni finali, utilizzati per i test, hanno una dimensione pari a 5 x 5 x 5 mm<sup>3</sup>. Sono stati immersi in 50 ml di SBF per 1, 3, 7, 14 e 21 giorni. Dopo l'immersione, i campioni sono stati risciacquati acqua deionizzata e fatti asciugare a 60°C per 12 ore.

Per analizzare le proprietà strutturali e gli effetti del dopaggio con ioni rame sono state utilizzate l'analisi FT-IR, la spettroscopia Raman, NMR e la spettroscopia UV-Vis. È stato confermato che il rame è presente all'interno della struttura vetrosa sotto forma di ioni Cu<sup>2+</sup>: questo ione funge prevalentemente da ione modificatore del network vetroso.

Come confermato dalla FT-IR e dalla spettroscopia Raman, il network di SiO<sub>2</sub> del vetro 45S5 non è stato influenzato in maniera significativa dall'aggiunta del rame; come unica differenza si è notata la diminuzione dei legami tra silicio ed ossigeno non pontante (NBO) con l'aumentare del contenuto di rame nei vetri. Dato che il 45S5-1Cu e il 45S5-2.5Cu mostrano all'incirca le stesse caratteristiche, per capire gli effetti dell'introduzione degli ioni rame sulla struttura dei vetri silicati considereremo solo il 45S5-2.5Cu.

L'analisi NMR ha anche dimostrato una distorsione maggiore del reticolo vetroso nel vetro in cui è stato aggiunto il rame; l'indebolimento della matrice vetrosa è stato confermato dalle misure DSC (differential scanning calorimetry), che hanno rivelato un abbassamento della temperatura di transizione vetrosa per il 45S52.5Cu. il dopaggio con ioni rame riduce quindi la Tg del 45S5 e stabilizza la fase amorfa durante la sinterizzazione. La diminuzione della Tg accompagnata dall'aumento del contenuto del rame nel vetro è dovuta al carattere più covalente dei legami Cu-O (ig,ionicità, = 0.617) rispetto al legame Ca-O (ig=0.707), risultando in un più alto ordine di rilassamento della struttura e quindi nell'abbassamento della Tg.

L'abilità di formare HA negli scaffold è stata analizzata tramite FT-IR e SEM. Anche se in letteratura sono presenti alcuni studi che riportano un impatto negativo della cristallinità sulla bioattività degli scaffold in BG, in questo caso è stato osservato un grado di bioattività paragonabile a quello osservato nei biovetri amorfi.

## 4.3.3-Nb-doped 45S5

Il niobio (Nb) è uno ione metallico relativamente poco preso in considerazione dall'ingegneria tissutale ma che potrebbe avere molta importanza in futuro per le applicazioni di rigenerazione ossea. Si è riportato che questo elemento ha una tossicità minore rispetto agli altri ioni metallici [40] e che stimola la mineralizzazione da parte delle cellule osteoblastiche [41]. Considerando questi due fatti, un team di ricercatori [42] ha sviluppato due vetri basati sul 45S5 contenenti ioni niobio, andando a sostituire, in parte o totalmente, l'ossido di forsforo con l'ossido di niobio. Possiamo vedere le composizioni dei biovetri ottenuti in tabella 4.7:

Tabella 4.7 Composizione nominale dei tre biovetri [42].

	Na <sub>2</sub> O	CaO	$SiO_2$	$P_2O_5$	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
45\$5	24.35	26.91	46.13	1.00	0.00
0.5Nb-BG	24.35	26.91	46.13	0.50	0.50
1.0Nb-BG	24.35	26.91	46.13	0.00	1.00

Anche in questo caso le particelle vetrose, aventi dimensioni tra i 6 e i 20  $\mu$ m, sono state ottenute tramite tecnica fusione-colata. Come controllo si sono usate particelle di 4585 (d = 5  $\mu$ m).

Analizzando il rilascio ionico di questi biovetri (figura 4.4), ci si accorge che il rilascio di silicio è leggermente maggiore per il Nb-BG. Nettamente maggiore il rilascio di ioni calcio da parte dei biovetri dopati con ioni Nb rispetto al 45S5: questo, come nel caso visto precedentemente, può essere spiegato analizzando la rottura dei legami tra silicio e ossigeno non pontante, rottura dovuta proprio all'introduzione di ioni Nb nel network vetroso, portando quindi ad un rilascio maggiore di ioni calcio dalla superficie del biovetro.



Figura 4.4 Rilascio ionico in soluzione dei tre campioni di materiali analizzati per 14 giorni [42].

Tramite FT-IR è stata anche analizzata la capacità di formare uno starto di HA sulla superficie dei due biovetri dopati con niobio. Le analisi mostrano che nel vetro in cui è presente una concentrazione maggiore di niobio le reazioni di formazione di HA sono rallentate ma comunque presenti. Possiamo quindi concludere affermando che l'introduzione di niobio all'interno del network vetroso non incide particolarmente sulla bioattività del biovetro. È stato anche osservato che il rilascio ionico del Nb-BG produce un aumento significativo nel rilascio di VEGF da parte dei fibroblasti, come possiamo osservare in figura 4.5.



Figura 4.5 Rilascio di VEGF da parte di cellule stromali del midollo osseo coltivate sui 3 scaffold testati [42].

## 4.4-Vetri borati e borosilicati ottenuti per fusione

I vetri contenenti boro sono stati sviluppati con lo scopo di migliorare la solubilità e la bioattività dei vetri silicati. Anche se i vetri borosilicati sono stati sviluppati da Otto Schott più di un secolo fa, il loro utilizzo in applicazioni biomediche è stato proposto negli anni 90' da Brink e dai suoi colleghi [43]. Nei vetri borati e borosilicati, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> è il principale ossido formatore, l'analogo del SiO<sub>2</sub> per i vetri silicati. Il boro ha effetti biologici già noti e ben studiati: nella forma di H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, a basse concentrazioni, aumenta la proliferazione e la crescita cellulare [44]; è in grado di stimolare la traduzione di mRNA, aumentando la produzione di fattori di crescita coinvolti nell'angiogenesi e nella riparazione delle ferite, tra cui VEGF e TGF-β.

Verranno analizzati ora due biovetri, 13-93B3 e 1605 [45], usando come controllo il 45S5. Le composizioni dei tre biovetri sono presenti nella tabella 4.8:

Fiber name	Na <sub>2</sub> O	$K_2O$	MgO	CaO	SiO <sub>2</sub>	$P_2O_5$	$B_2O_3$	CuO	ZnO
45\$5	24.5	0	0	24.5	45	6	0	0	0
13-93B3	6	12	5	20	0	4	53	0	0
1605	6	12	5	20	0	4	51.6	0.4	1

Tabella 4.8 Composizione nominale dei tre vetri bioattivi analizzati [45].

I tre biovetri analizzati, sono stati ottenuti sotto forma di fibre, con diametro nel range tra 0.05 e 2  $\mu$ m. In figura 4.6 possiamo osservare l'immagine SEM di questi tre costrutti, prima e dopo l'immersione all'interno del mezzo di coltura:



Figura 4.6 Immagine SEM dei 3 costrutti prima e 72 ore dopo l'immersione nel mezzo di coltura [45].

La concentrazione degli elementi rilasciati dal vetro (B, P, Si, Mg, Cu, Zn e Ca) è stata misurata tramite IPC-OES; gli ioni sodio e potassio rilasciati non sono stati monitorati a causa dell'alta

concentrazione di questi ioni presente nel mezzo di coltura. Possiamo osservare i risultati di questa analisi in figura 4.7:



Figura 4.7 Analisi del rilascio ionico per i 3 differenti biovetri [45]

Analizzando ciò che si vede in figura 3.5 si nota che tutti gli ioni rilasciati in soluzione raggiungono il loro picco dopo 8 ore; segue poi una diminuzione costante della concentrazione. Per alcuni ioni, specialmente fosforo e calcio, la concentrazione finale è inferiore a quella di partenza. Nel caso del vetro 1605 sono state analizzate anche le concentrazioni degli ioni rame e zinco, ma la loro concentrazione era inferiore alla sensibilità dello strumento di analisi utilizzato (0.02  $\mu$ g/mL), e quindi questi dati non sono presenti.

#### 4.5-Vetri Sol-Gel e mesoporosi (MBG)

Al giorno d'oggi, la tecnica sol-gel è molto considerata all'interno del settore tecnologico, dato che offre la possibilità ai ricercatori di ottenere un'ampia gamma di materiali differenti caratterizzati da nano e microstrutture, utili per la realizzazione di prodotti tecnologici. Di fatto questa tecnica rende possibile l'ottenimento di materiali omogenei e chimicamente puri utilizzando temperature di processo più basse rispetto a quelle utilizzate nei metodi tradizionali.

Questa tecnica mostra il suo potenziale nel settore biomedico soprattutto nella produzione di vetri bioattivi intrinsecamente nanoporosi, in grado di aumentare le caratteristiche di bioattività e la risposta cellulare grazie alle sue caratteristiche strutturali, prima su tutte la maggiore area specifica superficiale ottenuta rispetto a quella presente nei materiali ottenuti tramite fusione; in più, il processo sol-gel offre la possibilità di modificare le proprietà di superficie funzionalizzandola con altre molecole, cosa resa possibile dall'alta densità di gruppi silano esposti. Infatti, nei vetri ottenuti tramite tecnica sol-gel, la quantità di silice può salire fino al 90% senza compromettere la bioattività del materiale [46]; nei vetri ottenuti tramite fusione-colata questa percentuale non può superare il 60%.

A causa delle porosità intrinseche, i materiali ottenuti tramite sol-gel sono caratterizzati da basse proprietà meccaniche se confrontati con vetri densi aventi la stessa composizione. Questo problema diventa particolarmente importante quando si vuole processare questo materiale sotto forma di scaffold poroso; proprio per questo motivo è necessario sviluppare nuove strategie atte a migliorare le caratteristiche meccaniche dei materiali sol-gel. L'aggiunta di additivi durante il processo di sintesi può essere una soluzione: ad esempio, l'aggiunta di titanio (Ti) e magnesio (Mg) ha mostrato un miglioramento delle proprietà meccaniche rispetto ai vetri senza questi due elementi; anche il processo di sinterizzazione può essere ottimizzato per migliorare il comportamento meccanico, riducendo la dimensione dei pori.

L'abilità di degradare a contatto con i fluidi biologici è una delle caratteristiche più prese in considerazione quando si parla di biomateriali ottenuti tramite tecnica sol-gel. Proprio come per i vetri ottenuti tramite fusione, sono i prodotti della dissoluzione ionica i maggiori responsabili dell'attivazione dei geni, producendo quindi una risposta genica positiva, direttamente a collegata a processi quali l'osteogenesi e l'angiogenesi. Il rateo di dissoluzione di un materiale viene valutato monitorando la perdita di massa e la concentrazione degli ioni rilasciati in soluzione; dato che la dissoluzione di un vetro inizia sulla sua superficie, un'area superficiale maggiore è responsabile di un rateo di dissoluzione più elevato. Studi recenti hanno confermato gli effetti benefici di un'ampia area superficiale e del volume dei pori sulla capacità di formare apatite. Come già spiegato nel capitolo riguardante i metodi di produzione, i vetri bioattivi mesoporosi sono nati proprio per

soddisfare quest'ultima caratteristica, ossia ottenere nel materiale sintetizzato una SSA maggiore, migliorando quindi la bioattività del materiale. Analizzeremo ora due classi di biovetri mesoporosi, una dopata con ioni rame, l'altra con ioni cobalto, per caratterizzare le loro proprietà strutturali e biologiche.

#### 4.5.1-Cu-doped MBG

Gli scaffold composti da biovetri mesoporosi contenenti rame [47] sono stati preparati incorporando ioni Cu (0, 1, 2 e 5% molare) nei MBG andando a sostituire gli ioni calcio. Come co-template sono stati utilizzati due polimeri: P123 per ottenere la struttura mesoporosa e poliuretano per creare i pori di dimensione maggiore (diverse centinaia di  $\mu$ m). In tabella 4.9 possiamo osservare l'area superficiale, il volume e la dimensione dei pori dei quattro biovetri mesoporosi ottenuti:

Tabella 4.9 SSA, volume e dimensione dei pori degli scaffold a base di Cu-MBG [47].

Scaffolds	Surface area (m <sup>2</sup> /g)	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g)	Pore size (nm)
0Cu-MBG	439	0.60	5.2
1Cu-MBG	310	0.36	4.2
2Cu-MBG	353	0.34	3.8
5Cu-MBG	334	0.44	4.7

La struttura porosa, la composizione di fase e la microstruttura interna degli scaffold in questione sono state analizzate tramite SEM, XRD e TEM (transmission electron microscopy).

I quattro scaffold, con dimensione di 5 x 5 x 5 mm, sono stati usati per la coltura cellulare di cellule stromali umane del midollo osseo (hBMSCs). 100  $\mu$ L di medium sono stati aggiunti alla base dello scaffold ogni 20 minuti, fino a che il mezzo di coltura non ha ricoperto lo scaffold.

L'analisi SEM ha dimostrato che non sono presenti differenze tra i quattro scaffold per quanto riguarda i pori di dimensione maggiore, aventi in tutti i modelli dimensione tra i 300 e i 500  $\mu$ m; l'analisi TEM ha invece rivelato che sia lo scaffold composto da 1Cu-MBG che quello composto da 5Cu-MBG hanno una ben ordinata e uniforme struttura mesoporosa (dimensione dei pori circa 4.5 nm) all'interno della loro matrice.

Come è possibile vedere nella tabella 4.9, dopo l'inserimento degli ioni rame negli MBG-scaffold, l'area superficiale, il volume e la dimensione dei mesopori sono diminuiti, indicando che lo ione

inserito va in qualche modo a "disturbare" la struttura ordinata del MBG di partenza, perturbando l'orientazione dei gruppi SiO<sub>4</sub><sup>4–</sup> durante le reazioni di self-assembly.

La concentrazione ionica presente all'interno dei mezzi di coltura dopo sette giorni di contatto con gli scaffold a base di Cu-MBG è visibile nella tabella 4.10:

Tabella 4.10 Concentrazione ionica nei mezzi di coltura cellulare dopo 7 giorni di coltura [47].

lons concentrations (ppm)	0Cu-MBG	1Cu-MBG	2Cu-MBG	5Cu-MBG
Cu	0	60.4	94.4	152.7
Ca	24.1	26.3	29.6	45.9
Si	62.0	66.3	67.1	73.7

Come già osservato negli esempi precedenti, i vetri bioattivi modificati tramite l'introduzione di ioni rame hanno rilasciato una quantità maggiore di ioni silicio e calcio in soluzione, indice di una struttura resa più debole dalla modifica strutturale.

## 4.5.2-Co-doped MBG

Un altro ione molto importante per promuovere la neo-vascolarizzazione è lo ione cobalto. Lo stesso team di ricerca che ha sviluppato il Cu-MBG ha sviluppato anche degli scaffold composti da biovetri mesoporosi dopati con ioni cobalto [48]. Le tecniche di produzione utilizzate sono le stesse utilizzate nello studio precedente, e gli scaffold ottenuti hanno le caratteristiche descritte in tabella 4.11:

Materials	Surface area (m²/g)	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g)	Average pore size (nm)
MBG	290	0.30	4.97
2Co-MBG	180	0.19	4.51
5Co-MBG	127	0.15	4.10

Tabella 4.11 SSA, volume e dimensione dei pori per i 3 scaffold a base di MBG [48].

Il rilascio ionico non è stato cambiato in maniera significativa dall'incorporazione del cobalto, come possiamo vedere in figura 4.8; il rilascio di ioni  $Co^{2+}$  è più rapido negli scaffold contenenti una concentrazione maggiore di questo ione.



Figura 4.8 Variazione della concentrazione ionica nel mezzo di coltura [48].

Anche in questo caso, come per il Cu-MBG, l'incorporazione di uno ione all'interno del network vetroso diminuisce la SSA, mantenendo però una stuttura mesoporosa ordinata e una buona SSA, utile aumentare la bioattività del materiale.
# **CAPITOLO 5**

#### 5.1-Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale è nata per affrontare la riparazione e la rigenerazione di tessuti e organi in seguito a traumi, lesioni, malattie o invecchiamento [54]. Questo approccio ha il potenziale per superare i problemi legati alla carenza di tessuti viventi e organi disponibili per i trapianti. Nelle applicazioni comuni, uno scaffold, composto da un biomateriale con architettura ben definita, serve come impalcatura temporanea per le cellule al fine di supportare e guidare la loro proliferazione e la loro differenziazione. Fattori di crescita e altre biomolecole possono essere incorporate all'interno dello scaffold, assieme alle cellule, per guidare la regolazione delle funzioni cellulari durante la rigenerazione di organi e tessuti [55]. Lo scopo dell'ingegneria tissutale basata sull'utilizzo degli scaffold è quindi quello di fornire una struttura di supporto alle cellule affinché esse possano sintetizzare nuovo tessuto, regolandone forma e dimensioni.

Negli ultimi decenni il settore dell'ingegneria tissutale ha vissuto una crescita importante, portando alla creazione di costrutti in grado di rigenerare tessuti come la pelle [55], l'osso [56] e la cartilagine [57]. Lavori più recenti hanno mostrato risultati interessanti anche per la rigenerazione di strutture anatomiche più complesse che coinvolgono più di un tessuto, come ad esempio il sistema osteocondrale, il complesso muscoloscheletrico e il parodonto [58]. Naturalmente questi sviluppi non sarebbero stati possibili senza l'introduzione di biomateriali innovativi e tecniche di fabbricazione avanzate per ottenere scaffold; i materiali utilizzati per la creazione degli scaffold solo progettati per andare incontro ad una serie di requisiti stringenti che sono essenziali per l'ottimizzazione della formazione dei tessuti; gli scaffold invece, oltre a dover fornire una struttura di supporto, come menzionato prima, devono anche degradarsi man mano che il neo tessuto si forma. L'architettura di uno scaffold è molto importante per fornire alle cellule un microambiente ottimale alla sintetizzazione di nuovo tessuto e per permettere la diffusione di nutrienti tra le cellule e l'ambiente circostante.

Analizziamo ora le caratteristiche principali che uno scaffold deve avere:

- Deve essere biocompatibile e deve promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare;
- Deve avere proprietà meccaniche simili al tessuto che si vuole rimpiazzare;
- Deve avere una struttura porosa tridimensionale in grado di permettere la proliferazione cellulare, la vascolarizzazione e la diffusione di nutrienti;
- Deve avere una velocità di degradazione paragonabile alla velocità di formazione di nuovo tessuto, formando prodotti non tossici facilmente riassorbibili dal corpo;

 Deve essere processabile in forme e dimensioni differenti ed essere sterilizzabile per l'utilizzo clinico;

Nei capitoli precedenti sono state analizzate le soluzioni fino ad ora adottate per la costruzione di scaffold a base di vetri bioattivi, utilizzati in vari settori dell'ingegneria tissutale. Andremo ora ad esaminare risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo* utilizzando vetri e vetro-ceramici bioattivi, ponendo particolare attenzione ai processi pro-angiogenici stimolati da questi materiali.

### 5.2-Ingegneria tissutale ossea

Le caratteristiche *in vitro* degli scaffold a base di vetri bioattivi, come la velocità di degradazione, la conversione in HA, le caratteristiche meccaniche e l'interazione con le cellule, dipendono prevalentemente dalla composizione del vetro e dalla microstruttura dello scaffold.

Il meccanismo tramite il quale i vetri silicati, borosilicati e borati degradano e si convertono in HA è stato soggetto di numerosi studi; il meccanismo generale è complessivamente ormai noto, ma può presentare delle differenze, soprattutto in termini di velocità di reazione, che dipendono dalla specifica composizione analizzata e dalle caratteristiche micro-/nano-strutturali del materiale (ad esempio presenza di nanoporosità o fasi cristalline). Tipicamente, la cinetica di degradazione e di conversione in HA viene valutata *in vitro* immergendo il vetro (sotto forma di particelle, dischi o scaffold porosi) in SBF a 37°C e misurando la diminuzione di peso del vetro nel tempo, unitamente all'analisi delle modifiche superficiali. La degradazione è anche accompagnata dalla dissoluzione degli ioni nella soluzione, e quindi avvengono anche cambiamenti di pH. In figura 5.1 possiamo osservare le due analisi per valutare la degradazione del vetro e saminato. La reazione di conversione in HA è pseudomorfica, inizia sulla superficie del vetro e continua all'interno del materiale; se la reazione è sufficientemente lunga da far sì che il prodotto cristallizzi, la XRD del materiale convertito mostrerà dei picchi relativi alla presenza di HA.



Figura 5.1 Degradazione di scaffold a base di differenti biovetri con struttura trabecolare [88].

Una proprietà chiave, in particolare per gli scaffold utilizzati per la rigenerazione ossea, è la risposta meccanica del costrutto. Come detto in precedenza, gli scaffold dovrebbero avere proprietà meccaniche il più simili possibile a quelle del tessuto che vanno a sostituire. Come sappiamo, l'osso può essere classificato in due tipologie: osso corticale e osso trabecolare. Le proprietà meccaniche dell'osso variano tra soggetti differenti, tra un osso e un altro e anche all'interno dello stesso osso. Queste proprietà sono anche anisotrope, data la struttura orientata dell'osso. Comunque, basandoci sul test di moltissimi campioni, il modulo di compressibilità e il modulo elastico dell'osso corticale sono rispettivamente nel range di 100-150 MPa e 5-15 GPa, nella direzione parallela all'asse lungo [70]. In direzione perpendicolare a quest'asse i valori dei due moduli sono 1.5-2 volte inferiori. Invece, il modulo di compressibilità e il modulo elastico dell'osso trabecolare sono rispettivamente nel range di 2-12 MPa e 0.1-5 GPa [70].

Come possiamo vedere nella tabella 5.1 soprariportata, le proprietà meccaniche degli scaffold porosi dipendono dal tipo di biomateriale, dalla microstruttura e dal metodo di fabbricazione. Scaffold ottenuti tramite tecnica di replicazione di schiuma polimerica, gel-casting e sinterizzazione di particelle o piccole fibre hanno in genere caratteristiche meccaniche comparabili a quelle dell'osso trabecolare umano. Metodi come la prototipazione rapida e congelamento unidirezionale di una sospensione hanno invece portato alla creazione di scaffold porosi con modulo elastico e di comprimibilità paragonabili a quelli dell'osso corticale. Questi scaffold hanno quindi le caratteristiche necessarie per le applicazioni di rigenerazione di ossa portanti. In figura 5.2, vengono confrontati i moduli di compressione di 3 scaffold a base di 13-93 realizzati utilizzando tre tecniche differenti: tecnica di replicazione, congelamento unidirezionale e *freeze extrusion fabrication* (FET), un metodo di prototipazione rapida.



**Figura 5.2** Risposta meccanica di tre scaffold a base di 13-93. La struttura orientata, ottenuta con congelamento unidirezionale; struttura a grigli ottenuta con FET e struttura trabecolare tramite tecnica di replicazione [59].

Lo scaffold preparato tramite replicazione di schiume polimeriche (porosità = 85%, dimensione dei pori = 100-400  $\mu$ m) inizialmente mostra una risposta elastica, seguita da vari picchi e valli, forse attribuibili alla progressiva rottura della struttura vetrosa dell'architettura trabecolare e alla compattazione del campione. Invece, i costrutti realizzati tramite congelamento uniassiale (porosità = 50%, dimensione dei pori 60-80  $\mu$ m) o tramite prototipazione rapida (porosità = 50%, dimensione

dei pori = 100-500  $\mu$ m) mostrano una risposta tipica dei materiali fragili, ossia la risposta elastica seguita dalla frattura.

La composizione di un vetro bioattivo ha un effetto marcato sulla sua capacità di supportare la proliferazione e le funzioni cellulari *in vitro*.



**Figura 5.3** Abilità del biovetro silicato 13-93, borosilicato 13-93B1 e borato 13-93B3 con struttura trabecolare di supportare la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteogeniche MLO-A5 [89].

Come possiamo vedere in figura 5.3, i vetri bioattivi silicati (45S5 o 13-93), in forma di dischi o scaffold porosi, sono in grado di supportare le funzioni di proliferazione e differenziazione di cellule osteoblastiche, come le cellule murine MC3T3-E1 e le cellule MLO-A5, nel corso di una classica coltura *in vitro*. Al contrario, i vetri borati, come ad esempio il 45S5B3 e il 13-93B3, hanno mostrato un'inferiore abilità di supporto delle funzioni cellulari [71]. Questa è una diretta conseguenza della più elevata velocità di degradazione dei vetri borati: l'elevata concentrazione di boro rilasciata dalla rapida degradazione porta ad un aumento locale della concentrazione di boro nel mezzo di coltura, aumentando il pH della soluzione e provocando effetti citotossici. È stato però dimostrato che la bioattività di questa classe di vetri bioattivi può essere migliorata utilizzando un sistema di coltura

dinamico, in cui il mezzo di coltura viene miscelato e messo in movimento per far sì che il pH non possa aumentare nel medium a contatto con la superficie del vetro bioattivo [71].

Nello studio di Chen et al. [45], già affrontato nel capitolo precedente per analizzare da un punto di vista chimico-fisico i tre biovetri testati (45S5, 13-93B3 e 1605), è stato anche valutato il comportamento pro-angiogenico di questi vetri bioattivi. Per analizzare il comportamento angiogenico dei materiali in questione è stata preparata una coltura cellulare di fibroblasti umani. Il mezzo di coltura EMEM (Eagle's minimum essential medium) è stato messo a diretto contatto con le fibre di biovetro.



Figura 5.4 Rilascio di VEGF da parte dei fibroblasti umani coltivati sugli scaffold composti dai materiali analizzati [45].

Come possiamo vedere in figura 5.4, sia il 1605 che il 13-93B3 hanno migliorato il rilascio di VEGF da parte dei fibroblasti umani dopo 48 e 72 ore, rispetto al 45S5.

Nel capitolo precedente sono stati introdotti anche due vetri bioattivi mesoporosi, drogati con rame (MBG-Cu) e cobalto (MBG-Co) [47],[48]. Il MBG-Cu è stato utilizzato per una coltura cellulare in cui sono stati utilizzati hBMSC. Per valutare il rilascio di VEGF da parte delle hBMSC è stata utilizzata l'analisi ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). La secrezione di VEGF è stata decisamente maggiore nelle cellule a contatto con il MBG-Cu rispetto alle cellule a contatto con lo scaffold non contenente ioni rame (figura 5.5).



Figura 5.5 Valutazione della secrezione di VEGF tramite ELISA da parte dei hBMSC coltivati sui 4 scaffold [47].

Nello stesso studio è stato valutato anche l'effetto antibatterico di questo materiale: studi precedenti hanno mostrato che lo ione  $Cu^{2+}$  possiede proprietà antibatteriche [128]. Probabilmente, le proprietà antibatteriche di questo ione possono essere dovute al fatto che il rame può fungere da donatore/accettore di elettroni, alternando gli stati degli ioni  $Cu^+$  e  $Cu^{2+}$ . Il potenziale di ossido-riduzione del rame può variare tre 200 e 800 mV [127]. Le proprietà di ossido-riduzione del rame possono causare danni ai batteri. In più, le reazioni redox possono produrre radicali idrossili. Questi radicali estremamente reattivi possono partecipare ad una serie di reazioni, come l'ossidazione di proteine e lipidi, e quindi risultare letali per i batteri [129]. In figura 5.6 è possibile visualizzare questi effetti:



Figura 5.6 Proprietà antibatteriche dei diversi costrutti messe a confronto valutando la vitalità dei batteri [47].

Come possiamo vedere in figura 5.6, lo scaffold contenente il 5% di rame all'interno della struttura mesoporosa ha drasticamente inibito la vitalità dei batteri se confrontato con lo scaffold non contenente ioni rame.

Anche il MBG-Co è stato utilizzato per una coltura cellulare in cui sono state utilizzate BMSC. Per quanto riguarda il comportamento angiogenico del materiale, la secrezione di VEGF da parte delle BMSC dopo 7 giorni di coltura è aumentata significativamente incorporando nello scaffold il 2% di cobalto (figura 5.7).



Figura 5.7 Concentrazione di VEGF all'interno del mezzo di coltura a contatto con i biovetri mesoporosi testati [48]

Come possiamo notare dalle due figure soprariportate (fig.5.5 e fig.5.7), in entrambi i casi l'attività angiogenica è risultata migliore quando nella struttura del vetro bioattivo sono presenti gli ioni Cu e Co.

Xia et al. [111] hanno valutato *in vitro* gli effetti sulla proliferazione, la differenziazione osteogenica e sull'espressione di fattori angiogenici di diversi contenuti di vetri bioattivi borati (B-BG) (0, 10, 20, 30 e 40 wt. %) all'interno di una matrice polimerica in PCL, effetti valutati tramite una coltura cellulare di cellule stromali del midollo osseo di ratto (rBMSC) e. La composizione del vetro bioattivo borato utilizzato in questo studio è la seguente: 6Na<sub>2</sub>O-8K<sub>2</sub>O-8MgO-22CaO-18B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-36SiO<sub>2</sub>-2P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Come è possibile notare in figura 5.8, le cellule coltivate sul substrato in PCL hanno una forma prevalentemente arrotondata, mentre le cellule coltivate su B-BG/PCL sono ben distribuite sul

costrutto composito, con microfilamenti di actina paralleli all'asse lungo della cellula, soprattutto nei compositi contenenti il 30 e il 40 wt.% di B-BG.



**Figura 5.8** Immagini SEM (a) PCL (b) 10% B-BG/PCL (c) 20 %B -BG/PCL (d) 30% B-BG/PCL (e) 40% B-BG/PCL [111].

(e)

(d)

I risultati dell'analisi MTT, che analizza l'attività di proliferazione cellulare, dimostra che la proliferazione è aumentata con l'introduzione di B-BG nei compositi B-BG/PCL e ha raggiunto il suo picco nel gruppo contenente il 30 wt.% di B-BG. La proliferazione risulta invece inferiore nel gruppo contenente il 40 wt.% di B-BG, probabilmente a causa della più elevata velocità di degradazione, e quindi di un maggior aumento del pH della soluzione causato da questo materiale composito rispetto alle altre composizioni testate (figura 5.9)



Figura 5.9 Analisi MTT per le colture cellulari dei vari gruppi analizzati [111].

In figura 5.10 sono invece rappresentati i risultati che mostrano l'espressione di proteine fondamentali per il processo angiogenico, VEGF e ANG-1:



Figura 5.10 Espressione nei vari gruppi analizzati delle due proteine [111].

Questi risultati mostrano che i materiali compositi B-BG/PCL possono incrementare l'espressione di VEGF e ANG-1 delle rBMSC, soprattutto il composito contenente il 30 wt.% di B-BG, che ha ottenuto i migliori risultati.

Studi recenti hanno comparato gli effetti di differenti composizioni di vetri bioattivi sulle abilità di supportare la crescita tissutale *in vivo*. Fu et al. [72] hanno impiantato degli scaffold nel dorso di ratti, tutti con microstruttura trabecolare ma aventi differenti composizioni (13-93, 13-93B1 e 13-93B3), per poi valutarne la microstruttura, i cambiamenti chimici e istologici 6 settimane dopo l'impianto. È stato notato che gli scaffold impiantati si convertivano più velocemente in HA in quegli scaffold in cui era presente un contenuto maggiore di B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: sia il borosilicato 13-93B1 che il borato 13-93B3 sono stati completamente convertiti in HA, mentre lo scaffold a base di vetro silicato 13-93 è stato solo parzialmente convertito. Questa modifica *in vivo*, funzione della composizione dei vari vetri bioattivi, è simile a quanto è stato osservato negli studi *in vitro*. Ma, al contrario di quanto emerso dagli studi *in vitro*, nei quali i due vetri contenenti boro mostravano una minore abilità nel supportare le funzioni cellulari, tutti e tre i gruppi testati hanno mostrato l'abilità di supportare l'infiltrazione tissutale durante le sei settimane di impianto.

Bi et al. [73] hanno utilizzato le tre composizioni testate nello studio appena affrontato, ma tramite scaffold con microstruttura fibrosa, impiantando i tre scaffold per 12 settimane in difetti cranici di roditori, valutando l'abilità degli scaffold di supportare la formazione di nuovo osso e di guarire il difetto. I difetti riempiti con particelle (150-300  $\mu$ m) di 45S5 e i difetti lasciati vuoti sono stati utilizzati come controlli positivi e negativi, rispettivamente. I risultati mostrano che la formazione di nuovo osso è strettamente dipendente dalla composizione del vetro bioattivo utilizzato per realizzare lo scaffold. In figura 5.11 possiamo osservare i risultati di due analisi (hematoxilin and eosin, H&E, e von Kossa) sulle sezioni dello scaffold 13-93 e del 13-93B3 dopo 12 settimane dall'impianto:



Figura 5.11 Von Kossa e H&E dello scaffold a base di 13-93 e dello scaffold a base di 13-93B3 [73].

Come possiamo osservare, anche se entrambi gli scaffold risultano ben integrati con l'osso circostante, una quantità maggiore dello scaffold a base di 13-93B3 è stato convertito in HA e una maggiore quantità di nuovo osso si è formato all'interno dello stesso scaffold. Analisi istologiche quantitative mostrano che la quantità di nuovo osso formato all'interno dello scaffold borato (circa il 15%) dopo 12 settimane di impianto è circa il doppio rispetto a quello formatosi all'interno dello scaffold silicato, come possiamo notare in figura 5.12.



Figura 5.12 Percentuale di nuovo osso dopo 12 settimane di impianto negli scaffold testati [73].

Oltre alla composizione dei vetri bioattivi utilizzati, anche la microstruttura può avere effetti sull'abilità di supportare la formazione di nuovo tessuto, come notato da Fu et al. in un altro studio [74]: quando sono stati impiantati scaffold a base di 13-93 con microstruttura orientata (porosità = 60%, diametro pori = 90-110  $\mu$ m) per 4 settimane nel dorso di ratti, questo scaffold ha mostrato un'abilità superiore nel supportare l'infiltrazione di tessuto rispetto ad uno scaffold avente microstruttura trabecolare a base dello stesso vetro, anche se la porosità e la dimensione dei pori erano maggiori nel secondo scaffold (porosità = 85%, diametro pori 100-500  $\mu$ m). Le ragioni dell'aumento di infiltrazione tissutale in scaffold con microstruttura orientata non sono ancora chiare;

Anche la semina di cellule staminali mesenchimali (MSCs) si è dimostrata una buona metodologia per aumentare l'infiltrazione di tessuto in scaffold a base di vetri bioattivi. Sempre nello studio di Fu et al. [74], sono state seminate MSCs derivanti dal midollo osseo di ratto su uno scaffold trabecolare a base di 13-93, impiantato per 4 settimane nel dorso di un ratto. Lo stesso scaffold ma senza cellule è stato utilizzato come controllo. Le valutazioni istologiche hanno dimostrato che la quantità di tessuto infiltratosi nello scaffold seminato con MSCs era tre volte superiore rispetto al controllo.

Come abbiamo già visto analizzando gli studi *in vitro*, il boro può avere effetti tossici, ma le analisi istologiche non hanno mostrato la comparsa di effetti negativi dopo l'impianto di scaffold borati. Un altro studio [75], basato sempre sull'impianto sottocutaneo di scaffold borati in ratti, non ha mostrato danneggiamenti tissutali ai reni e al fegato. In questo studio sono stati valutati 5 gruppi di ratti, in ogni gruppo è stato impiantato un numero differente di scaffold (0, 4, 8, 12 e 16); tutti gli scaffold hanno una microstruttura fibrosa, una massa pari a 70 mg e sono stati impiantati per 4 settimane. Il tempo di impianto non è stato sufficiente a far sì che gli scaffold reagissero completamente si convertissero in HA. Passate le 4 settimane, un rene e un lobo del fegato sono stati rimossi da ogni animale per analizzarli: non sono stati trovati effetti negativi nel fegato di nessun animale, mentre nei reni sono stati osservati piccoli cambiamenti, spesso nei reni di ratti adulti. Quindi, basandoci su questi risultati tossicologici, i vetri borati risultano non tossici in un ambiente dinamico, come quello del corpo di piccoli animali, e possono essere considerati materiali promettenti per la rigenerazione dei *tessuti in vivo*.

Detsch et al. [124] hanno valutato l'abilità pro-angiogenica del vetro bioattivo S53P4 (composizione in wt.% pari a 53SiO<sub>2</sub>-23Na<sub>2</sub>O-20CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Questo vetro è già stato utilizzato come materiale riempitivo antibatterico per applicazioni chirurgiche ortopediche, maxillo-facciali e spinali. Lo scopo di questo studio è valutare *in vitro* l'abilità del S53P4 di stimolare l'espressione e la secrezione di VEGF da parte di fibroblasti umani, cercando quindi di capire se questo vetro bioattivo potrà essere usato in futuro per stimolare la neovascolarizzazione. Gli autori hanno quindi preparato granuli di BG (ottenuti tramite fusione) aventi 3 dimensioni differenti: 0.5-0.8 mm (No.1), 1.0-2.0 mm (No.2), 2.0-3.15 mm (No.3), visibili in figura 5.13:



Figura 5.13 Morfologia dei 3 granuli aventi dimensioni differenti [124].

Per la coltura cellulare sono state utilizzati cellule fibroblastiche CCD-180CO, coltivate in EMEM contenente il 10% di siero bovino fetale , al quale sono state aggiunte diverse concentrazioni di vetro

bioattivo (0-0.01-0.1 e 1 wt/vol %). Vitalità e proliferazione cellulare sono state valutate dopo 72 ore di incubazione valutando l'attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH). Come è possibile osservare in figura 5.14, l'attività di questo enzima aumenta a contatto con i campioni di vetro bioattivo, con la massima attività raggiunta dal campione No.2 alla concentrazione di 0.1 wt/vol %.



**Figura 5.14** Valutazione dell'attività enzimatica e mitocondriale dei 3 campioni alle differenti concentrazioni dopo 72 ore di incubazione [124].

L'analisi del rilascio di VEGF da parte delle cellule fibroblastiche, effettuata tramite analisi ELISA, è schematizzata in figura 5.15:



**Figura 5.15** Analisi del rilascio di VEGF da parte delle CCD-180CO a contatto con i BG di dimensioni differenti (a-c) a concentrazioni differenti [124].

Come possiamo vedere in figura 5.15, il maggiore rilascio di VEGF è stato ottenuto con il campione No.2 alla concentrazione di 0.1 wt/vol %. Sia il campione No.1 che il campione No.2 aumentano il rilascio di VEGF (fig. 5.15 a/b), mente l'utilizzo di particelle di vetro bioattivo appartenenti al gruppo No.3, a tutte le concentrazioni, porta all'inibizione del rilascio del fattore di crescita (fig. 5.15 c).

Quindi, dati i risultati di questo studio, è possibile concludere affermando che l'utilizzo di particelle nel range di 0.5-0.8 mm o 1.0-2.0 mm, specialmente alla concentrazione di 0.1 wt/vol %, può supportare la vascolarizzazione

Bi et al. [49] hanno messo a confronto le proprietà di tre vetri bioattivi, le cui composizioni sono visibili in tabella 5.2:

Tabella 5.2 Composizione nominale di tre vetri bioattivi: 1) 13-93B3 2) 13-93B3-Cu 3)4 5S5 [49].

Glass	SiO <sub>2</sub>	$B_2O_3$	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> 0	MgO	CaO	$P_{2}O_{5}$	CuO
13-93B3 13-93B3-Cu 45S5	45	53 52.6 24.5	6 6	12 12	5 5 24.5	20 20 6	4 4	0.4

Gli scaffold a base di vetri borati sono stati ottenuti con tre microstrutture differenti: trabecolare, orientata e fibrosa. Per confrontare i risultati, sono state utilizzato come controllo particelle di 4585 con dimensione compresa tra i 250 3 i 300 µm. Lo scaffold con microstruttura trabecolare è stato preparato utilizzando la tecnica di replica in schiuma, già affrontata in questo capitolo. Il costrutto finale, con geometria cilindrica (4 mm di diametro), è stato sezionato in dischi dallo spessore di 1.5 mm. Per ottenere lo scaffold orientato si è innanzitutto preparata una sospensione contenente particelle di vetro (10 vol.%), canfene e 2wt.% di acido stearico, utilizzato come agente disperdente. La sospensione così ottenuta è stata posta in una bottiglia chiusa in polipropilene per 24 ore a 55°C. L'impasto è stato poi trasferito in uno stampo, sempre in polipropilene, e fatto solidificare tramite raffreddamento in direzione radiale utilizzando una miscela di acqua e ghiaccio a 3°C. I campioni sono stati poi posti in una cappa aspirante per eliminare il canfene e poi riscaldati per eliminare la fase organica. Lo scaffold fibroso, con una microstruttura composta da fibre disposte in maniera casuale dal diametro di 100-300 µm, è stato ottenuto riscaldando uno stampo in grafite, all'interno del quale erano state inserite e messe in stretto contatto le fibre di vetro bioattivo. La fase di

riscaldamento è durata 45 minuti, raggiungendo i 575°C. In figura 5.16 possiamo osservare le microstrutture ottenute tramite le tre tecniche:



Figura 5.16 Immagini SEM delle 3 microstrutture ottenute [49].

in tabella 5.3 sono state riportate invece la porosità e la dimensione dei pori di tutti gli scaffold ottenuti, combinando microstruttura e vetro bioattivo di partenza:

Microstructure	Porosity (%)	Pore size (µm	
Trabecular			
13-93B3	77 ± 5	200-400	
13-93B3-Cu	77 ± 5	200-400	
Oriented			
13-93B3	62 ± 5	60-200	
13-93B3-Cu	62 ± 5	60-200	
Fibrous			
13-93B3	50 ± 2	50-500	
13-93B3-Cu	50 ± 2	50-500	

Tabella 5.3 Porosità e dimensione dei pori degli scaffold con differenti microstrutture [49].

Come possiamo vedere dalla che dalla tabella 3, le differenze nella struttura e nella porosità dipendono prevalentemente dalla tecnica utilizzata per ottenere i vari scaffold più che dai vetri di partenza: per ogni microstruttura analizzata le caratteristiche del vetro bioattivo dopato con ioni rame sono simili a quelle del vetro bioattivo non dopato.

Per valutare gli effetti biologici di queste combinazioni di scaffold, ogni costrutto è stato impiantato all'interno di difetti ossei in topi da laboratorio, seguendo lo schema presente nella tabella 5.4:

Rat	Left side	Right side
1	13-93B3 trabecular	13-93B3-Cu trabecular
2	13-93B3 trabecular	13-93B3 oriented
3	13-93B3 trabecular	13-93B3-Cu oriented
4	13-93B3 trabecular	13-93B3 fibrous
5	13-93B3 trabecular	13-93B3-Cu fibrous
6	13-93B3 trabecular	45S5
7	13-93B3-Cu trabecular	13-93B3 oriented
8	13-93B3-Cu trabecular	13-93B3-Cu oriented
9	13-93B3-Cu trabecular	13-93B3 fibrous
10	13-93B3-Cu trabecular	13-93B3-Cu fibrous
11	13-93B3-Cu trabecular	45S5
12	13-93B3 oriented	13-93B3-Cu oriented
13	13-93B3 oriented	13-93B3 fibrous
14	13-93B3 oriented	13-93B3-Cu fibrous
15	13-93B3 oriented	45S5
16	13-93B3-Cu oriented	13-93B3 fibrous
17	13-93B3-Cu oriented	13-93B3-Cu fibrous
18	13-93B3 oriented	45S5
19	13-93B3 fibrous	13-93B3-Cu fibrous
20	13-93B3 fibrous	45S5
21	13-93B3-Cu fibrous	45S5
22	Empty	13-93B3 oriented
23	Empty	13-93B3-Cu trabecular
24	Empty	13-93B3-Cu oriented
25	Empty	45S5
26	13-93B3 trabecular	13-93B3-Cu fibrous

Tabella 5.4 Posizionamento degli scaffold all'interno dei difetti del cranio dei topi [49].

La formazione di nuovo osso è stata valutata con il metodo von Kossa; i risultati migliori sono stati ottenuti con lo scaffold trabecolare composto da 13-93B3 e con lo scaffold fibroso in 13-93B3-Cu, come mostrato in figura 5.17.



Figura 5.17 Percentuale di nuovo osso formatosi dopo 12 settimane dall'impianto [49].

È stata valutata anche la formazione di nuovi vasi sanguigni, tramite la tecnica PAS. I vasi sanguigni sono stati in grado di infiltrarsi all'interno di tutti gli scaffold impiantati, ma i risultati migliori sono stati ottenuti con lo scaffold trabecolare a base di biovetro dopato con rame, come visibile in figura 5.18:



Figura 5.18 Valutazione della formazione di nuovi vasi sanguigni tramite tecnica PAS [49].

I risultati ottenuti confermano quanto già sapevamo sui vetri bioattivi: la formazione di nuovo osso è strettamente correlata alla porosità dello scaffold a base di vetro; lo scaffold con microstruttura trabecolare, con una porosità del 77% e con dimensione dei pori tra i 200 e i 400  $\mu$ m, ha le caratteristiche migliori per favorire la formazione di nuovo osso. L'aggiunta di ioni rame ha in più favorito la formazione di nuovi vasi sanguigni in tutti gli scaffold esaminati, confermando il potere angiogenico di questo ione.

Nel capitolo precedente è stato trattato anche un altro ione avente proprietà angiogeniche, lo ione cobalto. Deng et al. [48] hanno testato *in vivo* le capacità di questo ione incorporandolo in un vetro borosilicato bioattivo (3 wt.%), eseguendo gli esperimenti su 36 topi, divisi in 3 gruppi: per il primo gruppo non è stato utilizzato alcun materiale per riempire i difetti ossei (gruppo di controllo), nel secondo gruppo è stato applicato il 3Co-BG e nel terzo il vetro borosilicato bioattivo non dopato con ioni cobalto. La valutazione della formazione di nuovi vasi sanguigni è stata effettuata 8 settimane dopo 8 settimane dall'intervento. La ricostruzione delle immagini tomografiche presenti in figura 5.19 A mostrano che la densità vascolare, il numero e l'area dei vasi presenti nello scaffold a base di

3Co-BG sono nettamente maggiori rispetto agli altri due gruppi (solo BG o nessuno scaffold impiantato).



Figura 5.19 Valutazione tramite m-CT della formazione di vasi sanguigni in difetti cranici di topi [112].

La micro-CT mostra anche che la quantità di nuovo tessuto formatosi nei difetti ossei è più elevata nei difetti riempiti con lo scaffold dopato con ioni cobalto (fig. 5.20 A) e la rigenerazione di nuovo tessuto osseo è significativamente migliore nei campioni di 3Co-BG (fig. 5.20 B e C).



Figura 5.20 Valutazione tramite m-CT della formazione di nuovo tessuto osseo nei difetti cranici di topi [113].

Lo scaffold a base di 3Co-BG ha quindi esibito la capacità di aumentare in maniera significativa la rigenerazione di nuovo tessuto osseo e la formazione di nuovi vasi sanguigni rispetto agli altri scaffold analizzati.

Kargozar et al. hanno sintetizzato una serie di vetri bioattivi dopati con due ioni metallici, stronzio e cobalto, andando a rimpiazzare parte dell'ossido di calcio con gli ossidi dei due metalli citati. Lo stronzio è un metallo alcalino-terroso, attualmente usato nei trattamenti delle osteoporosi [130]. Questo metallo è in grado di aumentare la densità ossea e quindi di ridurre il rischio di frattura tramite due vie differenti: aumentando l'attività osteoblastica ed inibendo l'attività osteoclastica. Risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo* hanno confermato il ruolo positivo dello stronzio in termini di rigenerazione ossea [131]. Il team di ricerca ha sviluppato quattro gruppi differenti di BG progettati a partire da un sistema multi-componente composto da SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-SrO-Na<sub>2</sub>O-MgO-ZnO-K<sub>2</sub>O. Le composizioni dei 4 gruppi (Ca-glass, Sr-glass, Ca-Co-glass, Sr-Co-glass) sono presenti in tabella 5.5:

Sample	SiO <sub>2</sub>	$P_2O_5$	CaO	SrO	Na <sub>2</sub> O	MgO	K <sub>2</sub> O	CoO
Ca-glass	41.2	5.06	36.14	0	7.17	3.26	7.17	0
Sr-glass	41.2	5.06	30.14	6	7.17	3.26	7.17	0
Ca-Co-glass	41.2	5.06	35.64	0	7.17	3.26	7.17	0.5
Sr-Co-glass	41.2	5.06	29.64	6	7.17	3.26	7.17	0.5

Tabella 5.5 Composizioni nominali dei 4 gruppi di BG [127].

Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti su conigli, separati casualmente in 5 gruppi, ognuno dei quali include 5 conigli (1 gruppo per il controllo-difetto vuoto-e 4 gruppi per i 4 vetri bioattivi). Le particelle di vetro bioattivo di ogni gruppo sono state pre-coltivate con cellule HUCPVC (cellule perivascolari del cordone ombelicale umano). I sistemi particelle di BG + cellule sono stati impiantati in difetti femorali degli animali. Al fine di poter dimostrare il potere rigenerativo di questi materiali, è stata valutata l'espressione dell'osteocalcina (OCN), della fosfatasi alcalina (ALP) e del VEGF.



**Figura 5.21** Analisi immunochimica delle tre proteine marker (OCN, ALP, VEGF) dopo 4 e 12 settimane dall'impianto [127].

Come è possibile notare in figura 5.21, l'espressione delle 3 proteine è stata osservata nei difetti ossei di tutti i gruppi, anche se nel gruppo di controllo in maniera trascurabile. Dopo quattro settimane, l'espressione delle tre proteine nel difetto trattato con HUCPVC/Sr-Co-glass è stata leggermente maggiore rispetto agli altri gruppi. Anche se la produzione di proteine osteogeniche ed angiogeniche nei campioni alla dodicesima settimana è stata maggiore rispetto alla quarta, i quattro gruppi hanno un trend simile per quanto riguarda il processo di guarigione dell'osso, ottenendo i migliori risultati con il Sr-Co-glass. In figura 5.22 si possono osservare le percentuali di nuovo osso nei 5 gruppi testati:



Figura 5.22 Percentuale di nuovo osso dopo 4 e 12 settimane nei cinque gruppi [127].

È semplice notare la differenza tra il gruppo di controllo e i gruppi contenenti i vetri bioattivi; anche in questo caso è possibile notare che i risultati migliori sono stati ottenuti con il vetro contenente gli ioni stronzio e cobalto ma, anche negli altri gruppi, la percentuale di formazione di nuovo osso è accettabile. Per concludere, i risultati delle analisi effettuate hanno dimostrato che il processo di guarigione ossea è stato migliore nel gruppo di conigli in cui è stato impiantato il Sr-Co-glass, probabilmente grazie al lavoro combinato dello ione  $Sr^{2+}$  e dello ione  $Co^{2+}$  presenti nella struttura vetrosa.

#### 5.3-Wound healing

La pelle è l'organo più grande del corpo umano. Essa agisce come barriera protettiva contro l'ambiente esterno, prevenendo infezioni e perdita di liquidi ed elettroliti e regolando la temperatura del corpo [90]. La guarigione di aree estese di difetti della pelle riguardanti tutto il suo spessore è un problema clinico molto importante [91]: infatti, proprio come per il tessuto osseo, i trattamenti si basano principalmente su autoinnesti (autograft), innesti da altri esseri umani (allograft) o innesti derivanti da animali (xenograft). Queste tecniche hanno diverse limitazioni, come ad esempio il potenziale rischio di trasmissione di malattie e la disponibilità di tessuto limitata. Negli ultimi anni, ci sono stati sviluppi nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa anche in questo settore, sviluppando diversi metodi per la riparazione e la rigenerazione della pelle. Medicazioni basate sull'utilizzo di biomateriali sono sotto osservazione da parte dei ricercatori dato che potrebbero offrire una semplice soluzione al problema. Medicazioni composte da micro o nano fibre polimeriche (naturali o sintetiche) sono molto studiate dato che hanno una struttura simile a quella della matrice extracellulare, un'elevata area superficiale e proprietà meccaniche facilmente modificabili. Comunque, il loro utilizzo in applicazioni cliniche può soffrire di alcune limitazioni, come ad esempio il rilascio di prodotti di degradazione acidi in grado di abbassare il pH locale, di provocare forti infiammazioni, iperplasia e contrazione delle ferite [92]. La scarsa bioattività e la tipica natura idrofobica dei materiali polimerici può inoltre limitare l'integrazione di questi materiali all'interno del tessuto. Un ulteriore aspetto negativo di questi materiali è la mancanza di abilità di stimolare la vascolarizzazione. Anche se i vetri bioattivi sono stati studiati ed utilizzati per anni solo nel campo della rigenerazione ossea, recenti studi hanno dimostrato la loro capacità di stimolare l'angiogenesi e la riparazione dei tessuti molli. Come è stato recentemente dimostrato da Naseri et al. [94], i vetri bioattivi sono in grado di esplicare il loro effetto terapeutico in tutte e quattro le fasi della riparazione delle ferite (figura 5.23): 1) aumento della proliferazione cellulare, 2) riduzione dell'infiammazione, 3) effetto pro-angiogenico, 4) effetto antibatterico.



Figura 5.23 Effetti dei BG nella guarigione delle ferite. [94].

#### 5.3.1-Meccanismi di legame tra vetri bioattivi e tessuti molli

Il meccanismo che regola il legame tra BG e tessuti molli è governato dalle reazioni di dissoluzione e precipitazione che avvengono sulla superfice dei vetri bioattivi a contatto con i fluidi biologici [101]. Il pH locale aumenta a causa della concentrazione ionica causata dalla dissoluzione dei vetri, utile alla formazione dello strato di HA all'interfaccia tra vetri bioattivo e fluido biologico. Questa fase cristallina fornisce un'interfaccia di legame tra l'impianto e il tessuto, così come accade per i tessuti duri. Avvengono in questa fase due tipi di interazione tra organismo e vetro, riassunte in figura 5.24:



Figura 5.24 Illustrazione delle interazioni extra ed intracellulari in seguito all'impianto di un BG [102].

Queste interazioni sono influenzate dalla disponibilità di diversi ioni e quindi dipendono dalla specifica composizione del vetro bioattivo impiegato. Oltre a questo, il collagene presente nei tessuti molli è in grado di legarsi alla superficie del vetro. Anche se è stato dimostrato che i vetri bioattivi possono creare legami con diversi tessuti molli, i meccanismi responsabili di questa interazione non sono ancora stati del tutto descritti.

## 5.3.2-Applicazioni BG: rigenerazione del tessuto epiteliale

Nel 2010, un team di ricerca coordinato dal prof. Day ha sviluppato un materiale bio-riassorbibile composto da micro e nano fibre di 13-93B3, andando a mimare la microstruttura dei coaguli di fibrina. Questo materiale ha dimostrato di poter indurre una più rapida chiusura delle ferite in animali e in esseri umani diabetici che non rispondevano ad altre terapie [96]. Questi vetri bioattivi erano in grado di migliorare in maniera significativa l'angiogenesi *in vivo* [97] cosi come la migrazione delle cellule epidermiche. Possiamo osservare i risultati di questi studi in tabella 5.6, in cui sono presenti i valori di densità dei vasi sanguigni dopo 2, 3 e 4 settimane dall'impianto sottocutaneo.

Tabella 5.6 Analisi istologica quantitativa dei vasi in tessuti sottocutanei relativa ai vari campioni testati [97].

Implant Duration	Microfibrous Glass Implanted	Vessel Density, % (Mean ± SEM)		
2 weeks	None (sham control)	1.8 ± 0.2		
	45S5	$3.5\pm0.5$		
	13–93B3	$5.2 \pm 0.5^{*}$		
	13–93B3Cu	$7.1 \pm 0.6^{*}$		
3 weeks	None (sham control)	$1.8 \pm 0.2$		
	45S5	$3.3 \pm 0.5$		
	13–93B3	$7.7 \pm 1.1^{*}$		
	13–93B3Cu	$9.7 \pm 0.7*$		
4 weeks	None (sham control)	$1.9 \pm 0.2$		
	45S5	$3.5 \pm 0.4$		
	13–93B3	9.2 ± 1.2*		
	13–93B3Cu	$13.5\pm0.9^{\ast}$		

Il vetro bioattivo 13-93B3 "*cotton-candy*" (figura 5.25) è disponibile in commercio dal 2017 per scopi veterinari (DermaFuse<sup>TM</sup>/Mirragen<sup>TM</sup>)



Figura 5.25 microfibre del vetro bioattivo 13-93B3 [97].

Nel 2016, Li et al. dimostrarono che gli ioni presenti nel Bioglass® erano in grado di promuovere il processo di guarigione delle ferite influenzando la proteina connessina 43 (Cx43), proteina presente nelle giunzioni cellulari [99]. I risultati in vitro hanno mostrato che l'incubazione di 7 giorni di cellule endoteliali con il Bioglass® riduceva la morte cellulare e rendeva possibile una maggiore espressione di VEGF e bFGF. Oltre a questi, anche i risultati degli esperimenti in vivo, effettuati su ratti, mostrano un aumento dell'espressione della Cx43 e della vascolarizzazione 12 giorni dopo l'intervento chirurgico, causando quindi un miglioramento nel processo di guarigione (figura 5.26).

Wound tissue

Wound tissue + BG



Figura 5.26 analisi immunoistochimica della proteina Cx43 nei tessuti 2 e 12 giorni dopo l'impianto [99].

L'incorporazione di BG in matrici polimeriche, comodamente adattabili alla forma del tessuto da rigenerare, è un metodo utile per la somministrazione di vetri bioattivi in situ. Gao et al. [103] hanno sviluppato un composito idrogelo polimerico a base di sodio alginato (SA) e vetro bioattivo (45S5). Per la valutazione *in vitro* di questo materiale, sono state isolate cellule endoteliali umane derivanti dalla vena ombelicale (HUVEC) e fibroblasti dermici umani (HDF), entrambe fondamentali nel processo di guarigione delle ferite. I risultati mostrano che il rilascio di Si influenza positivamente la proliferazione dei due gruppi cellulari e, ancora più importante, l'analisi PCR ha rilevato che l'espressione di VEGF in HUVEC e HDF coltivati sull'idrogelo contenente 1% di vetro bioattivo è significativamente maggiore rispetto ai livelli registrati con il materiale di controllo, composto da solo idrogelo (figura 5.27). Questo risultato suggerisce che il materiale composito analizzato può stimolare l'angiogenesi.



Figura 5.27 Risultati analisi PCR dopo 3 giorni di coltura [103].

Gli effetti di questo materiale composito sula guarigione delle ferite sono stati valutati *in vivo* su topi. La chiusura delle ferite e la neovascolarizzazione indotte dall'idrogelo con BG e dal solo idrogelo sono state comparate. In figura 5.28 possiamo osservare le foto scattate 7, 14 e 21 giorni dopo i diversi trattamenti.



**Figura 5.28** a) processo di guarigione b) analisi H&E c) quantificazione della chiusura delle ferite e della formazione di nuovo tessuto epiteliale [103]

In tutte e tre le valutazioni effettuate, è chiaro come i risultati migliori in termini di chiusura delle ferite e formazione di nuovo tessuto epiteliale siano stati ottenuti tramite il materiale composito. Per quanto riguarda la formazione di nuovi vasi, i risultati sono riportati in figura 5.29:



Figura 5.29 a) analisi immunoistochimica del CD 31 b) numero di nuovi vasi sanguigni c) diametro dei nuovi vasi [103].

Il numero di nuovi vasi formatosi nel gruppo coltivato con l'idrogelo e il vetro bioattivo è nettamente superiore che negli altri gruppi (figura 5.29b). È anche interessante notare come il diametro dei vasi sia maggiore nel gruppo BG/idrogelo (figura 5.29c).

In un altro studio, condotto Mao et al. [110], sono stati preparate due tipologie di nanoparticelle a base di due differenti composizioni di vetri bioattivi, 58S-NBG ( $60SiO_2$ -36CaO- $4P_2O_5$ ) e 80S-NBG ( $80SiO_2$ -15CaO- $5P_2O_5$ ). La coltura cellulare, effettuata per valutare gli effetti sul processo di guarigione e sul processo angiogenico di questi due materiali, è stata svolta utilizzando cellule HUVEC. Le nanoparticelle sono state ottenute tramite metodo sol-gel. Per svolgere le analisi sono stati creati 4 mezzi di coltura differenti, due per ogni vetro bioattivo testato, ma contenenti differenti quantità di NBG, 200 o 500 µg di particelle per ogni ml di soluzione, composta da *endothelial basal medium* (EBM).

Gli effetti sulla guarigione delle ferite sono stati valutati depositando le cellule HUVEC in 6 pozzetti, graffiando le cellule con una micropipetta. Le cellule sono in seguito state esposte ai 4 mezzi di coltura contenenti BG per 5 e 20 ore. Per valutare gli effetti di questi due vetri bioattivi sull'angiogenesi, è stato condotto il *tube formation assay*. Le cellule sono state seminati in 96 pozzetti contenenti 50  $\mu$ l di ECM e incubate i vetri a 37°C per 5 e 20 ore.

Il test *in vitro* condotto per valutare gli effetti sulla guarigione delle ferite dei differenti mezzi di coltura sulle cellule endoteliali ha dimostrato che dopo 5 ore, la velocità di guarigione era simile per tutti i gruppi analizzati, ma dopo 20 ore la percentuale di guarigione ottenuta nei gruppi esposti al 58S-500 e al 80S-500, rispettivamente pari al 83.16% e al 80.84%, risultava nettamente maggiore a quella rilevata per il gruppo di controllo (64.44%), in cui il mezzo di coltura è composto da solo EBM. I risultati sono esposti in figura 5.30:



**Figura 5.30** a) valutazione in vitro della migrazione cellulare dopo il graffio b) velocità di guarigione confrontate per i diversi materiali [110].

Il test *in vitro* condotto per determinare le abilità angiogeniche dei NBG ha rilevato che dopo 5 ore di coltura in tutti i gruppi erano presenti strutture tubolari, ma i gruppi coltivati nei mezzi di coltura

contenenti i vetri bioattivi mostravano strutture tubolari più mature ed integre, rispetto al gruppo di controllo, in particolare il gruppo 58S-500 e il gruppo 58S-200. Dopo 20 ore in tutti i gruppi erano presenti strutture mature, ma le strutture tubolari presenti nel gruppo 58S-500 erano decisamente più numerose rispetto al gruppo di controllo (figura 5.31).



**Figura 5.31** a)immagine delle HUVEC coltivate sul gel di ECM contenente differenti BG b) valutazione del numero di strutture tubolari formatesi dopo 5 e 20 ore [110].

Tramite analisi ELISA è stata anche valutata l'espressione delle proteine VEGF e Bfgf dopo 48 ore di coltura all'interno dei differenti mezzi di coltura.



Figura 5.32 Livelli delle proteine VEGF e bFGF nelle differenti colture cellulari [110].

Come è possibile osservare in figura 5.32, tutti i mezzi di coltura contenenti NBG hanno stimolato la produzione delle due proteine correlate all'angiogenesi dopo 48 ore.

#### 5.4- Impianti orbitali

La perdita dell'occhio è deturpante e la volontà di voler migliorare l'estetica del viso in seguito a tale evento è un desiderio molto antico. Ci sono alcune condizioni critiche, come ad esempio la cecità e il dolore oculare, oppure occhi con tumori intraoculari, in cui la rimozione dell'intero occhio è obbligatoria. Le tecniche chirurgiche utilizzate per rimuovere l'intero occhio oppure il suo contenuto sono due: 1) eviscerazione oculare, ossia la rimozione del contenuto del bulbo oculare, mantenendo la sclera e la muscolatura oculare e 2) enucleazione, misura radicale in cui si rimuove l'intero globo oculare. Dopo uno di questi due interventi, un impianto deve essere posizionato nell'orbita oculare per ripristinare il volume oculare perso.

Sin dal 500', i produttori di vetro veneziani iniziarono a produrre il così detto "occhio di vetro", da inserire all'interno della cavità orbitale [104]. L'evoluzione di queste protesi oculari continuò nel corso del tempo, e la situazione cambiò drasticamente durante gli anni 80', in cui vennero introdotti gli impianti orbitali porosi. Questa tipologia di impianti permise un netto miglioramento nella percentuale di successi clinici e nella durata degli impianti grazie alla colonizzazione fibrovascolare postoperatoria all'interno degli impianti: il tessuto connettivo composto da vasi e cellule infiammatorie contribuiscono in maniera efficace al processo di guarigione.

Gli impianti orbitali disponibili sul mercato sono costituiti da HA naturale o sintetica, polietilene o allumina e hanno un network di macropori interconnessi con dimensioni nel range di 100-500  $\mu$ m [105].

L'introduzione dei vetri bioattivi in questo settore è dovuta alle abilità intrinseche di questa tipologia di materiali, ossia l'abilità di creare un legame stabile con i tessuti circostanti e la capacità di indurre l'angiogenesi. L'effetto pro-angiogenico è infatti molto rilevante per le applicazioni nel campo degli impianti orbitali: mentre il polietilene, l'idrossiapatite e l'allumina agiscono solamente come network passivo per la crescita interna di vasi sanguigni, i vetri bioattivi sono in grado di rilasciare prodotti di dissoluzione ionica in grado di stimolare questo processo, accelerando la reazione fibrovascolare all'interno dell'impianto.

Il primo utilizzo *in vivo* dei vetri bioattivi per questa applicazione è stato effettuato da un team di ricerca cinese negli anni 90' [106], utilizzando sfere porose di un vetro-ceramico con composizione non specificata. Queste sfere sono state impiantate nelle cavità orbitali di conigli e non sono state osservate reazioni dovute al materiale. Analisi ad ultrasuoni effettuate 3 mesi dopo l'impianto hanno rilevato la presenza di vascolarizzazione all'interno dell'impianto, che ha raggiunto il 90% del volume dei pori dell'impianto dopo 6 mesi. Le stesse sfere vetro-ceramiche sono state in seguito impiantate in 102 pazienti umani che apparentemente non hanno riportato alcuna complicazione dovuta al materiale [107]. Quattro pazienti hanno però avuto complicazioni postoperatorie attribuibili alle tecniche chirurgiche utilizzate, e un impianto è stato sostituito con un altro impianto. Tutti i pazienti erano soddisfatti per il risultato estetico e per la motilità oculare acquisita. Il fatto interessante da sottolineare è che questi primi studi sono stati svolti quando ancora non erano presenti in letteratura evidenze in grado di dimostrare il potere pro-angiogenico dei vetri bioattivi.

I vetri bioattivi sono stati utilizzati anche per produrre compositi biomedicali a base di polimeri. Probabilmente ispirato dagli studi in questo settore, i ricercatori della Porex Surgical (Newman, GA, USA) hanno esplorato la possibilità di incorporare particelle di vetri bioattivi all'interno dell'impianto orbitale in polietilene Medpor®. La linea di impianti Medpor® è stata lanciata negli anni 80' e divenne estremamente popolare grazie ai bassi costi se confrontati con gli impianti in HA o allumina. In seguito, sono stati prodotto impianti compositi (30% 45S5 Bioglass®/ 70% polietilene in volume) chiamati Medpor® Plus Sphere. Gli studi effettuati su questi impianti orbitali sono limitati. Choi et al. [108] per primi investigarono gli effetti di questo prodotto sulla fibrovascolarizzazione in conigli. 48 animali sono stati divisi in 4 gruppi in accordo con le differenti tecniche chirurgiche utilizzate e i diversi materiali impiantati: il gruppo 3 e il 4 hanno ricevuto il Medpor® Plus Sphere dopo enucleazione o eviscerazione, rispettivamente, mentre il gruppo 1 e 2 hanno ricevuto il Medpor® senza vetro bioattivo e anche per loro sono state utilizzate le due tecniche utilizzate per il gruppo 3 e 4. È stato molto interessante notare che, dopo le analisi istologiche eseguite 2 mesi dopo le operazioni, non erano presenti differenze significative tra i quattro gruppi in termini di crescita fibrovascolare. Risultati opposti sono stati ottenuti però da Naik et al. [109]. In 10 pazienti umani, dopo l'intervento di enucleazione, sono stati impiantati le sfere composte dal materiale composito (5 pazienti) e le sfere composte da Medpor® (5 pazienti). La risonanza magnetica ha rilevato un aumento significativo della fibrovascolarizzazione nei pazienti in cui è stato utilizzato il Medpor® in cui è stato aggiunto il Bioglass®, in percentuale il 69% contro il 58% dopo un mese e mezzo e 85% contro il 76% dopo quattro mesi e mezzo. Un trial clinico più esaustivo è stato riportato da Ma et al. [110], in cui in 170 pazienti umani è stato impiantato il Medpor® Plus Sphere in seguito a enucleazione. La maggior parte dei pazienti (161 casi) non ha evidenziato complicazioni di alcun genere, mentre per gli altri

pazienti è stato necessario intervenire nuovamente. Questi risultati suggeriscono che il composito vetro bioattivo/polietilene può essere una valida alternativa ai materiali tutt'ora utilizzati, ma i vantaggi clinici rimangono non chiari se confrontati con il Medpor® senza vetro bioattivo.

Nel 2010, il gruppo di ricerca brasiliano guidato dai professori Zanotto e Petil ha proposto l'utilizzo del Biosilicate® (composizione 23.75Na<sub>2</sub>O-23.75CaO-48.5SiO<sub>2</sub>-4PO<sub>5</sub>) per realizzare una nuova generazione di impianti orbitali. Nel primo studio pubblicato nel 2012, Brandao et al. [111] hanno valutato la biocompatibilità di coni composti da Biosilicate® o da 45S5 Bioglass® (figura 5.30) nell'occhio eviscerato di coniglio. I coni sono stati prodotti colando il fuso in stampi di grafite; non è stata indotta cristallizzazione nel 45S5 Bioglass®, mentre il Biosilicate® ha subito due trattamenti termici per sviluppare una o due fasi cristalline. Nel dettaglio, il Biosilicate® 1P è stato trattato in modo da contenere solo una fase cristallina (1Na<sub>2</sub>O-2CaO-3SiO), con l'ossido di fosforo rimasto in soluzione solida, mentre il trattamento termico scelto per il Biosilicate® 2P ha fatto sì che gli ioni fosfato formassero un ulteriore fase con il calcio, creando così cristalli di apatite.



Figura 5.30 Impianto orbitale composto da Biosilicate® utilizzati nei conigli [112].

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi, per testare i 3 materiali prodotti, e sono stati sacrificati al 7°, al 90° e al 180° giorno dopo l'impianto dei coni nella cavità orbitale. In nessun animale si è manifestata un'infezione orbitale o la migrazione/estrusione dell'impianto, e le analisi morfologiche hanno rilevato la formazione di pseudo-capsule fibrovascolarizzate attorno a tutti gli impianti. Gli impianti in 45S5 e Biosilicate® 1P hanno indotto minori infiammazioni rispetto al Biosilicate® 2P. Le reazioni infiammatorie hanno raggiunto il loro picco massimo 7 giorni dopo l'eviscerazione e il posizionamento dei coni; da quel momento in poi diminuì in tutti i gruppi, specialmente nel gruppo in cui è stato impiantato il 45S5.

Risultati simili sono stati ottenuti dallo stesso gruppo di ricerca in un secondo studio condotto su 45 conigli eviscerati [113]. Sulla base di questi studi condotti sugli animali, hanno affermato che il Biosilicate® 1P può rappresentare una valida alternativa al 45S5 Bioglass®, grazie alla mancanza di tossicità locale o sistemica nell'orbita dei conigli eviscerati.

I primi studi effettuati sull'uomo utilizzando il Biosilicate® 1P sono stati svolti in due università brasiliane tra il 2013 e il 2016. Quarantacinque pazienti sono stati scelti casualmente, ossia non badando all'età, al sesso e alla lateralizzazione dell'impianto (enucleazione occhio destro o sinistro indifferente), e separati in accordo al tipo di materiale impiantato: in due terzi dei pazienti è stato impiantato il Biosilicate® 1P, nella terza parte rimanente è stato impiantato un dispositivo in PMMA (gruppo di controllo). Tutti gli impianti erano conici e avevano lo stesso design, ed erano disponibili in due misure (16 e 18 mm) (figura 5.31).



Figura 5.31 impianti utilizzati negli umani, disponibili in due dimensioni, 16 3 18 mm [113].

Il design di questi impianti possiede due canali circonferenziali in grado di promuovere l'attaccamento fisico ai tessuti molli della cavità orbitale e quindi la biointegrazione. Le valutazioni cliniche sono state effettuate 7, 30, 60, 120 e 180 giorni dopo l'operazione chirurgica. Entrambi gli impianti non hanno evidenziato infezioni significative o processi infiammatori. Solo un paziente del gruppo PMMA ha avuto esperienza dell'estrusione dell'impianto, problema legato presumibilmente alla tecnica operatoria. Le analisi tomografiche (figura 13) non hanno mostrato migrazione degli impianti di entrambi i materiali nel corso del periodo di osservazione e le analisi di laboratorio non hanno rilevato danni o alterazioni agli organi vitali associati ai prodotti di dissoluzione ionica rilasciati dal Biosilicate® 1P.

I team di Ye e Wang ha sviluppato una serie di vetri bioattivi mesoporosi contenenti rame, usati come rivestimento di scaffold in pHA (HA porosa), valutandone gli effetti antibatterici e proangiogenici [132,133].



Figura 5.32 Immagine degli scaffold analizzati [132].

La composizione chimica dei MBG realizzati è presente in tabella 5.7:

Sample	SiO <sub>2</sub>	$P_2O_5$	CaO	CuO	
0Cu-MBG	80	5	15	0	
2Cu-MBG	80	5	13	2	
5Cu-MBG	80	5	10	5	

Tabellla 5.7 Composizione dei Cu-MBG [132].

La valutazione del potenziale antibatterico è stata effettuata utilizzando il metodo Oxford cup contro lo *Staphylococcus aureus* e l'*Escherichia coli*. L'attività antimicrobica è stata valutata tramite la misurazione del diametro della zona di inibizione (DIZ) dei microorganismi. In figura 5.33 è possibile osservare i risultati delle analisi antimicrobiche: i Cu-MBG-pHA sono circondati da DIZ maggiori rispetto al solo pHA. Questo test ha quindi mostrato il potenziale effetto antibatterico dei MBG contenenti rame.


Figura 5.33 Risultati delle analisi antimicrobiche valutando il DIZ [132].

Sono stati sviluppati numerosi impianti orbitali da applicare in seguito a enucleazione o eviscerazione. La maggiore limitazione degli impianti attualmente utilizzati è la lenta vascolarizzazione, che può portare a complicanze quali estrusione o infezione. L'HA è stata ampliamente utilizzata per gli impianti orbitali, ed è proprio per questo motivo che Wang et al. [133] hanno scelto come substrato da utilizzare nel loro studio la pHA, in seguito rivestita dai vetri bioattivi mesoporosi affrontati nello studio precedente. La capacità di questi costrutti di velocizzare il processo di vascolarizzazione degli impianti è stata valutata impiantando gli scaffold in conigli: sono stati testati tre costrutti: pHA, MBG/Pha e Cu-MBG/pHA. L'intero processo e il risultato di questa analisi sono rappresentati in figura 5.34:



Figura 5.34 Schematizzazione del processo di modifica degli scaffold, impianto e analisi dei risultati ottenuti dai differenti costrutti [133].

In figura 5.34 è presente anche la quantificazione della densità dei vasi sanguigni all'interno dei costrutti: il gruppo Cu-MBG/pHA ha ottenuto i migliori risultati in termini di vascolarizzazione, specialmente al 14° e al 28° giorno dopo l'impianto. Questi risultati, assieme ai risultati indicanti il potere antibatterico del Cu-MBG/pHA, suggeriscono che questo materiale non solo può migliorare l'integrazione fibrovascolare con i tessuti, ma può anche dotare l'impianto di capacità antibatterica, riducendo quindi le complicanze associate agli impianti, come le infezioni.

## 5.5- Ingegneria tissutale cardiaca

Da un punto di vista medico, i disturbi legati al sistema cardiaco sono considerati potenzialmente letali a causa del loro elevato tasso di mortalità. Il tasso in questione sta continuando a salire nel corso degli anni per colpa dell'aumento del numero di fumatori e dell'utilizzo del tabacco, dell'inattività fisica e dell'obesità [113]. Fino ad ora sono stati proposti ed utilizzati diversi approcci per trattare questi casi, come ad esempio il trapianto d'organi. Ciò nonostante, sonun o presenti alcuni problemi legati al trapianto di cuore e polmoni, tra i quali infezioni e rigetto. A tal proposito, stanno emergendo terapie avanzate in grado di rimuovere o superare almeno in parte queste complicazioni. Le terapie basate sull'ingegneria tissutale sono state valutate una valida alternativa per il trattamento di disturbi correlati al cuore. Per sviluppare un eccellente sostituto tissutale, sono state considerate ed utilizzate diverse tipologie di cellule e diversi biomateriali. Per quanto riguarda le cellule, sono soprattutto le cellule staminali adulte quelle che hanno ricevuto maggiore attenzione [114]. In merito ai biomateriali, i polimeri vengono utilizzati più spesso rispetto ai materiali ceramici e metallici grazie alle loro caratteristiche strutturali, più simili a quelle dei tessuti molli del cuore rispetto a quelle dei due materiali rigidi. In qualsiasi caso, le matrici polimeriche devono essere rinforzate con altre sostanze per accelerare i processi di guarigione e rigenerazione (figura 5.35)

Come abbiamo ormai ben chiaro, una delle strategie più promettenti per velocizzare la ricostruzione di un tessuto è incrementare il trasporto di nutrienti e ossigeno, utilizzando materiali in grado di indurre il processo angiogenico e quindi lo sviluppo di nuovi vasi. Proprio riguardo a questo concetto, alcuni degli approcci più recenti includono l'utilizzo di vetri bioattivi, in grado di migliorare diversi processi chiave correlati alla rigenerazione dei tessuti, anche di quello polmonare e cardiaco [115].



Figura 5.35 Tecniche di ingegneria tissutale cardiaca che includono l'utilizzo di cellule e biomateriali [120].

L'infarto del miocardio (MI) è uno disturbo cardiovascolare causato dall'ostruzione delle arterie coronarie, risultato della necrosi irreversibile della muscolatura cardiaca. Purtroppo, è già stata dimostrata la mancanza di capacità rigenerative dei cardiomiociti umani infartuati [117]. È quindi necessario sviluppare un costrutto in grado di rigenerare il tessuto danneggiato. I vetri bioattivi sono recentemente entrati a far parte dei materiali utilizzati nell'ingegneria tissutale cardiaca, soprattutto nella forma di nanoparticelle combinate a matrici polimeriche.

Per valutare il potere angiogenico dei vetri bioattivi applicati all'ingegneria tissutale cardiaca, Barabadi e i suoi collaboratori [118] hanno fabbricato uno scaffold nanocomposito composto da un idrogelo contenente nanoparticelle di 45S5. Il team di ricerca ha motivato questa scelta affermando che uno dei problemi presenti nell'ingegneria del tessuto miocardico è la mancanza di vasi sanguigni funzionali, fatto che risulta in un basso tasso di sopravvivenza del tessuto ingegnerizzato. Hanno quindi sviluppato due scaffold differenti, uno composto da gelatina e collagene (Gel/Col) e uno da gelatina, collagene e vetro bioattivo (Gel/Col/BG) (figura 5.36).



**Figura 5.36** Immagini SEM di scaffold Gel/Col/BG (destra) e scaffold Gel/col (sinistra). In alto le microstrutture dei due scaffold, in basso si possono notare le cellule sugli scaffold [118].

Al fine di dimostrare l'efficacia dell'incorporazione di BG sull'angiogenesi, è stata valutata la capacità di differenziazione di cellule staminali embrionali indifferenziate (ESC) in cellule endoteliali coltivate in mezzi di coltura contenenti i due scaffold preparati. I risultati hanno indicato che l'espressione di VEGF è stata nettamente maggiore nelle cellule coltivate nel mezzo di coltura in cui era presente lo scaffold Gel/Col/BG rispetto al controllo. Questo risultato indica quindi che l'inclusione di BG nell'idrogelo promuove l'espressione di VEGF e di conseguenza migliora il processo angiogenico. Gli autori hanno quindi affermato che gli scaffold composti da idrogeli contenenti vetri bioattivi possono essere considerati costrutti validi per l'ingegneria tissutale cardiaca.

## 5.8-Loop arterovenoso

Un metodo alternativo per favorire la vascolarizzazione di campioni di tessuto ingegnerizzati è l'impianto di un loop arterovenoso (AVL), concetto descritto per la prima volta da Erol e Spira nel 1972.

Un team di ricercatori [122] ha sperimentato l'integrazione del 45S5 dopato con rame (45S5 Cu1% BG) nel modello AVL inserendo il BG nella camera di isolamento. I risultati sono stati confrontati con i risultati derivanti da un altro studio, in cui veniva inserito il 45S5 non dopato [123]. L'esperimento è stato condotto su 10 ratti maschi. I ratti in cui è stato inserito il 45S5 non dopato sono stati inseriti nel gruppo A, quelli in cui è stato utilizzato il 45S5 Cu1% BG nel gruppo B. Per la creazione del loop arterovenoso, i vasi femorali sinistri sono stati sezionati microchirurgicamente. Il loop è stato creato usando un graft venoso proveniente dalla vena femorale destra ed interponendolo tra l'arteria femorale sinistra e la vena. In seguito, l'AVL è stato incorporato in una camera in teflon riempita con una matrice contenente granuli di BG e fibrina in gel (figura 5.37).



**Figura 5.37** (A) AVL posizionato sopra la matrice contenente BG e fibrina (B) camera in teflon completamente riempita dalla matrice [122].

Tutti i costrutti impiantati sono stati espiantati dopo tre settimane per analizzarli e valutare il grado di vascolarizzazione. Tutti i campioni sono stati analizzati con micro-CT: le immagini hanno mostrato una fitta rete vascolare all'interno dei costrutti, aventi densità vascolare più alta nell'area di ingresso del loop all'interno della camera (figura 5.38).



Figura 5.38 Immagine micro-CT del gruppo B [122].

Tutti i campioni mostrano vasi che emergono dal loop arterovenoso formando un network vascolare. Le analisi statistiche non hanno mostrato differenze significative tra i valori medi di tutti i costrutti per quanto riguarda la lunghezza dei vasi accumulati di tutti i diametri (figura 5.39).



Figura 5.39 Valutazione della distribuzione della lunghezza dei vasi per il diametro dei vasi [122].

La differenza maggiore tra i due gruppi si è osservata considerando la lunghezza totale dei vasi all'interno dei costrutti: nel gruppo B (45S5 Cu1% BG) la lunghezza complessiva dei vasi è circa 3 volte superiore rispetto alla lunghezza dei vasi presenti nel gruppo A (45S5 BG) (figura 5.40).



Figura 5.40 Comparazione tra la lunghezza totale dei vasi media dei due gruppi analizzati [122].

Le analisi istologiche hanno rivelato tessuto connettivo all'interno dei costrutti dopo 3 settimane. Per rendere visibili i vasi è stata effettuata una perfusione con Microfil®. Nelle immagini istologiche (figura 5.41) i vasi appaiono di colore nero. Non sono stati rinvenuti segni di tossicità cellulare o di infiammazione nelle vicinanze dei granuli di BG contenente rame.



Figura 5.41 Immagine istologica del costrutto 45S5 Cu1% perfuso con Microfil® [122].

Tramite un codice scritto in Matlab, è stata effettuata anche una valutazione automatica della vascolarizzazione all'interno dei costrutti. Da questa analisi sono emerse alcune differenze tra i due gruppi testati:

- La densità vascolare del gruppo A (8.98±6.44 mm<sup>2</sup>) risulta minore rispetto al gruppo B (12.27±13.21 mm<sup>2</sup>);

-Nel gruppo A l'area media dei vasi è pari a 0.07±0.05 mm<sup>2</sup>, mentre nel gruppo B risulta pari a 0.16±0.20 mm<sup>2</sup>;

-Dimensione media dei vasi del gruppo A pari a 293.83 $\pm$ 87.54 µm<sup>2</sup> contro 700.00 $\pm$ 699.89 µm<sup>2</sup> del gruppo B.

I dati riportati dimostrano che l'utilizzo di BG nei loop arterovenosi è in grado di stimolare la formazione di nuovi vasi, anche se la differenza tra i due gruppi non è stata così evidente. Probabilmente non è stata utilizzata la concentrazione corretta di rame in questo studio, o magari i tempi di impianto non sono stati quelli ottimali, e serviranno studi ulteriori per dimostrare il potere angiogenico del rame anche in questa applicazione.

## Conclusioni

Dalla scoperta del primo vetro bioattivo sono stati effettuati numerosissimi studi per analizzare l'integrazione di questo materiale con i tessuti viventi, specialmente con il tessuto osseo.

Il primo biomateriale inorganico sintetico in grado di creare legami stabili con i tessuti circostanti è stato il 45S5 Bioglass®, composto da un sistema quaternario di ossidi (SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); modificando le quantità di questi quattro ossidi, o aggiungendone di nuovi, è stato possibile sviluppare diverse tipologie di vetri bioattivi in grado di migliorare le proprie caratteristiche, sia meccaniche che biologiche.

È stato mostrato nel corso di questo studio come la bioattività di questi vetri dipenda sia dalla composizione (quantità massime di certi ossidi, esempio: max 60mol% di SiO<sub>2</sub> nei vetri ottenuti per fusione) sia dalle proprietà tessiturali (vetri bioattivi con 90mol% di SiO<sub>2</sub> possono essere comunque bioattivi se ottenuti tramite processo sol-gel, in modo da ottenere una SSA maggiore di 100 m<sup>2</sup>/g).

Nel campo dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa, i vetri bioattivi sono stati usati prevalentemente per le applicazioni correlate all'ingegneria tissutale di tessuti duri dato che i BG soddisfano i tre requisiti per ottenere un'ottima rigenerazione ossea, ossia osteoconduzione osteoinduzione ed osteointegrazione. È stato dimostrato come come l'esplicarsi di questi tre processi, così come di quello angiogenico, dipenda prevalentemente dai prodotti di dissoluzione ionica rilasciati dai vetri bioattivi una volta entrati a contatto con i fluidi biologici;

Anche se le applicazioni tradizionali dei vetri bioattivi erano limitate alla sostituzione ossea, le moderne scoperte sul loro comportamento pro-angiogenico hanno aperto nuove frontiere nell'ingegneria biomedica e nella riparazione di tessuti molli, così come è stato mostrato nell'ultimo capitolo di questo lavoro. È stato evidenziato come l'aggiunta di alcuni ioni metallici, come ad esempio lo ione rame o cobalto, possano migliorare il processo angiogenico, attivando i fattori di crescita pro-angiogenici e promuovendo la crescita e la migrazione delle cellule endoteliali, ottimizzando quindi il processo di formazione ed integrazione del neo-tessuto con il tessuto preesistente.

Comunque, anche considerando queste evidenze sperimentali, non è possibile ignorare la barriera che esiste tra questi studi e la creazione di nuovi prodotti a base di vetri bioattivi da utilizzare in clinica: infatti le ricerche svolte e la produzione di costrutti basati su questi biomateriali non procedono di pari passo, a causa del tempo e dei fondi necessari per svolgere studi preclinici *in vivo* e *in vitro*.

Nonostante queste difficoltà, sono presenti almeno due esempi in cui questo passaggio è stato svolto con successo. Il primo riguarda lo sviluppo del vetro bioattivo borato in forma cotton-candy utilizzato per le guarigioni delle ferite, disponibile ora per le applicazioni di medicina veterinaria e in attesa di approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) per l'utilizzo sull'uomo. Il secondo esempio invece fa parte del campo della chirurgia oculare, in particolare riguarda l'utilizzo dell'impianto orbitale Medpor® Plus TM. In tabella 1 sono presenti le principali applicazioni cliniche dei vetri bioattivi.

Year (First Experimental Use)	Achievement/Application
1969	Invention of the 45S5 glass composition (45S5 Bioglass®)
1977	Treatment of ear diseases by using Ceravital® glass-ceramics (replacement of middle ear small bones)
1978	Ocular implant (biocompatibility with corneal tissue)
1985	Approval by Food and Drug Administration (FDA) of the first 45S5 Bioglass <sup>®</sup> implant (MEP <sup>®</sup> implant for middle ear ossicular repair)
1987	Treatment of liver cancer (radioactive glasses)
1988	Clinical use of the 45S5 Bioglass <sup>®</sup> -based Endosseous Ridge Maintenance Implant (ERMI) in human patients
1993	FDA approval of PerioGlas (45S5 Bioglass <sup>®</sup> particulate used for bone and dental repair)
1998	Peripheral nerve repair
1999	FDA approval of radioactive glasses (TheraSphere $^{\otimes}$ ) for cancer treatment
2000	Wound healing
2002	FDA approval of Medpor <sup>®</sup> -Plus <sup>TM</sup> (polyethylene/45S5 Bioglass <sup>®</sup> composite porous orbital implants).
2003	Antibacterial (Zn-containing) bone/dental cements
2004	Lung tissue engineering
2004	Use of mesoporous bioactive glass (MBG) as a drug delivery system
2005	Skeletal muscle and ligament repair
2005	Treatment of gastrointestinal ulcers
2010	Cardiac tissue engineering
2011	Commercialization of a cotton-candy borate bioactive glass for wound healing in veterinarian medicine. FDA approval is pending.
2012	Embolization of uterine fibroids
2012	Spinal cord repair
2018	Use of radioactive glasses (TheraSphere $\space{1}$ ) in patients with metastatic colorectal carcinoma of the liver

Tabella 1 Cronologia delle principali applicazioni dei vetri bioattivi [134].

Dalla teballa è possibile estrapolare un dato interessante: la maggior parte delle applicazioni sono nate a partire dagli ultimi vent'anni, dimostrazione del fatto che la ricerca in questo settore sta aumentando sempre più, come testimonia il grafico presente in figura 1, in cui viene rappresentato il numero di pubblicazioni riguardanti i vetri bioattivi relative agli ultimi trent'anni: si può notare come questo aumento stia seguendo una crescita lineare anno dopo anno.



Figura 1 Numero di paper riguardanti i vetri bioattivi nel corso degli anni.

Quindi, gli studi riguardanti i vetri bioattivi stanno aumentando costantemente nel corso degli anni e non c'è motivo per pensare che questo trend possa invertirsi in futuro: i vetri bioattivi continueranno a migliorare la qualità della vita di sempre più persone, e le loro applicazioni saranno presto estese a nuovi campi della medicina rigenerativa in cui l'angiogenesi, assieme ad altri processi biologici, avrà un ruolo fondamentale. Infatti, la ricerca sta provando a soddisfare sempre più richieste modificando e perfezionando la composizione dei diversi vetri bioattivi, cercando di ottenere risposte biologiche sempre migliori.

È stato dimostrato nel corso di questo lavoro l'importanza degli ioni metallici inseriti all'interno della struttura dei vetri bioattivi e le loro proprietà biologiche. In futuro sarà possibile ottenere risultati molto interessanti sfruttando l'effetto di più ioni all'interno della stessa struttura vetrosa (es:  $Sr^{2+} e Co^{2+} [127]$ ) o sfruttando il duplice effetto di un singolo ione (es:  $Cu^{2+}$  antibatterico e pro-angiogenico [132,133]).

## **Referenze** bibliografiche

[1]https://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen saturation (medicine)#/media/File:Blutkreislauf.png

[2]Werner R., Mechanisms of angiogenesis, NATURE, Vol 386,17 April 1997.

[3]Carmeliet P., Angiogenesis in life, disease and medicine, NATURE, Vol 438, 15 December 2005.

[4]Ferrara N. & Kerbel R., Angiogenesis as a therapeutic target, NATURE, Vol 438, 15 December 2005.

[5] Ramakrishna S, Meyer J, Wintermantel E, Leong KW. Biomedical applications of polymer-composite materials: A review. Comp Sci Tech 2001;61:1189–1224.

[6]Kim S-S, Ahn KM, Park MS, Lee J-H, Choi CY, Kim B-S. A poly(lactide coglycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity.JBiomedMaterRes2007;80:206–215.

[7] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res 1972;2:117–141.

[8] Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. Biomaterials 2006;27:2907–2915.

[9] Filho OP, Latorre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45 S5. J Biomed Mater Res 1996;30:509–514.

[10]Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. Ann NY Acad Sci 2002;961:96–105.

[11]J. R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, Acta Biomaterialia 23 (2015) S53–S82.

[12]Kucera T, Urban K, Ragkou S. Healing of cavitary bone defects. Eur J Orthop Surg Traumatol 2012;22:123-8.

[13]Stanley HR, Hall MB, Clark AE, King CJ, Hench LL, Berte JJ. Using 45S5 bioglass cones as endosseous ridge maintenance implants to prevent alveolar ridge

resorption:a5-yearevaluation.IntJOralMaxillofacImplants 1997;12:95-105.

[14]G. Kaur,G. Pickrell,N. Sriranganathan,V. Kumar,D. Homa,Review and the state of the art: Sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016 Aug;104(6):1248-75.

[15] Pietrokowsky P., Novel mechanical device for producing rapidly cooled metals and alloys of uniform thickness. Rev Sci Instr 1963;34:445.

[16]. Zarzycki I, Naudin F. A study of kinetics of the metastable phase separation in the PbO-B2O3, system by small-angle scattering of X-rays. Phys Chem Glasses 1967;8:11–18.

[17] Davis JT, Rideal EK, Interfacial Phenomena; Academic Press:New York, 1963.

[18] Cacciotti, I.; Lombardi, M.; Bianco, A.; Ravaglioli, A.; Montanaro, L. Sol-gel derived 45S5bioglass: synthesis,microstructural evolution and thermal behavior. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2012, 23, 1849–1866.

[19] Faure, J.; Drevet, R.; Lemelle, A.; Jaber, N.B.; Tara, A.; El Btaouri, H.; Benhayoune, H. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. Mater. Sci. Eng. C2015, 47, 407–

[20]Elisa Fiume, Carla Migneco1, Enrica Verné, Francesco Baino, Comparison between Bioactive Sol-Gel and Melt-Derived Glasses/Glass-Ceramics Based on the Multicomponent SiO2–P2O5–CaO–MgO–Na2O–K2O System, materials 2020,13,540

[21]Fiume, E.; Serino, G.; Bignardi, C.; Verné, E.; Baino, F. Bread-derived bioactive porous scaffolds: an innovative and sustainable approach to bone tissue engineering. Molecules 2019, 24, 2954

[22]Brunauer, S.; Emmet, P.H.; Teller, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. J. Am. Ceram. Soc.1938,60, 309–319.

[23] C. Wu and J. Chang, "Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application."Interface Focus 2012 Jun 6;2(3):292-306.

[24] C. J. Brinker, "Evaporation-induced self-assembly: Functional nanostructures made easy", MRS Bull., vol. 29, no. 9, pp. 631–640, 2004.

[25] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass, VR45S5 dissolution. J Biomed Mater Res Part A 2001;55:151–157.

[26]Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: A review of in vitro and in vivo evidences. Tissue Eng Part B 2009;16:199–207.

[27]Chen, Q.Z.; Thompson, I.D.; Boccaccini, A.R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006, 27, 2414–2425

[28]Oudadesse, H.; Dietrich, E.; Gal, Y.L.; Pellen, P.; Bureau, B.; Mostafa, A.A.; Cathelineau, G. Apatite forming ability and cytocompatibility of pure Zn-doped bioactive glasses. Biomed. Mater. 2011, 6, 035006

[29] Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of poly(glycolic acid) mesh and bioactive glass for soft tissue engineering scaffolds. Biomaterials 2004;25:5857–66.

[30]Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass.Biomaterials 2005;26:4171–9.

[31]Leu A, Stieger SM, Dayton P, Ferrara KW, Leach JK. Angiogenic response to bioactive glass promotes bone healing in an irradiated calvarial defect. Tissue Eng Part A 2008;15:877–85.

[32] Jung SB, Day DE, Brown RF. Angiogenic bioactive borate glasses, submitted for publication.

[33] Beattie JH, Avenell A. Trace element nutrition and bone metabolism. Nutr Res Rev 1992;5(01):167e88.

[34] 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 2005;26(23): 4847e55.

[35] Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gatius M, Bozec A, Wagner EF, et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. J Bone Miner Res 2009;24(11):1856e68.

[36] Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gatius M, Bozec A, Wagner EF, et al.Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. J Bone Miner Res 2009;24(11):1856e68.

[37]Christoph Stähli, Mark James-Bhasina, Alexander Hoppeb, Aldo R. Boccaccinib, Showan N. Nazhata,Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass on 3D endothelial cell morphogenesis,Acta Biomaterialia Volume 19, June 2015, Pages 15-22.

[38]Alexander Hoppe,Robert Meszaros,Christoph St<sup>\*</sup>hli,Stefan Romeis, Jochen Schmidt,Wolfgang Peukert,Benedetto Marelli,Showan N. Nazhat,Lothar Wondraczek,Jonathan Lao,Edouard Jallotfand Aldo R.

Boccaccini,In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass derived scaffolds for bone tissue engineering, Journal of material chemistry B, issue 41 2013.

[39]Q.Z. Chen, I.D. Thompson and A.R. Boccaccini, Biomaterials, 2006, 27, 2414–2425.

[40] A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, J. Biomed. Mater. Res. 39 (2) (1998) 331–340.

[41] A. Obata, Y. Takahashi, T. Miyajima, K. Ueda, T. Narushima, T. Kasuga, Effects of niobium ions released from calcium phosphate invert glasses containing Nb2O5 on osteoblast-Like cell functions, ACS Appl. Mater. Interfaces 4 (10) (2012) 5684–5690.

[42]V. Miguez-Pachecoa, D. de Lignyb, J. Schmidtc, R. Detscha, A.R. Boccaccini, Development and characterization of niobium-releasing silicate bioactive glasses for tissue engineering applications, Journal of the European Ceramic Society 38 (2018) 871–876

[43]Brink, M. et al. (1997) Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system Na2O-K2O-MgO-CaO-B2O3-P2O5-SiO2. J. Biomed. Mater. Res. A 37, 114–121

[44]Park, M. et al. (2004) NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na+-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. Mol. Cell 16, 331–341

[45]Sisi Chen,Qingbo Yanga,Richard K. Browb,Kun Liua,Katherine A. Browa,Yinfa Ma,Honglan Shia,In vitro stimulation of vascular endothelial growth factor by borate-based glass fibers under dynamic flow conditions, Materials Science and Engineering C 73 (2017) 447–455.

[46]Zhang X, Zeng D, Li N, et al. Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration.Sci Rep. 2016;6:19361.

[47]Chengtie Wu,Yinghong Zhoub, Mengchi Xua, Pingping Hanb, Lei Chena, Jiang Changa, Yin Xiaob,Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity,Biomaterials 34 (2013) 422e433

[48]Chengtie Wu, Yinghong Zhoub, Wei Fanb, Pingping Hanb, Jiang Changa, Jones Yuenb, Meili Zhanga, Yin Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering, Biomaterials 33 (2012) 2076e2085

[49]Lianxiang Bi, Mohamed N. Rahaman, Delbert E. Day, Zackary Brown, Christopher Samujh,Xin Liu Ali Mohammadkhah, Vladimir Dusevich, J. David Eick, Lynda F. Bonewald, Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model, Acta Biomaterialia 9 (2013) 8015–8026

[50]Saeid Kargozar, Francesco Baino, Sepideh Hamzehlou, Robert G. Hill, and Masoud Mozafari, Bioactive Glasses: Sprouting Angiogenesis in Tissue Engineering, Trends in Biotechnology, April 2018, Vol. 36, No. 4

[51]Lutz-Christian Gerhardt, Kate L. Widdows, Melek M. Erol, Charles W. Burch, José A. Sanz-Herrera, Ignacio Ochoa, Rolf Stämpfli, Iman S. Roqan, Simon Gabe,

Tahera Ansari, Aldo R. Boccaccini, The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds, Biomaterials 32 (2011) 4096e4108

[52]Brunner TJ, Grass RN, Stark WJ. Glass and bioglass nanopowders by flame synthesis. Chem Commun 2006:1384e6.

[53]Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260:920-6.

[54]Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. Pharmaceut Res 2000;17:497–504.

[55]Cooper ML, Hansbrough JF. Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen–GAG matrix to cover full-thickness on athymic mice. Surgery 1991;109:198–207.

[56]Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissueengineered bone. N Eng J Med 2001;344:1511–4.

[57]Valonen PK, Moutos FT, Kusanagi A, Moretti MG, Diekman BO, Welter JF, et al.In vitro generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult humanstemcellsand3-D-wovenpoly(e-caprolactone)scaffolds.Biomaterials 2010;31:2193–200.

[58]Rahaman MN, Mao JJ. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. Biotechnol Bioeng 2005;91:261–84.

[59]Mohamed N. Rahaman, Delbert E. Day, B. Sonny Bal, Qiang Fu, Steven B. Jung ,Lynda F. Bonewald, Antoni P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, Acta Biomaterialia 7 (2011) 2355–2373

[60]Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. Clin Orthop Relat Res 1996;324:55–65.

[61]Chen ZQ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials 2006;27:2414–25.

[62]Fu Q, Rahaman MN, Bal BS, Brown RF, Day DE. Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique. Acta Biomater 2008;4:1854–64.

[63]ukasawa T, Ando M, Ohji T, Kanzaki S. Synthesis of porous ceramics with complexporestructurebyfreezedryprocessing.JAmCeramSoc 2001;84:230–2.

[64]Deville S, Saiz E, Tomsia A. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006;27:5480–9.

[65]Fu Q, Rahaman MN, Bal BS, Brown RF. Preparation and in vitro evaluation of bioactive glass (13-93) scaffolds with oriented microstructures for repair and regenerationofload-bearingbones.JBiomedMaterRes2010;93A:1380–90.

[66]RussiasJ,SaizE,DevilleS,TomsiaAP.Fabricationandin-vitro characterization of three-dimensional composite scaffolds by robocasting for biomedical applications. Adv Sci Technol 2006;49:153–8.

[67]Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. J Biomed Mater Res 2002;59:340-8.

[68]Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. J Biomed Mater Res 2002;60:613–21.

[69] Kim H-W, Kim H-E, Knowles JC. Production and potential of bioactive glass nanofibersasanext-generationbiomaterial.AdvFuncMater 2006;16:1529–35.

[70] Fung YC. Biomechanics: mechanical properties of living tissues. New York: Springer; 1993.

[71] Brown RF, Rahaman MN, Dwilewicz AB, Huang W, Day DE, Li Y, et al. Conversion of borate glass to hydroxyapatite and its effect on proliferation of MC3T3-E1 cells. J Biomed Mater Res 2009;88A:392–400.

[72]Fu Q, Rahaman MN, Bal BS, Bonewald LF, Kuroki K, Brown RF. Bioactive glass scaffolds with controllable degradation rates for bone tissue engineering applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation. J Biomed Mater Res 2010;95A:172–9.

[73] Bi L, Jung SB, Day DE, Neidig K, Dusevich V, Eick D, et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds, Journal of Biomedical Materials Research Part A, Vol 100A, 12, December 2012.

[74]Fu Q, Rahaman MN, Bal BS, Kuroki K, Brown RF. In vivo evaluation of 13-93 bioactive glass scaffolds with trabecular and oriented microstructures in a rat subcutaneous implantation model. J Biomed Mater Res 2010;95A:235–44.

[75]Jung SB, Day DE, Brown RF, Bonewald LF. Potential toxicity of bioactive borate glasses in vitro and in vivo, Acta Biomater.2011 Jun;7(6):2355-73.

[76]Zhang X, Jia W, Gu Y, Liu X, Wang D, Zhang C, et al. Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model. Biomaterials 2010;31:5865–74.

[77]Fu Q, Huang W, Jia W, Rahaman MN, Liu X, Tomsia AP. Osteoconduction and osteointegration by bioactive borate glass in a rabbit tibia model: a synchrotron X-ray micro computerized tomography (SR microCT) study. Tissue Eng Part A,

[78]Napoleone Ferrara, Robert S. Kerbe, Angiogenesis as a therapeutic target, NATURE, Vol 438, 15 December 2005.

[79]B .D Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, G. E. Lemmons, "Biomaterials science, an introduction to materials in medicine (third edition)", Elsevier inc., 2013

[80]Surface Science 500 (2002) 656-677.

[81]L.Hench, Bioceramics, from concept to clinic, J.Am.Ceram.Soc., 74(7)1487-510 (1991).

[82]Julian R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, Acta Biomaterialia 23 (2015) S53–S82.

[83]Gurbinder Kaur, Om P. Pandey, Kulvir Singh, Dan Homa, Brian Scott, Gary Pickrell, A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation, JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A, JAN 2014 VOL 102A, ISSUE 1.

[84]Chen QZ, Rezwan K, Armitage D, Nazhat SN, Boccaccini AR, The surface functionalization of 45S5 Bioglass(R)-basedglass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. J Mater Sci-Mater Med 2006;17:979–987.

[85]Pietrokowsky P. Novel mechanical device for producing rapidly cooled metals and alloys of uniform thickness. Rev Sci Instr 1963;34:445.

[86]Zarzycki I, Naudin F. A study of kinetics of the metastable phase separation in the PbO-B2O3, system by small-angle scattering of X-rays. Phys Chem Glasses 1967;8:11–18.

[87]Hoppe, A.; Güldal, N.S.; Boccaccini, A.R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. Biomaterials 2011, 32, 2757–2774.

[88]Fu Q, Rahaman MN, Fu H, Liu X. Bioactive glass scaffolds with controllable degradation rates for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation. J Biomed Mater Res 2010;95A:164–71.

[89]Fu Q, Rahaman MN, Bal BS, Bonewald LF, Kuroki K, Brown RF. Bioactive glass scaffolds with controllable degradation rates for bone tissue engineering

applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation. J Biomed Mater Res 2010;95A:172-9.

[90]Butler CE, Orgill DP. Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane. Adv Biochem Eng Biotechnol 2005;94:23e41.

[91]Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. Burns 2001;27:534e44.

[92]Meyer F, Wardale J, Best S, Cameron R, Rushton N, Brooks R. Effects of lactic acid and glycolic acid on human osteoblasts: a way to understand PLGA involvement in PLGA/calcium phosphate composite failure. J Orthop Res 2012;30:864e71.

[93]Jo JH, Lee EJ, Shin DS, Kim HE, Kim HW, Koh YH, et al. In vitro/in vivobiocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(epsilon-caprolactone) composite materials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;91:213e20.

[94]S. Naseri, W.C. Lepry, S.N. Nazhat, J. Mater. Chem. B 5 (2017) 6167-6174.

[95]Saeid Kargozar, Sepideh Hamzehloub, Francesco Baino, Can bioactive glasses be useful to accelerate the healing of epithelial tissues?, Materials Science & Engineering C 97 (2019) 1009–1020

[96]S. Jung, D. Day, T. Day, W. Stoecker, P. Taylor, Wound Repair Regen. 19 (2011) A30.

[97]Y. Lin, R.F. Brown, S.B. Jung, D.E. Day, J. Biomed. Mater. Res. A 102 (2014) 4491-4499.

[98]Y. Hong, X. Chen, X. Jing, H. Fan, B. Guo, Z. Gu, X. Zhang, Adv. Mater. 22 (2010) 754-758.

[99]H. Li, J. He, H. Yu, C.R. Green, J. Chang, Biomaterials 84 (2016) 64-75.

[100]J. Chen, X. Chen, X. Yang, C. Han, C. Gao, Z. Gou, Carbohydr. Polym. 92 (2013) 612-620.

[101]I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D. Buttery, L.L. Hench, and J.M. Polak, "Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis," Biochem. Biophys. Res. Commun., 276 [2] 461–65 (2000).

[102]V. Miguez-Pacheco, U.of Erlangen-Nuremberg

[103]Long Gao, Yanling Zhou, Jinliang Peng, Chen Xu, Qing Xu, Min Xingand Jiang Chang, A novel dualadhesive and bioactive hydrogel activated by bioglass for wound healing, Gao et al. NPG Asia Materials 2019) 11:66

[104]Danz W Sr. Ancient and contemporary history of artificial eyes. Adv Ophthal Plast Reconstr Surg. 1990;8:1–10.

[105]Karesh JW. Biomaterials in ophthalmic plastic and reconstructive surgery. Curr Opin Ophthalmol. 1998;9:66–74.

[106]Xu X, Wang C, Huang T, Ding L, Huang Z, Zhang X. An experimental study of bioactive glass ceramics as orbital implants. Bull Hunan Med Univ.1997;22:25–8.

[107]Xu X, Huang Z, Wang C. Clinical study of bioactive glass ceramics as orbital implants. Bull Hunan Med Univ. 1997;22:440–2.

[108]Choi HY, Lee JE, Park HJ, Oum BS. Effect of synthetic bone glass particulate on the fibrovascularization of porous polyethylene orbital implants. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 2006;22:121–5.

[109]Naik MN, Murthy RK, Honavar SG. Comparison of vascularization of Medpor and Medpor-plus orbital implants: a prospective, randomized study. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 2007;6:463–7.

[110]Cong Mao, Xiaofeng Chen, Guohou Miao and Cai Lin, Angiogenesis stimulated by novel nanoscale bioactive glasses, Biomed. Mater. 10 (2015) 025005

[111]Lunguo Xia,Wudi Ma,Yuning Zhou,Zhipeng Gui,Aihua Yao,Deping Wang,Akimichi Takemura,Mamoru Uemura,Kailin Lin and Yuanjin Xu, Stimulatory Effects of Boron Containing Bioactive Glass on Osteogenesis and Angiogenesis of Polycaprolactone: In Vitro Study, BioMed Research International Volume 2019, Article ID 8961409, 12 pages.

[112]Zhengwei Deng, Bocai Lin, Zenghui Jiang, Wenhai Huang, Jiusheng Li, Xiangqiong Zeng, Hui Wang, Deping Wang, Yadong Zhang, Hypoxia-Mimicking Cobalt-Doped Borosilicate Bioactive Glass Scaffolds with Enhanced Angiogenic and Osteogenic Capacity for Bone Regeneration, Int. J. Biol. Sci. 2019, Vol. 15

[113]Members, W.G.; Go, A.S.; Mozaffarian, D.; Roger, V.L.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Blaha, M.J.; Dai, S.;Ford, E.S.; Fox, C.S.; et al. Heart disease and stroke statistics—2014 update: A report from the American Heart Association. Circulation 2014, 129, e28–e292.

[114]Garbern, J.C.; Lee, R.T. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. Cell Stem Cell2013,12, 689–698.

[115]Miguez-Pacheco, V.; Hench, L.L.; Boccaccini, A.R. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. Acta Biomater. 2015, 13, 1–15.

[116]Saeid Kargozar, Sepideh Hamzehlouc and Francesco Baino, Potential of Bioactive Glasses for Cardiac and Pulmonary Tissue Engineering, Materials 2017, 10, 1429;

[117]Kikuchi, K.; Poss, K.D. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.2012, 28,719–741.

[118]Barabadi, Z.; Azami, M.; Sharifi, E.; Karimi, R.; Lotfibakhshaiesh, N.; Roozafzoon, R.; Joghataei, M.T.; Ai, J. Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering. Mater. Sci. Eng. C 2016, 69, 1137–1146.

[119]Cohrs, N.H.; Schulz-Schönhagen, K.; Jenny, F.; Mohn, D.; Stark, W.J. Bioactive glass containing silicone composites for left ventricular assist device drivelines: Role of bioglass 45s5®particle size on mechanical properties and cytocompatibility. J. Mater. Sci. 2017, 52, 9023–9038.

[120]Hinderer, S.; Brauchle, E.; Schenke-Layland, K. Generation and assessment of functional biomaterial scaffolds for applications in cardiovascular tissue engineering and regenerative medicine. Adv. Healthc. Mater.2015, 4,2326–2341.

[121] Erol, O.O. and Spira, M., New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. Surg Forum, 1979. 30:530–531.

[122]Gregor Bührer, Ulrike Rottensteiner, Alexander Hoppe, Rainer Detsch, Diana Dafinova, Tobias Fey, Peter Greil, Christian Weis, Justus P. Beier, Aldo R. Boccacini, Raymund E. Horch and Andreas Arkudas, Evaluation of in vivo angiogenetic effects of copper doped bioactive glass scaffolds in the AV loop model, Biomed. Glasses 2016; 2:111–117

[123] Arkudas, A., Balzer, A., Buehrer, G., Arnold, I., Hoppe, A., Detsch, R., et al., Evaluation of angiogenesis of bioactive glass in the arteriovenous loop model. Tissue Eng Part C Methods, 2013. 19(6): 479–486.

[124]Rainer Detsch,Patricia Stoor,Alina Grenewald,Judith A. Roether,Nina C. Lindfors,Aldo R. Boccaccini,Increase in VEGF secretion from human fibroblast cells by bioactive glass S53P4 to stimulate angiogenesis in bone,JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A|NOV 2014 VOL 102A, ISSUE 11.

[125]D'Andrea LD, Romanelli A, Di Stasi R & Pedone C,Bioinorganic aspects of angiogenesis. Dalton Trans 39, 7625–7636 (2010).

[126]Grasso G, Santoro AM, Magri A, La Mendola D, Tomasello MF, Zimbone S & Rizzarelli E, The inorganic perspective of VEGF: interactions of Cu (2+) with peptides encompassing a recognition domain of the VEGF receptor. J Inorg Biochem 159,149–158 (2016).

[127]Saeid Kargozar,Nasrin Lotfibakhshaiesh,Jafar Ai, Masoud Mozafari,Peiman Brouki Milan,Sepideh Hamzehlou,Mahmood Barati,Francesco Baino,Robert G. Hill,Mohammad Taghi Joghataei, Strontium- and cobaltsubstituted bioactive glasses seeded with human umbilical cord perivascular cells to promote bone regeneration via enhanced osteogenic and angiogenic activities, Acta Biomaterialia 58 (2017) 502–514.

[128] Neel EA, Ahmed I, Pratten J, Nazhat SN, Knowles JC. Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres.Biomaterials 2005;26(15):2247e54.

[129]Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. Appl Environ Microbiol 2011;77(5):1541e7.

[130]S. O'Donnell, A. Cranney, G.A. Wells, J. Adachi, J.Y. Reginster, Strontium Ranelate for Preventing and Treating Postmenopausal Osteoporosis, The Cochrane Library, 2006.

[131]S. Zhao, J. Zhang, M. Zhu, Y. Zhang, Z. Liu, C. Tao, Y. Zhu, C. Zhang, Three-dimensional printed strontiumcontaining mesoporous bioactive glass

scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects, Acta Biomater. 12 (2015) 270-280.

[132]Juan Ye,Jinjing He,Changjun Wang,Ke Yao,Zhongru Gou, Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity, Biotechnol Lett (2014) 36:961–968.

[133]C.Wang, K.Jin, J.Wang, X.Yang, C.Yao, X.Dai, C.Gao, Z.Gou, J.Ye, Synergistic effect of copper-containing mesoporous bioactive glass coating on stimulating vascularization of porous hydroxyapatite orbital implants in rabbit, Journal of Biomedical Nanotechnology, Vol.14,688-697, 2018.

[134]Francesco Baino,Sepideh Hamzehlou and Saeid Kargozar, Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?, J. Funct. Biomater. 2018, 9, 25