

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi e caratterizzazione di cementi ossei compositi caricati con un vetro bioattivo contenente rame



Relatore

firma del relatore (dei relatori)

Prof. Enrica Verné

.....

Candidato

firma del candidato

Carola Sabatini

Marzo 2018

“Soltanto una cosa rende impossibile un sogno: la paura di fallire.”

P. Coelho

Sommario

1. Introduzione	1
2. Vetri e Biovetri.....	5
2.1 Biomateriali	5
2.2 Vetri	10
2.2.1 Proprietà meccaniche.....	12
2.2.2 Proprietà fisiche	14
2.3 I vetri bioattivi	18
2.3.1 Breve storia del Bioglass®	18
2.3.2 Meccanismo di bioattività di Larry Hench.....	21
2.4 Proprietà antibatteriche dei Vetri Bioattivi (BAGs) e drogaggio con elementi metallici	22
2.4.1 MITA (Metallic Ions as Therapeutic Agents)	25
2.4.2 Rame.....	29
3. Infezioni	37
3.1 Infezioni nel tessuto osseo	37
3.1.1 Biofilm	40
3.1.2 Staphylococcus aureus	42
3.1.3 Resistenza dei batteri agli antibiotici	44
3.2 Rame.....	45
3.2.1 Rame antimicrobico e applicazione in biovetri	45
3.2.2 Rame e proprietà angiogeniche	49
4. Cementi ossei	50
4.1 Polimetilmetacrilato (PMMA)	50
4.1.1 Proprietà fisiche del PMMA.....	51
4.1.2 Proprietà meccaniche del PMMA.....	52
4.1.3 Fasi della presa	53
4.1.4 Biocompatibilità	54
4.2 Cementi antibiotati	56
4.3 Cementi bioattivi	60
4.4 Cementi antibatterici.....	62
4.5 Cementi bioattivi e antibatterici.....	63
4.6 CEMEX®	66
5. Materiali e metodi.....	68
5.1 Preparazione del vetro SBA3 0.05M-Cu trattato con acido tannico	68

5.1.1 Sintesi delle polveri di vetro SBA3.....	68
5.1.2 Drogaggio con rame mediante scambio ionico.....	70
5.1.3 Trattamento per la riduzione degli ioni Cu ²⁺	72
5.2 Preparazione del cemento osseo composito	73
5.3 Caratterizzazioni	76
5.3.1 Microscopia Elettronica a Scansione ad emissione di campo e Spettroscopia a Dispersione di Energia (FESEM-EDS)	76
5.3.2 Prove di bioattività <i>in vitro</i>	77
5.3.3 Prove di antibattericità <i>in vitro</i>	79
5.3.4 Prove meccaniche di compressione	82
6. Risultati e discussione	84
6.1 Analisi morfologica e composizionale (FESEM-EDS)	84
6.1.1 Caratterizzazione delle polveri di vetro.....	84
6.1.2 Caratterizzazione dei cementi ossei.....	89
6.2 Valutazione della bioattività in vitro	92
6.2.1 Andamento del pH	93
6.2.2 Analisi morfologica-composizionale <i>FESEM-EDS</i>	93
6.3 Test di antibattericità	97
6.4 Test di compressione.....	101
7. Conclusioni	104
Riferimenti.....	106

1. Introduzione

L'uso di differenti tipi di materiali in campo medico risale all'era pre-Cristiana, nel campo della sostituzione di ossa e della riparazione di parti danneggiate del corpo. In quell'epoca la riduzione di ossa fratturate veniva effettuata con bronzo e rame.

Più di 2000 anni fa, Romani, Cinesi, Aztechi ed Egiziani utilizzavano l'oro in campo dentistico e nella chirurgia del cranio. Spesso venivano utilizzati più materiali per eseguire una cranio plastica, come oro, argento, gusci di noci di cocco o di zucca.

Una vera e propria scienza medica nella quale altri materiali, oltre il bronzo e il rame, venissero considerati come possibili sostitutivi ossei non si sviluppò però fino alla metà del XIX secolo, a partire dall'era industriale, in cui si verificò un aumento dei ritmi di vita e degli incidenti sul lavoro. Per molto tempo si trattò solo di protesi esterne ma ben presto vennero messe in atto metodiche per l'alleviamento dei disagi causati da malformazioni ortopediche, ricostruendo difetti o parti mancanti.

Nel 1880 il materiale utilizzato come sostitutivo osseo era l'*avorio*, supportato da cemento osseo a base di pece greca, la colofonia. Nel 1884 venne progettata la prima protesi d'anca a base di materiali metallici e nel 1893 il chirurgo francese Jules-Émile Péan impiantò la prima artroprotesi.

A partire dal 1915 vengono effettuati i primi studi per la preparazione di substrati realizzati in *materiali vetrosi* mediante la tecnica di fusione nota come flame-spray ma con scarso successo per la difficoltà a trovare tecniche di spruzzatura adatte ai vetri fusi.

Dal 1971, per migliorare l'accoppiamento tra impianto protesico ed osso, inizia la tecnologia di produzione dei *biovetri* del sistema Hench e Brömer. Le composizioni studiate vengono attualmente adottate e modificate per realizzare rivestimenti su protesi metalliche, per piccoli sostitutivi ossei o come fasi disperse in matrici polimeriche, per indurre o stimolare un ancoraggio al tessuto osseo non solo meccanico ma chimico.

Una delle maggiori complicità in seguito a impianto di una protesi risiede nelle infezioni batteriche che possono svilupparsi nel decorso post-operatorio. Il trattamento di risoluzione delle infezioni post-impianto è molto lungo e consiste nell'espanto dell'apparato protesico e nel successivo re-impianto, associato a terapia antibiotica e trattamento riabilitativo prolungato, con risultati poco soddisfacenti ed elevati costi per il sistema sanitario. Inoltre, le infezioni che si sviluppano risultano spesso essere farmaco-resistenti, risulta quindi di particolare interesse ridurre la carica batterica adottando materiali dalle proprietà antibatteriche senza l'utilizzo di antibiotici.

Da numerosi studi condotti negli ultimi anni il rame è risultato avere ottime proprietà antibatteriche; proprio per questo motivo il rame è stato il primo materiale solido ad essere

stato dichiarato antibatterico dall'EPA nel Marzo del 2008, riconoscimento dato in precedenza a gas, liquidi o polveri usati come disinfettanti.

In questo lavoro di tesi si è messo a punto un cemento osseo a base di polimetilmetacrilato innovativo, contenente un vetro a base silice con proprietà bioattive e antibatteriche. Il vetro è stato drogato con ioni rameici Cu^{2+} mediante la tecnica dello scambio ionico in soluzione acquosa di acetato di rame. Poiché da studi precedenti gli ioni rameosi Cu^+ e gli ioni metallici Cu^0 hanno mostrato migliori proprietà antibatteriche è stata effettuata una riduzione chimica con acido tannico degli ioni Cu^{2+} a Cu^+ e Cu^0 .

Nel primo capitolo viene fornito uno sguardo generale sulle principali proprietà dei vetri e una definizione del concetto di bioattività e biocompatibilità. Si passa poi ad una descrizione più dettagliata dei sistemi vetrosi a cui si ispira il vetro oggetto di questo lavoro di tesi, in particolar modo sulle sue proprietà e sul sistema di bioattività che lo caratterizza. Si conclude con la descrizione degli ioni metallici che vengono adottati per incrementare alcune delle proprietà che devono presentare i biovetri focalizzandosi sullo ione utilizzato in questo lavoro di tesi, il rame.

Il secondo capitolo fornisce una panoramica sulle infezioni post operatorie sulla base della classificazione di Widmer e sei principali fattori di rischio. Segue una descrizione di uno dei principali ceppi batterici responsabili delle infezioni in giunti protesici, lo *Staphylococcus aureus*. Vengono poi esposte le due principali proprietà del rame: antibatteriche e angiogeniche.

Nel terzo capitolo viene data una descrizione di uno dei principali cementi ossei utilizzati in campo ortopedico, il polimetilmetacrilato (PMMA) e, successivamente, vengono introdotti i cementi antibiotati e antibatterici adottati e studiati in letteratura per prevenire le infezioni protesiche. Il capitolo si conclude con l'esposizione del cemento osseo adottato in questo lavoro di tesi, il CEMEX RX[®].

All'interno del quarto capitolo vengono esposte le varie fasi di preparazione del composito oggetto di questo lavoro di tesi, il CEMEX RX caricato con polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rameici Cu^{2+} ridotti chimicamente con acido tannico a ioni rameosi Cu^+ e ioni metallici Cu^0 ; vengono inoltre descritte le tecniche di caratterizzazione adottate per valutare la morfologia e la composizione del composito ottenuto, e proprietà meccaniche, la bioattività *in vitro* e l'antibattericità del campione. I test relativi all'antibattericità del campione di composito sono stati condotti al Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche di Torino e presso il laboratorio di analisi chimiche, cliniche e microbiologiche del CTO di Torino (alone di inibizione) con la collaborazione della Dott.ssa Valeria Allizond e della Dott.ssa Giuliana Banche.

Nel quinto capitolo vengono illustrati e commentati i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi in seguito alle caratterizzazioni eseguite sui campioni.

Le prove eseguite hanno permesso di mettere a confronto i diversi campioni preparati e, in particolar modo, hanno permesso uno studio della bioattività e della antibattericità *in vitro* del composito di cemento osseo caricato con polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rameici Cu^{2+} ridotti con acido tannico. Inoltre è stato possibile effettuare un confronto tra il campione di

composito e il cemento osseo tal quale sul comportamento meccanico a compressione, e un confronto sulle proprietà bioattive e sull'antibattericità tra il composito oggetto di questo lavoro di tesi e il composito a base di cemento osseo e polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rameici Cu^{2+} .

2. Vetri e Biovetri

In questo capitolo viene introdotto il concetto di vetro e le sue principali proprietà meccaniche e fisiche. Successivamente vengono fornite una prima definizione di biovetro, il concetto di biomateriale e la sua interazione con i tessuti biologici ponendo particolare attenzione al concetto di bioattività e biocompatibilità, all'analisi della risposta del materiale e dell'organismo e all'interfaccia tra i due. Si passa poi alla descrizione più in particolare del sistema di vetri adottato in questo lavoro di tesi, ovvero quello introdotto dal Larry L. Hench e dai suoi collaboratori nel 1971, il Bioglass[®], delle sue principali caratteristiche e del meccanismo di bioattività che lo contraddistingue. In seguito vengono introdotte le proprietà antibatteriche che possono essere conferite ai vetri bioattivi (BAGs). Il capitolo si conclude con la descrizione degli ioni inorganici adottati per incrementare alcune delle proprietà fondamentali che deve presentare un biovetro e con una descrizione dello ione metallico utilizzato in questo lavoro, il rame.

2.1 Biomateriali

La definizione di “Biomateriale” è stata modificata più volte nel tempo in modo tale da accentuarne il concetto di integrazione con i tessuti biologici, la proprietà principale di questo tipo di materiale[1]:

- 1982: “ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce qualunque tessuto, organo o funzione del corpo”.
- 1986: “un biomateriale è una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente”.

Nel corso degli anni i biomateriali hanno subito una evoluzione esplicitabile introducendo le tre generazioni esistenti[1]:

- Prima generazione (1950-1975): biomateriali *inerti*, ovvero non tossici che, inseriti all'interno dell'organismo, non danno risposta infiammatoria;
- Seconda generazione (1975-2000): materiali *bioattivi*, ovvero inerti e in grado di formare un legame interfacciale tra tessuto e impianto;
- Terza generazione (2000-oggi): materiali *biomimetici*, ovvero materiali bioattivi in grado di stimolare risposte di cellule specifiche a livello molecolare e di inviare uno scambio di segnali con l'organismo.

La caratteristica generale che deve avere un biomateriale è la *biocompatibilità*, che viene definita come “la capacità di un materiale di esplicare la propria funzione con una appropriata

risposta del sistema vivente che lo ospita”[1]; i materiali biocompatibili, a seconda del tipo di risposta dell’organismo, possono essere classificati in 4 categorie:

- Inerti: nessuna reazione e possono formarsi tessuti fibrosi;
- Bioattivi: legame tra impianto e tessuto;
- Biorisorbibili: dissoluzione e sostituzione con tessuto sano;
- Biomimetici: scambio di segnali con l’organismo.

Quando un materiale viene inserito all’interno dell’organismo si genera una risposta biologica, dovuta all’interazione microscopica tra la superficie del solido e le cellule viventi (sangue, proteine, fluidi biologici). Da questa interazione si generano una serie di processi che sono schematizzati in Figura 2.1.

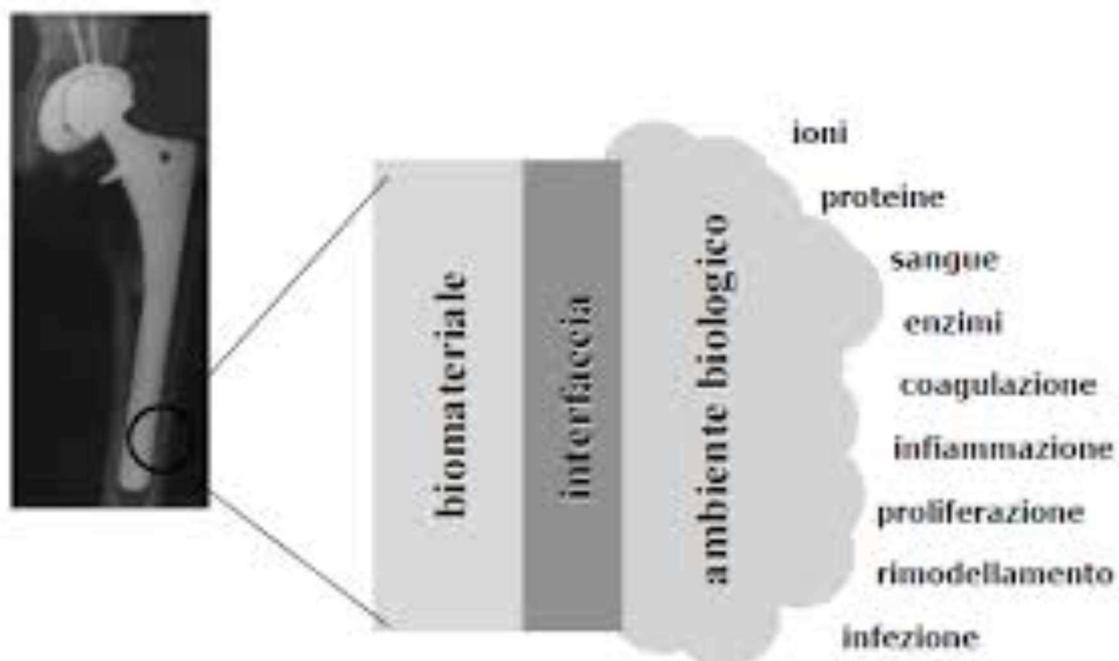


Figura 2.1 Interfaccia tra biomateriale e ambiente biologico.

La risposta biologica si esplica in *risposta del materiale* e *risposta dell’organismo*.

Per quanto riguarda la *risposta del materiale*, dipende se il materiale in questione è inerte e quindi biocompatibile, o reattivo e quindi potenzialmente tossico, bioattivo o biorisorbibile. La risposta del materiale ha quindi un’influenza critica rispetto alla risposta biologica in quanto, qualora un materiale fosse tossico, al contatto con i tessuti viventi porterebbe al rilascio di sostanze chimiche nocive dannose per i tessuti. I fattori che influenzano la reattività di una superficie di un materiale sono:

- Origine del materiale;
- Presenza di contaminanti;
- Grado di frammentazione del solido;
- Cristallinità e piani cristallini esposti;

- Composizione e topologia superficiale;
- Grado di irregolarità superficiale;
- Idrofilicità e idrofobicità.

Le modifiche dell'interfaccia di contatto tra materiale e ambiente biologico possono essere:

- Ossidazioni e riduzioni;
- Idrolisi (assorbimento di acqua o ioni idrati);
- Diffusione di ioni dai fluidi biologici alla superficie del materiale;
- Rilascio di ioni metallici;
- Rilascio di monomeri;
- Rilascio di radicali liberi;
- Degradazione del materiale;
- Riarrangiamento dei gruppi superficiali;
- Reazioni a forze meccaniche.

Per quanto riguarda invece la *risposta dell'organismo* a contatto con la superficie del materiale è importante il ruolo svolto dalle *cellule* che possono originare situazioni differenti:

- Membranolisi ed emolisi: alterazione della permeabilità delle membrane cellulari con conseguenti squilibri dei gradienti di concentrazione nei mezzi extracellulari e intracellulari;
- Citotossicità: interferenza nelle normali funzioni della cellula e conseguente alterazione del metabolismo;
- Necrosi (morte cellulare): infiammazioni, variazioni morfologiche e danni cellulari irreversibili;
- Proliferazione cellulare: le interazioni tra le cellule e i solidi sono differenti se le cellule sono in divisione;
- Rilascio di mediatori;
- Mutagenicità, carcinogenicità.

Data l'elevata ostilità dei mezzi biologici alla maggior parte dei materiali e l'elevata capacità del corpo di difendersi dai corpi estranei, quasi tutti i materiali, eccetto quelli estremamente inerti, subiscono una significativa e rapida degradazione.

La risposta locale del tessuto prevede due fasi: *infiammazione* con variazioni locali della vascolarizzazione e della composizione cellulare e *riparazione del danno* in cui l'organismo tenta di ripristinare la struttura e la funzionalità del tessuto danneggiato. Se la causa dell'infiammazione non viene rimossa l'infiammazione non cessa così come non cessano i meccanismi di difesa dell'organismo. I prodotti che si generano in seguito al processo di riparazione si concentrano all'interfaccia con il corpo estraneo e l'infezione è costituita da diverse fasi:

- Impianto del biomateriale;

- Assorbimento di proteine;
- Adesione di macrofagi;
- I macrofagi non riescono a digerire la superficie perché troppo grande, si fondono a dare origine a cellule giganti e producono citochine (messaggeri chimici) per reclutare nuove cellule;
- Arrivo di fibroblasti e sintetizzazione di collagene;
- Il biomateriale viene incapsulato in fibra di collagene priva di cellule e non vascolarizzata che ingloba i macrofagi.

La capsula fibrosa degrada le performances dell'impianto perché ne impedisce il contatto diretto con i tessuti, producendo complicazioni post-operatorie.

Un altro ruolo importante è quello delle *proteine*, per cui l'interazione proteine-superficie è correlata con la struttura primaria delle proteine, ovvero con la sequenza di amminoacidi; proteine più grandi interagiscono maggiormente con la superficie perché hanno un maggior numero di amminoacidi e quindi un maggior numero di siti.

L'adsorbimento delle proteine dai fluidi circostanti sulla superficie di un biomateriale è un processo primario rapido in cui le proprietà e la topografia della superficie determina il tipo, la quantità e la conformazione delle proteine adsorbite. La composizione del film proteico può differire da quella dei fluidi circostanti e cambiare nel tempo. La risposta dell'organismo in seguito all'adsorbimento di proteine è data da una serie di interazioni biomateriale-tessuti:

- *Interfaccia superficie-acqua*: nei primi nanosecondi successivi all'impianto le molecole di acqua presenti nei fluidi biologici raggiungono la superficie e formano un mono strato o un doppio strato (Figura 2.2). L'acqua si lega in modo differente alla superficie a seconda della natura della superficie stessa;



Figura 2.2 Molecole di acqua raggiungono la superficie[1].

- *Interfaccia superficie-acqua-proteine*: la presenza di un film di acqua sulla superficie modifica l'interazione con le proteine (Figura 2.3), determinandone una denaturalizzazione, l'orientamento o la capacità di aderire;

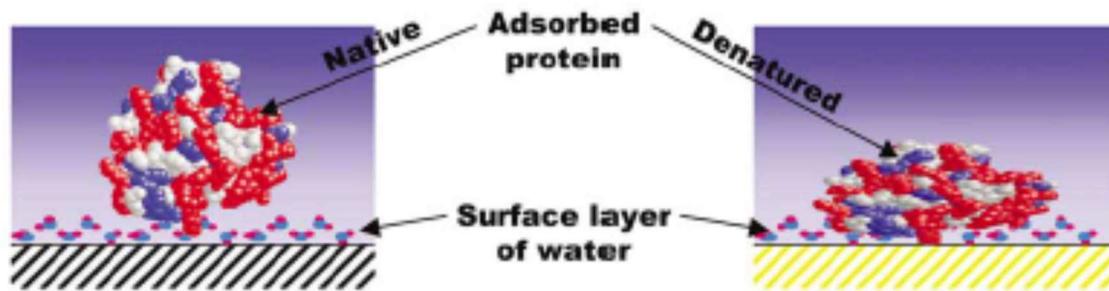


Figura 2.3 Le proteine aderiscono sul film di acqua precedentemente formatosi in superficie[1].

- *Interazione superficie-acqua-proteine-cellule*: le cellule che arrivano superficie vedono lo strato di proteine (Figura 2.4) per cui la loro interazione con la superficie dipende dalle proprietà dello strato di proteine, che alla loro volta dipende dal film idrato e dalle caratteristiche superficiali del materiale impiantato.

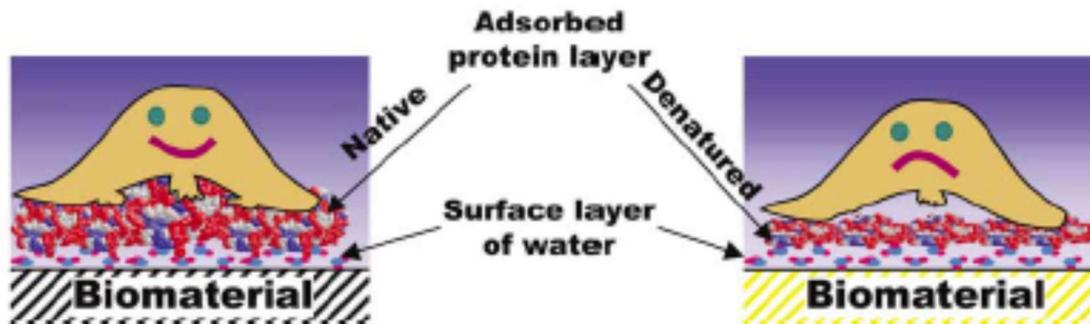


Figura 2.4 Adsorbimento delle cellule sullo strato proteico[1].

Un altro fattore importante è quello riguardante gli *effetti sistemici*, ovvero gli effetti che si verificano a causa del rilascio dei prodotti di reazione nei tessuti che possono diffondere attraverso i tessuti circostanti a causa di un gradiente di concentrazione; i prodotti solubili possono avere un rapido accesso all'apparato circolatorio e raggiungere facilmente altri tessuti e organi. Alcuni prodotti vengono metabolizzati ed espulsi dall'organismo attraverso vie naturali, altri rimangono accumulati e, in tal caso, se la concentrazione non supera i livelli di tolleranza dell'organismo non insorge alcun tipo di problema, in caso contrario si innescano degli effetti sistemici.

Il concetto di *bioattività* nasce dall'ipotesi secondo cui “la biocompatibilità 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”.

La velocità di formazione di un legame all'interfaccia fra un biovetro e il tessuto osseo può essere messo in relazione con il “livello di bioattività”, che a sua volta può essere anche messo in relazione con il tempo necessario a far sì che il 50% dell'interfaccia sia legata e a questo scopo è stato introdotto il concetto di *Indice di Bioattività (IB)*[1] espresso come:

$$I_B = \frac{100}{t_{0,5bb}} \quad (2.1)$$

Dove $t_{0,5bb}$ è il tempo necessario affinché il 50% della superficie dell'impianto sia legata con i tessuti.

L'indice di bioattività varia molto con la composizione ma in linea generale i materiali bioattivi possono essere raggruppati in due categorie a seconda del valore di I_B :

- $0 < I_B < 8$: sono materiali bioattivi e osteoconduttivi, ovvero forniscono una interfaccia biocompatibile sulla quale il tessuto osseo può crescere (come HA e β -tricalcio fosfato);
- $I_B > 8$: oltre ad essere bioattivi e osteoconduttivi questi materiali risultano essere anche osteoproduttivi, interagiscono con i tessuti, sia molli che duri, promuovendo la loro rigenerazione e il legame con essi (e.g. vetri e vetroceramici bioattivi).

Dunque, la bioattività può essere concepita come una estensione della biocompatibilità ed è applicabile a tutti quei materiali che inducono una risposta specifica da parte dell'organismo tale da portare un legame chimico con i tessuti. A questa classe di materiali appartengono quattro categorie: ceramici a base di fosfati di calcio (*apatiti*), *vetri bioattivi* (*Bioglass®*), *vetroceramici bioattivi* e *compositi bioattivi*.

2.2 Vetri

I vetri sono costituiti da network di atomi legati tra di loro attraverso legami covalenti con atomi di ossigeno. Un esempio tipico è il vetro di silice, che è caratterizzato da unità tetraedriche SiO_4^{4-} in cui ogni atomo di silicio si trova al centro di un tetraedro ai cui vertici è presente un atomo di ossigeno[2]; ogni vertice è condiviso da un altro tetraedro in modo tale che ogni ossigeno risulti condiviso da due atomi di silicio. Sono materiali amorfi ottenuti per progressivo irrigidimento di un liquido che non è cristallizzato durante il raffreddamento[3]. Il vetro così ottenuto è caratterizzato da un'organizzazione spaziale ad elevato grado di disordine (Figura 2.5).

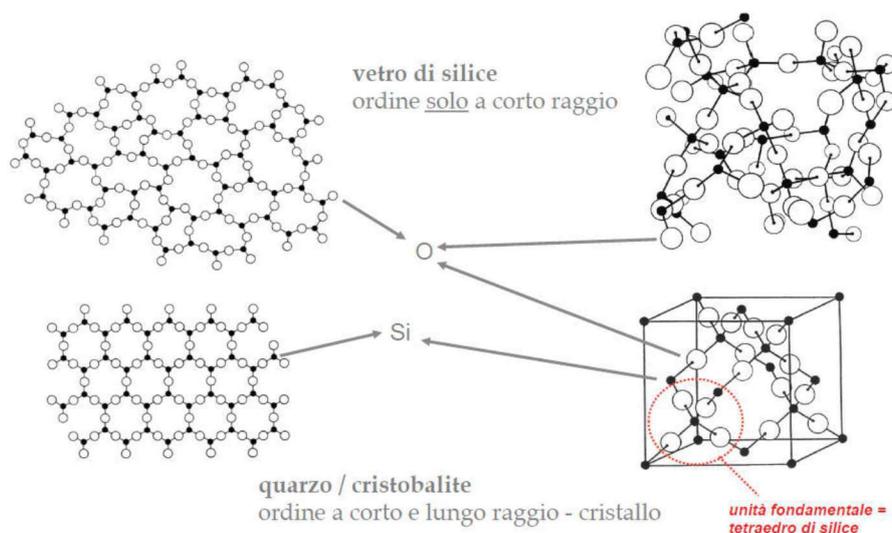


Figura 2.5 Possibili organizzazioni spaziali della silice: in alto è rappresentata la struttura amorfa tipica del vetro di silice, in basso la struttura cristallina tipica del quarzo [3].

A seconda della distribuzione degli atomi la silice può assumere due tipi di strutture, una ordinata (tipica del quarzo) o una irregolare (vetro di silice) senza ordine a lungo raggio e che manifesta il fenomeno di *transizione vetrosa*; i vetri, infatti, differiscono dai solidi regolari (cristallini) per una serie di ragioni e in primo luogo perché non fondono come i solidi cristallini. Se si scalda un solido cristallino puro a fase singola, ad un certo punto il solido fonderà ad una ben definita temperatura di fusione. La presenza di impurezze e di più di una fase nel cristallo alterano il punto di fusione portando alla esistenza di più punti di fusione. Nel caso di un solido amorfo tale passaggio avviene per progressiva e continua diminuzione della viscosità all'aumentare della temperatura, fino a completa fusione. Il passaggio dallo stato solido allo stato liquido è definito dalla temperatura di transizione vetrosa (T_g) che è una importante proprietà dei vetri (Figura 2.6). La viscosità dei vetri in corrispondenza di questo specifico valore di temperatura è dell'ordine di 10^{13} Pa·s. La T_g dipende dalla storia termica del vetro e, in particolare, dalla velocità di raffreddamento a cui viene condotta l'analisi; per questa ragione si utilizza un valore standard di velocità di raffreddamento di $1^\circ\text{C}/\text{min}$ seguita da un riscaldamento a $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

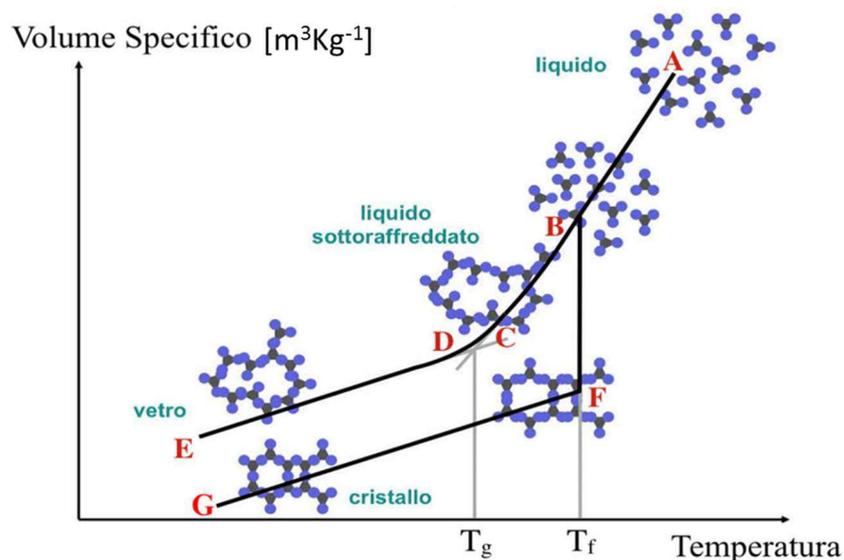


Figura 2.6 Andamento del volume specifico in funzione della temperatura per un solido cristallino e un vetro [3].

Osservando in maniera più attenta la Figura 26 e supponendo di riscaldare il cristallo a partire dal punto G si può notare un aumento lineare del volume specifico all'aumentare della temperatura; in corrispondenza del punto di fusione si ha un brusco aumento del volume specifico (tratto F-B), con successivo aumento lineare del volume specifico fino al punto A, che indica completa fusione.

A raffreddamento dal punto A esistono due possibili soluzioni a seconda della velocità a cui viene condotto il raffreddamento:

- Per un lento raffreddamento il comportamento è analogo a quello precedentemente descritto per cui la curva seguirà l'andamento iniziale (curva A-B-F-G);

- Per un raffreddamento rapido, al contrario, non si osserva più la brusca variazione della curva ma questa varia gradualmente (tratto A-D) portandosi alla stessa pendenza della curva tipica di un cristallo ma a valori di volume specifico maggiori (tratto D-E).

Il valore di temperatura corrispondente alla variazione di pendenza è proprio la temperatura di transizione vetrosa. Si possono quindi definire tre zone caratteristiche del materiale[3]:

- $T < T_g$ vetro: il materiale ha un comportamento prevalentemente elastico e soggetto a frattura fragile perché l'elevata viscosità annulla gli scorrimenti;
- $T_g < T < T_f$ liquido sottoraffreddato: il materiale ha un comportamento viscoelastico ma la viscosità non è tale da annullare completamente gli scorrimenti;
- $T > T_f$ liquido: il materiale ha comportamento viscoso con scorrimento delle unità strutturali del vetro.

Il vetro è formato da più elementi[3]:

- *Vetrificanti* o *ossidi formatori di reticolo* (es. SiO_2 , B_2O_3 , P_2O_5 , GeO_2 , TeO_2) sono ossidi che anche da soli sono in grado di vetrificare dopo fusione. Questi ossidi devono rispettare le condizioni di vetrificabilità presenti nelle regole di Zachariasen (1932), secondo cui: un anione (ossigeno) si lega a non più di due cationi metallici, il numero di coordinazione per i cationi è basso (<4), le unità strutturali condividono solo gli angoli e non spigoli e facce, le unità strutturali poliedriche dovrebbero condividere almeno tre angoli di ogni poliedro.
- *Fondenti* o *ossidi modificatori di reticolo*: sono ossidi di metalli alcalini (Na_2O , K_2O , Li_2O), alcalino-terrosi (MgO , CaO , BaO), ossido di Zinco (ZnO) e non sono in grado di vetrificare; vengono definiti fondenti perché sono in grado di abbassare la temperatura di fusione dei vetrificanti (es. Na_2O abbassa la temperatura di fusione della silice da circa 1720°C a 1550°C) e modificatori in quanto, poiché l'ossigeno si lega ad un solo atomo di silicio, provocano una interruzione del reticolo amorfo del formatore, a cui sono debolmente legati, e sono relativamente liberi di diffondere. Spezzando i ponti di silice diminuiscono la viscosità della struttura e le temperature caratteristiche aumentando, di conseguenza, la lavorabilità del fuso.
- *Ossidi intermedi*: non sono in grado di vetrificare ma, in quantità limitata, possono entrare a far parte del reticolo di un ossido formatore; ad esempio l'allumina (Al_2O_3) per alcuni vetri viene considerata un ossido modificatore ma nel caso del vetro sodico-calcico entra a far parte degli ossidi formatori insieme alla silice.

2.2.1 Proprietà meccaniche

In Tabella 2.1 sono riportati i valori corrispondenti alle proprietà meccaniche fondamentali per un generico vetro.

Tabella 2.1 Proprietà meccaniche del vetro [4]

Simbologia	Proprietà	Valore
P	Densità [Kg·m ⁻³]	2 500
E	Modulo elastico [N·mm ⁻²]	68 000 - 70 000
v	Coefficiente di poisson	0.23
α _T	Coefficiente di dilatazione termica [°C ⁻¹]	7.7 – 8.8x10 ⁻⁶
	Durezza Mohs	7
	Resistenza a copressione [N·mm ⁻²]	900 - 1 000
	Resistenza a trazione [N·mm ⁻²]	20 - 200

Per temperature inferiori a quella di deformazione il comportamento del vetro è elastico e fragile tipico dei ceramici. La frattura fragile è regolata dalla equazione di Griffith :

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{2E \gamma_s}{\pi a}} \quad (2.2)$$

Dove σ_c è la sollecitazione applicata, E il modulo di Young, γ_s l'energia superficiale del materiale e a la lunghezza della cricca. Griffith assunse che la rottura fosse dovuta alla presenza di difetti nella struttura cristallina e che la dimensione della cricca fosse il fattore critico che determinava la sollecitazione a rottura.

I vetri sono caratterizzati da una bassa resistenza a trazione:

$$\sigma_f = \frac{K_{IC}}{\sqrt{\pi a}} \quad (2.3)$$

Ciò è dovuto al fatto che i vetri hanno bassa tenacità a frattura $K_{IC} \sim 0.5 \text{ MPa}\sqrt{m}$ e difetti di grande taglia[3].

Poiché non si può determinare con precisione il comportamento meccanico di materiali fragili, in quanto questo dipende proprio dalla presenza di difetti all'interno della struttura, si valuta la *probabilità di sopravvivenza* a determinati tensioni applicate con la "Statistica di Weibull", secondo cui la probabilità di frattura è determinata dalla distribuzione dimensionale dei difetti presenti e dalla probabilità di trovare cricche di determinate dimensioni nel materiale:

$$P_s(V_0) = e^{-\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m} \quad (2.4)$$

Dove $P_s(V_0)$ è la frazione di campioni con volume V_0 che sopravvive in seguito ad una sollecitazione a tensione uniforme e uniassiale σ , σ_0 è il modulo a tensione che corrisponde alla sopravvivenza del 37% dei campioni e m è il modulo di Weibull. Valori molto bassi di m corrispondono a materiali con elevata velocità di propagazione delle cricche, comportamento tipico dei vetri.

Per quanto riguarda la *resistenza a compressione* risulta essere 10-15 volte superiore rispetto alla resistenza a trazione.

2.2.2 Proprietà fisiche

2.2.2.1 Proprietà reologiche

La viscosità è definita come la resistenza allo scorrimento laminare in risposta ad una sollecitazione meccanica applicata parallelamente alla superficie.

L'unità di misura adottata dal Sistema internazionale è il Pa·s.

In Figura 2.7 è mostrato l'andamento della viscosità in funzione della temperatura (Eq. 2.5).

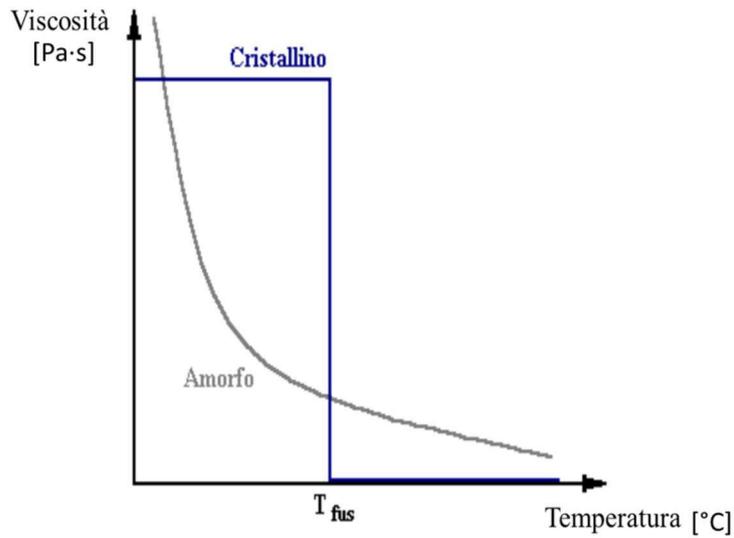


Figura 2.7 Andamento viscosità in funzione della temperatura per un solido cristallino ed un solido amorfo[3].

La viscosità è dovuta all'attrito interno tra le varie unità tetraedriche che si trovano a scorrere le une sulle altre e nei solidi amorfi varia secondo l'equazione di Arrhenius:

$$\eta = \eta_0 e^{\frac{Q}{RT}} \quad (2.5)$$

Dove η è la viscosità, η_0 è la costante legata al peso molecolare e al volume molare, Q è l'energia di attivazione necessaria per iniziare lo scorrimento, R è la costante dei gas e T la temperatura assoluta.

Dall'Equazione 1.4 si evince che la viscosità nei solidi amorfi decresce esponenzialmente con la temperatura secondo una curva continua, a differenza dei solidi cristallini.

La viscosità in funzione della temperatura è la proprietà fondamentale per determinare i processi di fusione, temperatura e tempra e le temperature principali che descrivono il comportamento reologico di un vetro (Figura 2.8):

- *Punto di fusione*: corrisponde ad un valore di η pari a 10 Pa·s ed è la temperatura alla quale il vetro può essere considerato allo stato liquido;

- *Punto di lavorazione:* è la temperatura alla quale il vetro è facilmente deformabile e ha inizio per un valore di η pari a 10^3 Pa·s. Questo è l'intervallo di lavorabilità in cui il vetro viene formato ed è compreso tra 10^3 e 10^7 Pa·s;
- *Punto di rammollimento:* il vetro scorre sotto il suo peso rappresenta la massima temperatura alla quale si può maneggiare il vetro senza danneggiarlo e corrisponde ad un valore di η pari a $10^{6.6}$ Pa·s;
- *Punto di ricottura:* è la temperatura in cui la diffusione atomica è sufficiente ad eliminare le tensioni residue entro 15 minuti e corrisponde ad un valore di η pari a 10^{12} Pa·s;
- *Punto di deformazione:* è la temperatura alla quale gli stress sono rilasciati dopo 4h e indica la transizione da comportamento viscoelastico a fragile. Corrisponde a valori di η pari a $3 \cdot 10^{13}$ Pa·s.

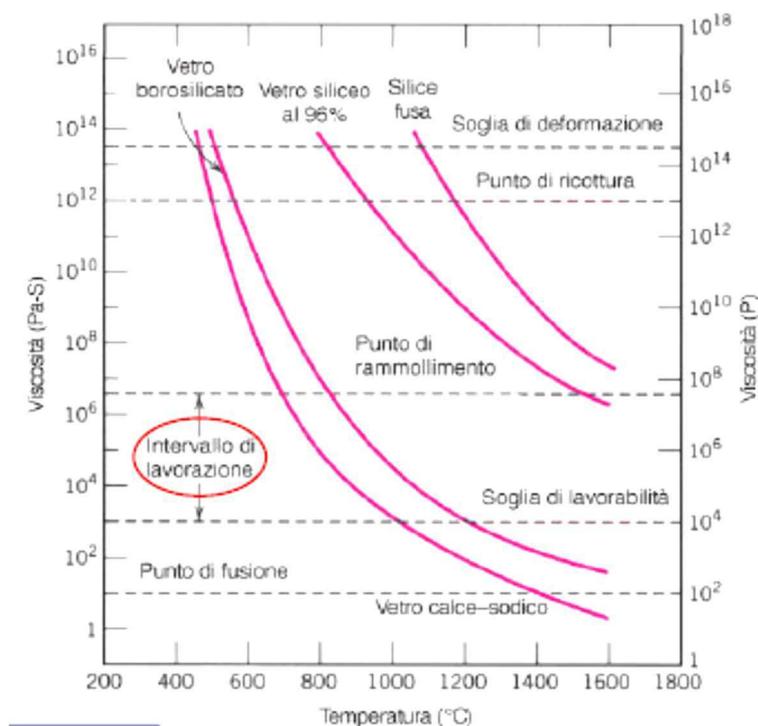


Figura 2.8 Andamento della viscosità in funzione della temperatura che descrive il comportamento reologico di un vetro[3].

2.2.2.2 Proprietà termiche

Poiché i vetri sono dei solidi al altissimo disordine strutturale, il libero cammino medio dei fononi è breve e questo è il motivo per cui i vetri sono cattivi conduttori di calore. Il parametro che descrive i fenomeni di scambio di calore è il coefficiente di conducibilità, che nel caso dei vetri sodico-calcici è basso (circa 1 W/mK). Un ulteriore parametro che descrive il comportamento termico di un vetro è la trasmittanza termica, U , che rappresenta la perdita di calore per conduzione, convezione ed irraggiamento per 1m^2 e per una differenza di temperatura ΔT tra interno ed esterno di 1 K e dipende dallo spessore.

L'applicazione di una variazione brusca di temperatura tra parte esterna e interna genera uno shock termico che risulta in una dilatazione disomogenea del vetro e nella formazione di tensioni residue che portano alla rottura del pezzo. Le condizioni superficiali del vetro sono quelle che influenzano maggiormente il comportamento a temperatura in quanto la presenza di intagli o cricche peggiora il comportamento in seguito a shock termico. Questo problema può essere ovviato effettuando un trattamento di tempra in modo da eliminare le tensioni residue presenti nel vetro o utilizzando degli appositi rivestimenti per l'isolamento.

2.2.2.3 Proprietà ottiche

Le proprietà ottiche che descrivono il generico comportamento di un vetro sono le seguenti[3]:

- Indice di rifrazione
- Dispersione cromatica e numero di Abbè
- Riflessione e rifrazione

La luce è caratterizzata da fotoni che si propagano come onde elettromagnetiche e la sua propagazione all'interno del materiale avviene per interazione con il materiale stesso; la propagazione della luce induce una polarizzazione temporanea del materiale e l'*indice di rifrazione* indica il fattore numerico per cui la velocità di propagazione della radiazione elettromagnetica viene rallentata quando questa attraversa il materiale.

L'indice di rifrazione n viene definito come:

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.6)$$

Dove c è la velocità della luce con una specifica lunghezza d'onda λ nel vuoto (è uguale a 1) e v la velocità della luce nel mezzo che stiamo considerando, ovvero il vetro (i materiali in generale presentano un indice di rifrazione ≥ 1).

L'indice di rifrazione è correlato al momento di dipolo elettrico temporaneo indotto dall'interazione della luce con atomi e molecole presenti all'interno del materiale secondo l'*equazione di Lorentz-Lorentz*:

$$\frac{(n-1)V}{n^2+2} = N_a \alpha \quad (2.7)$$

Dove V è il volume molare del materiale dielettrico, N_a il numero di Avogadro e α la polarizzabilità.

Un'altra proprietà è la *Dispersione*, D_s , che indica la variazione dell'indice di rifrazione con il variare della lunghezza d'onda λ e in generale questa diminuisce all'aumentare della lunghezza d'onda:

$$D_s = \frac{n_F - n_C}{N_d - 1} \quad (2.8)$$

Dove n_F , n_d e n_C indicano gli indici di rifrazione nel blu (F), giallo (d) e rosso (C) delle linee spettrali di Fraunhofer. Per caratterizzare la dispersione si utilizza il *Numero di Abbè*, che è il reciproco della Dispersione.

La *Riflessione* è legata all'indice di rifrazione dall'equazione:

$$R = \frac{(n-1)^2}{(n+1)^2} \quad (2.9)$$

La *Rifrazione*, infine, è data dal passaggio da un mezzo più denso ad uno meno denso, quindi da un mezzo ad indice di rifrazione maggiore ad uno ad indice di rifrazione minore ed è rappresentata in Figura 2.9.

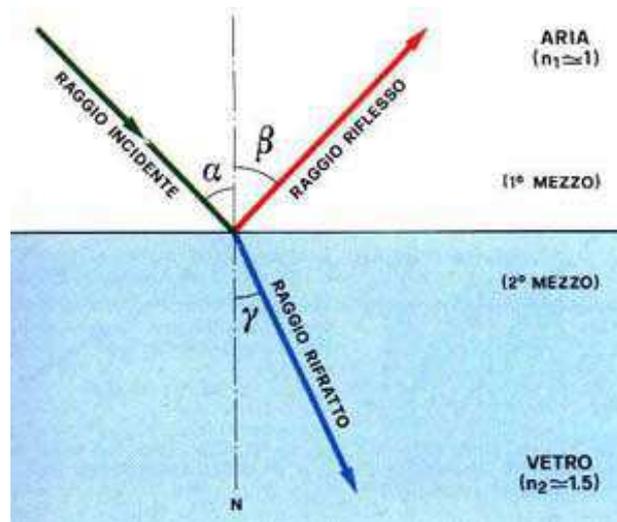


Figura 2.9 Rappresentazione grafica del fenomeno di rifrazione all'interfaccia tra due mezzi[5].

La rifrazione correlata ai rispettivi indici di rifrazione del mezzo 1 e 2 (n_1 e n_2) secondo la Legge di Snell:

$$n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \gamma \quad (2.10)$$

Dove $\sin \alpha$ è il seno dell'angolo incidente e $\sin \gamma$ il seno dell'angolo rifratto.

2.2.2.3 Proprietà elettriche

A temperatura ambiente, a causa delle disomogeneità all'interno della struttura, il vetro si comporta come isolante. al di sopra di 800 °C la conducibilità elettrica nei vetri è di tipo ionico per cui è legata alla presenza di ossidi alcalini o alcalino-terrosi strettamente legati al reticolo per cui dipende non solo dal tipo di ione ma anche dalle interazioni di legame che si instaurano tra gli ioni e il vetro. Invetri che presentano nella loro struttura degli ioni alcalini la conducibilità elettrica è più complessa in quanto questi ioni si spostano con più difficoltà da un sito dell'uno a quello dell'altro in quanto risulta necessario una riorganizzazione strutturale.

2.2.2.4 Stabilità chimica

La resistenza del vetro alla corrosione chimica è una delle ragioni del suo utilizzo. A seconda della composizione del vetro e dalla natura dell'ambiente chimico si ottengono vetri ad alta e bassa durabilità. L'esposizione all'acqua e agli agenti atmosferici danno origine a fenomeni di scambio con gli ioni alcalini e la formazione di sali sulla superficie.

L'esposizione agli alogenuri metallici (LiCl, NaCl, KI, MgCl₂) ad alta temperatura genera fenomeni di devetrificazione. Riguardo le reazioni con gli acidi possono verificarsi due tipi di processi:

- Processo di dissoluzione in cui ad esempio l'acido fluoridrico (HF) attacca il vetro e, a causa della maggior elettronegatività del fluoro rispetto all'ossigeno, dissolve la matrice silicea e portando alla formazione di fluoruri di silicio;
- Processo di perdita in cui altri ioni non attaccano il network di silice ma effettuano una estrazione selettiva degli ioni alcalini per sostituzione protonica.

La reazione con le basi varia a seconda che le soluzioni basiche siano fortemente o debolmente concentrate: nel primo caso si ha una dissoluzione del vetro a causa della rottura dei legami Si-O-Si mentre nel caso di una soluzione debolmente concentrata può innescare fenomeni di dissoluzione o perdita a seconda del tipo di soluzione.

2.3 I vetri bioattivi

I vetri bioattivi (o biovetri) appartengono ad una particolare classe di biomateriali che è in grado di formare, a contatto con soluzione fisiologica, uno strato di idrossiapatite/idrossicarbonatoapatite (HA/HCA), il principale costituente del tessuto osseo, portando alla formazione di un legame chimico con i tessuti viventi. Per questo motivo vengono definiti *osteconduttivi*.

La bioattività di questi materiali si manifesta attraverso una modifica della superficie nel tempo; tale modifica può avvenire a contatto con una soluzione fisiologica simulata (*in vitro*) o a contatto con fluidi biologici (*in vivo*). Il risultato *in vivo* è la completa integrazione con il tessuto osseo (osteointegrazione). La velocità di formazione del legame chimico dipende dalla composizione della fase vetrosa per cui si è osservato che per avere la rapida cristallizzazione di HCA entro 2h è necessaria una percentuale di vetro del 42-53% molare; se la percentuale di vetro è del 53-62% molare lo strato di HCA si forma in due o tre giorni mentre se è superiore al 62% il materiale risulta inerte.

In generale, i vetri utilizzati in applicazioni biomedicali possono essere raggruppati a seconda degli elementi che li costituiscono in 4 sistemi:

- *Sistema Hench*: SiO₂ – CaO – Na₂O – P₂O₅;
- *Sistema Kokubo*: SiO₂ – CaO – MgO – P₂O₅;
- *Sistema Beall*: SiO₂ – Al₂O₃ – CaO – MgO – K₂O – P₂O₅ – F;
- *Sistema Brömer*: SiO₂ – CaO – MgO – Na₂O – K₂O – P₂O₅;

Il vetro trattato in questo lavoro di tesi appartiene al *Sistema Hench* e di questo vengono riportate le principali proprietà nel paragrafo 1.2.1.

2.3.1 Breve storia del Bioglass®

La composizione tipica dei vetri adottati in campo biomedico è quella brevettata da L.L. Hench e collaboratori nel 1971[6] e denominata 45S5 (Bioglass®): tale sigla implica il 45% di silice e rapporto Ca/P=5.

Questo tipo di biovetro appartiene al sistema $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$ con percentuali in peso pari a: 45% SiO_2 , 24.5% CaO , 24.5% Na_2O e 6% P_2O_5 (Figura 2.10).

La bioattività di questo materiale inorganico è attribuita a[7]:

- Reazioni interfacciali che provvedono alla formazione dell'ambiente fisiologico ideale per la colonizzazione, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti;
- Effetto diretto dei prodotti ionici di dissoluzione del vetro sull'osteogenesi.

I test *in vivo* e *in vitro* effettuati hanno evidenziato la formazione di uno strato di idrossiapatite in cui i cristalli erano legati a strati di fibrille di collagene prodotte all'interfaccia da osteoblasti e proprio questo legame chimico tra idrossiapatite e collagene ha creato una interfaccia fortemente legata. Test *in vivo* hanno mostrato che la forza del legame interfacciale tra il Bioglass® e l'osso corticale era uguale o addirittura più elevato della forza dell'osso ospite.

Il Bioglass® è stato il primo materiale inorganico che ha mostrato la tendenza a legarsi all'osso. La bioattività di questo tipo di materiale è da attribuire ad una serie di fattori tra cui le reazioni che hanno luogo all'interfaccia tessuto-materiale provvedendo alla formazione di un'ambiente ideale per la colonizzazione, proliferazione e differenziazione di osteoblasti per la formazione di nuovo tessuto osseo e l'effetto diretto dei prodotti di dissoluzione sull'osteogenesi e sull'angiogenesi[8].

In Figura 1.10 è rappresentato il diagramma di fase ternario SiO_2 , CaO , Na_2O con il 6% di P_2O_5 [6], [8]: i sistemi vetrosi appartenenti alla *regione A* formano legame con l'osso in quanto si forma uno strato di gel di silice e può precipitare apatite in seguito alla precipitazione di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Nella *regione B* sono inclusi i vetri che non formano legame perché la reattività è troppo bassa a causa della formazione di uno strato di idratazione a contatto con la soluzione fisiologica e che sono quindi considerati bioinerti. Nella *regione C* la reattività è talmente elevata che si ha una rapida dissoluzione di gel di silice in formazione e una graduale dissoluzione del vetro e nella *regione D* materiali che non vetrosi. La *regione S* è la regione di bioattività di classe A, tipica dei materiali osteoconduttivi e osteoproduttivi, in grado di essere colonizzati da cellule osteogeniche presenti nell'ambiente biologico circostante e comprende vetri in grado di formare legami con l'osso e con i tessuti molli e che sono attivatori di geni. Vetri con il più alto livello di bioattività sono quelli all'interno della *regione E*. La composizione è molto vicina all'eutettico ternario e per questo motivo è di facile fusione.

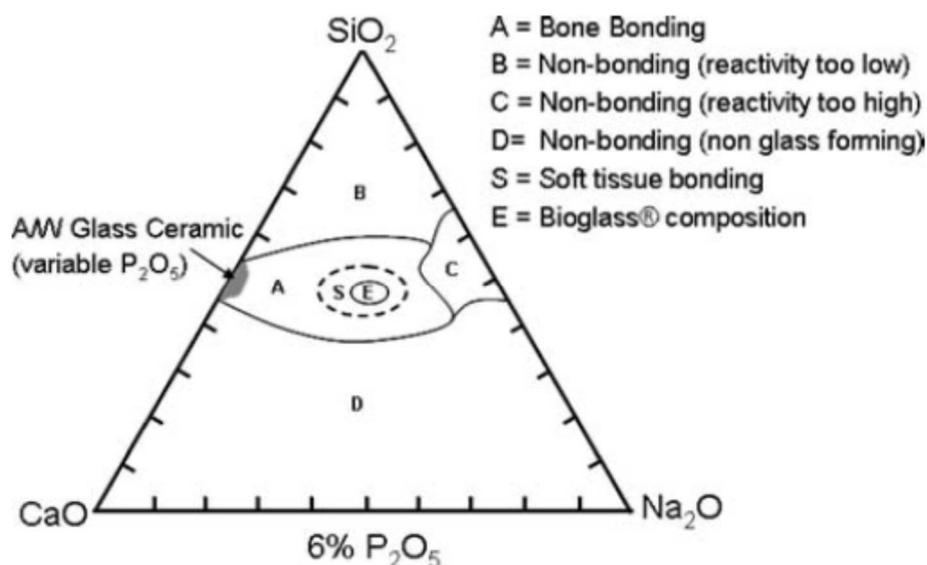


Figura 2.10 Mappa di bioattività di composizioni all'interno del sistema SiO₂-Na₂O-CaO (6%wt P₂O₅) che mostra le regioni di risposta bioattiva[6].

In Tabella 2.2 sono elencate le principali proprietà del Bioglass[®] ed è possibile notare che questo, così come altri vetri bioattivi presenta scarse proprietà meccaniche, una bassa resistenza a trazione e un elevato modulo elastico se comparato con l'osso corticale (rispettivamente 50-150 MPa e 7-30 GPa) e questo implica il fatto che non si possano fare intere protesi completamente vetrose ma questi vetri necessitano di essere fissati con un apposito materiale metallico per sopportare il carico ciclico a cui l'articolazione viene sottoposta; al contrario possono essere utilizzati piccoli impianti in vetro tal quale, come gli scaffold.

Tabella 2.2 Principali proprietà Bioglass[®][2].

Proprietà	Valore
Densità	2.7 g/cm ³
Temperatura di transizione vetrosa	538°C
Temperatura onset di cristallizzazione	677°C
Temperatura di fusione	1224-1264 °C
Coefficiente di espansione termica	15.1 x 10 ⁻⁶ °C ⁻¹
Indice di rifrazione	1.59
Resistenza a trazione	42 Mpa
Modulo di Young	35 Mpa
Modulo di taglio	30.7 GPa
Resistenza a frattura	0.6 MPa m ^{1/2}
Durezza Vickers	5.75 Gpa

Per incrementare le proprietà meccaniche e accelerare la formazione di apatite biomimetica dopo l'impianto i vetri bioattivi possono essere incorporati in strutture composite sotto forma di particelle o fibre.

Nonostante sia il vetro più comunemente utilizzato, il 45S5 non è l'unico esistente ad essere bioattivo ma ne esistono altri basati sulla composizione originaria dei vetri silicatici (Tabella

2.3) con lo scopo di incrementare le proprietà meccaniche o la lavorabilità formando componenti con differenti microstrutture[9].

Tabella 2.3 Composizione di alcuni vetri bioattivi[9].

Composition (wt%)	45S5	13-93	6P53B	58S	70S30C	13-93B1	13-93B3	P₅₀C₂₅N₂₅
Na ₂ O	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
K ₂ O	0	12.0	2.8	0	0	11.7	11.1	0
MgO	0	5.0	10.2	0	0	4.9	4.6	0
CaO	24.5	20.0	18.0	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
SiO ₂	45.0	53	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
P ₂ O ₅	6.0	4.0	6.0	9.2	0	3.8	3.7	71.0
B ₂ O ₃	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

Il 13-93 è basato sulla composizione del Bioglass[®] ma ha un maggior contenuto di silice e presenta ossidi modificatori come K₂O e MgO, non presenta differenze marcate nella proliferazione e nella differenziazione degli osteoblasti e degrada più lentamente. I vetri bioattivi a base di boro hanno una minor durabilità chimica e si convertono in maniera più completa in un materiale simile ad idrossiapatite. Vetri come il P₅₀C₂₅N₂₅ hanno P₂O₅ come ossido formatore di reticolo (e sono quindi composizioni biorassorbibili) e CaO e Na₂O come ossidi modificatori.

2.3.2 Meccanismo di bioattività di Larry Hench

Il meccanismo proposto da Larry Hench è un processo multistadio che coinvolge 11 stadi di reazione[2]:

1. Rapido scambio di ioni Na⁺ e Ca⁺ con ioni H⁺ o H₃O⁺ dai fluidi corporei incrementando il pH all'interfaccia con l'osso;
2. Perdita di silice solubile in forma SiOH₄ (acido silicico) risultante dalla rottura dei legami Si-O-Si in seguito all'azione degli ioni H⁺ dell'acqua, con conseguente formazione di silanoli (Si-OH) (Si-O-Si + H₂O → Si-OH + OH-Si);
3. Condensazione e ripolimerizzazione dei silanoli (Si-OH) per creare uno strato ricco in SiO₂;
4. Migrazione di gruppi Ca²⁺ [PO₄]³⁻ dal vetro e dai fluidi biologici formando al di sopra dello strato ricco in SiO₂ un film amorfo ricco in ossidi di calcio (CaO₂) e ossidi di fosforo (P₂O₅);
5. Cristallizzazione della fase amorfa ricca in CaO₂ e P₂O₅ per incorporazione di anioni OH⁻, Ca₃²⁻ e F⁻ a formare uno strato misto di idrossiapatite (HA) e idrossicarbonatoapatite (HCA);
6. Adsorbimento nell' HCA di molecole biologiche capaci di stimolare il differenziamento cellulare;

7. Azione dei macrofagi che intervengono sempre di più in difesa da un corpo estraneo;
8. Adesione delle cellule staminali sulla superficie bioattiva;
9. Proliferazione e differenziamento delle cellule staminali in osteoblasti;
10. Produzione e mineralizzazione della matrice del tessuto osseo;
11. Cristallizzazione della matrice ossea.

I primi cinque (Figura 2.11) stadi sono osservabili in vitro attraverso l'immersione in opportuna soluzione fisiologica simulata (SBF).

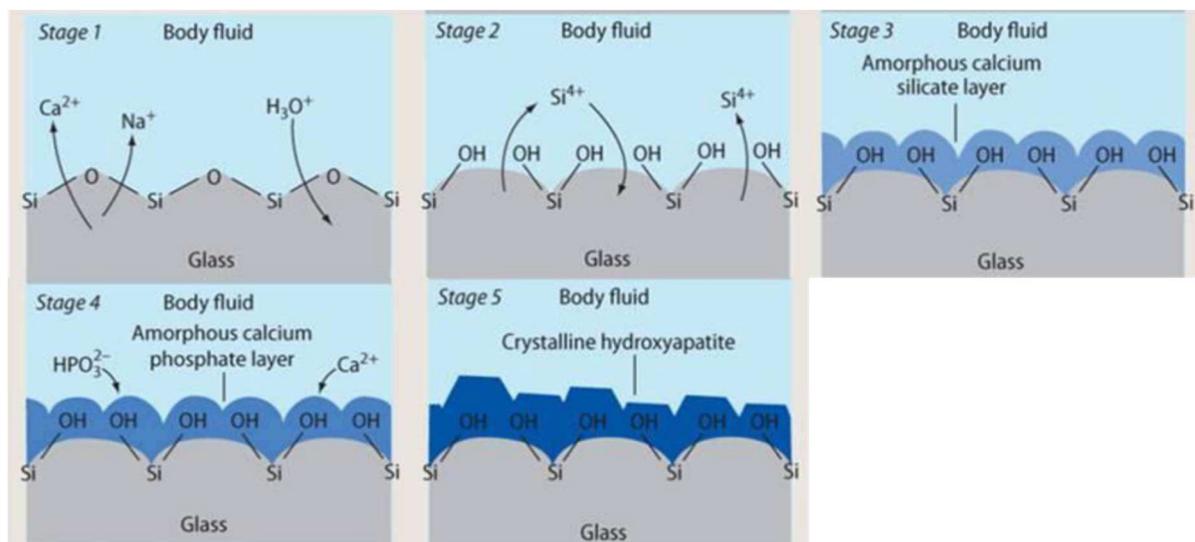


Figura 2.11 Primi cinque stadi del meccanismo di bioattività proposto da Larry Hench[1], [10].

2.4 Proprietà antibatteriche dei Vetri Bioattivi (BAGs) e drogaggio con elementi metallici

L'uso dei vetri bioattivi viene fatto risalire agli anni '90 con l'introduzione del BAG-S53P4 (53% SiO₂, 23% Na₂O, 20% CaO, 4% P₂O₅)[8], un biovetro adottato nel trattamento di difetti di cavità che ha mostrato una tendenza a prevenire le infezioni postoperatorie e a trattate le infezione dovute ad osteomielite cronica senza l'aggiunta di antibiotico. I principali benefici dovuti al BAG-S53P4 consistono nelle sue proprietà osteoconduttive, nella sua azione antibatterica senza l'uso di antibiotici locali e nella possibilità di adottare una procedura one-stage anziché una two-stage (espianto e successivo reimpianto della protesi a distanza di qualche mese) tipica dell'uso di atibiotici contenenti gocce di PMMA.

Uno studio condotto da *Hu et al.*[11] sul Bioglass® ha mostrato una forte potere battericida del biovetro (98%) nei confronti di tre batteri patogeni della pelle (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*) per concentrazioni di BAG di 50mg/ml. L'effetto antibatterico di questo biovetro è dovuto ad un incremento del pH della soluzione in seguito al contatto con i batteri e ad una modificazione della morfologia superficiale dei batteri quando vengono a contatto con frammenti BAG, che porta a un danneggiamento delle pareti cellulari del batterio (Figura 2.12).

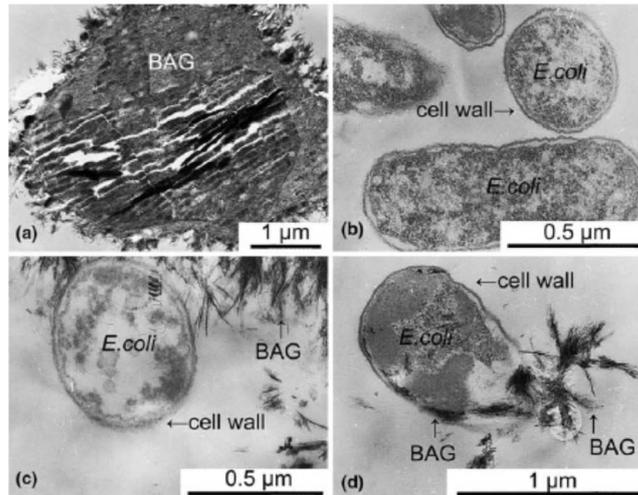


Figura 2.12 Morfologia dei batteri di *E. coli* adesi sulla superficie delle particelle di Bioglass®. (a) particelle di BAG senza batteri adesi. (b) cellule viventi di *E. coli* senza BAG. (c) cellula di *E. coli* su particella di BAG. (d) cellula morta di *E. coli* in seguito a danno della parete cellulare e frammenti di BAG[11].

In generale, le proprietà osteoconduttive e osteostimolative dei vetri bioattivi aiutano la crescita ossea necessaria alla ricostruzione del difetto, mentre le proprietà antibatteriche risultano in un cambiamento nell'ambiente fisiologico locale: poco dopo l'impianto e l'esposizione ai fluidi biologici le reazioni interfacciali portano alla formazione di un layer di fosfato di calcio. Il processo che porta alla formazione del legame osseo può essere descritto come una serie di reazioni chimiche interfacciali che portano alla formazione di uno strato di idrossiapatite (HA). Ciò che si verifica è un incremento locale del pH dovuto allo scambio di ioni sodio con i protoni presenti all'interno dei fluidi biologici; la dissoluzione di ioni sodio dal vetro può portare un incremento iniziale del pH all'interno dei fluidi corporei fino a 11 nelle prime 8h e rimanere costante per oltre 48h. La neutralizzazione del pH elimina gli effetti batterici ma al tempo stesso potrebbe avere effetti negativi anche sulle cellule. L'entità di questa variazione dipende dal tipo di vetro, dal rapporto area superficiale/volume, dal dosaggio del campione e dall'agitazione del sistema. Un fattore addizionale dovuto al rilascio di ioni silicio, calcio e fosfato che disturbano il potenziale di membrana dei batteri consiste in un aumento della pressione osmotica dovuta alla conversione del vetro in idrossiapatite.

Studi condotti per valutare i cambiamenti nella morfologia batterica durante il periodo di incubazione su BAG-S53P4[8], hanno evidenziato un significativo cambiamento nella morfologia delle cellule dello *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii* e della *Klebsiella pneumoniae*, come uno shrinkage con conseguente diminuzione della dimensione della cellula e il danneggiamento della membrana batterica. Questi risultati sono correlati ai due meccanismi di azione discussi precedentemente, l'osmolarità e la variazione nel pH: la concentrazione di soluti all'interno del citoplasma batterico è normalmente più elevata rispetto all'ambiente circostante e questa condizione crea una pressione positiva sulla membrana della cellula; a sua volta un incremento nella concentrazione di soluti esterni come quelli dovuti al contatto del BAG con i fluidi biologici genera un rapido efflusso di acqua e la pressione sulla membrana della cellula crolla alterandone la dimensione, la forma e i livelli di stress. In maniera analoga l'esposizione ad un ambiente basico può risultare stressante per i batteri in quanto rispondono agli stress alcalini cambiando la loro morfologia, ultrastruttura, sintesi delle proteine e espressione genica. Nonostante condizioni estreme come elevate variazioni nel pH e nella pressione osmotica possano comportare complicazioni a cellule

ospiti e tessuti, i BAGs vengono adottati per trattare la cavità frontale, mastoidi, tumori ossei benigni, traumi e chirurgia spinale per più di 20 anni senza segni osservabili di reazioni tossiche.

A tal proposito in un lavoro condotto da *Van Gestel et al.*[12] è stata proposta una panoramica su alcuni studi effettuati *in vivo* sul biovetro S53P4, indicato per la stimolazione nella formazione di tessuto osseo in seguito a chirurgia craniofacciale, nella cura di osteomieliti, in spondilodisi e fratture del piatto tibiale ed in innesti di materiali ossei in seguito ad esportazione di tumori ossei benigni. L'uso del biovetro è una buona alternativa al tessuto osseo autologo, in quanto quest'ultimo presenta alcuni limiti in termini di disponibilità non immediata, forma e dimensione. Inoltre il biovetro S53P4 è in grado di proteggere l'osso dall'adesione e dalla proliferazione batterica con il meccanismo rappresentato in Figura 2.13, secondo cui le proprietà antibatteriche di questo biovetro sono dovute ad un incremento del pH in seguito allo scambio di ioni alcalini con i protoni presenti nei fluidi corporei; inoltre, il rilascio di ioni causa un incremento nella pressione osmotica, un altro fattore antimicrobico. In seguito all'esposizione ai fluidi, si osserva la precipitazione di fosfato di calcio che, in seguito al rilascio di ioni sodio, silicio, calcio e fosfato cristallizza in idrossiapatite naturale; questo strato di idrossiapatite dà inizio all'attivazione degli osteoblasti per la formazione di nuovo osso.

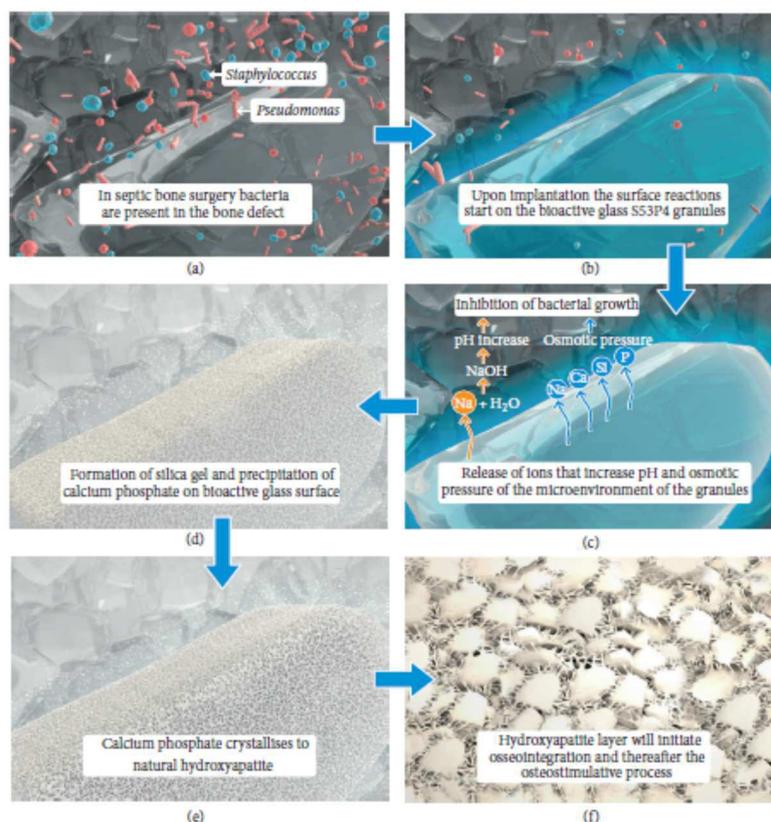


Figura 2.13 Reazioni superficiali su biovetro dopo impianto. (a) presenza di batteri nel difetto osseo in seguito a chirurgia settica, (b) reazioni superficiali in seguito al contatto con i fluidi corporei. (c) scambio alcalino con idronio presente nel microambiente con conseguente incremento del pH e della pressione osmotica, che inibiscono la crescita batterica. (d) Formazione di un gel di silice e precipitazione di fosfato di calcio sulla superficie del biovetro con conseguente cristallizzazione di questo in forma di idrossiapatite (e), responsabile dell'osteointegrazione e del processo osteostimolativo[12].

Un ulteriore vantaggio del S53P4 è la tendenza a degradare lentamente, infatti è osservabile anche 14 anni dopo l'impianto e questo potrebbe essere dovuto buone proprietà angiogeniche del biovetro, in seguito alla formazione di vasi sanguigni, che forniscono nutrimento e ossigeno alle cellule all'interno del materiale al fine di formare nuovo tessuto osseo; tuttavia, delle proprietà angiogeniche di questo biovetro non ci sono evidenze dirette.

Un altro studio sulla cura di infezioni (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e/o funghi) della cavità mastoidea con l'uso del S53P4 è stato condotto da *Silvola*[13]. Questo biovetro, con il 45S5, è stato testato *in vivo* in precedenti studi e ha mostrato una minor velocità di riassorbimento osseo rispetto al 45S5. Invece, una proprietà in comune è che non risultano tossici per l'organismo, a differenza di innesti ossei contenenti alluminio. Lo studio è stato condotto nel dipartimento ENT (Ear, Nose and Throat) del Pa"ija"t-Ha"me Central Hospital a Lahti (Finlandia) su 6 uomini (di cui ricevente un intervento di revisione) e 9 donne. L'obliterazione del mastoide è stata effettuata utilizzando il biovetro S53P4 e, in seguito all'intervento, un solo paziente ha subito una timpanoplastica. La conclusione raggiunta è che i biovetri lavorano con successo come materiali da oblitterazione nelle cavità uditive in quanto sembrano tollerare le infezioni croniche del mastoide e prevengono le infezioni post-operatorie; inoltre, le proprietà antibatteriche di questo biovetro limitano il rischio di estrusione dell'oblitterazione.

Le proprietà antibatteriche dei biovetri possono essere incrementate con l'utilizzo di elementi come Ag, Zn e Cu, noti per le loro proprietà antibatteriche.

Infatti, in uno studio condotto da *Goh et al.*[14] su un biovetro del sistema $50\text{SiO}_2 - 45\text{CaO} - 5\text{P}_2\text{O}_5$ sono state valutate le sue proprietà antibatteriche in seguito al drogaggio con 1, 5 e 10 %mol di CuO o Ag_2O . Il vetro è stato sintetizzato separatamente mediante tecnica sol-gel a partire da tetraetil ortosilicato (TEOS), trietilfosfato (TEP), nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitrato di argento (AgNO_3) e nitrato di rame triidrato ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$); in seguito è stata valutata la sua proprietà antibatterica con la tecnica di incubazione in una sospensione contenente il batterio *E. coli*. L'incorporazione di rame (10%mol) e argento (superiore al 5%mol) hanno impedito la colonizzazione batterica efficace dopo 24h e, nel caso del biovetro drogato con ioni argento, il più rapido rilascio iniziale di tali ioni lo rende un *bacteria-killing* migliore rispetto al biovetro drogato con rame, che manifesta un rilascio prolungato, rendendosi un miglior candidato per la protezione antibatterica a lungo termine.

2.4.1 MITA (Metallic Ions as Therapeutic Agents)

Specifici ioni metallici, conosciuti come *TII*s (Therapeutic Inorganic Ions) o ioni *Bioinorganici*[8] sono essenziali per il metabolismo e hanno mostrato un ruolo importante nell'incremento della bioattività dei biovetri, nel conferire un effetto antibatterico e nei processi di angiogenesi. Un valore aggiunto di alcuni TII è il loro effetto antibatterico, tale da renderli utilizzabili per combattere le infezioni. Questi ioni bioinorganici sono noti anche come *MITA* (Metallic Ions Therapeutic Agents), ovvero ioni metallici come agenti terapeutici. Come ampiamente discusso da *Mouriño et al.*[15] tali ioni, tra cui è possibile citare gli ioni argento, rame, cobalto, zinco, calcio, silicio, fosforo, ferro, stronzio, gallio, vanadio e manganese, mostrano la tendenza ad interagire con altri ioni alterando le funzioni metaboliche e biologiche della cellula, legando macromolecole come enzimi e acido nucleico attivando segnali secondari. I MITA, oltre a rappresentare una soluzione economica, mostrano altre

proprietà, come stabilità ad elevata temperatura, all'uso di solventi organici, alla presenza di radicali liberi e alle elevate pressioni: condizioni di processo tipiche della produzione di biomateriali. Bisogna però considerare alcuni limiti come il rilascio di ioni metallici all'interno dell'organismo che causerebbe una tossicità sistemica. L'efficienza e la selettività di questi ioni metallici può essere incrementata modulando il preciso livello e la locazione all'interno del corpo. Una strategia molto spesso utilizzata per caricare gli ioni metallici in matrici è legarli ad un sottile strato (zeoliti, idrossiapatite, vetro bioattivo, silice, fibre di carbonio) in modo da migliorare la stabilità degli stati ionici e liberare gli ioni in lungo arco di tempo.

In Figura 2.14 è mostrata una panoramica delle proprietà incrementate grazie al rilascio di ioni terapeutici dalla superficie del biovetro.

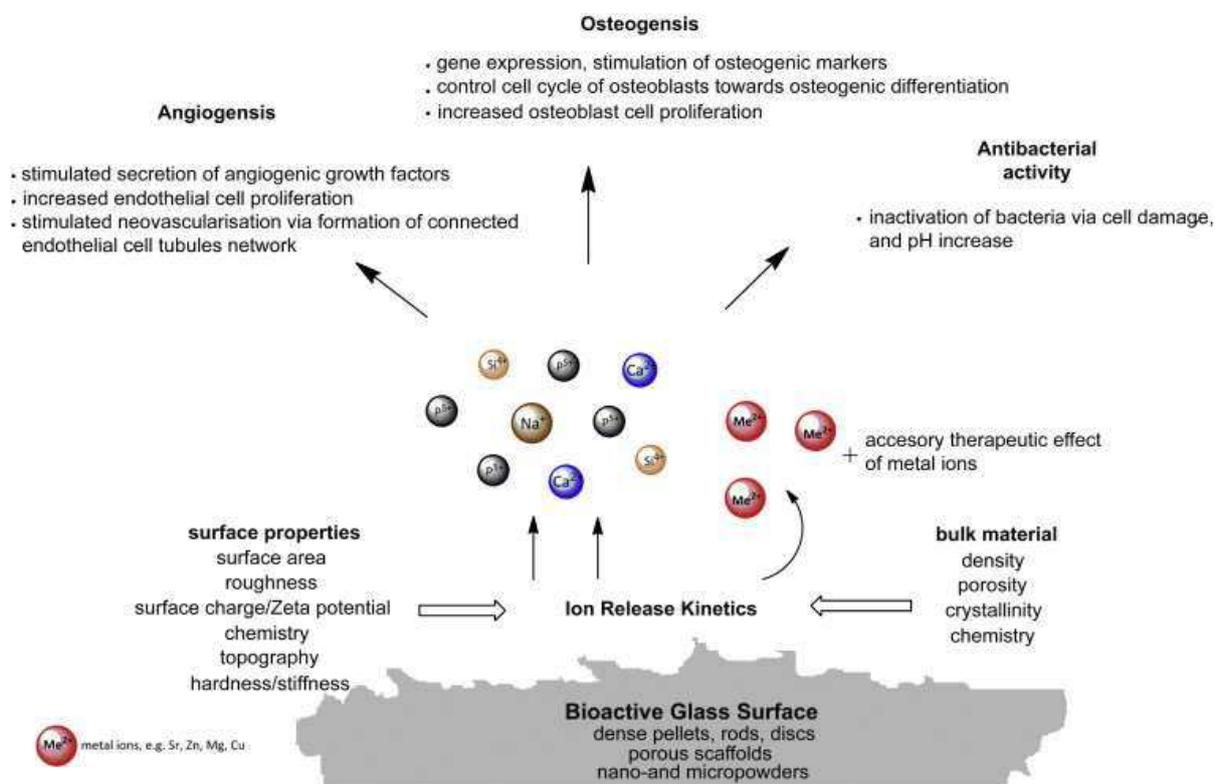


Figura 2.14 Panoramica della risposta biologica di un biovetro alla dissoluzione di prodotti ionici[16].

Alcuni MITA, come Ag, Cu, Co, Zn e Ga esplicano le loro proprietà angiogeniche inducendo sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti e hanno un ruolo fondamentale nei processi biologici e patologici; questa è una proprietà molto importante in quanto la vascolarizzazione dell'impianto è essenziale affinché l'intervento di sostituzione ossea abbia successo. Nel caso specifico del rame, oggetto di questo lavoro di tesi, questo ha mostrato un ruolo importante nei processi angiogenetici e una tendenza a stimolare la proliferazione di cellule endoteliali (all'interno delle quali è stata trovata una elevata concentrazione di Cu), ad aumentare la differenziazione osteogenica e, per concentrazioni di

ioni Cu^{2+} pari a 10^{-6} mol L^{-1} , inibisce l'attività osteoclastica, causa del riassorbimento osseo[8].

In Figura 2.15 è possibile osservare la crescita di vasi sanguigni dovuto al ruolo di TIIIs come rame e cobalto; il cobalto è conosciuto in quanto induce condizioni di ipossia, una insufficienza di ossigeno nei tessuti umani, e stabilizza l'HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor), un fattore responsabile della ricrescita ossea. Allo stesso modo il rame stimola i fattori HIF-1 e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), responsabile della crescita endoteliale.

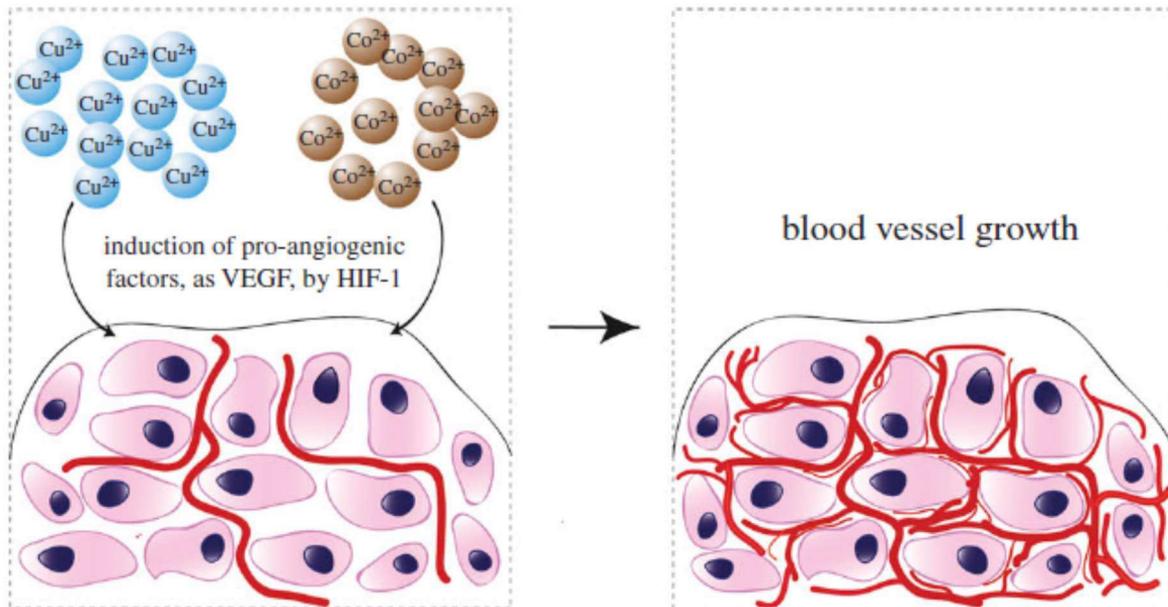


Figura 2.15 Proprietà angiogenica di ioni metallici mediante HIF-1 e VEGF [15].

L'adesione batterica sulla superficie dei biomateriali, che causa infezioni ed una scarsa integrazione con il tessuto osseo, può limitare la durabilità dell'impianto. A tal proposito vengono studiati dispositivi in grado di rilasciare farmaci per impedire la colonizzazione batterica sulla superficie dell'impianto in seguito all'intervento chirurgico e incrementare il potenziale pro-angiogenico.

In Tabella 2.4 nella pagina seguente vengono riportate le principali risposte biologiche *in vivo* e *in vitro* di alcuni dei principali MITA.

Tabella 2.4 Funzioni ed effetti biologici dei principali TIIs[8], [15].

Elemento	Funzioni e effetti biologici	Esperimenti condotti
Argento	Ha effetto antibatterico e si lega al DNA (impedendo la replicazione) o a gruppi solfidrilici degli enzimi dei batteri (inibendo la respirazione cellulare e impedendo il trasporto di sostanze attraverso la membrana cellulare	<i>In vitro/in vivo</i>
Rame	Stimola la proliferazione di cellule endoteliali umane. Complessi rame-tiolato presentano proprietà antinfiammatorie. Ha proprietà antibatteriche nei confronti dello <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Diminuisce il rischio di ischemia ai lembi della pelle e può indurre capsule vascolarizzate attorno a idrogeli formati da acido ialuronico reticolato. Induce un fattore di crescita endoteliale e stimola angiogenesi <i>in vivo</i> .	<i>In vitro/in vivo</i>
Zinco	Nella sintesi delle ossa è associato della crescita e al fattore di crescita IGF-1 e facilita la formazione di osso mediante l'aumento del differenziamento degli osteoblasti; l'interazione degli ioni Zn^{2+} con siti ad alta o bassa affinità di Na^+ può modulare l'eccitabilità neuronale attraverso un effetto bifasico di Zn^{2+} dipendente dalla concentrazione degli ioni che può attivare o inibire la corrente di sodio. Ha effetti antibatterici e inibisce la crescita batterica sul sito della ferita e ne velocizza la guarigione.	<i>In vitro/in vivo</i>
Stronzio	Piccole dosi di Sr^{2+} stimolano la formazione ossea mentre elevate dosi hanno effetti deterioranti per quanto riguarda la mineralizzazione dell'osso, attraverso una riduzione dell'assorbimento di Ca^{2+} dall'idrossiapatite; porta ad un incremento della differenziazione degli osteoblasti e riduzione della differenziazione degli osteoclasti e distruzione del citoscheletro.	<i>In vitro/in vivo</i>
Silicio	Elemento essenziale nella formazione e calcificazione di tessuto duro; Si osseo può indurre la precipitazione di idrossiapatite; $Si(OH)_4$ stimola la formazione di collagene I e la differenziazione osteoblastica	<i>In vitro/in vivo</i>
Calcio	Favorisce la proliferazione osteoblastica, differenziazione e mineralizzazione della matrice extracellulare; incrementa l'espressione del fattore di crescita IGF-I o IGF-II (insulina)	<i>In vitro/in vivo</i>

Questo lavoro di tesi si articola sullo studio della bioattività del vetro SBA3, appartenente al sistema Hench discusso nel paragrafo 1.2.1. drogato con ioni rame, le cui proprietà antimicrobiche e angiogeniche verranno ampiamente discusse nei Paragrafi 2.2.1 e 2.2.2.

2.4.2 Rame

2.4.2.1 Il rame nella storia

Il primo utilizzo del rame dalla civiltà umana viene fatto risalire al V-VI millennio a.C.[17], presumibilmente in quanto presente allo stato nativo (Figura 2.16) e non richiedeva fusione.



Figura 2.16 Cristallo di rame nativo [18].

Con la scoperta della fusione si iniziò a produrre manufatti a base di rame combinato con stagno scoprendo così il bronzo. I primi oggetti in bronzo sono stati ritrovati in Cina e Medio Oriente e risalgono al 3000 a.C. ma fino al II millennio a.C. il suo uso era sconosciuto in Europa. Il primo utilizzo del rame in campo medico è menzionato in un famoso manoscritto, lo *Smith Papyrus*, il più antico libro mai conosciuto. Questo testo medico Egizio, scritto tra il 2600 e il 2200 a.C. descrive l'utilizzo del rame per sterilizzare ferite sul petto e acqua potabile. Allo stesso modo Greci, Romani e Aztechi utilizzavano le leghe a base di rame per sterilizzare alimenti e curare mal di testa, vermi intestinali, bruciate, infezioni alle orecchie e per l'igiene in generale. La svolta ci fu nel XIX secolo, quando fu scoperto che i lavoratori di rame risultavano immuni all'epidemia di colera scoppiata a Parigi nel 1832. L'uso del rame come agente antimicrobico è continuato fino all'avvento degli antibiotici nel 1932. Nel 1983 uno studio ha documentato i benefici dell'utilizzare bronzo e ottone per i pomelli delle porte per prevenire la diffusione di microbi negli ospedali ma ha suscitato scarso interesse [19]. Solo recentemente si è sviluppato un intenso interesse nell'utilizzare il rame come materiale autodisinfettante.

2.4.2.2 Caratteristiche generali e proprietà biologiche

Il rame è un metallo di colore rosso che possiede stati di ossidazione +1 e +2, rispettivamente rameoso e rameico, mentre gli stati di ossidazione +3 e +4 sono più rari e sono definiti ioni cuprati. È l'unico tra i metalli puri ad uso industriale a presentare un potenziale elettrochimico positivo, che gli conferisce una scarsa tendenza a sciogliersi negli acidi se non quelli fortemente ossidanti come HNO₃ e H₂SO₄. È molto lavorabile in quanto duttile e malleabile ed ha una buona resistenza alla corrosione. Le leghe di rame più comunemente utilizzate sono Cu-Sn (bronzo) e Cu-Zn (ottone). Il rame possiede un buon comportamento antimicrobico in quanto è in grado di contrastare la proliferazione batterica.

Il rame ha un ruolo importante nella vita dell'uomo in quanto guida una serie di reazioni chimiche che supportano la salute e lo sviluppo umano. Una volta ingerito viene assorbito dall'intestino tenue attraverso la circolazione sanguigna e qui si lega a proteine vettore che lo trasportano al fegato, da cui viene distribuito al resto del corpo.

Oltre alle funzioni principali elencate in Tabella 1.4 il rame svolge diversi ruoli[20]:

- *Ruolo nel sistema nervoso* in quanto è responsabile della formazione di mielina, la sostanza necessaria a garantire una adeguata trasmissione dei segnali nervosi ed è coinvolto nella sintesi dei neurotrasmettitori, che consentono la comunicazione tra le cellule nervose;
- *Ruolo nel sistema immunitario* in cui è necessario per il mantenimento di un adeguato numero di globuli bianchi che distruggono i microrganismi estranei;
- *Ruolo nel sistema circolatorio* in cui consente di mantenere una adeguata elasticità in particolare di aorta e altre piccole arterie;
- *Ruolo nell'apparato cardiaco* poiché è essenziale nella sintesi del collagene che si trova nel tessuto connettivo e per questo motivo consente di mantenere tono e funzionalità muscolare del tessuto cardiaco;
- *Ruolo nell'apparato endoteliale*, essendo il collagene è la proteina più presente nel tessuto umano il rame permette di mantenere elasticità della pelle;
- *Ruolo nell'apparato scheletrico* poiché il collagene è anche responsabile della rigidità e resistenza meccanica delle ossa;
- *Ruolo nelle cellule* in cui neutralizza i radicali liberi che ucciderebbero le cellule sane;
- *Ruolo in gravidanza* in quanto nei primi mesi di gestazione il feto assorbe dalla madre il quantitativo di rame necessario per lo svolgimento dei ruoli precedentemente elencati dopo la nascita.

2.4.2.3 Tecniche di incorporazione ioni rame nel biovetro

In letteratura sono state studiate numerose tecniche di incorporazione del rame all'interno di un biovetro; di seguito vengono elencate le principali metodologie adottabili: tecnica *sol-gel*, *scambio ionico* e *incorporazione in scaffolds di biovetro*.

Incorporazione del rame con tecnica sol-gel

Come descritto in un lavoro del 2015[21] la tecnica sol-gel è costituita da due fasi (Figura 2.17):

1. Preparazione di una soluzione nella quale si formano le particelle di soluto, il *sol*;
2. Aggregazione delle particelle e formazione di una sospensione colloidale, detta *gel*, mediante idrolisi e condensazione.

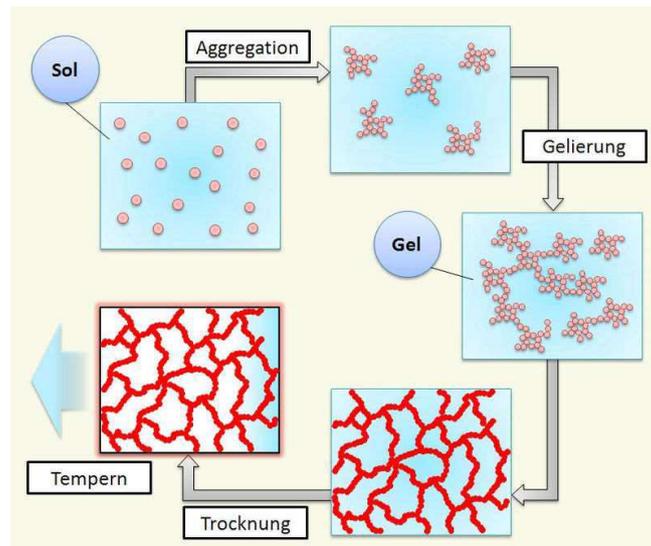


Figura 2.17 schematizzazione del processo sol-gel[22].

Questo tipo di processo permette di ottenere una elevata concentrazione di ioni metallici ed è alternativo al processo di fusione e colata, rispetto al quale presenta una serie di vantaggi, tra cui:

- Purezza e omogeneità più elevata;
- Temperature di lavorazione più basse;
- Ampia gamma di composizioni bioattive realizzabili;
- Elevata area specifica;
- Elevata velocità di formazione di idrossiapatite.

I precursori utilizzati in questo lavoro per ottenere la composizione vetrosa voluta sono il tetraetil ortosilicato (TEOS), il trietilfosfato (TEP), il nitrato di sodio (NaNO_3), il nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e il nitrato di rame triidrato ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) o nitrato di zinco tetraidrato nel caso ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) di drogaggio con ioni zinco.

Il sol viene ottenuto dall'idrolisi del TEOS aggiungendo gli altri reagenti in modo sequenziale e in costante mescolamento fino ad ottenere una composizione specifica. La miscela ottenuta viene mantenuta per 3h a temperatura ambiente per la gelificazione. Per la caratterizzazione del vetro il gel è stato essiccato, macinato e sottoposto a trattamento termico in atmosfera ossidante a 700°C per consentire la riduzione degli ioni rame da Cu^+ a Cu^0 . Infine è stato nuovamente macinato manualmente e setacciato ($<75 \mu\text{m}$). Da analisi condotte su questo vetro caricato con ioni rame o ioni zinco è stata osservata una inibizione nella formazione di uno strato di apatite, fortemente dipendente dal tipo di vetro, di ioni metallici e

dalla concentrazione di questi ultimi. Il biovetro tal quale ha mostrato proprietà citotossiche, mentre il biovetro drogato si è rivelato bioattivo e non citotossico, arrivando alla conclusione che questo biovetro possa essere un potenziale biomateriale terapeutico e antibatterico grazie alla proprietà angiogenica del rame e osteoconduttiva dello zinco.

Uno altro studio condotto da *Aina et al.*[23] su un biovetro silicato-fosfato caricato con rame in due stati di ossidazione diversi: Cu^{2+} (noto come SGCu(ox)) e Cu^0 (SGCu(red)) in forma di nanoparticelle. La bioattività di questo vetro è stata testata in termini di precipitazione di uno strato di idrossiapatite/idrossicarbonatoapatite (HA/HCA) (Figura 2.18) e si è dimostrata quasi invariata, con un leggero ritardo nella formazione dello strato di HA/HCA rispetto al biovetro non caricato nel caso di SGCu(ox) e una inibizione della deposizione dello strato nel caso di SGCu(red).

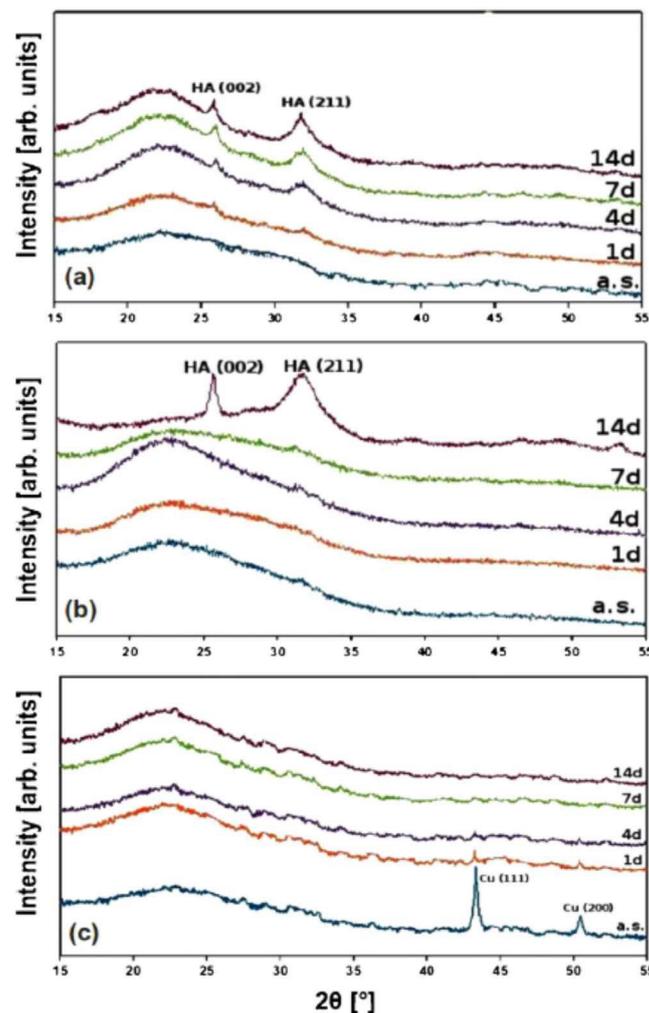


Figura 2.18 Analisi XRD sull'effetto della reazione in SBF di: (a) vetro tal quale, (b) SGCu(ox) e (c) SGCu(red)[23].

Il ritardo nella formazione dello strato di HA/HCA è dovuto al lento rilascio di ioni Cu^{2+} , che sono presenti in maggior quantità nel bulk del vetro rispetto alle nanoparticelle confinate in superficie; la presenza delle nanoparticelle sulla superficie è indice delle proprietà antibatteriche del rame, utilizzato in molte applicazioni biomediche, in particolare come agente antibatterico, ma anche per legare le biomolecole sulla superficie del vetro; inoltre, il

rilascio di rame in soluzione sia nel caso di Cu^{2+} che nel caso di nanoparticelle può agire come battericida nel sito di impianto.

Incorporazione del rame con scambio ionico

Lo scambio ionico è un processo reversibile che consiste nello scambio di ioni tra una sostanza chiamata *scambiatore* (cationico o anionico a seconda dello ione che è in grado di scambiare) e una soluzione acquosa[24] o un bagno di sali fusi; questa tecnica è un trasferimento di massa guidato da gradienti di concentrazione, in cui gli ioni presenti sulla superficie del vetro (generalmente ioni monovalenti come Na^+) diffondono fuori dalla superficie e vengono sostituiti con ioni diversi provenienti o da un bagno di sali fusi o da soluzione acquosa (contenente Sali di rame a differenti concentrazioni).. Il drogaggio del vetro con scambio ionico induce modifiche nel vetro dal punto di vista morfologico, rendendolo più rugoso; la bioattività del vetro, in termini di crescita di uno strato di idrossiapatite a contatto con soluzione fisiologica simulata (SBF) non è influenzata dalla presenza di rame sulla superficie, a differenza di alcuni studi in letteratura in cui veniva utilizzata la tecnica sol-gel per l'incorporazione del rame; questo può essere dovuto al basso contenuto di rame che si ottiene nel caso dello scambio ionico e alla sua presenza solo in un sottile strato superficiale. Questo, con la rugosità, fa sì che il biovetro sia in grado di rilasciare gli ioni coinvolti nel meccanismo di bioattività.

Polveri di biovetro di composizione SBA2 e SBA3 (utilizzati in questo lavoro di tesi), ottenute precedentemente con tecnica di fusione e tempra, sono state sottoposte a scambio ionico in soluzione acquosa contenente diversi sali di rame in concentrazioni diverse (0,01M, 0,05M e 0,1M):

- Nitrato di rame triidrato ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,01M, 0,05M e 0,1M;
- Cloruro di rame diidrato ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,01M, 0,05M e 0,1M;
- Acetato di rame ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,01M e 0,05M;
- Solfato di rame (CuSO_4) 0,01M e 0,05M.

In tutti gli esperimenti 2g di polvere di vetro sono stati inseriti in una soluzione di 20ml e mantenuti in agitazione termica a 37°C per 1h per agevolare lo scambio tra gli ioni rame e gli ioni degli ossidi modificatori del vetro (Na^+ e Ca^{2+}); la soluzione è stata rimossa e le polveri, dopo essere state sciacquate con acqua bidistillata, sono state filtrate utilizzando dischi di carta filtro ed essiccate a 60°C per 24h.

Nel caso in cui lo scambio ionico venga effettuato in *bagno di sali fusi*, come in uno studio condotto da *Newby et al.*[25] in cui uno scaffold di BIoglass[®] è stato drogato con ioni rame, il procedimento consiste nell'inserimento di un bagno di sali di nitrato di argento (AgNO_3) e nitrato di sodio (NaNO_3) in un crogiuolo ceramico, posto a sua volta all'interno di un forno a 400°C , temperatura al di sopra di quella di fusione di entrambi i sali (rispettivamente 210°C e 310°C), in modo tale da assicurarne la completa fusione. Gli scaffolds di biovetro sono stati immersi nel bagno fuso per 30 minuti e successivamente rimossi e posti a raffreddare a temperatura ambiente; una volta raffreddati sono stati sciacquati con acqua bidistillata per eliminare ogni traccia di nitrato. Ciò che si è osservato, in seguito a scambio ionico in bagno di sali fusi è il raggiungimento di un valore di saturazione, oltre il quale l'argento non può più essere scambiato all'interno dello scaffold (tra i 15 e i 30 minuti dall'inizio dell'immersione); test di coltura *in vitro* hanno evidenziato che la bassa concentrazione di argento raggiunta supporta la viabilità cellulare in maniera paragonabile allo scaffold di biovetro tal quale, mantenendo la bioattività del vetro.

Il *processo di scambio* è legato ad una serie di fattori [26]:

- Velocità delle reazioni di scambio praticamente istantanee;
- Diffusione della soluzione all'interno dei granuli del vetro e quindi porosità di quest ultimo;
- Ioni scambiati dal vetro alla soluzione.

Lo stadio controllante del processo di scambio è la diffusione e la sua velocità è governata da una serie di parametri tra cui la velocità di agitazione, la temperatura (che aumenta la mobilità ionica), la dimensione dei granuli. Granuli più piccoli, con maggior area specifica, presentano una velocità di scambio maggiore a parità di volume di vetro.

I due fenomeni controllanti sono la diffusione dello ione da scambiare nel film liquido e la diffusione dello ione all'interno della particella di vetro; per stabilire quale di questi due sia lo stadio controllante viene impiegato un parametro, P , così definito:

$$P = \frac{\pi^2 D_r \delta [R - Me]}{3 D_0 r [Me^+]} \quad (2.11)$$

Dove D_r e D_0 sono i coefficienti di diffusione interparticellare dello ione Me^+ nel film liquido, δ è lo spessore del film liquido e r è il raggio delle particelle di vetro espresso in cm.

Valutando il parametro P , possono verificarsi tre casi [26]:

- $P > 1$: lo stadio controllante è la diffusione nel film liquido;
- $P < 1$: lo stadio controllante è la diffusione intraparticellare;
- $P = 1$: entrambe i fenomeni diffusivi avvengono alla medesima velocità.

Nel caso specifico di un vetro soda-calcico caricato con ioni rame, lo scambio ionico Cu-Na può essere rappresentato in 5 punti[27]:

1. Il rame penetra nel vetro in forma Cu^+ e sostituisce gli ioni Na^+ della matrice;
2. Alcuni degli ioni monovalenti Cu^+ vengono convertiti in ioni Cu^{2+} all'interno del vetro;
3. Il coefficiente di diffusione dei cationi Cu^{2+} è molto piccolo per cui il contributo di ioni Cu^{2+} allo scambio ionico è limitato;
4. Una parte degli ioni rame possono essere convertiti a Cu_2O o cluster di rame metallico;
5. La formazione di ioni Cu^{2+} e cluster metallici può essere vista come il risultato dell'equilibrio tra Cu^+ e gli altri stati del rame.

Lo scopo di un lavoro condotto da Gonella *et al.*[28] è stato quello di valutare il profilo di concentrazione del rame una volta introdotto per scambio ionico alcalino in un vetro soda-calcico e, in seguito a ciò, si è notato che questo dipende da entrambe le specie ioniche che si vanno a formare, ovvero Cu^+ e Cu^{2+} , ma che presentano profili di concentrazione differenti e sono osservabili in Figura 1.19 dove viene mostrato l'andamento *gaussiano* del profilo di concentrazione del Cu^+ e *erfc* (funzione degli errori complementari) nel caso del Cu^{2+} .

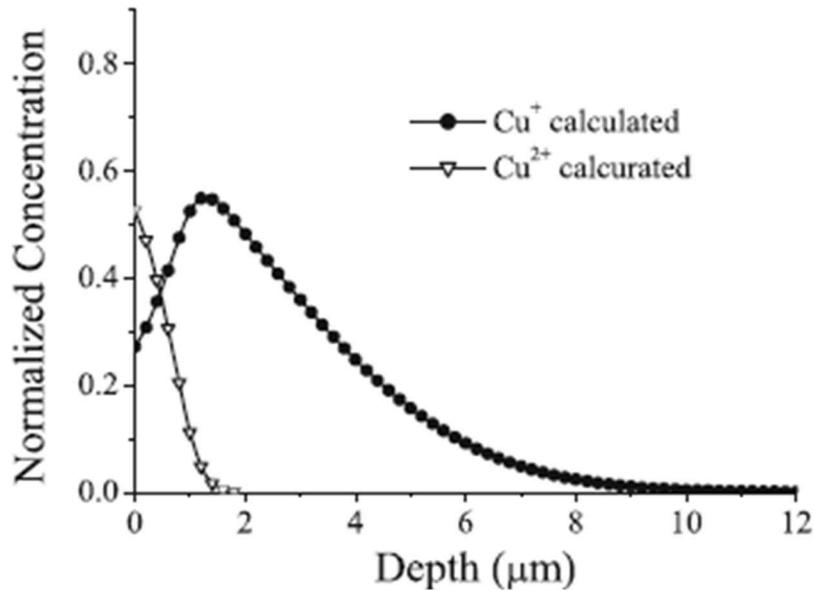


Figura 1.19 Andamento della concentrazione normalizzata degli ioni Cu^+ (gaussiano) e Cu^{2+} (erfc) in funzione dello spessore del biovetro[28].

Da questo studio sono state dedotte le seguenti conclusioni:

- L'interdiffusione di ioni Cu^+ , Cu^{2+} e Na^+ è governata dalla correlazione tra flussi ionici e dà origine ad una distribuzione del rame che è fortemente dipendente dai parametri di trasporto di tutte le specie coinvolte nel processo;
- Il profilo di diffusione del Cu^+ mostra un massimo sotto la superficie e questo comportamento è tipico dei processi di scambio che coinvolgono più specie ioniche;
- Il coefficiente di diffusione dipende dalla concentrazione ionica locale e ciò è in relazione con la modifica della struttura locale;
- La migrazione delle due specie ioniche di rame è governata dalla dinamica di diffusione e non dalla chimica degli stati di equilibrio.

Incorporazione del rame in scaffolds di biovetro

Uno studio effettuato nel 2012 da *Wu et al.*[29] ha descritto le proprietà che si possono ottenere nel caso di scaffolds mesoporosi di biovetro caricati con ioni rame (Cu-MBGs), ovvero di combinare capacità di angiogenesi con osteostimolazione e proprietà antibatteriche mediante la stimolazione del fattore HIF-1 (che risponde alla diminuzione di apporto di ossigeno alla cellula) e del fattore di crescita endoteliale VEGF. Viene preparato uno slurry contenente il copolimero a blocchi Pluronic P123, il tetraetil ortosilicato (TEOS), il nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), il trietil fostato (TEP) e l'acido cloridrico (HCl) in soluzione di etanolo; lo slurry viene poi posto in agitatore a temperatura ambiente per 24h. Contemporaneamente si prepara uno scaffold a partire da un template in schiuma poliuretana, che presenta una struttura simile a quella dell'osso trabecolare. Lo scaffold viene per prima cosa immerso per tre minuti in uno slurry contenente particelle di vetro biattivo in modo tale che la sospensione rivesta la superficie della spugna; segue poi un trattamento termico per favorire la decomposizione della spugna poliuretana e la

densificazione del vetro evitandone la cristallizzazione. Il vetro infine viene immerso nello slurry contenente gli ioni rame e viene sottoposto ad evaporazione a temperatura ambiente; una volta seccato viene calcinato a 650°C ottenendo uno scaffold di vetro mesoporoso caricato con ioni rame.

3. Infezioni

Il presente capitolo fornisce una breve descrizione delle infezioni post operatorie in base alla classificazione di Widmer e ai fattori di rischio principali. Si passa poi al principio con cui si sviluppano le infezioni, ovvero attraverso la formazione di un biofilm, uno strato di adesione di batteri Gram-positivi (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) e Gram-negativi (e.g. *Escherichia coli*, e *P. aeruginosa*). Successivamente viene descritto in particolare il batterio *Staphylococcus aureus*, uno dei principali ceppi batterici responsabili delle infezioni dei giunti protesici (PJIs) e come viene esplicitata la resistenza di questi batteri agli antibiotici. Si conclude poi con l'esposizione delle due principali proprietà del rame, utilizzato in questo lavoro di tesi: antibatteriche e angiogeniche.

3.1 Infezioni nel tessuto osseo

L'infezione cronica dell'osso è considerata una infezione distruttiva della struttura ossea connessa a necrosi del tessuto stesso. Gli agenti patogeni più frequenti sono quelli Gram-positivi come *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ed *Enterococcus faecalis*, ma non sono rari fenomeni di contaminazione anche da parte di batteri anaerobi e di agenti patogeni Gram-negativi come *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* l'*Acinetobacter baumannii*.

La figura 3.1 rappresenta un grafico a torta dei principali agenti patogeni responsabili di infezioni periprotetichiche [30]. Dall'immagine è possibile notare che i due ceppi principali sono quelli dello *Staphylococcus aureus* (34%) e dello *Staphylococcus epidermidis* (32%). Esistono poi altri stafilococchi Gram-negativo, noti come CNSs (Coagulase Negative Staphylococci) tra cui lo *Staphylococcus hominis* e lo *Staphylococcus haemolyticus* che contribuiscono per il 13%. In ordine di prevalenza seguono poi la *Pseudomonas aeruginosa* (8%) e l'*Enterococcus faecalis* (5%).

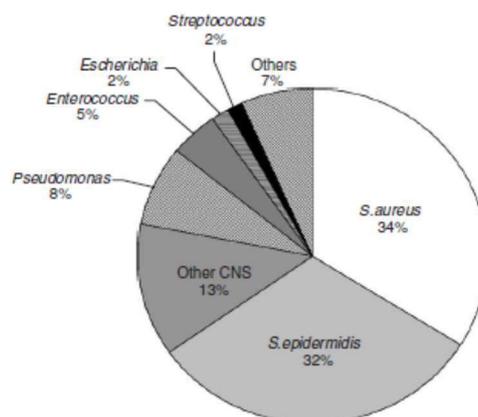


Figura 3.1 Frequenza dei principali agenti patogeni responsabili di infezioni periprotetichiche [30].

Le infezioni associate alle protesi ortopediche possono essere definite secondo la classificazione di Widmer [31]:

- *Infezione di “Tipo 1”* acuta del sito chirurgico causata solitamente da *Staphylococcus aureus* o da Stafilococchi Gram-negativi che insorge 2- 4 settimane dall’intervento;
- *Infezione di “Tipo 2”* cronica tardiva che consiste in un allentamento della protesi e formazione di fluido e insorge tra i 16 mesi e i 2 anni dall’impianto ad opera di *Staphylococcus aureus*, Stafilococchi Gram-negativi ma anche batteri anaerobi come *Propionibacterium*;
- *Infezione di “Tipo 3”* di natura ematica che si verifica 2 anni dopo l’impianto dovuta a disseminazione ematica a seguito di batteriemia transiente ad opera di *Staphylococcus aureus* e Stafilococchi Gram-negativi.

L’infezione può colpire ogni tipo di osso nel corpo e può essere dovuta alla conseguenza di un trauma ad alta energia (sport, incidenti), a procedure chirurgiche o a disordini metabolici come artropatie (artrite reumatoide, *lupus erythematosus* sistemico), farmaci, diabete tipo-1, precedenti infezioni dei giunti, malnutrizione, tumori maligni e emofilia. Si possono presentare tre casi:

- *Pazienti con Elevato Carico di Contaminazione* si riferisce ad una durata elevata dell’intervento chirurgico come importante fattore nello sviluppo di infezioni e in particolar modo tempi superiori a 150 minuti sono associati ad una maggior velocità di sviluppo di infezioni;
- *Pazienti con Storia di Contaminazione* si riferisce a pazienti che hanno subito precedenti infezioni articolari;
- *Pazienti con Immunità Ridotta* si riferisce a tutte quelle classi di patologie precedentemente elencate come artrite reumatoide, diabete mellito, trapianti di organi, iniezioni di steroidi, malnutrizione (anoressia e obesità) e emofilia.

In generale l’insorgenza di infezioni sembra essere associato ad una serie di fattori tra cui una lunga degenza ospedaliera, un trattamento antimicrobico a lungo termine e rischi post operatori.

L’incidenza di infezione risulta particolarmente elevata in seguito ad interventi di revisione protesica, con percentuali quali il 2% nell’anca, l’ 1-2% nel ginocchio, il 4% nella spalla. Il verificarsi di infezioni nelle ossa e tessuti di giuntura è dovuto alla scarsa abilità degli agenti antibatterici usati ad oggi (antibiotici) di raggiungere le zone interessate, limitando l’effettivo trattamento degli antibiotici sistemici. L’uso frequente di antibiotici ha portato ad un’ aumento della resistenza batterica e, secondo la World Health Organization, nel 2011, ha portato a 25 000 morti l’anno in tutto il mondo e costi di circa €1.5 miliardi per l’Unione Europea. Stime dell’incidenza annua di infezioni ossee o delle articolazioni in Europa spaziano tra i 30 e i 60 ogni 100 000 abitanti [8].

Se un piccolo quantitativo di batteri aderisce e colonizza sul materiale, l’impianto protesico risulta a rischio in quanto aderendo sulla superficie diventa sessile e quindi risulta in grado di muoversi nell’intorno e di formare un biofilm (Paragrafo 3.1.1.). Se alcuni batteri nel biofilm

si convertono in batteri planctonici, in grado di fluttuare nei fluidi biologici, l'infezione si trasmette ai tessuti adiacenti. In queste circostanze gli antibiotici somministrati intra vena o oralmente colpiscono i batteri planctonici presenti nei tessuti molli o nell'osso ma non le forme sessili presenti all'interno del biofilm.

Uno dei parametri che influenzano la velocità di adesione dei batteri è la rugosità superficiale [32], che incrementa la forza di adesione e ne favorisce l'attaccamento (in 2-4h). Uno studio [33] condotto su batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* a contatto con tre tipi di superfici (polimerica (acido polilattico), in composito polimerico HA/acido polilattico (PLLA) e metallica) ha mostrato una preferenza in termini di adesione batterica da parte dello *Staphylococcus aureus* per la superficie metallica e per il composito polimerico rispetto al polimero tal quale, mentre lo *Staphylococcus epidermis* non ha mostrato alcun tipo di preferenza.

Una infezione dovuta all'adesione batterica comporta una diminuzione dell'afflusso di sangue al tessuto osseo riducendo, di conseguenza, il trasporto di farmaci via circolazione sanguigna e rendendo quindi difficoltosa l'azione degli antibiotici. Per questo motivo, nel 1969 è stata introdotta l'aggiunta di agenti antimicrobici al cemento osseo acrilico come soluzione alle infezioni, quando *Lodenkämper e Buchholz* [34] hanno iniziato uno studio sul cemento osseo a base di polimetilmetacrilato (PMMA) per valutarne la sua idoneità come sistema a rilascio di farmaco. In laboratorio *Lodenkämper* ha osservato che alcuni agenti antimicrobici sono stati rilasciati a lungo termine mentre altri no; la Gentamicina, ad esempio, si è mostrata molto efficace nel garantire alti livelli di concentrazione a lungo termine. L'adozione di un cemento osseo acrilico caricato con antibiotico ha ridotto la velocità di infezione in seguito ad impianto primario di articolazioni artificiali dal 7% a meno dell'1%.

Alcuni studi [35] hanno mostrato che il rilascio locale di antibiotico come mezzo per aumentare la concentrazione locale degli antibiotici minimizza la tossicità sistemica e eventuali effetti collaterali; infatti il PMMA caricato con antibiotici presenta aspetti negativi come tossicità sistemica dovuta alla elevata concentrazione di antibiotico che eluisce dal cemento, a reazioni allergiche all'antibiotico utilizzato, allo sviluppo di batteri resistenti al farmaco e nondimeno al costo. Per queste ragioni il cemento osseo deve essere caricato con un quantitativo di antibiotico opportunamente dosato. Inoltre, alcuni test *in vitro* hanno evidenziato che l'aggiunta di una quantità di antibiotico in polvere al di sopra di una concentrazione critica o l'aggiunta di antibiotico in fase liquida portano ad una diminuzione dello sforzo a compressione e dello sforzo di taglio del cemento, fattore che influenza la nucleazione di cricche in condizioni di carico dinamico prolungato. Un altro fattore che influenza le proprietà meccaniche del cemento osseo consiste nella scelta del metodo da adottare per inglobare l'antibiotico all'interno del cemento [36] e in particolar modo se il processo viene condotto sottovuoto (a 550mmHg) o in centrifugazione (a 2100 giri/min): sottovuoto si ottiene una riduzione della porosità del 70% (dovuta ad una riduzione dell'ingresso di aria nel cemento) ed un aumento della trazione pari al 10-20%; in centrifugazione la porosità si riduce del 45% lasciando pori piccoli ed uniformi, e la trazione aumenta del 15-30%. Ad esempio, uno studio [37] condotto sul cemento osseo Simplex P tal quale e caricato con tobramicina adottando le tecniche di mescolamento manuale e di centrifugazione ha mostrato che la vita a fatica del cemento osseo non viene ridotta significativamente dalla presenza dell'antibiotico, ma è influenzata dalla tecnica utilizzata per la preparazione del cemento e, in particolare, la vita a fatica è risultata maggiore nel caso in cui sia stata adottata la centrifugazione rispetto al mescolamento manuale.

Alcuni vetri bioattivi a base silice risultano essere un buon compromesso alle limitazioni rappresentate dal PMMA caricato con antibiotico, in quanto sono sostitutivi ossei con proprietà osteoconduttive, osteostimolative, angiostimolative e antibatteriche; un esempio è dato dal biovetro BAG-S53P4 (BonAlive[®]), appartenente al sistema Hench, è stato recentemente proposto nel trattamento difetti di cavità come la chirurgia di oblitterazione del mastoide [13] e nel trattamento dell'osteomielite cronica in impianti spinali [12]; questo si è mostrato un buon e ben tollerato sostitutivo osseo che permette di adottare una procedura *one-stage*, a differenza del caso in cui si utilizzi il PMMA caricato con antibiotico per il quale è prevista una procedura *two-stage*, con conseguente asportazione dell'impianto protesico qualora insorgesse un'infezione. Dunque, l'utilizzo dei biovetri come alternativa consente alcuni vantaggi tra cui l'adozione di un trattamento economicamente più conveniente e meno invasivo e la riduzione della durata del ricovero dei pazienti.

3.1.1 Biofilm

Il termine biofilm descrive una comunità strutturale di cellule batteriche (microcolonie) racchiuse in matrici polimeriche (polisaccaridica "slime") extracellulari autoprodotte e aderenti ad una superficie inerte o vivente all'interfaccia con una fase liquida. Spesso le infezioni batteriche associate all'uso di dispositivi medici impiantabili sono causate dalla formazione di questo biofilm in quanto i batteri hanno la tendenza, in linea generale, ad aderire ad una superficie inerte o necrotica come biomateriali o tessuto osseo morto (Figura 3.2).

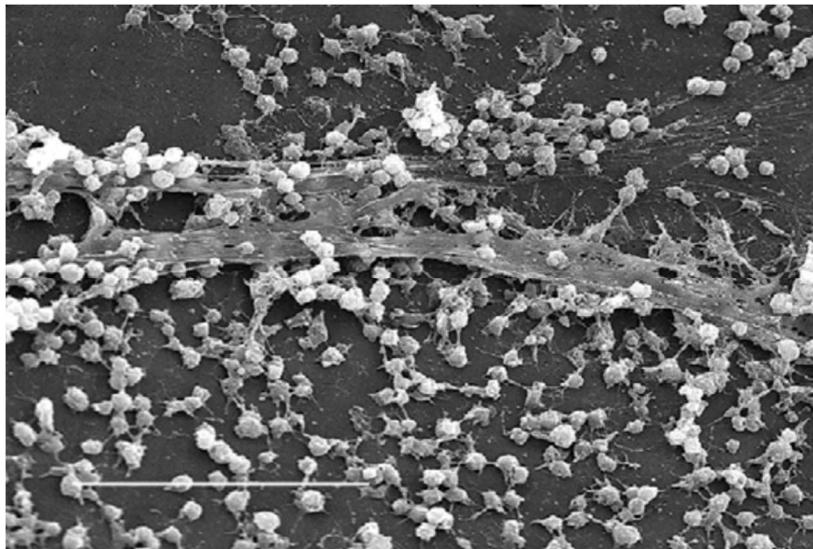


Figura 3.2 Biofilm di *Staphylococcus epidermidis* sulla superficie di un pacemaker [38].

In Tabella 3.1 sono elencate le principali specie batteriche che è possibile trovare sulla superficie di dispositivi medici impiantati.

Tabella 3.1 Biofilm su dispositivi medici [39].

Dispositivi contaminati	Biofilm (specie batterica principale)
Dispositivi ortopedici	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Protesi di vari organi	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Valvole cardiache meccaniche	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Inneschi vascolari	Cocchi Gram-positivi
Dispositivi endotracheali	Flora batterica e fungina mista
Dispositivi intrauterini	<i>Actinomyces israelii</i>
Cateteri urinari	<i>E. coli</i> e altri bacilli Gram-negativi
Lenti a contatto	Cocchi gram-positivi e <i>P. aeruginosa</i>
Cateteri venosi	<i>S. epidermidis</i>
Dispositivi per dialisi peritoneale	Flora batterica e fungina mista

Il biofilm dovuto all'adesione batterica potrebbe impedire la corretta prestazione del dispositivo biomedico e portare alla rimozione dell'impianto. Il ciclo di crescita del biofilm è rappresentato in Figura 3.3 e si suddivide in quattro stadi [39][40][41]:

- *Iniziazione*: i batteri aderiscono sulla superficie del dispositivo;
- *Maturazione*: formazione di microcolonie che col tempo diventa inerte agli antibiotici e alla reazione di fagociti e anticorpi;
- *Mantenimento*: i fagociti sono attratti dal biofilm ma la fagocitosi è impedita e si il conseguente rilascio di enzimi proteolitici e sviluppo di superfici antiadesive;
- *Dissoluzione* (dispersione): gli enzimi proteolitici danneggiano il tessuto che circonda il biofilm e batteri in forma planctonica si staccano dalla superficie e vanno a colonizzare nuove aree causando infezioni croniche.

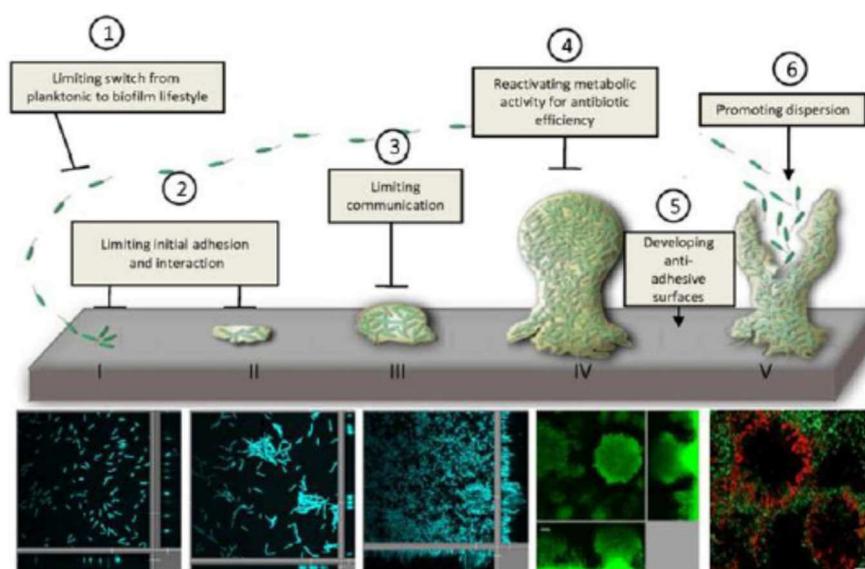


Figura 3.3 Rappresentazione schematica degli stadi di formazione dello strato di biofilm, che includono iniziazione (I), maturazione (II e III), mantenimento (IV) e dissoluzione (V) [40].

Le funzioni che svolge il biofilm sono vaste, da agire come barriera protettiva contro i fagociti e prevenire il distacco delle cellule in condizioni normali di flusso a lavorare come una barriera di permeabilità selettiva, come è possibile osservare in Figura 3.4, in cui viene mostrata, in seguito ad adesione batterica, la produzione del glicocalice [42], uno strato esocellulare in polisaccaride, che aderisce preferenzialmente sulla superficie del biomateriale e del tessuto compromesso. Il biofilm, inoltre, resiste alla penetrazione degli antibiotici e provvede a proteggere da anticorpi e macrofagi.

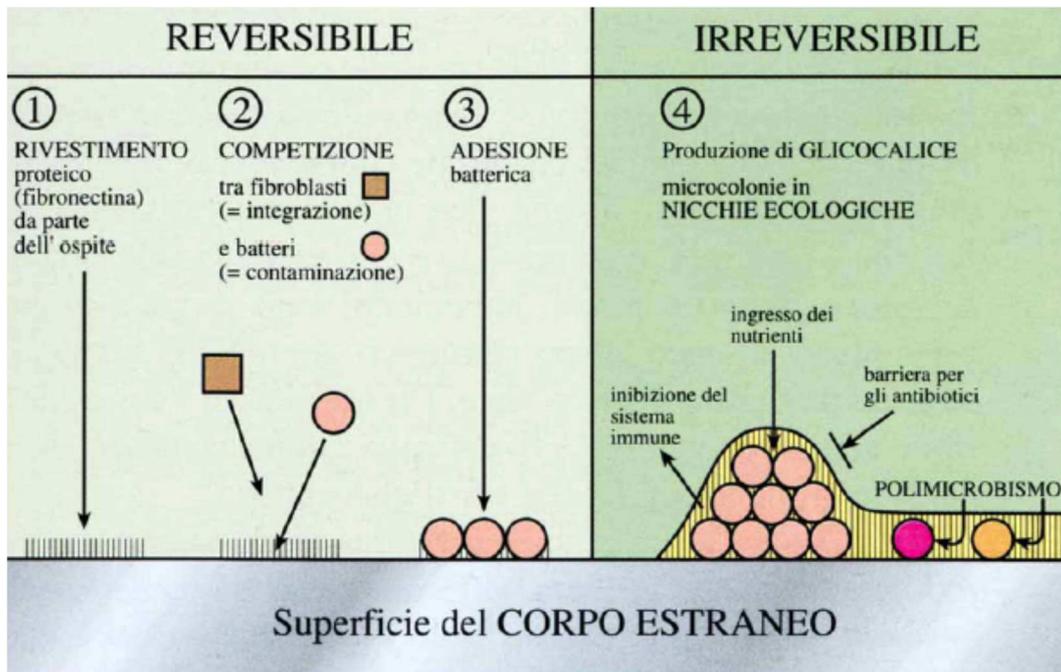


Figura 3.4 Adesione batterica reversibile e irreversibile [42].

I batteri, essendo inglobati nel biofilm, si trovano in condizione di parziale anaerobiosi e di scarso apporto nutritivo, che assicura una lunga sopravvivenza e una maggior resistenza agli antibiotici. I primi batteri che colonizzano sulla superficie vi aderiscono formando dei deboli legami di Van der Waals (reversibili), seguiti poi da proliferazione dovuta all'arrivo di altre cellule con conseguente formazione di una barriera protettiva (irreversibile).

3.1.2 Staphylococcus aureus

Lo *Staphylococcus aureus* (Figura 3.5) è un batterio Gram-positivo, di forma sferica e con un diametro compreso tra 0.5 e 1 μm [43]. Questo batterio è una delle cause principali di PJI (Prosthetic Joint Infection); poiché i dispositivi protesici sono avascolari e l'interfaccia osso-protesi è scarsamente vascolarizzata le infezioni di giunti protesici sono difficili da trattare qualora l'infezione fosse già in atto e generalmente richiedono la rimozione della protesi per essere totalmente curate. I tipi di infezione che possono verificarsi sono due:

- *Infezioni precoci* di giunti protesici (normalmente a 30 giorni dall'impianto) si presentano normalmente in forma di ferite profonde. In questi casi il paziente ha febbre e sono presenti infiammazione e versamento nel giunto;
- *Infezioni croniche* sono invece più acute e talvolta si verificano con un leggero dolore cronico e scarsa funzionalità ma non vi sono segni evidenti di infezione. Emartrosi, gotta, debris metallici che inducono sinovite (infiammazione cronica della membrana sinoviale che può estendersi fino a cartilagine e tendini) possono essere facilmente scambiati per PJIs. L'unico modo per diagnosticare una PJI dovuta a *Staphylococcus aureus* è isolare l'organismo da campioni di fluido presenti nel giunto o da campioni di tessuto periprotetico e analizzare le culture positive.

I danni che può causare questo batterio sono il risultato di due meccanismi differenti:

- Abilità a moltiplicarsi e diffondersi nei tessuti circostanti;
- Abilità a produrre enzimi extracellulari e tossine.

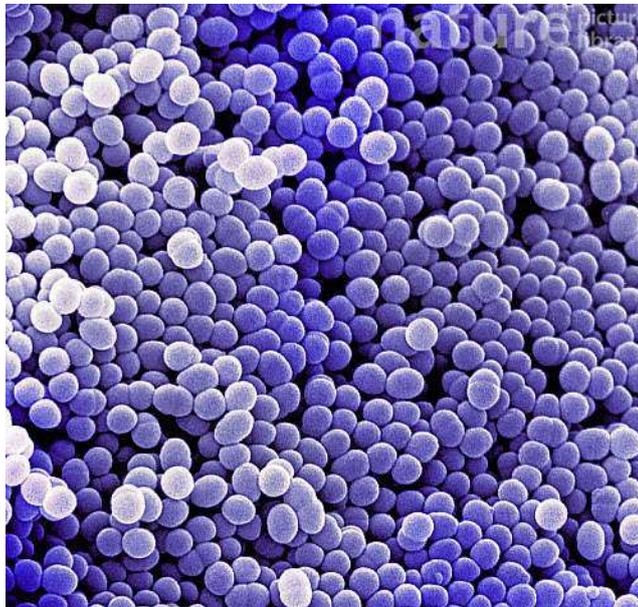


Figura 3.5 Immagine SEM del batterio *Staphylococcus aureus* [44].

Questo ceppo batterico si diffonde nell'uomo attraverso il contatto diretto con un individuo infetto, inalando goccioline disperse attraverso la tosse o gli starnuti o usando un oggetto contaminato. Si trova nell'aria, nella polvere, nelle acque di rifiuto, sulla pelle, sui cibi e nelle vie respiratorie [45]. In generale i batteri possono spostarsi all'interno dell'organismo mediante il circolo ematico e infettare qualunque organo, in particolare le valvole cardiache, causando *Endocardite* e le ossa, causando *Osteomielite*. Tutto questo avviene grazie alla tendenza che questi batteri hanno ad accumularsi sui dispositivi medici presenti nell'organismo come valvole cardiache, protesi artificiali, pacemaker e cateteri.

Uno studio condotto da *Montanaro et al.* [46] ha evidenziato che lo *Staphylococcus aureus*, anche se in entità minore rispetto allo *Staphylococcus epidermidis*, ha una tendenza a formare biofilm, anche se il meccanismo di adesione batterica sembrerebbe essere maggiormente caratterizzato dalla tendenza dello stesso *Staphylococcus aureus* a formare un legame con le proteine presenti nella matrice extracellulare.

Inoltre, alcuni ceppi di questo batterio, hanno sviluppato una resistenza agli antibiotici beta-lattamici, tra cui le penicilline, che sono utilizzate nella cura di numerose infezioni. Questo batterio è noto con il nome di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA).

3.1.3 Resistenza dei batteri agli antibiotici

Uno dei principali problemi relativi ai batteri riguarda la loro antibiotico-resistenza. I comportamenti che favoriscono la resistenza sono [47]:

- L'abitudine di utilizzare antibiotici per trattare le infezioni virali, dove non hanno alcuna utilità;
- Prendere farmaci in maniera diversa da come scritto nella prescrizione medica, a dosi inferiori o per un tempo differente da quello raccomandato;
- L'abitudine in molti ospedali di prescrivere a scopo preventivo antibiotici.

La resistenza agli antibiotici può contribuire al fallimento terapeutico e ciò avviene in quanto i microorganismi hanno la proprietà di modificare il proprio patrimonio genetico, sia attraverso mutazioni spontanee sia attraverso scambio genetico tra specie diverse. Questa possibilità consente ai batteri di adattarsi a qualsiasi tipo di ambiente, incluso quello dominato dagli antibiotici e sono in grado di eliminare l'azione letale degli antibiotici seguendo vie diverse [48]:

- *Produzione di enzimi inattivanti*: questi enzimi distruggono l'anello lattamico dell'antibiotico annullandone totalmente la sua attività antibatterica. Nei Gram-positivi l'enzima viene liberato nell'ambiente impedendo il contatto del farmaco con il batterio, nei Gram-negativi le lattamasi (responsabili della resistenza agli antibiotici β -lattamici come la penicillina) avviene nello spazio periplasmico dove l'antibiotico viene neutralizzato;
- *Alterazione della permeabilità dell'involucro*: la resistenza è intrinseca e dipende dalla idrofobicità o idrofilicità degli antibiotici e quindi dalla facilità a penetrare nella parete;
- *Alterazione del bersaglio*: nel caso degli Stafilococchi, che hanno sviluppato una elevata resistenza alla meticillina, è regolato dalla acquisizione di un gene noto come *mecA* veicolato da un trasposone (elemento genetico presente nel genoma in grado di spostarsi da una parte all'altra);
- *Sistemi di trasporto attivi*: il trasporto attivo consente il mantenimento del potenziale di membrana mediante pompa sodio-potassio (ATP)
- *Vie metaboliche alternative*.

Per poter contrastare i batteri è importante capire con quale di questi meccanismi diventa resistente all'antibiotico.

Negli ultimi anni tra le resistenze si è aggiunta anche quella ai carbapenemi, antibiotici di ultima risorsa per trattare infezioni da batteri multi resistenti. Resistenza che può rendere l'infezione praticamente intrattabile. Nel 2015, la percentuale media di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi nei Paesi europei era del 8,1% con una larghissima

variabilità che va da 0 al 61,9%, mentre rimane ancora bassa (0,1%) per *Escherichia coli*. La resistenza ai carbapenemi e la multi resistenza risultano comuni anche per *Acinetobacter baumannii*.

I trend relativi ai batteri Gram-positivi mostrano invece una situazione diversa: negli ultimi anni, la percentuale media di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) ha mostrato un trend di diminuzione a livello Ue/Eea (dal 18,8% nel 2012 al 16,8 nel 2015), anche se lo MRSA rimane una priorità di salute pubblica perché 8 Paesi su 30 ha riportato percentuali superiori al 25% [49].

Una possibile soluzione allo sviluppo di infezioni si ha con l'utilizzo di ioni metallici che hanno mostrato ottime proprietà antibatteriche, come quello adottato in questo lavoro di tesi, il rame.

3.2 Rame

3.2.1 Rame antimicrobico e applicazione in biovetri

Numerosi studi condotti negli ultimi anni hanno evidenziato che il rame presenta proprietà angiogeniche e antibatteriche, e la capacità di indurre una differenziazione osteogenica, responsabile della crescita ossea. Da una serie di analisi su campioni di vetro contenenti concentrazioni diverse di rame [50] è risultato che le proprietà osteoinduttive del rame dipendono dalla concentrazione del metallo all'interno del vetro: ciò che è risultato è che per concentrazioni superiori all'1%(wt.) il metallo risulta citotossico (in grado di distruggere le cellule), mentre per concentrazioni dello 0,1%(wt.) l'incremento della perossidazione lipidica che si verifica non è associata alla citotossicità ma ad un lieve aumento della crescita ossea.

Come reso noto dalla International Copper Association (ICA), che ha creato il marchio *Antimicrobial Copper* [51], l'esposizione della superficie a leghe di rame, ed esempio l'ottone, ha portato alla morte di un ampio spettro di microrganismi, tra cui batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi e l'inattività permanente di virus. Più del 99.0% dei batteri è stato ucciso in meno di due ore a temperatura ambiente e a livelli di umidità tipicamente interni. Tra le principali proprietà dell'Antimicrobial Copper è possibile citare:

- La capacità di eliminare costantemente i batteri;
- La capacità di non perdere l'efficacia batterica anche in seguito ad ossidazione superficiale o continua abrasione in ambienti secchi e umidi con ricontaminazione batterica;
- Sicurezza per l'ambiente e non tossicità per l'uomo e sono completamente riciclabili.

Tali conclusioni sono state raggiunte in seguito all'analisi di 3000 campioni di 5 leghe di rame diverse, eseguite nei laboratori EPA (Environmental Protection Agency) [52]. Queste hanno mostrato l'efficacia del rame contro 5 differenti ceppi batterici: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli O157:H7*, *Pseudomonas aeruginosa* e il superbatterio *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). In presenza di questo metallo si è notato non solo una diminuzione del numero di batteri, ma anche delle infezioni nosocomiali e, in seguito ad uno studio condotto nei reparti di terapia intensiva di tre ospedali americani nel 2012[53], è stato osservato che per i pazienti ricoverati in camere contenenti

oggetti di rame l'insorgenza di infezioni nosocomiali è calata del 58% rispetto a pazienti degenti in stanze contenenti oggetti "standard".

Come prima cosa è stato misurato il numero di batteri presenti su sei oggetti differenti e, più gli oggetti erano vicini ai pazienti, più erano responsabili di infezioni. Nella seconda fase è stato eseguito il confronto tra materiali standard e materiali a base di leghe di rame e, come si evince dalla Tabella 3.2 sugli oggetti in rame la carica batterica è risultata inferiore del 97% (valore mediano). Su 3610 prelievi sul rame i batteri dell'MRSA sono stati trovati solo 5 volte.

Tabella 3.2 Carico batterico su vari oggetti, espresso in CFU/100cm²* [53].

Oggetto	Batteri su materiale di controllo	Batteri su lega di rame
Sponde dei letti	6517	374
Piantane portaflebo	955	132
Braccioli delle sedie	2818	691
Pulsanti di chiamata	4851	226
Monitor	305	326
Tavolini mobili per i letti	677	226

* CFU/100cm² è il numero di colonie formate su 100 cm² di superficie.

Per le sue proprietà il rame è stato dunque il primo materiale solido ad essere stato dichiarato antibatterico dall'EPA nel Marzo del 2008, riconoscimento dato in precedenza a gas, liquidi o polveri usati come disinfettanti; inoltre il rame ha mostrato proprietà antibatteriche più elevate rispetto a rivestimenti a base di argento.

Il principio su cui si basa l'effetto antimicrobico del rame è noto come "*contact killing*", secondo cui i batteri vengono inattivati sulla superficie di rame nell'arco di qualche ora; l'efficienza di questo sistema dipende da alcuni parametri [17]:

- Alto contenuto di rame nella lega;
- Elevata temperatura;
- Elevata umidità relativa.

In Figura 3.6 è schematizzato il meccanismo di "contact killing", con cui gli ioni rame vengono rilasciati dalla superficie causando danno cellulare (A) e conseguente rottura della membrana cellulare ad opera del rame e di altri fenomeni di stress (B), portando ad una perdita del potenziale di membrana e del contenuto citoplasmico (C). Di conseguenza gli ioni rame inducono la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che causano ulteriori danni alla cellula, come la degradazione del DNA genomico e plasmidico (D).

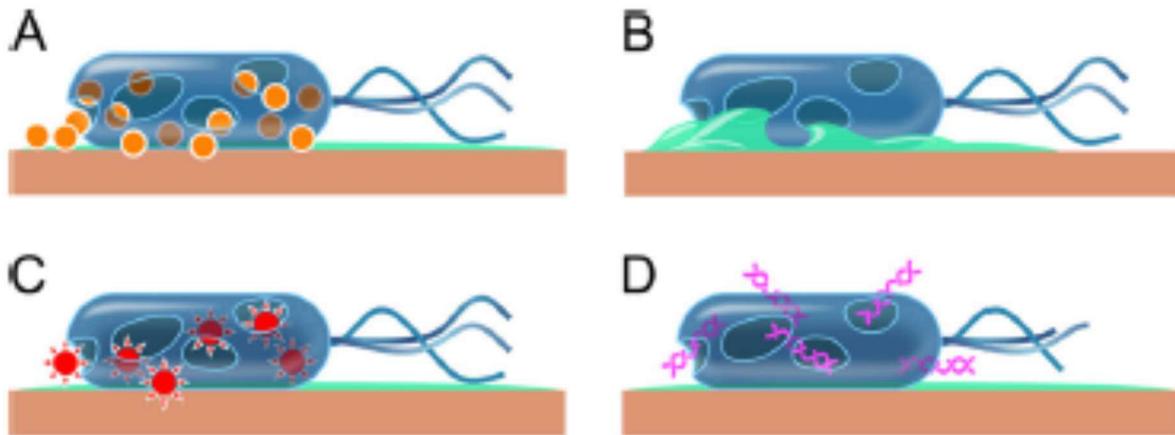


Figura 3.6 Contact killing ad opera del rame [17].

La generazione di ROS è probabilmente mediata dai cicli redox che si generano tra le differenti specie di rame, Cu(0), Cu(I), and Cu(II); queste reazioni sono la causa dell'insorgere di un fenomeno noto come *stress ossidativo*, una condizione patologica determinata da un eccesso di questi radicali liberi (ROS) che l'organismo non riesce a smaltire normalmente e che a lungo termine causa morte cellulare. Inoltre, il DNA cellulare è risultato il maggior bersaglio della tossicità del rame, che induce la sua rapida frammentazione e morte della cellula. Tuttavia, alcuni studi hanno mostrato che il primo fattore responsabile della morte cellulare è la rottura della membrana, mentre il danno al DNA rappresenta la seconda causa.

In uno studio condotto da *Kim et al.* [54] sono state investigate le proprietà antibatteriche degli ioni rame rilasciati dalla superficie di un vetro in seguito alla deposizione di uno strato sottile di sol a partire da nitrato cuprico come precursore. I vetri sono stati caricati con diverse percentuali di Cu (0.2%M, 0.6%M e 1%M) e testati su tre ceppi Gram-negativi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Helicobacter pylori*. Dopo 24 ore di incubazione le colonie batteriche proliferate sono stati conteggiate con la tecnica di diluizione in piastra. Questo vetro rivestito con ioni rame è stato poi confrontato con il vetro tal quale esposto agli stessi ceppi batterici (Figura 3.7) e ed è stato possibile osservare che i batteri messi a contatto con gli ioni rame hanno subito un significativo danneggiamento, dovuto alla produzione di formaldeide (HCHO) da parte del rame stesso in seguito alla transmetilazione enzimatica delle istamine; gli ioni Cu^{2+} mobilitano e coordinano l' HCHO presente all'interno delle cellule microbiche e del mezzo di coltura legandole a sé e formando il complesso $[\text{Cu}(\text{CH}_2\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ da cui la formazione di HCHO risulta continua [55]. Il numero di HCHO generato dalla reazione sinergica con Cu^{2+} è direttamente proporzionale alla concentrazione di HCHO presente all'interno delle cellule microbiche. Inoltre, il rilascio di HCHO può essere incrementato dalla reazione con il perossido di idrogeno endogeno (H_2O_2) da cui si ottiene O_2 e HCHO eccitato.

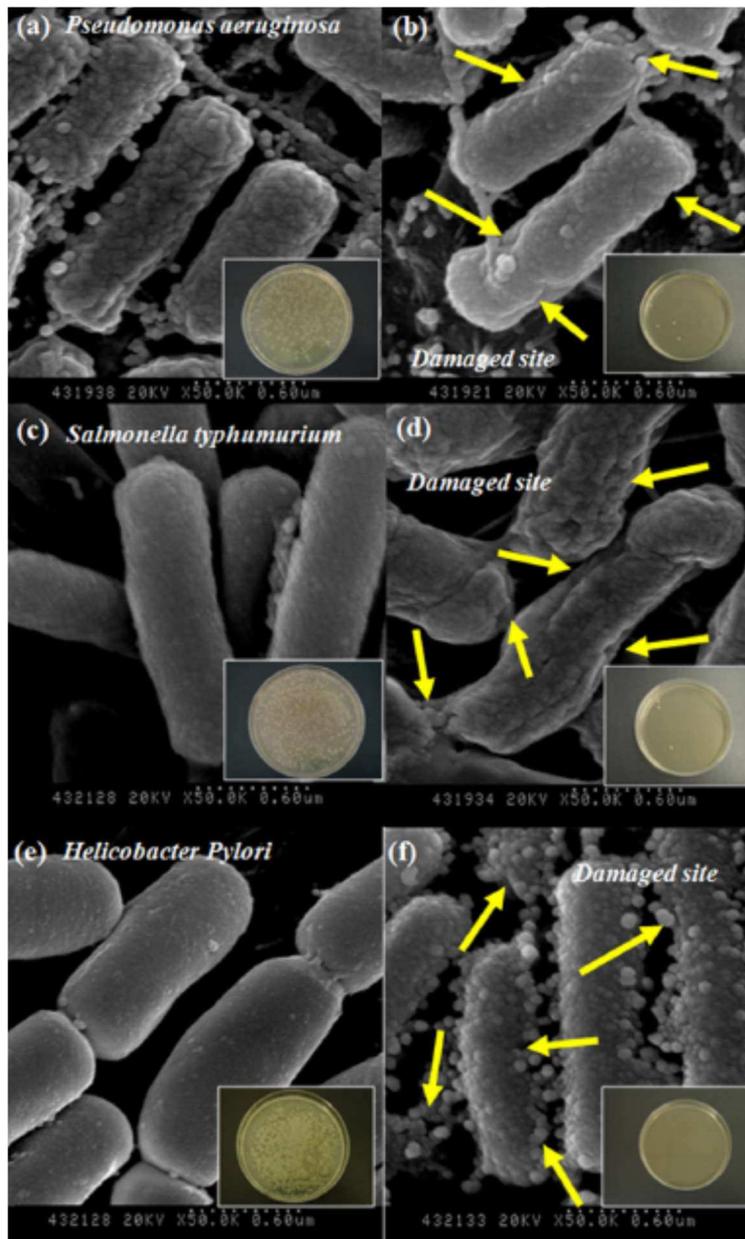


Figura 3.7 Immagine SEM di batteri non trattati (a), (b) e (c) e di batteri trattati per 30s con 0.2%M Cu (d), (e) e (f). Le immagini in basso a destra mostrano il numero di colonie batteriche cresciute [54].

In conclusione, per tutte e tre le concentrazioni di Cu utilizzate è stato osservato, in termini di proliferazione, un effetto antibatterico pari al 99.9%.

I vetri a base di silice non sono stati gli unici ad essere stati testati ma uno studio analogo effettuato da *Neel et al.* [56] è stato fatto su fibre di vetro a base fosfato (PFG) appartenenti al sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$. Anche qui le fibre di vetro sono state caricate con diverse percentuali di CuO (0.1%M, 5%M e 10%M) e sono state prodotte con diametri differenti per caratterizzarle in termini di proprietà strutturali e antibatteriche. Ciò che è stato valutato in questo lavoro è l'effetto battericida nei confronti del Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis* in relazione alla velocità di degradazione delle fibre e al rilascio di ioni rame, più elevato nel caso di fibre di vetro caricate con il 10%M di CuO e con diametro maggiore e, di conseguenza, più efficaci nell'attività antibatterica.

3.2.2 Rame e proprietà angiogeniche

Nonostante al rame sia riconosciuto un ruolo nell'effetto osteogenico, la funzione maggiormente riconosciuta a questo metallo è relativa all'angiogenesi; infatti, mentre il rilascio di ioni rame da parte di fosfati di calcio ha mostrato ottime proprietà angiogeniche, nel caso di uno scaffold di vetro mesoporoso bioattivo contenente ioni rame è stato osservato che tali stimolano sia l'angiogenesi che l'osteogenesi [8]. L'angiogenesi è un processo che viene attivato in risposta a cambiamenti all'interno dell'ambiente fisiologico ed è responsabile della crescita e della riparazione dei tessuti. Tra i vari fattori di crescita coinvolti nel processo angiogenico, il principale è il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).

Da uno studio eseguito da *Xie et Kang* [57] è risultato che il rame stimola l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e di altri fattori, come il fattore-1 di ipossia inducibile (HIF-1), che è il maggior fattore di trascrizione che regola l'espressione di VEGF; infatti il rame è necessario per l'attivazione di HIF-1 α , componente chiave del fattore di trascrizione HIF-1, in quanto stabilizzandolo si ha il suo accumulo nel citoplasma con conseguente formazione di un dimero e attivazione dell'attività trascrizionale di HIF-1. Questa proprietà del rame, tenendo conto delle condizioni dei pazienti prima dell'inizio della terapia, lo rende utile nella terapia di anti-angiogenesi adottata nella cura del cancro, in quanto i chelanti del rame (agenti utilizzati per trattare le patologie da eccesso di rame) sembrano ridurre la crescita delle cellule tumorali; allo stesso modo è utile nella cura dell'ipertrofia cardiaca e nell'osteointegrazione di una protesi. In un lavoro di *Gérard et al.* [58] sono stati effettuati test *in vitro* e *in vivo* per valutare la stimolazione angiogenica e la formazione di collagene dovute all'effetto del solfato di rame (CuSO₄). Il test *in vitro* è stato condotto con un sistema di coltura 3D in cui sono state utilizzate cellule endoteliali, sotto la stimolazione del fattore-2 di crescita dei fibroblasti (FGF-2) e in misura minore del fattore VEGF. La combinazione del solfato di rame con le concentrazioni crescenti dei due fattori di crescita ha incrementato significativamente le reti angiogeniche. *In vivo* è stata osservata la deposizione di collagene in seguito all'interazione del CuSO₄ con l'FGF-2 e ciò che si è osservato è la tendenza del CuSO₄ a stimolare, in seguito all'incremento dell'espressione di VEGF ai margini della ferita, la guarigione delle ferite accelerandone la contrazione e la chiusura.

Un altro lavoro condotto da *Wu et al.* [29] ha rivelato che il rame rilasciato da scaffolds realizzati in biovetro mesoporoso stimola il fattore di crescita HIF-1 (necessario per la produzione di insulina) e VEGF (necessario per la crescita dell'endotelio), che sono due importanti agenti di trascrizione in angiogenesi presenti nelle cellule stromali del midollo osseo umano (hBMSCs). Il rilascio di rame da parte del 45S5 (Bioglass®) è stato investigato in co-coltura e si è notato che il rilascio di ioni Cu²⁺ stimola le BMSCs a secernere il fattore di crescita VEGF che a sua volta promuove specifici markers superficiali e la formazione di strutture tubulari nelle cellule endoteliali.

Dunque, le proprietà angiogeniche dei biovetri sono importanti non solo per l'osteointegrazione della protesi ma anche per la rigenerazione dei tessuti molli [2]. Un esempio consiste nella cura delle ulcere diabetiche che colpiscono milioni di persone nel Mondo. Queste ferite sono dovute ad una carenza vascolare e guariscono con molta difficoltà: una possibile soluzione consiste nel riparare il network vascolare drogando appositi biovetri con alcuni ioni metallici come rame e zinco.

La reazione è spesso incompleta e porta al rilascio di monomero causando tossicità sistemica in loco. Inoltre, è fortemente esotermica, con evaporazione del monomero e degli additivi ed espansione di bolle d'aria intrappolata fino ad un aumento del volume del 10% quando il polimero è ancora allo stato plastico (recuperato in fase di raffreddamento con un ritiro fino al 22%); il raggiungimento di tali temperature può causare gravi lesioni tissutali in quanto le temperature che si possono raggiungere in loco sono di 80-100°C.

4.1.1 Proprietà fisiche del PMMA

Tra le principali proprietà fisiche del cemento osseo è importante citare la *porosità*, condizionata da una serie di fattori come [36]:

- Inglobamento di aria durante la fase di preparazione della mescola;
- Liberazione di aria assorbita durante la polimerizzazione;
- Intrappolamento di aria durante la cementazione della protesi;
- Evaporazione del monomero.

Per ottenere una cementazione di qualità, si può operare una pressurizzazione sottovuoto (circa 2 atm) o in centrifuga, che comportano una diminuzione della porosità rispettivamente del 70% e del 45%, con conseguente aumento della resistenza a trazione meccanica del cemento.

Un'altra proprietà importante è la *viscosità*, che dipende da:

- Composizione chimica del cemento;
- Stato di polimerizzazione;
- Temperatura del monomero.

Una diminuzione della viscosità consente la maggior penetrazione del cemento negli interstizi dell'osso ed un aumento della superficie di trasferimento del carico.

Infine può essere citata la *temperatura di polimerizzazione*, che varia in rapporto a:

- Composizione chimica del PMMA;
- Spessore del cemento;
- Condizioni circolatorie endostali e periostali;
- Conducibilità termica della protesi.

In vitro, in alcuni casi, si raggiungono temperature superiori a 126°C, molto più elevate rispetto alla temperatura di denaturazione delle fibre di collagene, che si attesta intorno a 60°C, causando necrosi. Cementi con rapporto polimero/monomero 3:1 e manti cementizi di spessore non superiore a 2 mm consentono di abbattere il danno osseo termico causato dalla reazione di polimerizzazione.

4.1.2 Proprietà meccaniche del PMMA

Il cemento osseo presenta un *modulo elastico* che varia tra i 2 e i 5 GPa. Il suo comportamento è quello tipico di un *materiale fragile*, ovvero resiste meglio a compressione (65-100 MPa) che a trazione (25-50 MPa). In generale le proprietà di un cemento variano a seconda della modalità di preparazione, della composizione, e dalle condizioni di sollecitazione (temperatura, velocità di sollecitazione). Come per molti polimeri si osserva un aumento del modulo elastico all'aumentare della velocità di sollecitazione.

A causa del comportamento *viscoelastico* risultano importanti i fenomeni di *creep* e di *rilassamento* che possono portare alla nucleazione di cricche con conseguente mobilizzazione dell'impianto ortopedico[1]. I fenomeni di creep sono influenzati da alcuni parametri come la porosità, la presenza di monomero residuo, la dimensione delle polveri di partenza e la presenza di copolimeri e, in particolar modo, si osserva una diminuzione dello scorrimento se:

- La presenza di porosità è bassa;
- La concentrazione di monomero residuo è bassa;
- Le dimensioni delle particelle di partenza sono piccole e per questo si ottiene maggior densità;
- È presente una certa quantità di copolimeri.

Nel campo delle artroprotesi lo studio della *meccanica della frattura* ha un ruolo importantissimo. Nel caso dei cementi ossei molto spesso si ha la formazione di una cricca nel momento dell'inserimento della protesi e i parametri da controllare sono:

- La velocità di propagazione della cricca;
- Le dimensioni critiche della cricca.

In letteratura[1] si riportano dei valori di K_{IC} compresi tra 1 e 2 $MNm^{-3/2}$ con una forte dipendenza dalla pressione di formatura (K_{IC} aumenta all'aumentare della pressione) e bassa dipendenza dalla temperatura. L'ambiente fisiologico non sembra avere nessun effetto deleterio sulla resistenza a frattura del cemento.

Il meccanismo di frattura *in vivo* dei cementi ossei è sempre un meccanismo a fatica, con valori limite normalmente compreso tra 5 e 25 MPa. Una accurata analisi delle superfici di frattura ha mostrato un aumento della porosità all'aumentare dei cicli a fatica, in seguito a coalescenza di microcricche. In seguito a test di trazione/compressione e trazione/trazione è stato evidenziato che il contributo che regola i cicli a fatica è quello a trazione mentre la tensione di compressione risulta trascurabile.

Riducendo la porosità presente all'interno del cemento osseo è possibile aumentare notevolmente la resistenza a trazione e i limiti a fatica, mentre i tempi di presa, la temperatura di picco e il modulo elastico rimangono inalterati.

È inoltre possibile rafforzare il cemento tramite l'uso di seconde fasi [1], ottenendo cioè un cemento composito in cui le fasi aggiunte possono essere idrossiapatite o biovetri per conferire proprietà bioattive; sono state anche testate ma con scarso successo fibre o particelle

di carbonio o grafite in quanto incrementano molte proprietà meccaniche come la resistenza a frattura, la resistenza a flessione e il modulo a flessione ma hanno effetti collaterali sulla biocompatibilità *in vitro* delle cellule che le circondano [59].

4.1.3 Fasi della presa

Dal momento in cui si mescolano i diversi componenti, il chirurgo ha pochi minuti per impastare la massa e introdurla all'interno della cavità da riempire; in questi pochi minuti il cemento deve essere in grado di raggiungere tutti gli interstizi e le trabecole ossee. Dopo l'inserimento il cemento attraversa una fase di latenza, che va dai 3 ai 5 minuti, in cui non si osserva nessuna variazione nella viscosità e temperatura della massa plastica; dopo questo arco di tempo si ha un rapido incremento di viscosità e di temperatura con un picco di temperatura dopo circa 10 minuti.

La norma ISO 5833-2002 [60], riguardante l'applicazione di cemento osseo a base di resine acriliche, definisce tre parametri di presa (*curing parameters*) che caratterizzano la reazione di polimerizzazione a cui è soggetto il cemento quando deve essere utilizzato: *dough time*, *working time* e *setting time* (Figura 4.2).

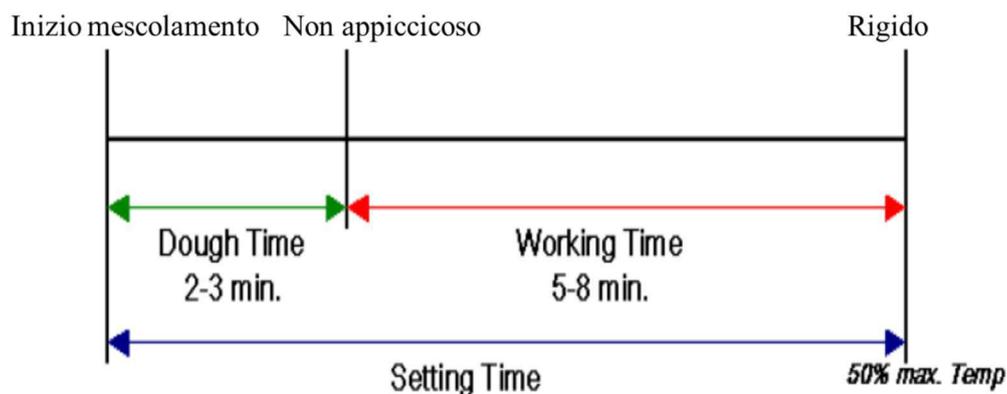


Figura 4.2 Parametri di presa per un cemento osseo [1].

Come è possibile osservare le tre fasi di presa sono [1]:

- *Dough time*: è il tempo che intercorre da quando il chirurgo inizia a mescolare i componenti fino a quando la massa non risulta più appiccicosa ma si stacca facilmente dal guanto ed è quindi lavorabile;
- *Working time*: è il tempo in cui il materiale deve essere inserito all'interno del corpo prima che aumenti eccessivamente la sua viscosità e che non risulti più lavorabile. Questo intervallo procede fino al raggiungimento del 50% della temperatura massima del cemento;
- *Setting time*: è dato dalla somma di "dough time" e "working time" ed indica il tempo che intercorre dall'inizio della polimerizzazione fino a quando il cemento non risulta più applicabile.

La modalità di presa può dipendere da una serie di fattori esterni [1]:

- La riduzione della *temperatura dei componenti* prima dell'inizio della miscelazione riduce la porosità residua;
- La riduzione della *temperatura ambiente* aumenta i tempi di presa;
- L'aumento del rapporto *polvere/liquido* diminuisce i tempi di presa e la temperatura di picco in quanto una più elevata concentrazione di iniziatori permette una polimerizzazione più veloce riducendo il rilascio di calore;
- La polimerizzazione *in vivo* è più lenta di quella *in vitro* in quanto *in vitro* si ha una densità minore di quella che ci si aspetta.

4.1.4 Biocompatibilità

La biocompatibilità [4] di un cemento osseo è condizionata da aspetti *tossicologici, biologici e meccanici* e per questo motivo è importante distinguere due aspetti problematici:

- *Biologici e clinici*: che riguardano gli aspetti relativi alla fase di preparazione del cemento osseo, l'introduzione della miscela e la polimerizzazione della stessa;
- *Tossicologici*: che riguardano tutte quelle reazioni indotte da sostanze a basso peso molecolare sia in sede che sistemica. Le vie di eliminazione risultano essere fegato, reni e polmoni (i più bersagliati).

In generale i *danni fisico-meccanici* sono dovuti a necrosi dei tessuti circostanti dovuti alla reazione di polimerizzazione esotermica del cemento osseo e all'applicazione di elevate pressioni durante l'introduzione dello stesso nella cavità ossea. In queste condizioni l'incremento della temperatura fino a valori di 120°C e l'eccessiva pressurizzazione possono portare al deterioramento dell'osso e del tessuto adiacente all'impianto così come a embolia polmonare. Inoltre il cemento osseo con il trascorrere degli anni va incontro ad invecchiamento, con conseguente aumento della porosità e riduzione della resistenza meccanica.

Il fattore più importante è la *risposta biologica* del tessuto osseo, che implica il successo o il fallimento dell'impianto. Ciò è dovuto alla presenza di un film fibroso interposto tra il tessuto osseo e il cemento, che ha il ruolo di trasmettere gli sforzi meccanici tra materiali che presentano moduli elastici molto differenti. Una fissazione non adeguata può compromettere l'interfaccia osseo-cemento e portare a micro-movimenti del cemento rispetto alla superficie ossea causando anomalie nella conformazione dello strato fibroso con conseguente alterazione della trasmissione degli sforzi. Qualora venga superata la deformabilità elastica delle strutture biologiche si genera una ipersollecitazione delle superfici ossee con conseguenti emorragie, fibrinolisi e necrosi con conseguente riassorbimento osseo e quindi processo irreversibile di mobilizzazione dell'impianto protesico.

Un fattore non trascurabile è la capacità del monomero MMA di scatenare reazioni allergiche: ciò è dovuto non solo ad una sensibilizzazione del paziente ma anche ad una tendenza del monomero ad inibire fagocitosi e chemiotassi.

La biocompatibilità a lungo termine varia a seconda delle applicazioni: nel campo della chirurgia plastica, neurochirurgia ed oculistica non si sono osservate particolari modificazioni o formazione di una membrana fibrosa anche a distanza di tempo; mentre per quanto riguarda la chirurgia ortopedica la durata nel tempo risulta più limitata e ciò è dovuto alle sollecitazioni meccaniche a cui il cemento risulta sottoposto, che possono portare a fratture, frammentazioni ed usura per sfregamento. Oltre a ciò si possono verificare anche danni dovuti a fattori fisici come la diffusione di monomero e di prodotti di degradazione.

L'innescò di queste reazioni dipende dalla stabilità iniziale dell'impianto; infatti, se la necrosità iniziale supera certi limiti si avrà una mobilitazione precoce dell'impianto con conseguente sviluppo di sollecitazioni di taglio tra impianto e osso che portano a frattura.

Un altro aspetto non trascurabile è la variazione della pressione sanguigna in seguito all'introduzione del cemento e, in particolare, è stato osservato un calo della pressione arteriosa ed un aumento della pressione venosa centrale. Questo fattore, sommato a microembolismi, può portare alla morte del paziente. Tuttavia, tale evenienza è molto rara (non supera lo 0.1-0.5%) e si verifica in pazienti che presentano già altri fattori a rischio.

Per incrementare la biocompatibilità o conferire particolari proprietà possono essere aggiunti una serie di additivi [61]:

- *Agenti fluidificanti*: servono in primo luogo per ridurre il tempo di miscelazione del cemento osseo;
- *Agenti areanti*: comunemente utilizzati per generare una macroporosità indotta che normalmente non si sviluppa in fase di inserimento del cemento osseo nelle cavità e che incrementerebbe la crescita ossea e l'osteointegrazione dell'impianto;
- *Agenti per il miglioramento della lavorabilità*: ad esempio *polisaccaridi*, che ne aumentano l'iniettabilità e la *gelatina* che porta ad un incremento del setting time;
- *Agenti rinforzanti*: per aumentare le proprietà meccaniche del cemento osseo. Ad esempio le fibre di nylon migliorano la tenacità;
- *Agenti antibiotici*: per ridurre lo sviluppo di infezioni. Dopo l'inserimento del cemento nelle cavità ossee l'antibiotico viene rilasciato lentamente attraverso le porosità presenti all'interno del cemento stesso;
- *Agenti antibatterici*: chitosano per le sue proprietà antibatteriche contro *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e argento contro *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*;
- *Vetri bioattivi e antibatterici*: per rendere il cemento bioattivo garantendo un legame biologico tra osso e cemento e allo stesso tempo un comportamento antibatterico (vetri bioattivi caricati normalmente con ioni rame o argento, idrossiapatite).

L'utilizzo di polimeri nel campo della chirurgia ortopedica deve mirare a promuovere un comportamento osteoconduttivo e, allo stesso tempo, osteoinduttivo; altri parametri che deve soddisfare sono la radiopacità, l'iniettabilità, un adeguato tempo di consolidamento, biocompatibilità, adeguate proprietà meccaniche (resistenza a compressione, flessione, fatica e durezza) e una bassa tendenza a degradare.

4.2 Cementi antibiotati

L'utilizzo di cemento antibiotato associato ad una adeguata profilassi antibiotica e alla sterilità delle procedure chirurgiche è correlato ad una riduzione di incidenza di infezioni nelle protesi di primo impianto. Come evidenziato da *Persson et al.* [62] il principale motivo dell'insorgenza di infezioni protesiche risulta da perdita di asetticità e ciò richiede una revisione dell'impianto.

Uno studio condotto su 42 250 pazienti in Norvegia e durato 20 anni [63] ha mostrato che l'utilizzo di cemento osseo antibiotato, unito ad una terapia antibiotica, riduce notevolmente l'insorgenza di infezioni post operatorie nelle protesi di primo impianto rispetto all'utilizzo dei presidi singolarmente.

In Figura 4.3 è possibile osservare la percentuale di sopravvivenza di protesi di primo impianto in quattro casi: nessuna profilassi antibiotica (indicato in figura come None), profilassi antibiotica intravenosa (S), cemento osseo impregnato di antibiotico (C) e combinazione di profilassi intravenosa e impregnazione del cemento (SC). Da ciò è possibile dedurre come nell'ultimo caso esposto la percentuale di sopravvivenza dell'impianto in seguito ad infezioni risulti essere notevolmente maggiore, ovvero circa del 90% dopo 14 anni dall'impianto.

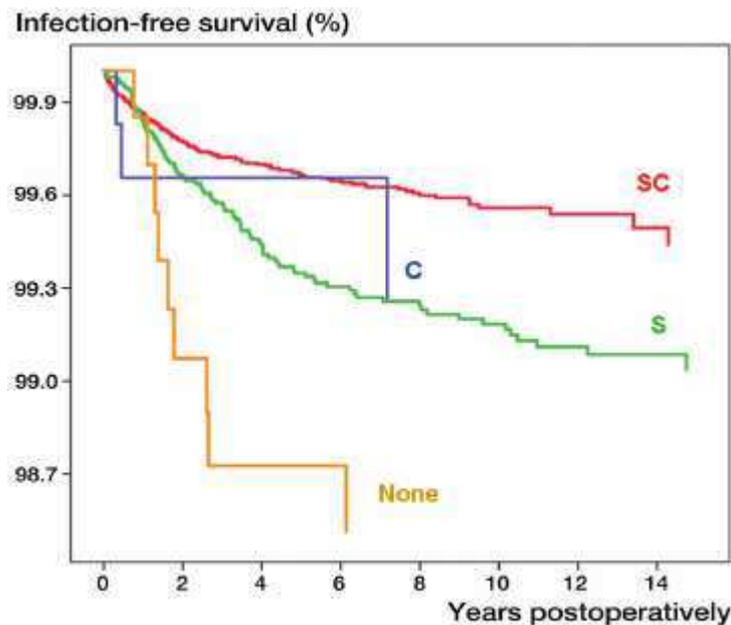


Figura 4.3 Percentuale di sopravvivenza di protesi in seguito ad infezioni [63].

I cementi antibiotati si possono distinguere in:

- Cementi caricati manualmente in sala operatoria con antibiotici come tobramicina, gentamicina, penicillina, eritromicina, colistina, cefalosporina, polimixina e vancomicina [64];

- Cementi commerciali contenenti nella formulazione un quantitativo di antibiotico come Cemex Genta, Palacos R+G, Simplex P, Cobalt G-HV, Smartset GHV, Smartset GMV e VersaBond AB [65].

In passato i cementi antibiotati utilizzati erano esclusivamente quelli caricati manualmente in sala operatoria ma, dal 2003, la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato negli Stati Uniti l'uso dei cementi commerciali (premescolati), in quanto rappresentano una soluzione efficace per prevenire le infezioni post-operatorie; al tempo stesso la FDA ha introdotto alcune restrizioni nella profilassi, ovvero l'utilizzo di meno di 2g di antibiotico per 40g di cemento (e.g. 1g di tobramicina) per prevenire lo sviluppo di reazioni allergiche, resistenza batterica e costi. Sono stati inoltre classificati i cementi antibiotati a seconda del dosaggio di antibiotico come segue:

- *A basso dosaggio* (1-2g): utilizzati per profilassi o per la fissazione di impianti protesici;
- *Ad alto dosaggio* (maggiore di 3.6g): per preparare spaziatori in presenza di infezione attiva.

Al tempo stesso l'evidenza clinica ha mostrato preoccupazioni riguardanti possibili farmacoresistenze derivanti dall'utilizzo routinario di tali antibiotici a basse dosi in protesi primarie. Numerosi dati registrati in Norvegia e Svezia mostrano come l'utilizzo di questa profilassi antibiotica sia la soluzione migliore per ridurre l'insorgenza di infezioni del giunto nei pazienti.

I vari cementi antibiotati differiscono non solo per la concentrazione e il tipo di antibiotico adottato ma anche per la cinetica di diffusione *in situ*. Il cemento ideale deve essere [36]:

- Ad ampio spettro;
- Solubile in acqua;
- Termostabile;
- Poco allergenico;
- Dotato di lunga emivita.

In Tabella 4.1 è rappresentata una lista di antibiotici termostabili, una proprietà che devono avere in modo da non andare incontro a modificazioni strutturali e quindi funzionali in seguito alla reazione fortemente esotermica dello stesso cemento osseo.

Tabella 4.1 Lista di antibiotici termostabili usati nei cementi antibiotati [36]

Antibiotici termostabili adottati in cementi antibiotati	
Gentamicina	Colistina
Clindamicina	Metacillina
Cefalotina	Tetraciclina
Tobramicina	Lincomicina
Eritromicina	Didoacillina
Oxacillina	Vancomicina
Cefuroxime	Trimetoprin

Nonostante il cemento osseo antibiotato presenti il vantaggio di ridurre il rischio di infezione periprotetica, l'utilizzo di questo materiale può comportare una serie di svantaggi sul piano clinico come sviluppo di reazione allergica e tossicità locale o sistemica; tuttavia ad oggi in letteratura non sono presenti studi su fenomeni di tossicità clinica collegati all'utilizzo di basse dosi di cemento antibiotato e tantomeno allo sviluppo di reazioni allergiche in seguito all'introduzione di gentamicina o tobramicina.

Ciò che è risultato da molti lavori tra cui quello di *Lautenschlager et al.* [66] è che l'utilizzo di cementi antibiotati contenenti più di 2g di antibiotico risulta dannoso per le proprietà meccaniche del cemento stesso. Il cemento antibiotato utilizzato è però quello a basse dosi per cui comporta una trascurabile ed inconsistente riduzione della resistenza statica e a fatica. [67]

Altri studi condotti da *Mau et al.* [68] hanno evidenziato che l'adozione di opportuni sistemi di mescolamento sottovuoto consentono di mantenere le proprietà meccaniche originali rispetto alle procedure manuali in quanto viene ridotto l'ingresso di aria nel cemento e quindi della sua porosità, limitando il rischio di indebolimento e lo scollamento asettico dell'impianto.

Un altro potenziale svantaggio è, come detto precedentemente, l'instaurarsi di fenomeni di farmaco-resistenza, come *stafilococchi gentamicina-resistenti* e *enterococchi vancomicina-resistenti*. In generale il cemento rappresenta una superficie ideale per adesione, colonizzazione e crescita batterica in quanto permette la formazione di un biofilm che isola il microorganismo dall'ambiente circostante, portandolo da una fase di sospensione ad una di adesione (Figura 4.4).

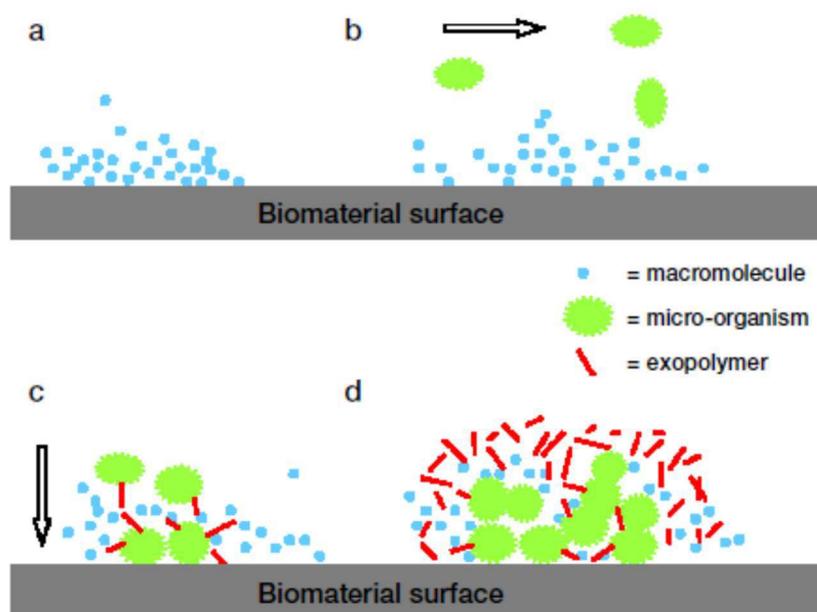


Figura 4.4 Stadi di formazione di biofilm sulla superficie di un biomateriale [69].

Il cemento antibiotato, in particolar modo quello caricato con gentamicina, ha mostrato una maggior efficacia nel ridurre la formazione di biofilm di superficie. Ciò che accade, però, è un'elevata esposizione all'antibiotico con livelli inibitori insufficienti, dovuta ad una prolungata esposizione, che generano nel microorganismo stesso delle mutazioni genetiche tali da innescare il fenomeno citato prima di farmaco-resistenza. Questo fenomeno può verificarsi per via ematogena anche a distanza di anni dall'impianto e nei confronti di Stafilococchi coagulasi negativi come il CN5115 e il CNS5234 e del *Pseudomonas Aeruginosa* [70].

La Figura 4.5 mostra una particella di PMMA caricata con perle di gentamicina; in studi clinici su pazienti trattati con cemento osseo caricato con perle di antibiotico si è osservato che dopo circa 14 giorni il cemento ha rilasciato dal 20% al 70% del quantitativo totale dell'antibiotico incorporato, periodo dopo il quale le concentrazioni crollano considerevolmente [71].

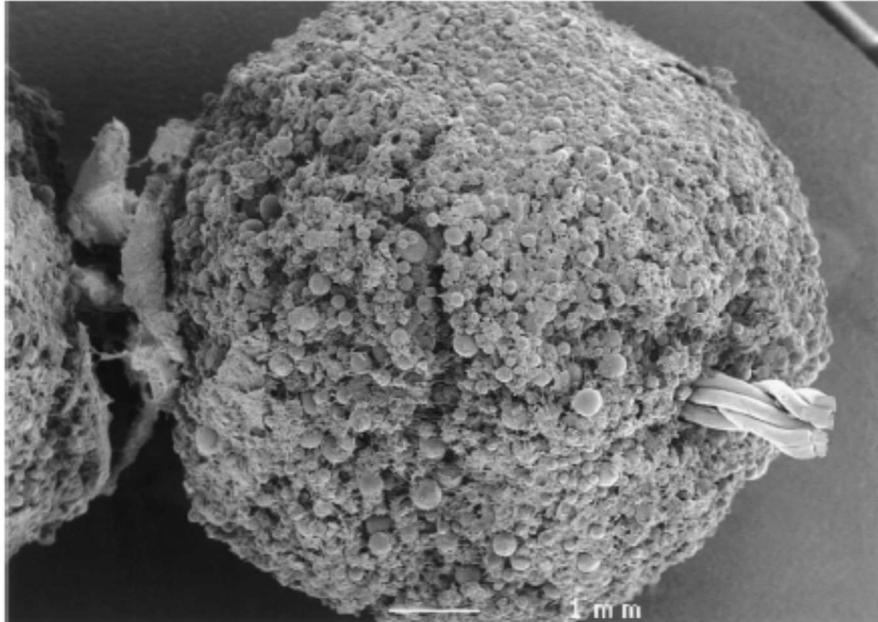


Figura 4.5 Perle multiple su particella di PMMA [71].

In generale il rilascio di antibiotico è *tempo-dipendente* e *bi-fasico*, con un picco nelle prime ore, seguito da un lento e progressivo decremento nell'arco di mesi o anni. Inoltre è incompleto ed è limitato alla superficie del cemento a causa di assenza di comunicazione tra i fluidi biologici e il cemento stesso dovuta alla l'assenza di effetti prolungati del carico ciclico sul rilascio di antibiotici da parte del cemento. L'antibiotico maggiormente utilizzato è la gentamicina, in virtù dell'antibattericità ad ampio spettro, della termostabilità ad alte temperature e della bassa incidenza di risposte allergiche. In uno studio *in vitro* condotto nel 2005 da *Hendriks* [72] sul rilascio di gentamicina dal cemento Palacos® è stato dimostrato che la concentrazione di questo antibiotico all'interfaccia con l'impianto ortopedico è risultata 1000 volte superiore alla concentrazione minima inibente (MIC) per gli stafilococchi, che risulta essere 4µg/ml facendo sì che si abbiano migliori risultati in tempi brevi.

4.3 Cementi bioattivi

I cementi bioattivi sono caratterizzati dall'aggiunta di una fase bioattiva come idrossiapatite (HA) o un biovetro in modo tale da garantire un legame biologico tra l'osso e il cemento in seguito alla formazione di uno strato di HA e favorire fenomeni come l'osteoconduzione. In uno studio condotto da *Dalby et al.* [73] è stata valutata *in vitro* la risposta biologica del cemento osseo (PMMA) a cui è stata aggiunta idrossiapatite (HA) in concentrazioni di 0, 4.6 e 8%vol. Ciò che è stato osservato è la maggior formazione di placche di adesione focale ma mano che la concentrazione di HAp aumenta e un ancoraggio preferenziale alla superficie dell'HA piuttosto che a quella del cemento da parte dei filopodi durante l'adesione primaria degli osteoblasti umani (HOBs) (Figura 4.6).

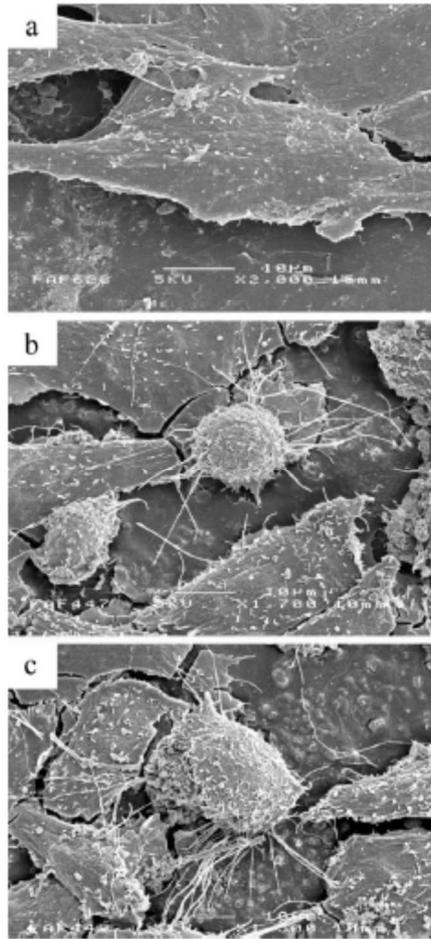


Figura 4.6 Immagini SEM dei cementi testati dopo 24h. scarsa formazione di filopodi in seguito ad adesione di HOBs nel PMMA con 0%vol di HA (a); maggior formazione di filopodi per 4.6%vol di PMMA/HA (b) e 8%vol di PMMA/HA(c) [73].

Inoltre, al crescere del contenuto di HA è stata osservata una maggior sinergia tra la crescente formazione di contatti focali, l'organizzazione citoscheletrica, la proliferazione cellulare e l'espressione del fenotipo, responsabile dell'interazione tra la costruzione genetica e l'ambiente fisiologico. Questi fattori indicano un incremento della bioattività del cemento osseo in seguito all'aggiunta di HA.

Un altro studio [74] *in vivo* è stato condotto su un cemento osseo bioattivo (GBC) formato da perle di biovetro ($MgO-CaO-SiO_2-P_2O_5-CaF_2$) come riempitivo inorganico e PMMA (70%vol) come matrice organica. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'andamento delle proprietà meccaniche e della osteoconduttività (Figura 4.7) del cemento bioattivo in funzione della dimensione delle particelle di biovetro (4, 5, 9 e 13 μm , da cui i nomi GBCs4, GBCs5, GBCs9 e GBCs13).

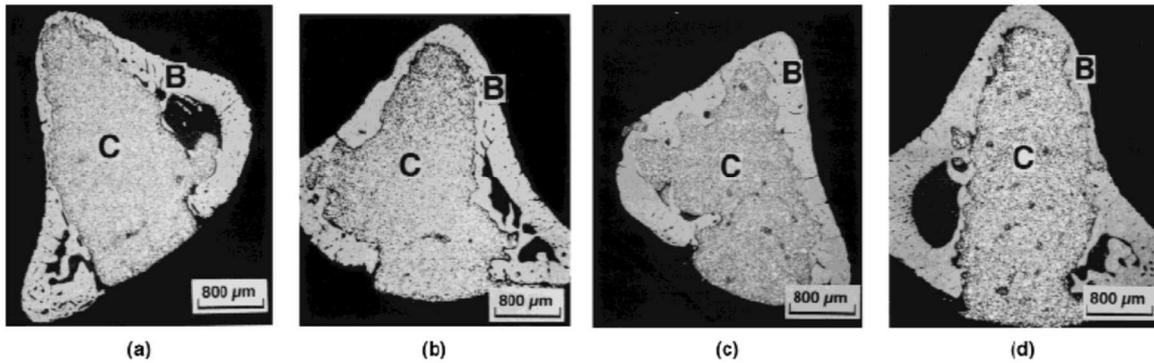


Figura 4.7 Immagine SEM del GBCs4 (a) e GBCs13 (b) a 4 settimane dall’impianto, e del GBCs4 (c) e GBCs13 (d) a 8 settimane dall’impianto nella tibia di ratto. Contatto diretto tra l’osso (B) e il cemento osseo (C) nel caso di GBCs4 mentre GBCs13 mostra un lieve contatto [74].

In termini di osteoconduttività l’utilizzo di perle di biovetro è risultato più benefico per la formazione di tessuto osseo in quanto, poiché la superficie specifica aumentava al diminuire della dimensione delle perle di vetro, aumentando la superficie esposta e, di conseguenza, incrementando la bioattività del composito. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche è stata osservata una diminuzione della resistenza a flessione al crescere della dimensione delle perle di biovetro. In conclusione, considerando sia le proprietà meccaniche sia l’osteoconduttività, quello che ha ottenuto i migliori risultati è il cemento osseo bioattivo ottenuto con perle di vetro di piccola sezione.

4.4 Cementi antibatterici

Per cementi antibatterici ci si riferisce a cementi ossei caricati con antibiotico (e.g. gentamicina, tobramicina) o con particelle di metalli ad azione antibatterica come l’argento.

A tal proposito è stato condotto uno studio [75] *in vitro* che mette a confronto le proprietà antibatteriche di un cemento osseo a base PMMA caricato con nanoparticelle di argento di dimensioni di 5-50 μ m (NanoSilver) e un cemento osseo caricato con gentamicina nei confronti di ceppi batterici *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* meticillino resistente (MRSE) e *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA); ciò che è risultato da questo lavoro è che il cemento caricato con nanoparticelle di argento ha mostrato attività antibatterica nei confronti di tutti e tre i ceppi testati, mentre il cemento contenente gentamicina non è risultato efficace nei confronti del MRSE e MRSA a causa dell’elevato livello di resistenza di questi ceppi alla gentamicina. Inoltre è stata valutata la citotossicità di questi due campioni e il cemento osseo caricato con nanoparticelle non ha mostrato comportamento citotossico a differenza di quello caricato con gentamicina che, seppur in bassa entità, mostra citotossicità (Figura 4.8).

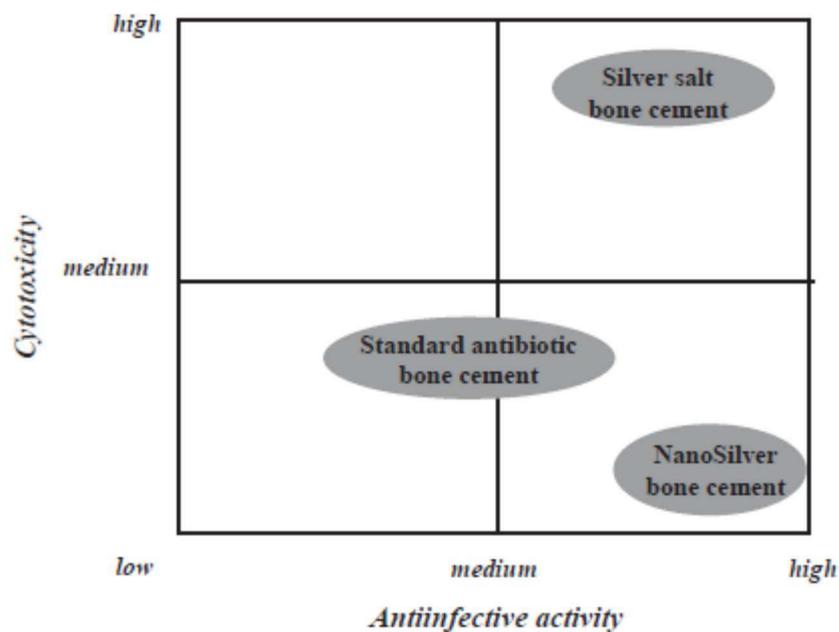


Figura 4.8 Panoramica su attività antibatterica e citotossicità di cemento osseo caricato con NanoSilver, cemento osseo caricato con sali d'argento e cemento osseo standard caricato con antibiotico (gentamicina) [75].

Osservando la figura è possibile concludere che il cemento osseo caricato con NanoSilver risulta la miglior soluzione sia in termini di citotossicità che di antibattericità.

Un altro lavoro [76] condotto su un cemento osseo caricato con nanoparticelle di argento rivestite di tiopronina a partire da due diversi rapporti AgNO_3 :tiopronina (1:3 e 1:0.5) e in tre diverse concentrazioni di argento (1%wt., 0.5%wt. e 0.1%wt.); di questi è stata testata l'antibattericità e la tossicità; una volta incapsulate nel cemento, solo le nanoparticelle grandi e con una frazione inorganica (Ag) più elevata hanno mostrato ottima attività antimicrobica nei confronti di MRSA, crescente all'aumentare della concentrazione di argento, a differenza delle nanoparticelle più piccole che in proporzione avevano più tiopronina e che non hanno mostrato alcuna attività perfino ad elevate concentrazioni di argento (1%wt.); ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'elevato quantitativo di fase organica riduce l'esposizione della parte inorganica di argento o impedisce l'interazione dell'argento stesso con i componenti cellulari, come gli enzimi. Inoltre, test condotti per valutare la citotossicità hanno evidenziato che per ambedue in campioni non vi sono segni di citotossicità, perfino ad elevate concentrazioni di argento (1%wt.).

4.5 Cementi bioattivi e antibatterici

Quando si parla di cementi bioattivi e antibatterici normalmente si parla di compositi formati da una matrice a base di PMMA, vetri bioattivi e antibiotici. Solo alcuni studi recentemente hanno sviluppato cementi bioattivi e antibatterici contenente vetri bioattivi drogati con ioni ad azione antibatterica [77][78]. Con questo tipo di cementi si tenta di risolvere alcuni problemi relativi al cemento osseo come:

- Scarsa integrazione con l'osso;
- Riassorbimento osseo;

- Scarsa resistenza meccanica;
- Infezioni tra osso e impianto.

Numerosi studi sono stati eseguiti su cementi ossei a base di PMMA caricati con vetri bioattivi. Uno dei principali problemi nell'utilizzo di questi sistemi consiste nel mantenere la bioattività del vetro quando questo viene aggiunto al PMMA; in uno studio condotto da *Arcos et al.*[79] un vetro del sistema $\text{SiO}_2 - \text{CaO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5$ è stato caricato con gentamicina. Questo composito vetro/PMMA è stato immerso in SBF (soluzione fisiologica simulata) e durante le prime ore ha rilasciato elevate dosi di antibiotico, seguito da un più lento rilascio che rappresenta la dose di "mantenimento" fino al termine dell'esperimento. L'azione della gentamicina e la velocità del rilascio di antibiotico sono dovute ad uno scambio ionico di Ca^{2+} e H_3O^+ tra composito e SBF; inoltre, la struttura porosa ha favorito la crescita, sia sulla superficie sia all'interno dei pori stessi, di idrossicarbonatoapatite.

Un lavoro di *Liu et al.* [80] su un cemento osseo contenente idrossiapatite modificata con stronzio (Sr-HA) caricato con solfato di gentamicina, creato per creare un adeguato sistema di rilascio di antibiotico per difetti ossei. L'antibattericità è stata valutata osservando l'inibizione nella crescita dello *Staphylococcus aureus*, uno dei batteri responsabili delle infezioni periprotesi e circa il 38% di gentamicina è stato rilasciato dal composito entro 30 giorni, rendendo possibile una eventuale abbreviazione del periodo di esposizione all'antibiotico. La bioattività di questo composito è stata determinata monitorando la formazione di uno strato di idrossiapatite in seguito ad immersione in soluzione fisiologica simulata (SBF): ad 1 giorno dall'immersione è stata osservata la formazione di uno strato di spessore $1.836 \pm 0.037 \mu\text{m}$ mentre a 7 giorni $5.177 \pm 1.355 \mu\text{m}$ (Figura 4.9).

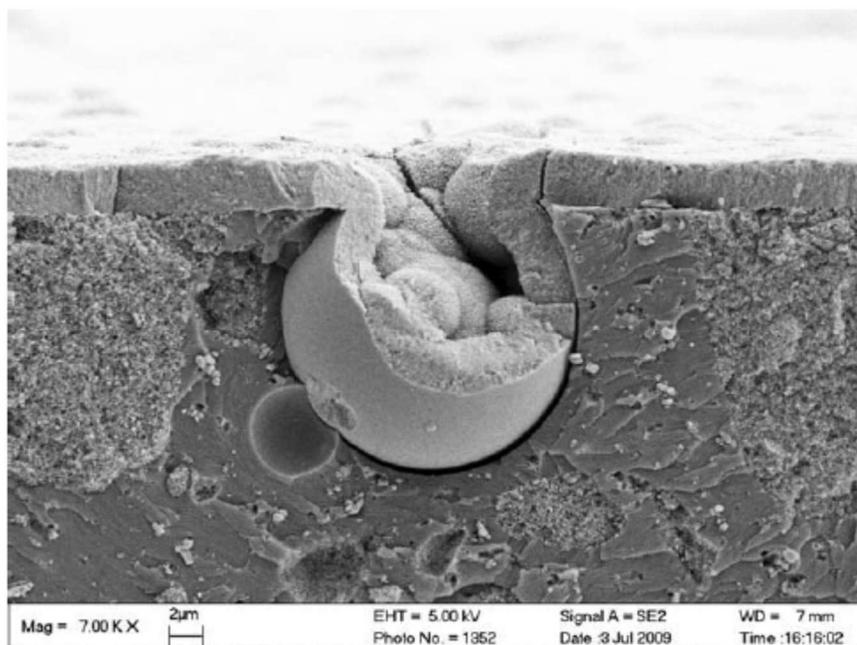


Figura 4.9 Immagine SEM di apatite formatasi all'interno di una porosità creata dall'eluizione della gentamicina sul cemento osseo Sr-HA dopo 7 giorni di immersione in SBF [80].

Inoltre, l'aggiunta di gentamicina al cemento osseo Sr-HA non sembra compromettere le sue proprietà meccaniche. Tutte queste caratteristiche rendono questo composito una alternativa migliore rispetto al classico cemento osseo caricato con gentamicina.

Allo scopo di limitare il rischio di revisione protesica dovuta a mobilitazione della protesi e al rischio di infezione, il gruppo di ricerca GLANCE del Politecnico di Torino (DISAT) [81] ha brevettato un cemento caricato con vetro bioattivo drogato con ioni argento. Questo composito ha mostrato un notevole potere antibatterico e un rilascio di Ag prolungato. La composizione del cemento, costituito da una fase inorganica contenente gli ioni argento permette di modulare il rilascio di tali ioni inibendo il rischio di infezioni.

L'analisi antibatterica (Figura 4.10) è stata condotta su due ceppi batterici, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli*, e su un ceppo fungino, *Candida albicans*.

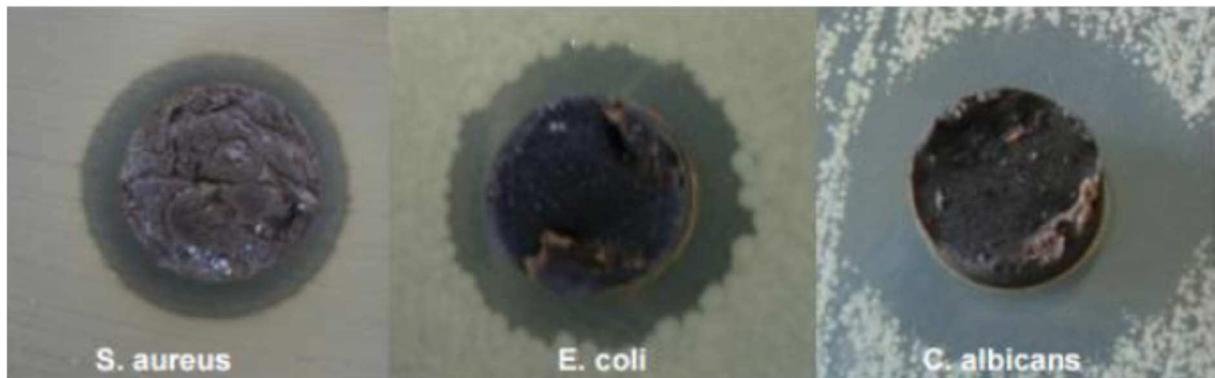


Figura 4.10 Analisi antibatteriche del cemento su tre diversi ceppi [81].

Lo stesso studio è stato effettuato su cementi Palacos R[®] e Palacos LV[®] [77], caricati con ioni argento. Le analisi sono state effettuate caricando questi cementi con il 30% e il 50% di polveri di vetro. Da un punto di vista meccanico, il cemento caricato con il 50% di polveri di vetro ha mostrato una diminuzione dello sforzo a compressione, cosa che non è stata osservata nel caso in cui è stato caricato con il 30% di polveri di vetro. Tutte e due le formulazioni hanno mostrato ottime proprietà antibatteriche, sia in termini di adesione che di proliferazione, più marcato nel caso di cemento caricato con il 50% di vetro. Per questo motivo un compromesso tra bioattività, effetto antibatterico e resistenza a compressione è stato ottenuto nel caso di Palacos R[®] e Palacos LV[®] caricati con il 30% di polveri vetro.

Un altro lavoro [78] è stato condotto su cemento osseo caricato con polveri di vetro bioattivo a base silice (SBA2) drogato con ioni argento. Il cemento osseo composito è stato investigato in termini di morfologia, composizione, bioattività e antibattericità nei confronti dello *Staphylococcus aureus*. La bioattività del composito è stata controllata immergendo i campioni in soluzione fisiologica simulata (SBF) ed è stata osservata la nucleazione e precipitazione di agglomerati ricchi in calcio e fosforo con morfologia tipica dell'idrossiapatite sulla superficie dei campioni dopo 14 giorni di immersione in SBF (Figura 3.11).

L'antibattericità è stata valutata con il test dell'alone di inibizione, che ha mostrato la capacità di questo composito di creare una zona significativa in cui la crescita batterica risulta inibita; ciò è dovuto ad una elevata concentrazione di rilascio di argento attorno alla superficie del campione. Inoltre il rilascio di argento è stato monitorato in SBF e ciò che si è osservato è un rilascio elevato durante i primi tre giorni di immersione in SBF, che sono i più critici dopo l'intervento e, in più, il cemento composito è risultato in grado di rilasciare ininterrottamente un piccolo quantitativo di argento per un massimo di un mese, utile per prevenire lo sviluppo di infezioni latenti.

4.6 CEMEX®

Il cemento osseo utilizzato per questo lavoro di tesi è designato con il nome commerciale CEMEX®. Di seguito vengono riportate alcune informazioni su questo tipo di cemento presenti all'interno del bugiardino del prodotto commerciale della TECRES®.

Il CEMEX® è un cemento radiopaco, a bassa temperatura di polimerizzazione perché utilizza un rapporto tra polvere e liquido 3:1, rispetto al tradizionale 2:1. Esiste in diverse formulazioni a seconda della viscosità:

- CEMEX ISOPLASTIC: è un cemento ad alta viscosità rapidamente manipolabile e idoneo all'applicazione manuale;
- CEMEX RX: è un cemento a bassa viscosità adatto sia per l'applicazione manuale che mediante siringa;
- CEMEX XL: è un cemento a bassissima viscosità adatto per l'applicazione in siringa;
- CEMEX FAST: è un cemento ad alta viscosità adatto per l'applicazione manuale qualora siano richiesti tempi applicativi ridotti.

In Tabella 4.2 vengono elencate le varie composizioni dei cementi ossei CEMEX per quanto concerne la componente liquida e la componente in polvere, con particolare attenzione per le percentuali di componenti utilizzati nel CEMEX RX, utilizzato in questo lavoro.

Tabella 4.2 Composizione dei cementi ossei CEMEX.

	CEMEX ISOPLASTIC	CEMEX RX	CEMEX XL	CEMEX FAST
Componente liquido	Fiala da 13.30 g di liquido sterile	Fiala da 13.30 g di liquido sterile	Fiala da 18.33 g di liquido sterile	Fiala da 8.35 g di liquido sterile
METIL METACRILATO	99.10% p/p	99.10% p/p	98.20% p/p	98.20% p/p
N-N DIMETIL-P-TOLUIDINA	0.90% p/p	0.90% p/p	1.80% p/p	1.80% p/p
IDROCHINONE	75 ppm	75 ppm	75 ppm	75 ppm
Componente polvere	Busta da 40 g di polvere sterile	Busta da 40 g di polvere sterile	Busta da 50 g di polvere sterile	Busta da 20 g di polvere sterile
PMMA	84.30% p/p	84.30% p/p	85.00% p/p	85.00% p/p
BARIO SOLFATO	13.00% p/p	9.00% p/p	12.00% p/p	12.00% p/p
PEROSSIDO DI BENZOILE	2.70% p/p	2.73% p/p	3.00% p/p	3.00% p/p

Il CEMEX è indicato per la fissazione di protesi all'osso in procedure ortopediche muscoscheletriche dovute ad una serie di patologie come osteoartrite, artrite reumatoide,

problemi degenerativi dell'anca post-traumatici e revisione di precedenti procedure di artoplastica. Come tutti i cementi ossei è controindicato nel caso di ipersensibilità al monomero o ad alcuno degli altri componenti del cemento osseo e nel caso in cui sia presente un'infezione attiva o non completamente trattata che potrebbe coinvolgere il sito di applicazione del cemento.

Dopo la miscelazione dei due componenti modifica in pochi minuti la sua consistenza aumentando rapidamente la sua viscosità fino a diventare una massa marmorea che imprigiona stabilmente la protesi ancorandola all'osso. Il raggiungimento di questo stato è facilmente avvertibile dall'aumento della temperatura del cemento stesso, in quanto caratterizzato da una reazione fortemente esotermica. Dopo alcuni minuti il cemento si raffredda spontaneamente indicando il termine della reazione e il momento in cui si può lasciare libera la protesi.

La temperatura e la tecnica di miscelazione influenzano la manipolazione e l'indurimento del cemento e per questo è necessario che l'equipe chirurgica effettui delle prove pratiche di utilizzo prima dell'intervento sul paziente nelle stesse condizioni strumentali e ambientali. Un aumento di temperatura sia dei componenti del cemento sia degli strumenti utilizzati per mescolare i componenti oltre i 23°C, riduce i tempi di preparazione del cemento, mentre una diminuzione di tale temperatura aumenta tali tempi.

Per migliorare l'impiego del cemento osseo bisogna seguire alcune indicazioni:

- Utilizzare il cemento alla temperatura di $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Pulire dai detriti e lavare accuratamente con soluzione fisiologica le sedi ossee di impianto;
- Evitare il più possibile l'interposizione di liquidi tra tessuto osseo e cemento;
- Attenersi per quanto possibile a deposizione di spessori ottimali di cemento per cui tutto lo stelo deve essere rivestito.

Oltre a temperatura e umidità, diversi fattori possono influenzare il "setting time" del cemento, come la tecnica di mescolamento (velocità e uso di mixer), grado di miscelazione, l'utilizzo di tutta la componente solida e liquida, l'inclusione di sostanze estranee all'interno di cemento (sangue, soluzione salina, ecc.).

5. Materiali e metodi

In questo lavoro di tesi è stato preparato un composito a base di polimetilmetacrilato (PMMA) a partire da un cemento osseo commerciale, CEMEX[®] RX (Tecres[®] S.p.a), caricato con un vetro (SBA3) drogato con ioni rame, ridotti chimicamente con acido tannico. In questo capitolo viene fornita la descrizione dei procedimenti adottati per la preparazione dei campioni utilizzati e parzialmente già caratterizzati in un precedente lavoro di tesi [4],[82]: le polveri di vetro SBA3, il vetro SBA3 drogato con ioni rame e il vetro SBA3 drogato con ioni rame ridotti con acido tannico, il cemento osseo tal quale (CEMEX[®] RX), il composito cemento osseo/polveri di vetro SBA3 tal quali (CEMEX[®] RX/SBA3), il composito cemento osseo/polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rame (CEMEX[®] RX/SBA3 0.05M-Cu) e il composito cemento osseo/polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rame ridotti con acido tannico (CEMEX[®] RX/SBA3 0.05 M-Cu-tannico). Successivamente si passa a descrivere le tecniche di indagine utilizzate per verificare la bioattività *in vitro* sia delle polveri di SBA3 (tal quali e drogate) sia del cemento (tal quale e composito), l'antibattericità *in vitro* e il test a compressione effettuato sul cemento tal quale e sul cemento composito realizzato.

5.1 Preparazione del vetro SBA3 0.05M-Cu trattato con acido tannico

5.1.1 Sintesi delle polveri di vetro SBA3

Le polveri di vetro utilizzate in questo lavoro di tesi sono state preparate e parzialmente caratterizzate in precedenti lavori di tesi [4],[82]. Il vetro SBA3 è un vetro bioattivo appartenente alla famiglia di composizioni facenti capo al Bioglass[®], la cui composizione è rappresentata in tabella 5.1.

Tabella 5.1 Composizione ponderale Bioglass[®].

Ossidi	Wt. %
SiO ₂	45.0
CaO	24.5
Na ₂ O	24.5
P ₂ O ₅	6.0

Lo SBA3 ha una composizione lievemente diversa da quella tipica del Bioglass[®] (45S5) in quanto, oltre agli ossidi citati in Tabella 4.1, presenta in aggiunta ossido di boro (B₂O₃) e allumina (Al₂O₃). Le quantità sono riportate in Tabella 5.2.

Tabella 5.2 Composizione di 100 g di polvere SBA3.

Ossidi	%mol	PM	Numero di moli	%wt.
SiO ₂	48	60	0.8	48.63
CaO	26	62	0.42	25.49
Na ₂ O	22	56	0.39	23.88
P ₂ O ₅	3	142	0.02	1.28
B ₂ O ₃	0.43	69.62	0.01	0.38
Al ₂ O ₃	0.57	102	0.01	0.34
tot	100		1.65	100

A partire dalla quantità di ossidi occorrenti per formare le polveri di vetro SBA3 è stata utilizzata la formula (5.1) per ottenere i grammi di reagente necessari per produrre 100 g di SBA3:

$$g_{reagente} = \frac{g_{vetro}}{100} \cdot \%wt_{componente} \cdot \frac{PM_{reagente}}{PM_{componente}} \quad (5.1)$$

Dove $\%wt_{componente}$ è la percentuale in peso del reagente considerato e PM è il peso molecolare di ogni reagente.

Applicando l'equazione (5.1) è stata ottenuta la colonna di destra della Tabella 5.3 sottostante, che rappresenta i grammi di reagente da pesare al fine di ottenere, in seguito alle opportune reazioni chimiche, 100 g di SBA3.

Tabella 5.3 Quantità in peso dei reagenti per 100 g di SBA3.

Reagenti	PM	g reagenti
SiO ₂	60	48.63
Na ₂ CO ₃	106	43.58
CaCO ₃	100	39.93
Ca ₃ (PO ₄) ₂	310	2.80
H ₃ BO ₃	61.83	0.33
Al ₂ O ₃	102	0.34

Ad esempio, nel caso dell'ossido di sodio (Na₂O), la formula per ottenere il peso del reagente necessario sarà:

$$g_{Na_2CO_3} = \frac{100}{100} \cdot 25.49 \cdot \frac{106}{62} = 43.57967g \quad (5.2)$$

Dove 25.49 è la %wt dell'ossido che si vuole ottenere, 106 il peso molecolare (PM) del reagente utilizzato e 62 il PM dell'ossido desiderato.

Stesso procedimento viene effettuato per gli altri reagenti, che sono stati poi pesati tramite bilancia analitica di precisione ORMA BCA120S con portata 120 g e sensibilità pari a 0.0001g.

Le polveri dei reagenti vengono accuratamente miscelate e successivamente inserite all'interno di un crogiuolo in platino, un materiale inerte che non reagisce con le polveri contenute al suo interno e in grado di sopportare le alte temperature di fusione (1450°C nel caso di SBA3). Il crogiuolo contenente i reagenti viene poi inserito in un forno a camera, impostando una rampa di salita di 12 °C/min e mantenendo il vetro alla temperatura di 1450°C per 1 ora. Successivamente il fuso viene colato in acqua distillata per non avere contaminazione e raffreddato rapidamente per non ottenere fenomeni di cristallizzazione: si ottiene così la *fritta*, che deve essere fatta asciugare prima di procedere con la macinazione. La fritta viene quindi sottoposta a macinazione meccanica utilizzando una giara in zirconia contenente 6 sferette anche esse in zirconia, materiale selezionato in quanto è molto resistente all'usura e inerte; la macinazione viene eseguita per 30 minuti con una velocità di 200 rpm in un verso e per 30 minuti in verso contrario. Successivamente la polvere viene setacciata fino a granulometria < 20 µm, utilizzando un setaccio con rete in nylon (Figura 5.1A). Questa taglia è stata selezionata da studi precedenti [24] [77] [78].

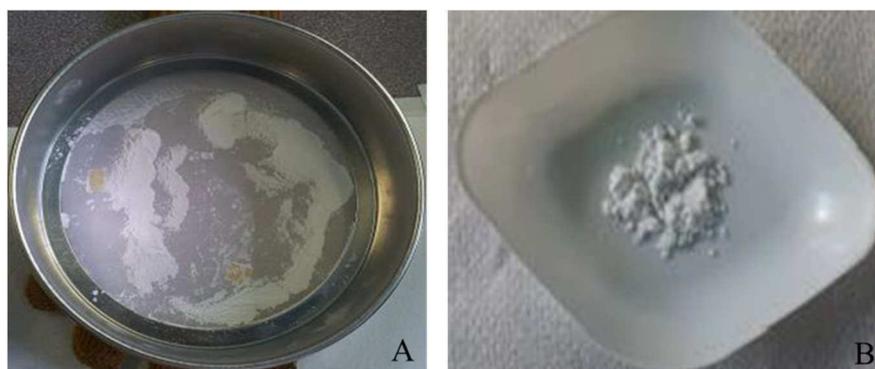


Figura 5.1 Polveri di SBA3 in setaccio manuale (A); polveri di SBA3 setacciate con granulometria < 20 µm (B).

5.1.2 Drogaggio con rame mediante scambio ionico

Il vetro è stato caricato con ioni rame mediante la tecnica dello scambio ionico (Paragrafo 2.4.2.3.), che consente una introduzione di ioni rame più controllata e uniforme (Figura 5.2).

Sono stati preparati 40 ml di soluzione acquosa di acetato di rame ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,05M, poiché, da studi precedenti [4],[82],[24],[83], è stato osservato che con questa concentrazione molare è possibile l'introduzione di un quantitativo di rame tale da conferire al vetro proprietà antibatteriche. Per avere una soluzione con questa molarità è necessario calcolare il numero di moli necessarie:

$$n_{mol} = V \cdot M = 0.040 \cdot 0.05 = 0.02 \text{ mol} \quad (5.3)$$

Da questo valore, sapendo che il peso molecolare dell'acetato di rame è pari a 199.65 g/mol, si può ricavare il quantitativo in grammi necessario per produrre 40 ml di soluzione:

$$g_{\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = n_{mol} \cdot PM = 0.02 \cdot 199.65 = 0.3993 \text{ g} \quad (5.4)$$

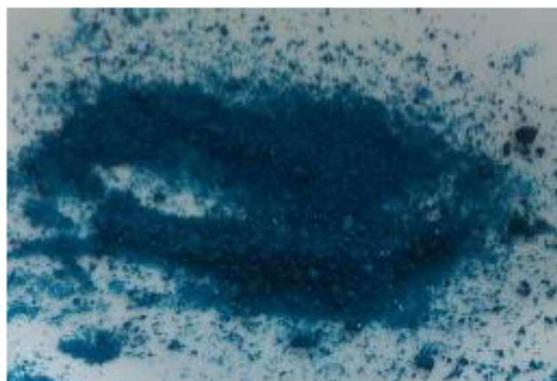


Figura 5.2 Polveri di acetato di rame.

Per effettuare lo scambio ionico devono essere eseguiti alcuni precisi passaggi:

1. Inserimento di 40 ml di acqua bidistillata in un contenitore di plastica;
2. Inserimento di 0.3991 g di polvere di $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di un magnete per l'agitazione;
3. Dissoluzione di $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in oscillatore termostatico (Figura 5.3 A) a 37 °C a una velocità di 150 rpm per 20 minuti;
4. Inserimento di 2 g di polvere di SBA3 all'interno della boccetta (Figura 5.3 B);
5. Oscillazione termostatica a 37 °C a una velocità di 150 rpm per 1 ora;
6. Aspirazione della soluzione al termine dello scambio mediante l'ausilio di una pipetta, lasciando il vetro sul fondo;
7. Lavaggio delle polveri vetrose per due volte con acqua bi-distillata e filtrazione con filtri di carta (Figura 5.3 C);
8. Asciugatura dei filtri (posti all'interno di petri di plastica) in stufa a 37 °C per 24 ore.



Figura 5.3 Soluzione acquosa 0,05M di $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e SBA3(A); soluzione acquosa di $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e SBA3 in oscillatore termostatico (B); Filtrazione della soluzione acquosa di $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e SBA3 dopo agitazione (C).

Una volta ottenute le polveri di vetro drogate con ioni rame, queste sono state inserite all'interno di un mortaio in marmo per frantumare gli eventuali agglomerati formatisi (Figura 5.4).



Figura 5.4 Polveri di SBA3 0.05M-Cu [4].

5.1.3 Trattamento per la riduzione degli ioni Cu^{2+}

Una volta ottenute le polveri di SBA3 drogate con ioni rame è stata effettuata una riduzione degli ioni rame Cu^{2+} a ioni Cu^+ o rame metallico Cu^0 . Le tecniche adottate in un precedente lavoro di tesi [82] per questo procedimento sono:

- Riduzione chimica con acido tannico come agente riducente;
- Riduzione chimica con NaOH come agente riducente;
- Riduzione chimica con ascorbato di sodio come agente riducente;
- Trattamento termico in argon;
- Trattamento termico in aria;
- Irraggiamento con UV;
- Irraggiamento con UV e successivo trattamento termico in argon;
- Irraggiamento UV con successivo trattamento termico in aria.

Sulla base dei risultati ottenuti precedentemente, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato il trattamento con *acido tannico* come agente riducente.

5.1.3.1 Riduzione chimica con acido tannico

Le concentrazioni di acido tannico utilizzate sono state individuate da studi di letteratura effettuati su altri materiali [83]; sono quindi stati preparati 65 ml di soluzione 0,01M di acido tannico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) con 2 g di SBA3 0.05M-Cu.

$$n_{mol} = V \cdot M = 0.065 \cdot 0.01 = 0.00065 \text{ mol} \quad (5.5)$$

Dal numero delle moli, sapendo che il peso molecolare dell'acido tannico (Figura 5.5) è a 1701,2 g/mol, è possibile calcolare i grammi necessari:

$$g_{\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}} = n_{mol} \cdot PM = 0.00065 \cdot 1701.2 = 0.696 \text{ g} \quad (5.6)$$



Figura 5.5. Polveri di acido tannico ($C_{76}H_{52}O_{46}$).

La soluzione di scambio è stata preparata in un apposito contenitore contenente acido tannico (Figura 4.5) e acqua bi-distillata; questa è stata posta in oscillatore termostatico per far disciogliere l'acido tannico. Successivamente sono state aggiunte alla soluzione le polveri di SBA3 drogato con ioni rame (Figura 5.6 A) e la soluzione è stata nuovamente sottoposta ad agitazione e portata a 37 °C all'interno dell'oscillatore termostatico, assumendo un colore verde scuro. La soluzione è stata poi filtrata con l'uso di appositi filtri di carta (Figura 5.6 B), successivamente risciacquati con acqua bi-distillata. Il filtro con le polveri è stato messo in stufa a 37 °C per 24 ore per consentire l'essiccazione delle polveri.

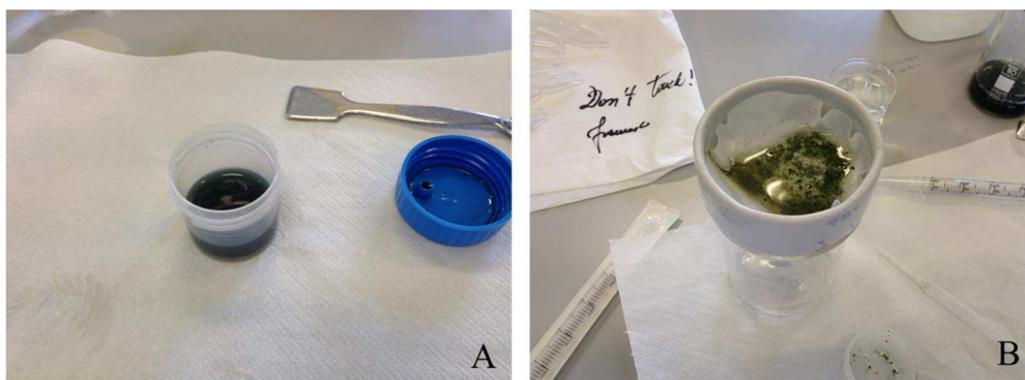


Figura 5.6. Soluzione acquosa SBA3 0.05M-Cu trattato con acido tannico (A); Filtrazione della soluzione acquosa (B) [82].

5.2 Preparazione del cemento osseo composito

L'obiettivo di questa tesi è quello di sintetizzare un cemento osseo composito a partire da una matrice commerciale (CEMEX[®] RX – Tecres S.p.a.) inglobando una fase vetrosa (SBA3), cercando di renderlo contemporaneamente bioattivo e antibatterico.

Il cemento utilizzato è presente in quattro formulazioni diverse a seconda della viscosità:

- CEMEX[®] RX: è un cemento a bassa viscosità adatto sia per l'applicazione manuale che mediante siringa;

- CEMEX® ISOPLASTIC: è un cemento ad alta viscosità rapidamente manipolabile e idoneo all'applicazione manuale;
- CEMEX® XL: è un cemento a bassissima viscosità adatto per l'applicazione in siringa;
- CEMEX® FAST: è un cemento ad alta viscosità adatto per l'applicazione manuale qualora siano richiesti tempi applicativi ridotti.

La *componente liquida* è costituita da metil metacrilato, n-n-dimetil p-toluidina e idrochinone, mentre la *componente polvere* è costituita da PMMA, bario solfato e perossido di benzoile.

Il perossido di benzoile attiva la polimerizzazione quando i due componenti (liquido e polvere) vengono miscelati, mentre il solfato di bario funge da agente radiopaco.

L'idrochinone presente nella componente liquida ha il ruolo di stabilizzatore, per evitare la polimerizzazione precoce in presenza di luce o calore; l'n-n-dimetil-p-toluidina ha lo scopo di favorire la polimerizzazione dopo la miscelazione dei due componenti.

Il CEMEX® RX è indicato per la fissazione di protesi all'osso in procedure ortopediche muscoloscheletriche dovute ad una serie di patologie come osteoartrite, artrite reumatoide, problemi degenerativi dell'anca post-traumatici e revisione di precedenti procedure di artroplastica.

Per migliorare l'impiego del cemento osseo è bene lavorare a temperature di $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in quanto la temperatura e la tecnica di miscelazione influenzano la manipolazione e l'indurimento del cemento. Un aumento di temperatura sia dei componenti del cemento sia degli strumenti utilizzati per mescolare i componenti oltre i 23°C , riduce i tempi di preparazione del cemento, mentre una diminuzione della temperatura li aumenta.

In questo lavoro sono stati preparati quattro tipi di campioni differenti:

- Cemento osseo tal quale;
- Cemento osseo caricato con il 10% di SBA3;
- Cemento osseo caricato con il 10% di SBA3 0.5M-Cu;
- Cemento osseo caricato con il 10% di SBA3 0.5M-Cu-tannico.

Poiché il rapporto fra polimero e monomero di questo tipo di cementi è 3:1:

$$\frac{\text{polvere}}{\text{liquido}} = 3 \quad (5.7)$$

Per 4 g di polvere, secondo l'equazione (5.7) e utilizzando la densità dell'MMA (940 kg/m^3), sono necessari 1.418 ml di MMA, per cui, ad esempio, per ottenere 10 g di composto si utilizzerà la proporzione:

$$4: 1.418 = 10: x \quad (5.8)$$

Da cui si ottengono 3.545 ml di MMA per 10 g di polvere.

I cementi sono stati realizzati mescolando 3.6 ml di MMA e 10 g di polvere di cemento all'interno di un contenitore (Figura 5.7 A) e, con l'ausilio di una spatola sono state mescolate le due componenti. La polvere è stata versata sopra al monomero liquido e, per minimizzare l'inclusione di bolle, è stata mescolata muovendo la spatola dall'esterno verso il centro della ciotola fino a completa omogeneizzazione del prodotto (Figura 5.7 B).



Figura 5.7 Strumenti utilizzati per la preparazione del CEMEX RX (A); miscelazione dei componenti del CEMEX RX (B) [4].

Il composto è stato poi inserito con l'aiuto di spatola all'interno di un apposito stampo in acciaio contenente 25 fori di diametro 10 mm e altezza 5 mm.

Una volta terminata la fase di indurimento i campioni sono stati estratti dallo stampo.

Per quanto riguarda la preparazione degli altri tre campioni (CEMEX RX/SBA3, CEMEX RX/SBA3 0.05M-Cu e CEMEX RX/SBA3 0.05M-Cu-tannico) si è partiti pesando 9 g di cemento e 1 g di polvere di vetro (10% in peso della fase solida), in modo tale da mantenere il rapporto commerciale 3:1; successivamente le polveri sono state inserite all'interno di una boccetta di plastica e miscelate per 1 ora in modo da omogeneizzare le polveri, dopodiché si è proceduto in modo analogo al cemento tal quale.

In Figura 5.8 è possibile osservare i 4 tipi di cementi ossei ottenuti.

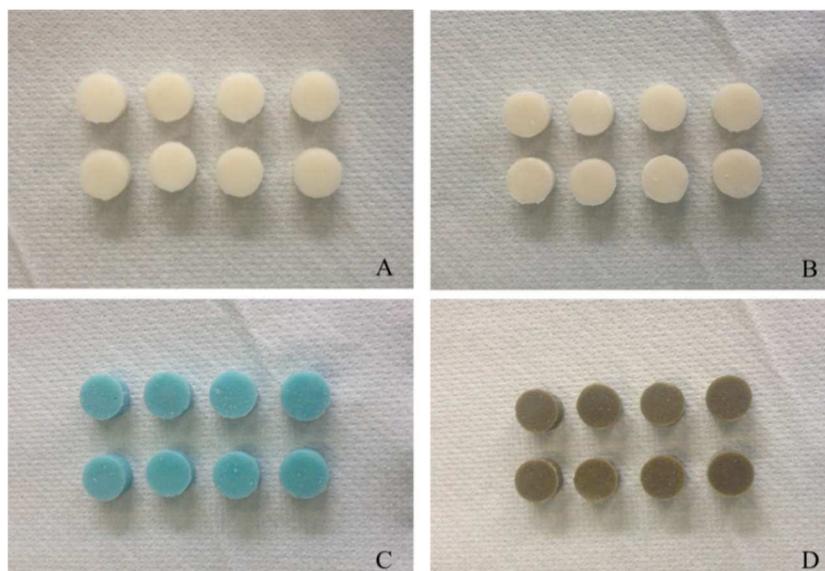


Figura 5.8 CEMEX RX tal quale (A); CEMEX RX/SBA3 (B); CEMEX RX/SBA3 0.05M-Cu(C); CEMEX RX/SBA3 0.05M-Cu-tannico (D).

5.3 Caratterizzazioni

Sui campioni ottenuti sono stati fatti alcuni test per valutare le proprietà morfologiche, composizionali, bioattive, antibatteriche e meccaniche: *Microscopia Elettronica a Scansione ad emissione di campo e Spettroscopia a Dispersione di Energia (FESEM-EDS)*, *Prove di bioattività in vitro*, *Test di antibattericità in vitro* e *test di compressione*.

5.3.1 Microscopia Elettronica a Scansione ad emissione di campo e Spettroscopia a Dispersione di Energia (FESEM-EDS)

Le analisi FESEM ed EDS sono state effettuate per studiare i campioni dal punto di vista morfologico e composizionale prima dell'immersione in soluzione fisiologica simulata (SBF) e per valutare la nucleazione e crescita di cristalli di idrossiapatite dopo il test di bioattività *in vitro*.

Il FESEM è un microscopio basato sul principio di funzionamento del SEM (microscopio elettronico a scansione) (Figura 5.9), che lavora con elettroni che vengono liberati da una sorgente ad emissione di campo (catodo) e vengono accelerati da un gradiente di campo elettrico. Con una colonna ad alto vuoto gli elettroni primari vengono focalizzati e deflessi da lenti elettromagnetiche per produrre un fascio incidente stretto che bombarda il campione. In questo modo si generano degli elettroni secondari, che vengono riemessi dal campione. Un detector rileva questi elettroni e genera un segnale elettrico che viene poi amplificato e trasformato in immagine digitale; l'angolo e la velocità con cui vengono emessi questi elettroni secondari forniscono informazioni topografiche sul campione.

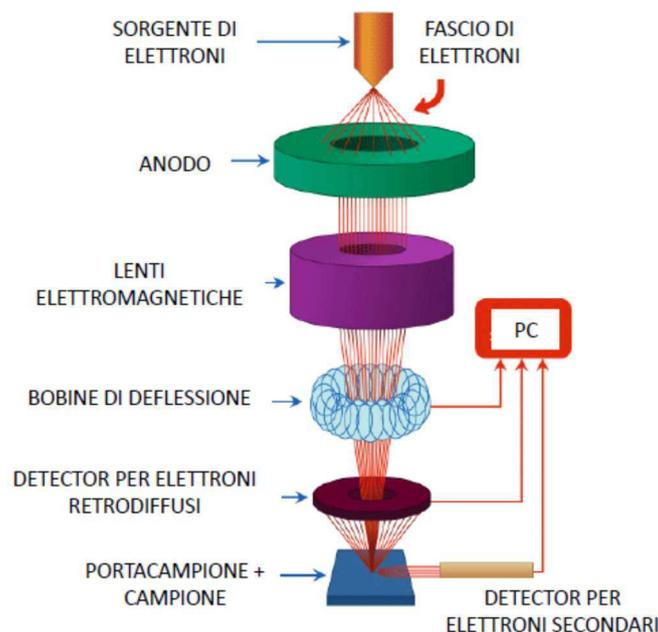


Figura 5.9 Schema funzionamento Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) [84].

Il FESEM è una variante del SEM in quanto utilizza una sorgente di elettroni ad emissione di campo (Figura 5.10): l'emissione è data dalla capacità di estrarre elettroni da un monoblocco di tungsteno appuntito da parte di campi elettrici intensi [85].

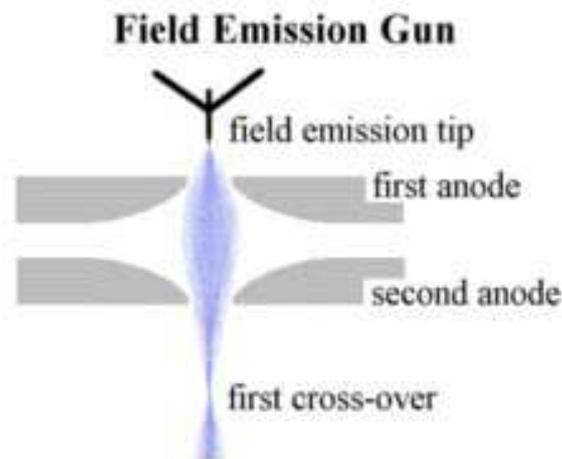


Figura 5.10 Schematizzazione principio di funzionamento emissione di campo [85].

Il monoblocco in tungsteno viene sottoposto all'azione del campo elettrico del primo anodo (circa 3000V) e gli elettroni emessi vengono accelerati dal secondo anodo fino a 100 keV; le lenti elettroniche servono per generare il cross-over oltre i due anodi.

Tra i principali vantaggi di questa tecnica è possibile citare:

- Possibilità di esaminare piccole zone di contaminazione a voltaggi compatibili con l'EDS;
- Penetrazione dell'analisi di circa 1-2 nm e ridotta di elettroni a bassa energia cinetica;
- Possibilità di raggiungere risoluzioni fino a 300000x;
- Non necessita la conducibilità della superficie di un campione isolante;
- Immagini di alta qualità con carica elettrica trascurabile dei campioni (voltaggi di accelerazione di 0.5-30kV).

L'EDS fornisce una analisi quantitativa e qualitativa degli elementi chimici che compongono il materiale e sfrutta l'emissione di raggi-X generato da un fascio di elettroni che incide sul materiale. Il rivelatore è costituito da un monocristallo di silicio drogato con litio rivestito alle due estremità da uno strato conduttivo di oro e mantenuto in alto vuoto alla temperatura di -192°C in azoto liquido. La corrente elettrica che viene generata è amplificata dall'interazione tra cristallo e fotoni.

5.3.2 Prove di bioattività *in vitro*

Poiché il cemento deve essere in grado di formare un legame chimico vero e proprio con il tessuto osseo mediante la formazione di un layer di apatite, la bioattività è una delle proprietà più importanti. Per valutare la bioattività sono state effettuate delle prove *in vitro*, in cui i campioni sono stati immersi in una soluzione fisiologica simulata (Simulated Body Fluid, SBF), avente una concentrazione ionica simile a quella del plasma umano e molto utile per

valutare *in vitro* le reazioni che potrebbero avvenire *in vivo* sulla superficie di un biomateriale, quando questo va in contatto con i fluidi biologici. Durante il test inoltre, è stato misurato il pH ogni 2-3gg della SBF in cui erano immersi i campioni di CEMEX RX/SBA3 0,05M-Cu trattato con acido tannico per valutare eventuali variazioni dal pH fisiologico. Il pH è stato monitorato con l'uso di un pH-metro (Figura 5.11).



Figura 5.11 pH-metro [4].

Infine sono state effettuate analisi FE-SEM/EDS dopo 7, 14, 28 giorni dall'immersione nella SBF per verificare l'effettiva formazione di idrossiapatite.

Preparazione SBF

In Tabella 5.4 è riportata la quantità in grammi, fatta eccezione per l'acido cloridrico (1M-HCl) espresso in millilitri, dei reagenti necessari per la preparazione di 1L di SBF sulla base del protocollo di Kokubo [86].

Tabella 5.4. Reagenti necessari per la preparazione della SBF [86].

Reagente	Formula	1L SBF [g/L]
Cloruro di sodio	NaCl	8,035
Bicarbonato di sodio	NaHCO ₃	0,355
Cloruro di potassio	KCl	0,225
Fosfato dipotassico tri-idrato	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,231
Cloruro di magnesio esaidrato	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,311
Acido cloridrico 1M	1M-HCl	39ml
Cloruro di calcio	CaCl ₂	0,292
Solfato di sodio	Na ₂ SO ₄	0,072
TRIS	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,118
Acido cloridrico 1M	1M-HCl	0-5ml

Per ottenere 2 L di SBF sono stati scaldati su piastra termica 1600 ml di acqua bidistillata fino ad una temperatura di $36.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$; in seguito sono stati aggiunti i primi 8 reagenti uno alla volta e rispettando l'ordine in Tabella 4.4, facendoli sciogliere e sciacquando le barchette contenenti le polveri precedentemente pesate con acqua bidistillata e aggiungendola poi alla soluzione. Prima dell'introduzione del nono reagente (tris(idrossimetil)amminometano

cloridrato, TRIS) il pH della soluzione è normalmente compreso tra 1 e 3. Successivamente è stata disciolta poco alla volta la TRIS, controllando attentamente il pH, che in un primo momento sale velocemente, poi rallenta. Dal momento che, con l'aggiunta della TRIS, il pH della soluzione non deve superare il valore di 7.45 ± 0.01 , il decimo reagente, che è nuovamente 1M-HCl, viene utilizzato per riportare il pH a 7.42 ± 0.01 , facendo particolare attenzione a che non scenda al di sotto di 7.40 ± 0.01 . Questo procedimento viene ripetuto fino alla completa dissoluzione di tutta la TRIS raggiungendo il valore finale di pH di 7.40 ± 0.01 a $36.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$.

Test di bioattività *in vitro*

In questo lavoro di tesi la bioattività è stata testata a 3 tempi (7gg, 14gg, e 28gg) su cemento osseo con SBA3 0,5M ridotto con acido tannico. La bioattività dei cementi compositi contenenti SBA3-Cu 0.5M era infatti già stata valutata in un lavoro precedente[4] e si era osservata precipitazione di idrossiapatite dopo circa 7 giorni di immersione in SBF. Sono stati preparati 6 contenitori contenenti ciascuna 25 ml di SBF e all'interno sono stati posizionati i campioni, con la superficie a maggior rugosità rivolta verso l'alto.

I campioni sono stati posizionati in un incubatore a 37°C per tutta la durata della prova ed è stato misurato il pH della soluzione ed effettuato un *refresh* dell'SBF ogni 2-3gg.

Terminati i periodi di incubazione i campioni sono stati estratti dalla SBF, sciacquati in acqua bi-distillata e posti ad asciugare in stufa a 37°C per 24 ore.

I campioni sono quindi stati incollati su uno stub di alluminio (supporto per analisi microscopiche) con una colla conduttiva a base di argento per essere analizzati con la tecnica FE-SEM/EDS.

5.3.3 Prove di antibattericità *in vitro*

Le prove di antibattericità effettuate per questo lavoro di tesi consistono nella valutazione dell'alone di inibizione e nella conta dei batteri adesi alla superficie del cemento osseo e proliferati nel brodo di coltura (metodo delle diluizioni o conta delle unità formanti colonie - CFU). I test sono stati condotti al Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche di Torino (conta CFU) e presso il laboratorio di analisi chimiche, cliniche e microbiologiche del CTO di Torino (alone di inibizione). L'obiettivo di queste prove era quello di valutare e confrontare l'antibattericità dei campioni: SBA3 0.5Cu, SBA3 0.5 Cu trattato con acido tannico. CEMEX RX, CEMEX RX/SBA3 0,05M-Cu e CEMEX RX/SBA3 0,05M-Cu-tannico. Durante la prova è stato utilizzato lo *Staphylococcus aureus*, uno dei ceppi batterici maggiormente associati alle infezioni protesiche [30].

5.3.3.1 Valutazione dell'alone di inibizione

Questa prova è stata eseguita facendo riferimento alla Normativa "NCCLS M2-A9"[87].

Si prepara una soluzione 0.5 McFarland del ceppo batterico *Staphylococcus aureus* e, prendendo una provetta di soluzione fisiologica sterile adatta alla valutazione ottica della torbidità, si verifica con turbidimetro che l'indice di McFarland sia pari a 0. Si prepara un brodo batterico a torbidità nota (0.5 McFarland) inserendo all'interno della soluzione

fisiologica una piccola quantità di batteri prelevati mediante cotton fioc da piastra Agar Sangue (Figura 5.12).

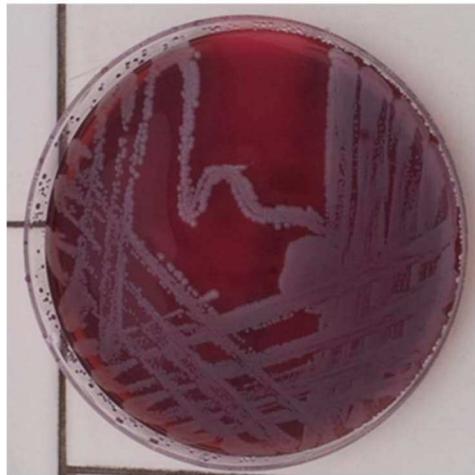


Figura 5.12 Piastra Agar Sangue contenente colonie di *S. aureus* [4].

La soluzione fisiologica viene agitata e viene misurata la torbidità con turbidimetro: se il valore è inferiore a 0.5 si aggiungono batteri, se è maggiore di 0.5 si aggiunge soluzione fisiologica sterile e si ripete la misura fino ad arrivare a un valore di torbidità pari a 0.5 McFarland.

Successivamente si impregna un cotton fioc nella soluzione 0.5 McFarland e lo si passa su una piastra di terreno Mueller Hinton agar realizzando diversi passaggi (Figura 5.13): dopo aver effettuato il primo la piastra viene ruotata di 45° e poi di 90°. La procedura viene nuovamente ripetuta e infine si passa il cotton fioc ai bordi della piastra per 2-3 volte.

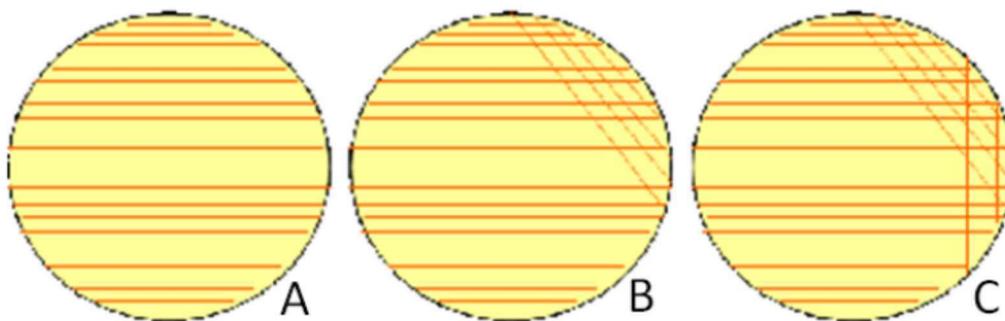


Figura 5.13 Preparazione piastra per alone di inibizione [4].

Si preparano appositi campioni di vetro pesando 200 mg di ciascuna tipologia e inserendole in stampo cilindrico, pressandole applicando con un pistone un carico di circa 4 tonnellate per 10 s. Si posizionano i campioni a contatto con la piastra e posti in incubazione a 35 °C per 24 ore.

Il giorno successivo si osserva e misura l'eventuale formazione di un alone di inibizione attorno ai campioni, all'interno del quale i batteri non proliferano. Se non si osserva alcun alone di inibizione si solleva il campione per valutare la possibile formazione di batteri sotto

al campione. Qualora non vi fosse proliferazione batterica al di sotto del campione è indice di buone proprietà antibatteriche. Affinché venga valutata con certezza la presenza o meno di batteri, il campione viene passato velocemente 2-3 volte su becco bunsen in modo tale da fissare i batteri e da poterli osservare al microscopio.

5.3.3.2 Metodo della conta in piastra

Il giorno prima della prova si allestisce la brodocultura (Mueller Hinton Brodo, MHB) overnight a 37°C a partire da 5 *microbank* contenenti 5 ml di brodo e proseguendo con diluizioni di 100 µl in 100 µl.

Il giorno della prova si trasferiscono i campioni, precedentemente sterilizzati in stufa a secco a 100°C per 3 ore, in *piastre microtiter* a 6 pozzetti. La serie di campioni viene allestita in doppio, una per le 3 ore e una per le 24 ore.

Si centrifuga la provetta n°5 a 4000 giri per 10 minuti e il pellet risospeso di 100 µl di MHB. Si prosegue poi preparando la 0.5 McFarland in 5 ml di soluzione fisiologia 0.9% (10^8 ufc/ml) e l'inoculo batterico:

- 0.1 ml della 0.5 McFarland (10^8) + 9.9 ml di MHB: 10^6 ufc/ml;
- 1.5 ml del 10^6 + 148.5 ml di MHB: 10^4 ufc/ml.

Una aliquota pari a 5 ml dell'inoculo batterico (10^4 ufc/ml) viene trasferita in piastra microtiter a 6 pozzetti contenenti i campioni sterili e parallelamente viene allestita una provetta di controllo crescita contenente 5 ml di brodocultura per eseguire la conta in piastra a t_0 su batteri non adesi (ufc).

I campioni vengono incubati a 37 °C in agitazione per 3 ore e 24 ore. Allo scadere delle 3 ore e 24 ore i campioni vengono rimossi dalla brodocultura con pinzette sterili e vengono prelevati 0.5 ml di brodo e eseguite delle diluizioni scalari (Figura 5.14) con relative conte in piastra (ufc) per valutare i *batteri non adesi*.



Figura 5.14 Diluizioni scalari per conta dei batteri non adesi.

I campioni vengono lavati immergendoli in falcon con 5 ml di acqua sterile per qualche secondo. Successivamente vengono trasferiti in sacchetti sterili contenenti 1.5 ml di soluzione fisiologica 0.9%. I sacchetti vengono sonicati a 43 Hz per 7 minuti per consentire il distacco

dei batteri adesi al materiale; dopo aver vorticizzato i sacchetti per circa 20 minuti si prelevano 0.5 ml dalla soluzione si eseguono diluizioni scalari con relative conte in piastra per valutare i *batteri adesi*.

5.3.4 Prove meccaniche di compressione

Le prove meccaniche (Figura 5.15) vengono effettuate per studiare il comportamento di un materiale sottoposto ad una deformazione; tra le sollecitazioni, oltre a trazione, taglio e compressione, è possibile citare la compressione, uno degli sforzi elementari perpendicolare alla superficie di riferimento a cui un corpo o un materiale può essere sottoposto. Nel caso del cemento osseo è stato effettuato un test a compressione in quanto il suo ruolo principale è quello di garantire, oltre ad adesione, il trasferimento degli sforzi tra impianto protesico e osso e, *in vivo*, una articolazione è costantemente sottoposta a sollecitazioni quali la pressione. Questo test serve a misurare la resistenza a compressione del provino, espressa come:

$$\sigma = \frac{P}{A} \quad (5.9)$$

Dove σ è la resistenza a compressione [MPa], P è il carico a cui è sottoposto il provino [N] e A è l'area di base a contatto con il piatto della pressa [mm²].



Figura 5.15 Macchinario durante la prova di compressione [4].

Le prove meccaniche di compressione sono state effettuate su appositi campioni di forma cilindrica (Figura 5.16 A e B) sia sul cemento tal quale sia sul composito in riferimento alla norma ISO 5833:2002 [60].

I provini sono stati creati con appositi stampi per avere una altezza di 12 mm e un diametro di 6 mm; prima di sottoporli al test di compressione sono stati levigati con carta vetro di granatura 600 in modo tale da eliminare le asperità e ottenere superfici lisce e parallele tra di loro e con i piani superiore e inferiore del macchinario, garantendo maggior stabilità in sede di misura.

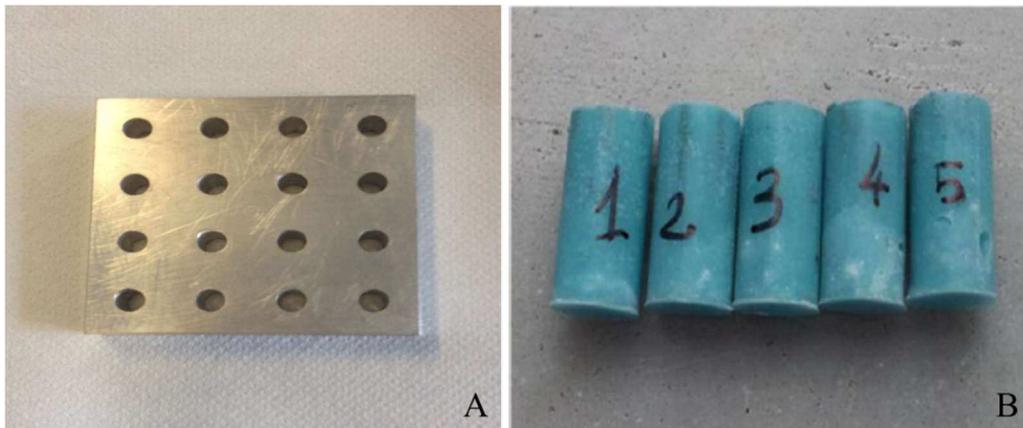


Figura 5.16 Stampo (A) e provini per test di compressione (B).

I cilindri sono stati posizionati uno alla volta tra i due piani del macchinario ponendo particolare attenzione a che non vi fosse alcuno spazio tra il cilindro e il piano in modo tale che il carico applicato fosse uniformemente distribuito. È stata poi applicata una velocità costante di 20 mm/min fino a rottura del campione e ne è stato registrato lo snervamento al 2%.

6. Risultati e discussione

In questo lavoro sono stati realizzati cementi ossei composti costituiti da una matrice a base di polimetilmetacrilato commerciale (CEMEX RX) caricato con un vetro bioattivo (SBA3) sottoposto a scambio ionico in soluzione acquosa con acetato di rame 0.05M e lo stesso vetro contenente Cu sottoposto a un trattamento di riduzione chimica con acido tannico per consentire la formazione di nanoparticelle di rame metallico. In questo capitolo vengono esposti i risultati ottenuti in varie prove atte a caratterizzare il campione di composito preparato (CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico), in confronto con il cemento contenente il vetro drogato con Cu in forma ionica:

- *Microscopia elettronica a scansione e spettrometria a dispersione di energia (FESEM-EDS)* per caratterizzare morfologicamente e quantitativamente a livello composizionale i campioni ottenuti per questo lavoro di tesi;
- *Prove di bioattività in vitro* per valutare la bioattività dei campioni CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico attraverso un'analisi morfologico-composizionale e la valutazione del pH della soluzione fisiologica simulata (SBF) in seguito ad immersione dei campioni per 7, 14 e 28 giorni;
- *Test di antibattericità in vitro* per valutare se il cemento osseo, in seguito all'introduzione del vetro trattato come seconda fase, assume proprietà antibatteriche;
- *Prove meccaniche di compressione* per valutare e il comportamento meccanico del composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico e confrontarlo con il comportamento meccanico del cemento tal quale.

6.1 Analisi morfologica e composizionale (FESEM-EDS)

Le analisi FESEM-EDS effettuate sui campioni sono state condotte utilizzando i software Smartsem Zeiss (FE-SEM) e Inca Oxford Instrument (EDS). L'analisi EDS di area del campione è stata effettuata allo scopo di studiarne le caratteristiche composizionali e valutare l'esposizione del vetro. Per le analisi EDS di area la potenza dello strumento è stata impostata a 20 kV ad ingrandimenti fino a 10000x.

6.1.1 Caratterizzazione delle polveri di vetro

In questa sezione vengono mostrate le immagini FESEM e i rispettivi spettri EDS delle polveri di vetro preparate in questo lavoro di tesi: SBA3 tal quale, SBA3-0.05M Cu, SBA3-0.05M Cu-tannico.

In Figura 6.1(a) e Figura 6.1(b) è possibile osservare rispettivamente un'area del campione di polveri di vetro tal quale (SBA3) e il relativo spettro EDS.

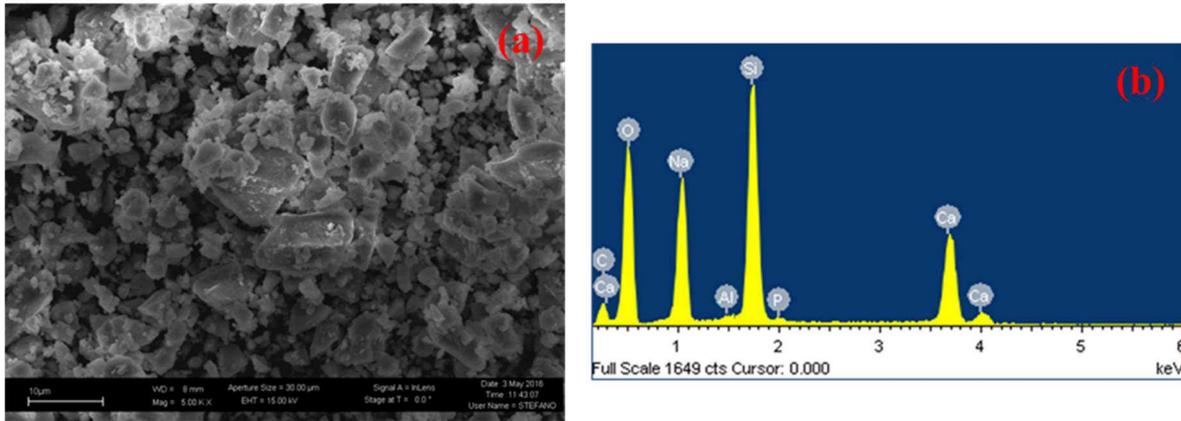


Figura 6.1 Immagine FESEM di SBA3 ad ingrandimento 5000x(a). Spettro EDS di area del campione di SBA3(b).

L'analisi morfologica mostra delle polveri di granulometria inferiore ai 20 μm , di diversa geometria in conseguenza al processo di macinazione subitò.

Lo spettro EDS mostra i picchi degli elementi che costituiscono le polveri di vetro utilizzate ad esclusione del B, non identificabile attraverso questa misura. In Tabella 6.1 vengono mostrate le percentuali atomiche dei principali costituenti del vetro, escluso come accennato il B. Le percentuali ricavate dall'analisi EDS sono in accordo con le percentuali teoriche.

Tabella 6.1 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro SBA3.

Element	%atomic
Na K	30.5±0.2
Al K	0.38±0.02
Si K	43.4±0.2
P K	1.02±0.1
Ca K	24.74±0.07

Di seguito sono riportate l'immagine FESEM del campione di SBA3 drogato con ioni rame (Figura 6.2(a)) e il rispettivo spettro EDS (Figura 6.2(b)).

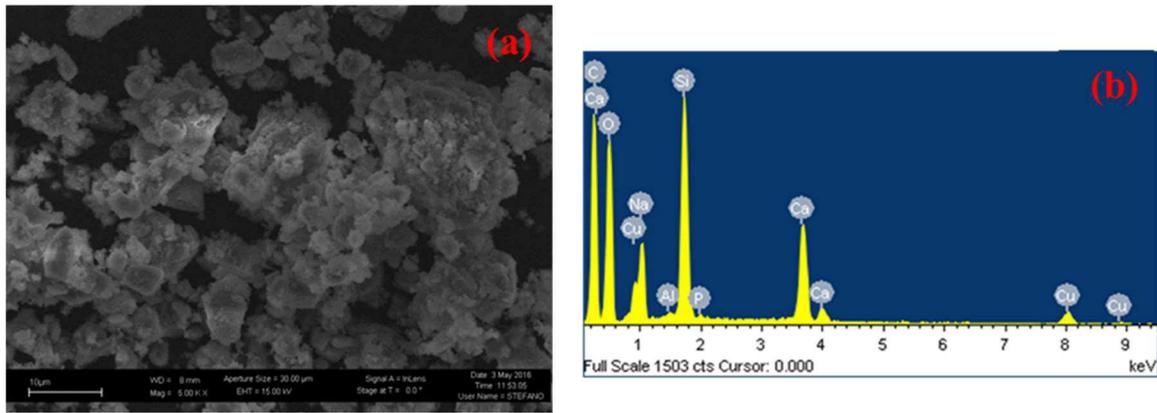


Figura 6.2 Immagine FESEM di SBA3-0.05M Cu con ingrandimento a 5000x(a). Spettro EDS di area del campione di SBA3-0.05M Cu (b).

La Figura 6.2(a) evidenzia una morfologia delle polveri molto simile al campione SBA3, tuttavia a maggiori ingrandimenti (Figura 6.3) è possibile osservare la formazione di una pellicola superficiale dovuta alla sensibilità alle soluzioni da parte dei vetri bioattivi; in questo caso la soluzione a cui ci si riferisce è quella a base di acetato di rame 0.05M, utilizzata per effettuare il drogaggio delle polveri di SBA3 con tecnica dello scambio ionico.

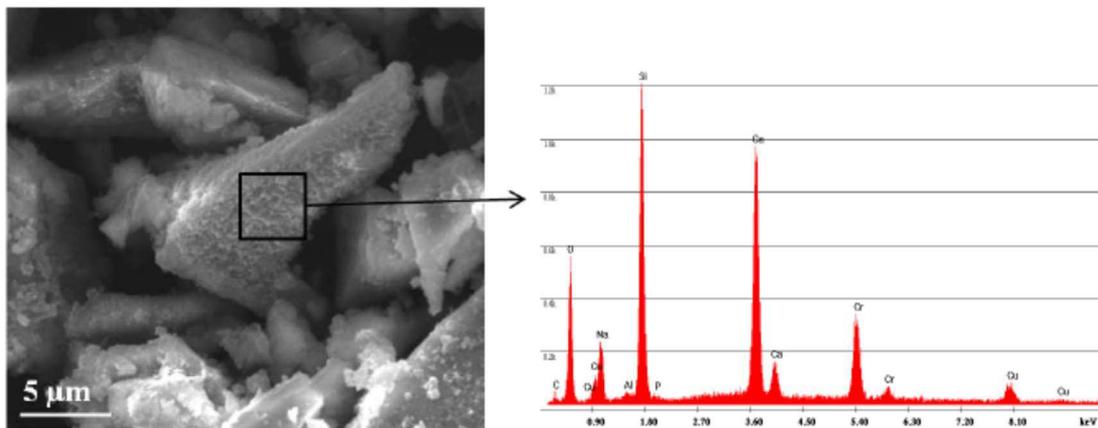


Figura 6.3 Immagine FESEM con ingrandimento 10000x di SBA3-0.05M Cu e rispettivo spettro EDS locale [4].

La tabella 6.2 mostra le quantità degli elementi costituenti il vetro SBA3-0.05M Cu.

Tabella 6.2 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro SBA3-0.05M Cu.

Element	%atomic
Na K	26.4±0.2
Al K	0.54±0.03
Si K	44.3±0.2
Ca K	20.1±0.3
Cu K	7.46±0.35

Dallo spettro EDS (Figura 6.2(b)) e dalla Tabella 6.2 è possibile notare la comparsa dei picchi relativi al rame (Cu); il sodio risulta più basso rispetto al campione SBA3 e anche il quantitativo di Ca è diminuito. Questo evidenzia che lo scambio ionico avviene sia con il Na che con il Ca.

In Figura 6.4(a) è possibile osservare la morfologia delle polveri di SBA3-0.05 Cu sottoposte a trattamento in acido tannico. Dall'immagine riportata si può notare la formazione di crepe superficiali dovute all'aggressività del trattamento in acido tannico a cui è stato sottoposto il vetro drogato con ioni rame. In Figura 6.4(b) si ha l'analisi composizionale della sezione di area interessata.

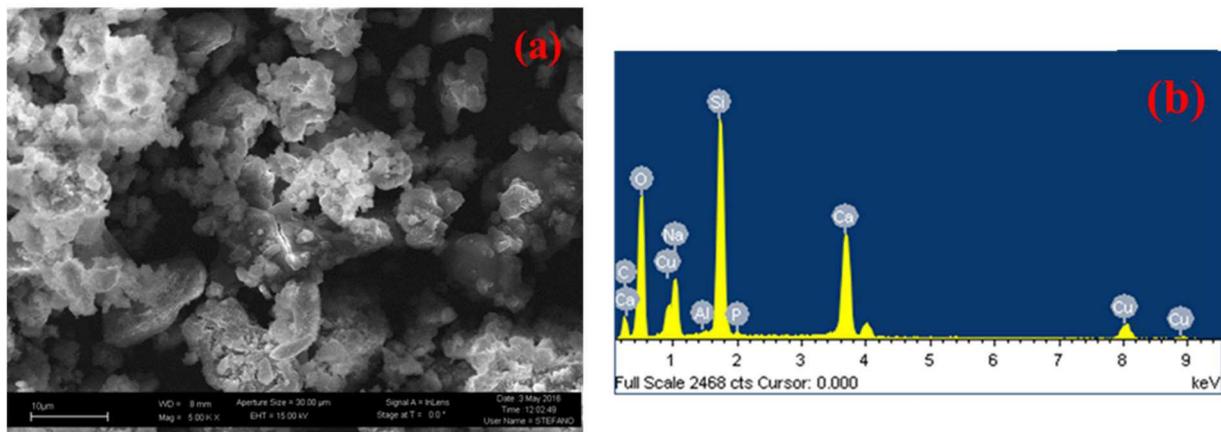


Figura 6.4 Immagine FESEM di SBA3-0.05M Cu-tannico con ingrandimento 5000x(a). Spettro EDS di area del campione di SBA3-0.05M Cu-tannico(b).

Dallo spettro EDS (Figura 6.4(b)) e dalla Tabella 6.3 si osserva un'ulteriore diminuzione del Na, dovuta al trattamento in acido tannico e un conseguente lieve incremento degli elementi più significativi (Si, Ca and Cu).

Tabella 6.3 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro SBA3-0.05M Cu-tannico.

Element	%atomic
Na K	21.6±0.3
Al K	0.55±0.20
Si K	45.5±0.7
P K	0.84±0.02
Ca K	22.4±0.4

La Figura 6.5 mostra la presenza di nanoparticelle contenenti Cu presenti sulla superficie del campione FESEM di SBA3-0.05M Cu-tannico.

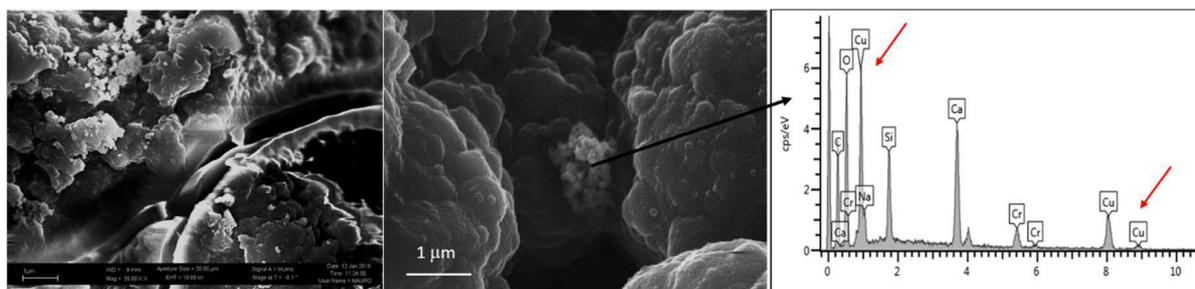


Figura 6.5 Immagine FESEM e rispettivo spettro EDS di SBA3-0.05M Cu-tannico [82].

Per confermare la presenza del rame metallico le polveri sono state sottoposte a diffrazione a Raggi X (Figura 6.6).

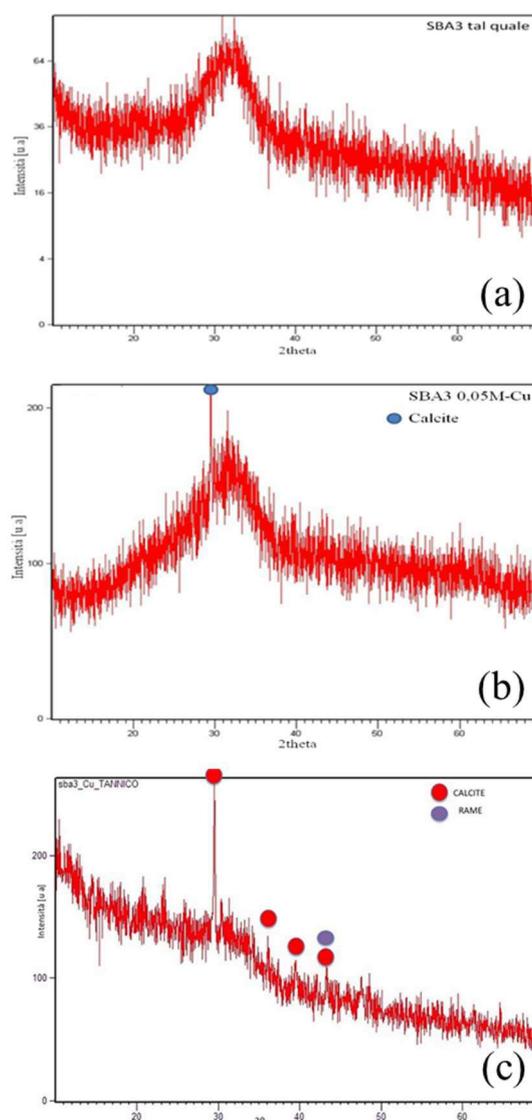


Figura 6.6 Difrattogramma del campione SBA3 tal quale (a), del campione SBA3-0.05M Cu (b) e del campione SBA3-0.05M Cu-tannico (c) [4][82].

L'analisi strutturale (Figura 6.6) evidenzia la natura amorfa del vetro tal quale, la presenza di un moderato picco attribuibile alla calcite per il vetro SBA3-0.05M Cu (formatasi probabilmente in seguito al processo di scambio ionico) e l'incremento dei picchi della calcite insieme a un picco riconducibile al rame metallico per il campione SBA3-0.05M Cu-tannico.

6.1.2 Caratterizzazione dei cementi ossei

In questa sezione vengono mostrate le immagini e gli spettri EDS relativi ai cementi compositi preparati caricando il cemento osseo con le polveri di vetro precedentemente trattate: CEMEX RX, CEMEX RX/SBA3, CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu e CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

In Figura 6.7(a) e Figura 6.7(b) è possibile osservare un'immagine FESEM relativa al cemento osseo tal quale, il CEMEX RX, e il rispettivo spettro EDS di area. Si notano la tipica morfologia sferica del polimero prepolimerizzato e di polveri nanometriche riconducibili al solfato di bario, agente radiopaco del CEMEX RX, costantemente presente in tutti gli spettri EDS successivi in quando ben disperso sulla superficie del cemento. Le sfere di polimetilmetacrilato (PMMA) presentano dimensioni variabili (10-100 μ m).

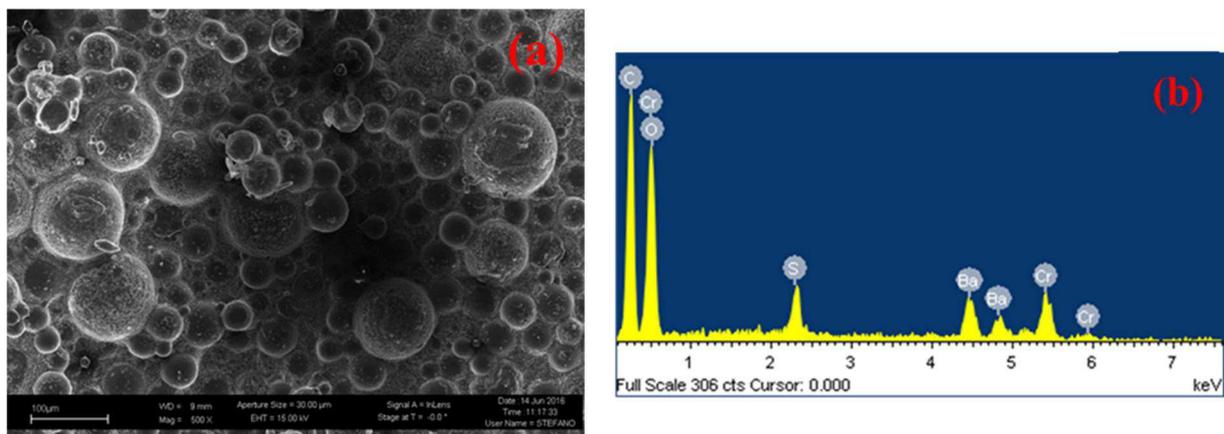


Figura 6.7 Immagine FESEM di CEMEX RX tal quale ad ingrandimento 5000x(a). Spettro EDS di area del campione di CEMEX RX tal quale(b).

In Figura 6.7(b) possono vedersi i picchi caratteristici del cemento osseo: C e O, insieme allo zolfo e al bario, che costituiscono l'agente radiopaco del CEMEX RX, il solfato di bario.

In Figura 6.8(a) e Figura 6.8(b) sono mostrate una analisi puntuale della superficie del campione di cemento osseo caricato con vetro e il rispettivo spettro EDS. Le particelle di vetro hanno dimensione di circa 20 μ m e forma irregolare; alcune di esse sembrano rivestite da una pellicola, probabilmente un film di polimero formatosi in seguito al processo di polimerizzazione.

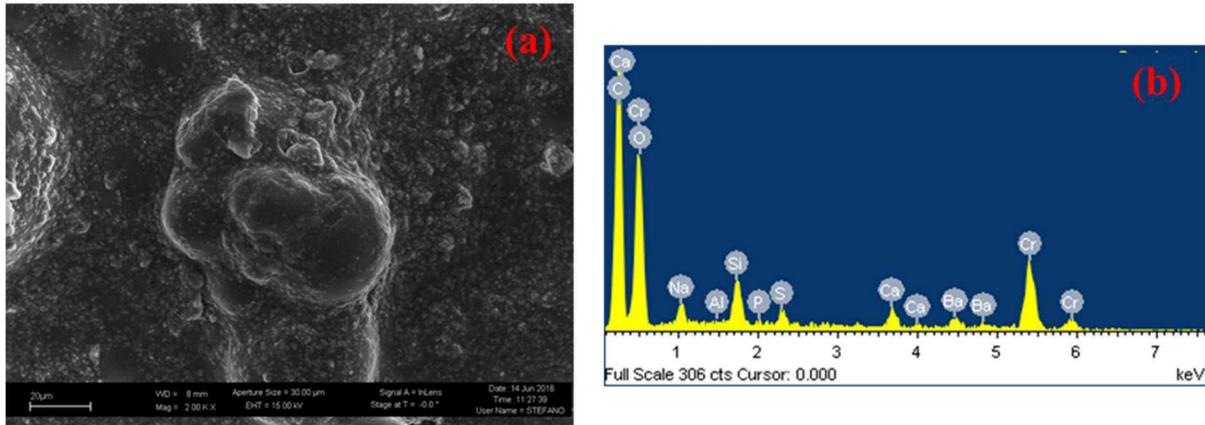


Figura 6.8 Immagine FE-SEM di CEMEX RX/SBA3 ad ingrandimento 2000x(a). Spettro EDS puntuale del campione di CEMEX RX/SBA3(b).

Nell'immagine EDS (Figura 6.8(b)) è possibile osservare i picchi caratteristici sia del cemento osseo, come il carbonio e l'ossigeno sia del vetro, come il silicio, il sodio e il calcio, in quanto ben esposto sul cemento osseo.

La Figura 6.9(a) e la Figura 6.9(b) mostrano il cemento osseo caricato con polvere di vetro drogato con ioni rame e lo spettro EDS. È possibile notare le particelle sferiche di PMMA con al di sopra particelle irregolari di vetro, insieme al solfato di bario. Nello spettro EDS sono presenti i principali picchi relativi alle polveri di vetro e i picchi del rame che indicano lo scambio ionico avvenuto e la presenza del vetro esposto sulla superficie del cemento.

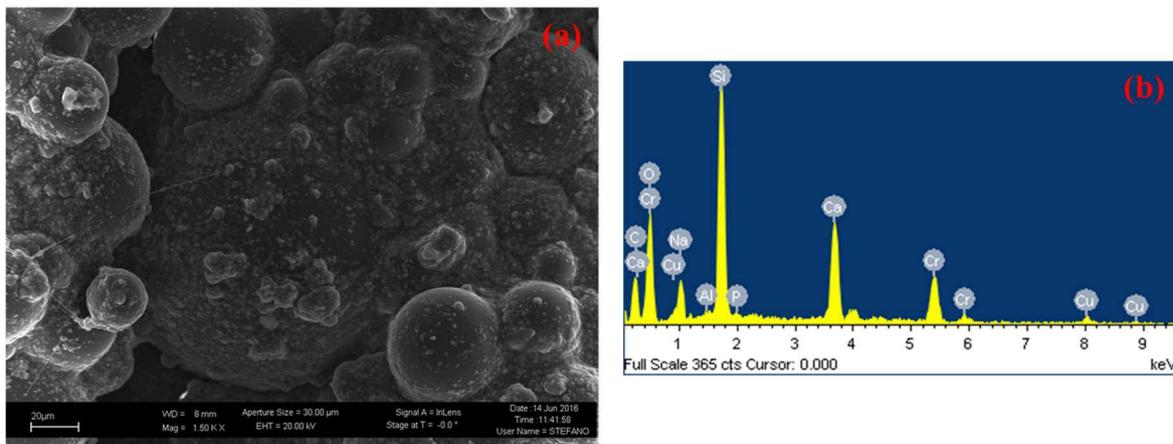


Figura 6.9 Immagine FESEM di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu (1500x).

La tabella 6.4 mostra le quantità degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu.

Tabella 6.4 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard)degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu.

Element	%atomic
Na K	18,82
Al K	0,46
Si K	55,17
P K	1,29
Ca K	24,27

La Figura 6.10 mostra l'analisi morfologica del campione oggetto di questo lavoro di tesi, il cemento osseo caricato con polvere di vetro drogata con ioni rame, ridotti con trattamento in acido tannico.

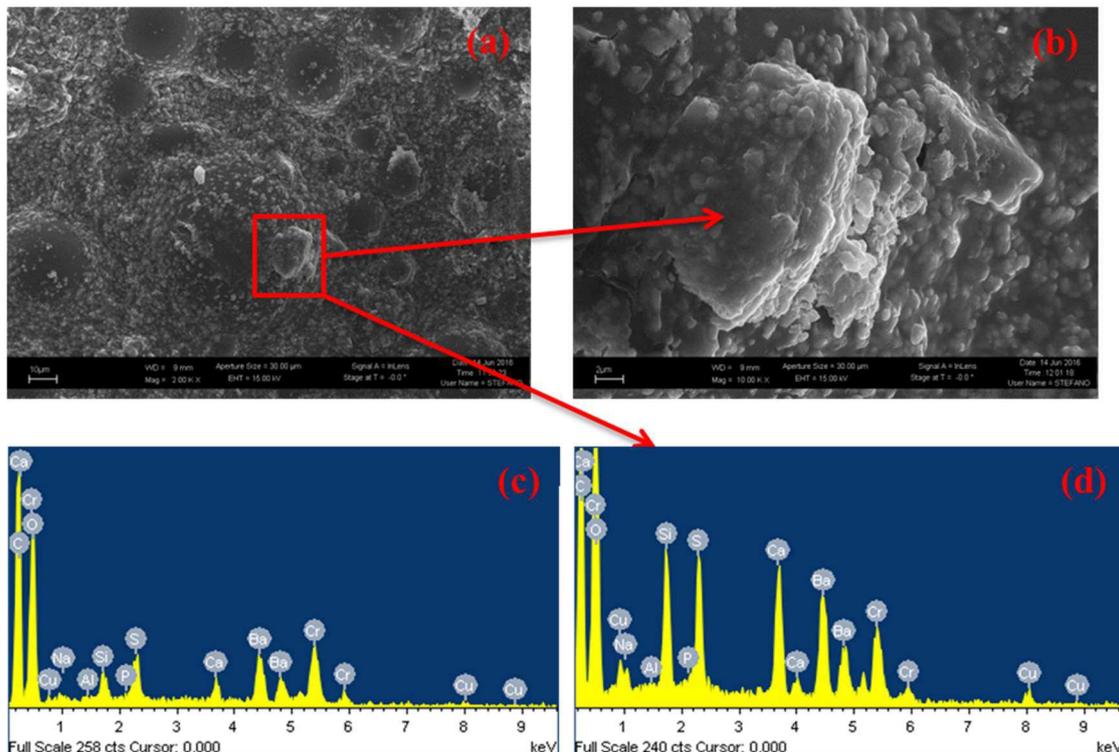


Figura 6.10 Immagine FESEM di Cemex RX/SBA3-0.05M Cu-tannico a 2000x (a). Ingrandimento 10000x superficie del Cemex RX-SBA3-0.05M Cu-tannico a 10000x(b). Spettro EDS di area del campione Cemex RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (c). Spettro EDS puntuale del campione Cemex RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (d).

La Figura 6.10 mostra una immagine a bassi ingradimenti del campione Cemex RX/SBA3-0.05M Cu-tannico, un particolare a ingradimenti più elevati del vetro disperso nella matrice polimerica e le rispettive analisi composizionali. Come nei casi precedenti il vetro è ben esposto sulla superfcr del cemento, come evidenziato dall'EDS di area (Figura 6.10(c)). L' EDS puntuale (Figura 6.10(d)) mostra elevati picchi del calcio, del silicio, del sodio e del rame che indicano una buona esposizione del vetro sulla superficie del cemento.

In Figura 6.11 vengono mostrate due immagini FESEM ottenute in modalità backscattering, in cui è possibile distinguere le tre fasi presenti nei campioni: il cemento osseo, il vetro e il rame.

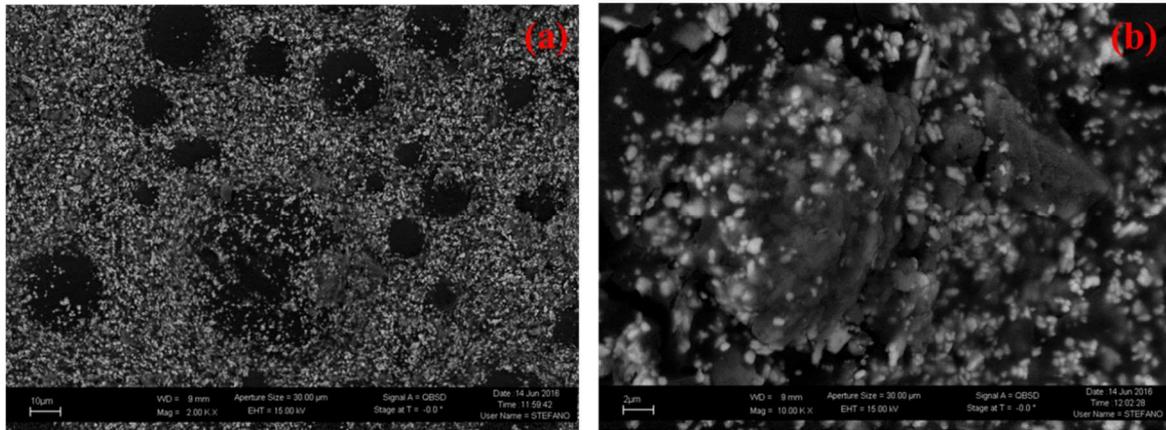


Figura 6.11 Immagine FESEM in modalità backscatter di Cemex RX/SBA3-0.05M Cu-tannico a 2000x (a). Ingrandimento 10000x superficie del Cemex RX-SBA3-0.05M Cu-tannico a 10000x(b).

La Tabella 6.5 mostra i quantitativi degli elementi costituenti il vetro all'interno del campione.

Tabella 5.5 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

Element	%atomic
Na K	16,95
Al K	5,08
Si K	52,12
P K	0,00
Ca K	25,85

6.2 Valutazione della bioattività *in vitro*

In questo lavoro di tesi è stata effettuato uno studio sulla bioattività *in vitro* dei campioni di composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico e confrontata con la bioattività del cemento composito contenente il vetro SBA3-0.05Cu. I campioni sono stati immersi in soluzione fisiologica simulata (SBF) e, in sede di *refresh* (ogni 2/3 giorni), prima di estrarre il campione dalla boccetta, è stato monitorato il pH della soluzione con l'uso di un pH-metro, ad una temperatura di 37°C. Ad ogni *refresh* la SBF è sostituita prima di reinserire il campione. I campioni, al termine dell'incubazione sono stati caratterizzati con analisi morfologica composizionale *FESEM-EDS*.

6.2.1 Andamento del pH

In Figura 6.12 è rappresentato l'andamento del pH della SBF durante i giorni di immersione dei campioni di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

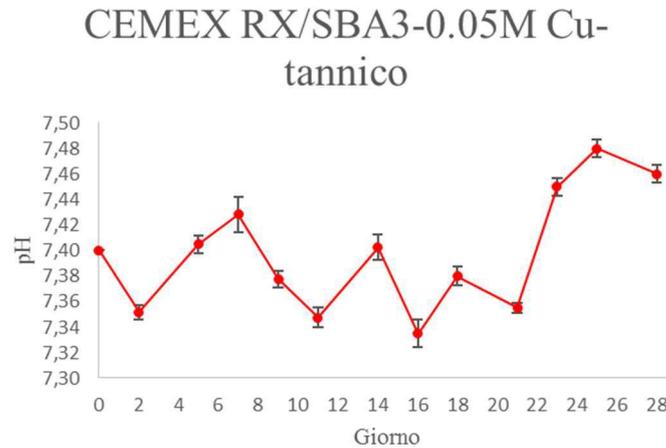


Figura 6.12 andamento del pH del campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico immerso in SBF.

Dall'immagine è possibile notare una variazione del pH molto limitata e compresa nell'intervallo di tollerabilità fisiologica ($7.3 < \text{pH} < 7.5$); ciò implica che questo tipo di materiale, impiantato nell'organismo, non causa alterazioni degli equilibri fisiologici.

Dal grafico, inoltre, si evince un andamento altalenante del pH e un incremento intorno al 21 giorno, che potrebbe suggerire la presenza di un meccanismo di bioattività, dovuto allo scambio di ioni Na^+ e Ca^+ presenti nel composito con ioni H^+ (H_3O^+) presenti nella soluzione fisiologica simulata.

6.2.2 Analisi morfologica-composizionale *FESEM-EDS*

Di seguito sono mostrate le immagini microscopiche e le analisi composizionali dei campioni di composito in seguito ad immersione in soluzione fisiologica simulata (SBF) dopo 7, 14 e 28 giorni.

In Figura 6.13 è possibile osservare il campione oggetto di questo lavoro di tesi dopo 7 giorni di immersione in SBF. Le particelle di vetro come è osservabile dall'ingrandimento a destra (Figura 6.13(b)), presentano una superficie frastagliata; ciò potrebbe essere dovuto ad un inizio del processo di bioattività.

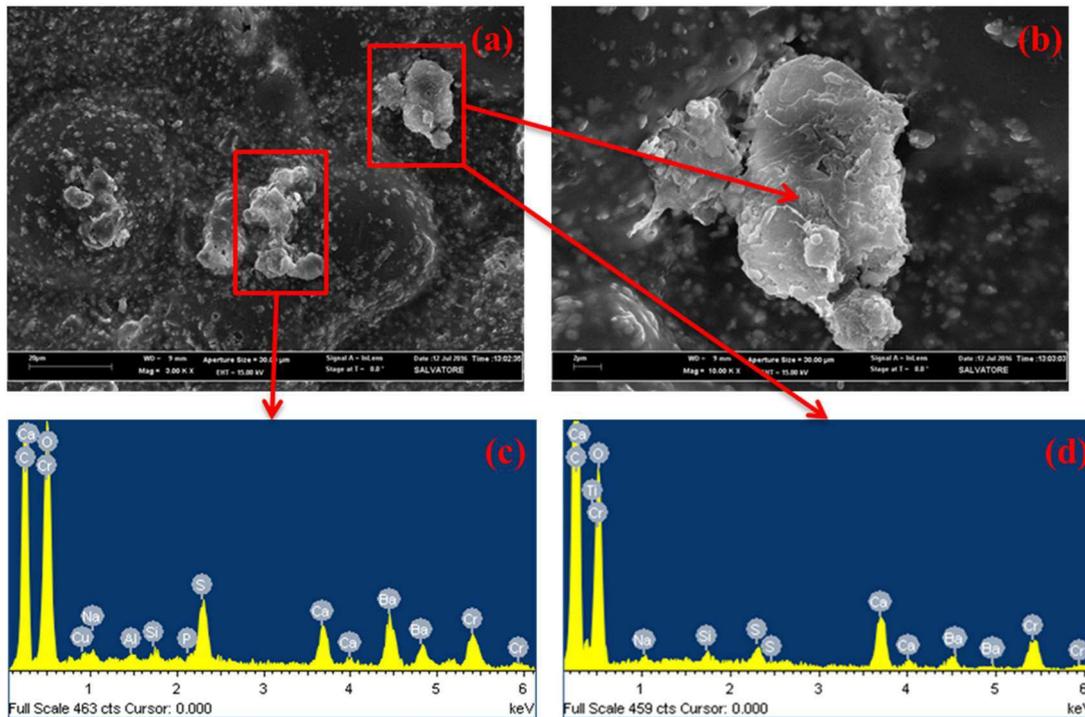


Figura 6.13 Immagine FESEM di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico dopo 7 giorni di immersione in SBF a 3000x(a). Immagine FESEM dell'ingrandimento di un particolare del campione a 10000x(b). Spettro EDS puntuale di due particolari diversi del campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (c) e (d).

Dalle immagini EDS (Figura 6.13(c) e Figura 6.13(d)) e dall'analisi quantitativa (Tabella 6.6) è possibile notare l'incremento del picco del calcio, tale aumento può essere dovuto a due fattori: la formazione di uno strato di gel di silice ricco di calcio o la nucleazione della calcite (CaCO_3), uno dei precursori dell'apatite. La presenza del calcio e di una piccola concentrazione di fosforo potrebbe indicare un inizio del quarto stadio di bioattività, in cui il calcio e il fosforo nucleano all'interno del gel di silice.

Tabella 6.6 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (7giorni in SBF).

Element	%atomic
Na K	16,97
Al K	9,23
Si K	7,38
P K	4,80
Ca K	61,62

La Figura 6.14 è relativa al campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico in seguito a 14 giorni di immersione in SBF. È possibile vedere le particelle sferiche del cemento osseo e le particelle di vetro che presentano uno strato di reazione (Figura 6.14(c)) dovuto all'immersione in SBF. Come confermato dall'EDS, nonostante nello spettro siano presenti i picchi elevati del BaSO_4 , si osserva

anche in questo caso che il picco del Ca è più elevato del picco del Si. Anche dopo 14 giorni di trattamento in SBF sembra quindi che la superficie di vetro si sia arricchita in Ca.

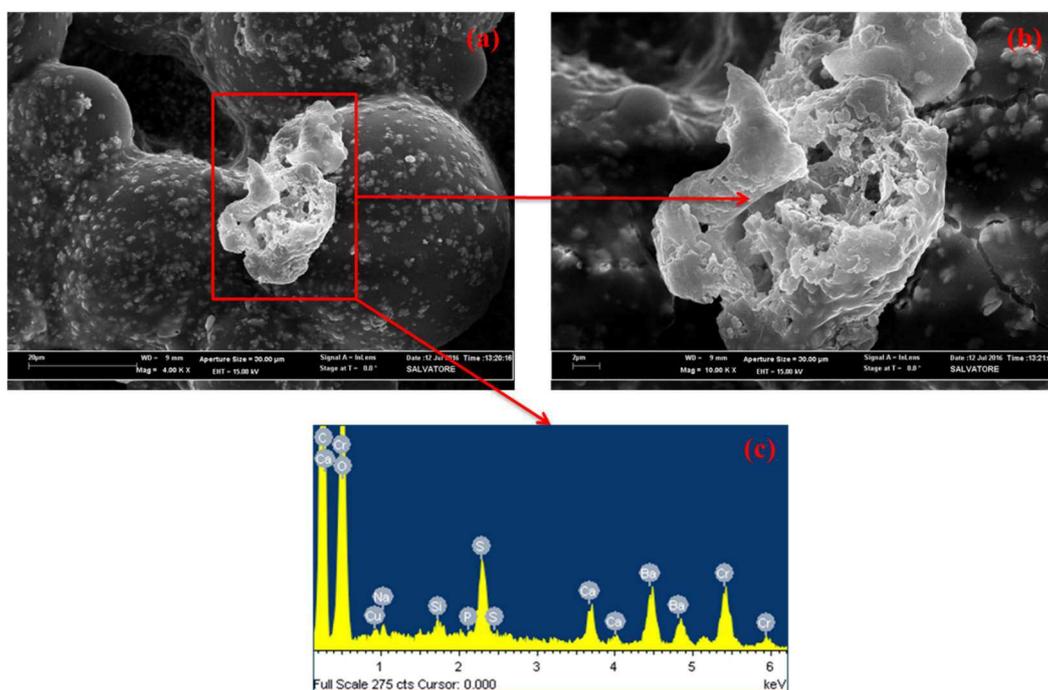


Figura 6.14 Immagine FESEM di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico dopo 14 giorni di immersione in SBF(a). Ingrandimento di un particolare superficiale(b). Spettro EDS puntuale del particolare superficiale(c).

Confrontando le analisi EDS quantitative relative al campione dopo 14 giorni di immersione in SBF (Tabella 6.7) con quelle relative al campione dopo 7 giorni di immersione (Tabella 6.6) è possibile osservare un lieve aumento del quantitativo del fosforo (P); ciò implica un segno di bioattività del campione anche se la cinetica della bioattività risulta più lenta rispetto a quella osservata per i cementi compositi contenenti SBA3-0.05M Cu, in cui dopo 14 giorni si osservava la presenza di idrossiapatite[4]. Nonostante il campione di vetro trattato con acido tannico sembri aver creato uno strato di gel di silice già in fase di preparazione (Figura 6.13), la successiva precipitazione di fosfati di calcio e cristallizzazione di apatiti sembra rallentata.

Tabella 6.7 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (14giorni in SBF).

Element	%atomic
Na K	21,74
Si K	14,29
P K	5,59
Ca K	58,38

L'immagine SEM di Figura 6.15 è relativa al campione dopo 28 giorni di immersione in SBF e mostra oltre alle particelle sferiche di PMMA e il solfato di bario delle particelle di vetro esposte in superficie ricoperte da dei precipitati ricchi in Ca, ma che tuttavia non presentano la tipica morfologia dell'idrossiapatite.

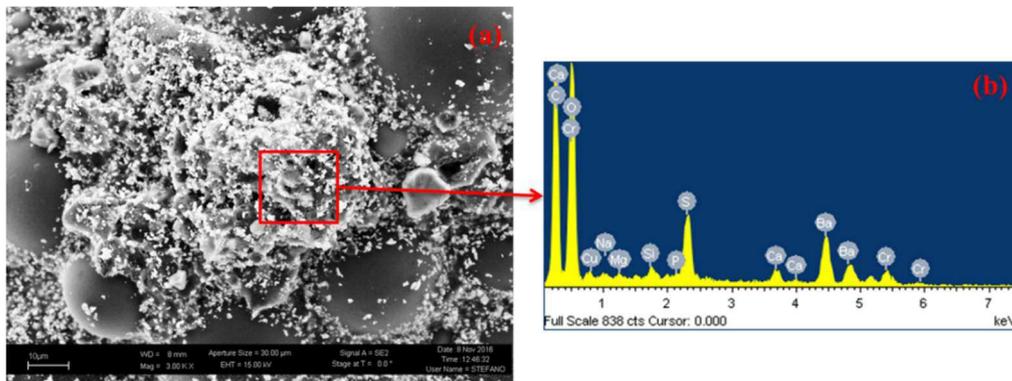


Figura 6.15 Immagine FESEM di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico dopo 28 giorni di immersione in SBF a 3000x(a). Spettri EDS puntuale di due particolari sulla superficie del campione (b).

La Figura 6.16 mostra la presenza di particelle di vetro sulla superficie del campione caratterizzate da uno strato di reazione la cui analisi EDS evidenzia la presenza di Ca e P. tali analisi mostrano quindi che il processo di bioattività del vetro è sicuramente iniziato e si trova probabilmente fra il quarto e quinto stadio; tuttavia il trattamento in acido tannico sembra aver ritardato la cristallizzazione dell'apatite.

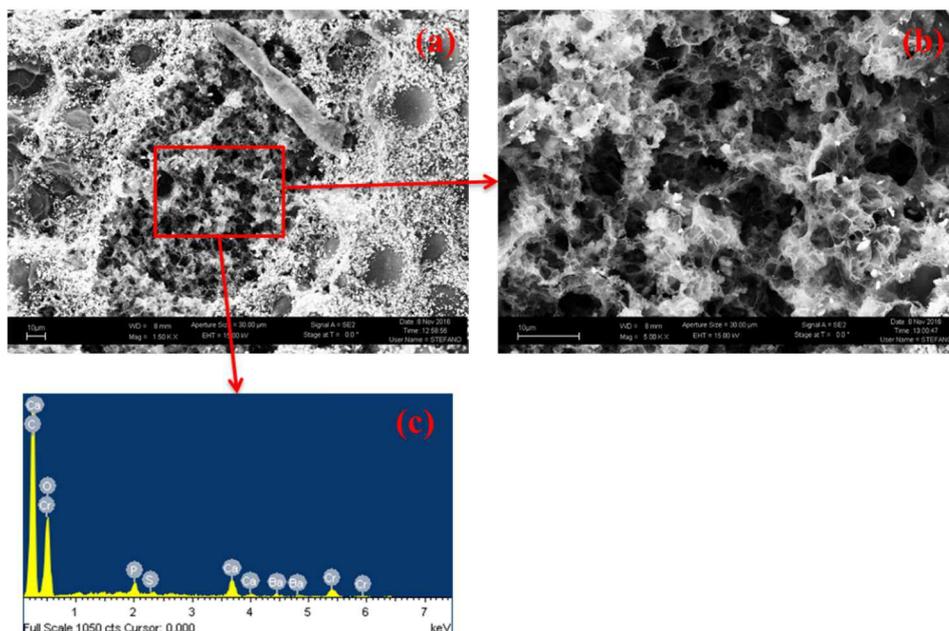


Figura 6.15 Immagine FESEM di una porosità nel CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico dopo 28 giorni di immersione in SBF a 15000x(a). Ingrandimento della porosità (b)Spettro EDS puntuale del campione (c).

Rispetto alle immagini relative al giorno 14 (Figura 6.14) il campione potrebbe risultare fra il quarto e il quinto stadio di bioattività anche se non sembrano essere ancora presenti i tipici nanocristalli di idrossiapatite che si presenta normalmente nel quinto stadio di bioattività proposto da Larry Hench [6]. In Tabella 6.8 sono presenti le quantità in percentuale atomica in riferimento alla Figura 6.15.

Tabella 6.8 Quantità in percentuale atomica (media e deviazione standard) degli elementi costituenti il vetro nel campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (28 giorni in SBF).

Element	%atomic
Na K	7.02
Si K	29.82
P K	7.90
Ca K	55.26

Ciò che risulta dall'immagine EDS (Figura 6.15) e dalla Tabella 6.8 è che il calcio è presente in quantità maggiori rispetto al silicio, quindi si è formato uno strato di gel di silice arricchito in calcio. Il sodio è presente in concentrazione bassa perché probabilmente è stato rilasciato in seguito all'attacco con l'acido tannico sulla superficie del vetro. Confrontando gli spettri EDS relativi ai campioni di composito oggetto di questo lavoro di tesi in seguito a 7, 14 e 28 giorni di immersione in SBF è possibile osservare un incremento nella quantità di calcio e fosforo rispetto ai campioni prima dell'immersione in SBF.

In conclusione, dopo 28 giorni di immersione sembra essersi attivato il processo di bioattività sul campione di composito ma, al tempo stesso, tale processo risulta rallentato probabilmente dal trattamento di riduzione chimica con l'acido tannico a cui sono state sottoposte le polveri di vetro che costituiscono la fase dispersa di questo composito.

6.3 Test di antibattericità

I test condotti per valutare l'antibattericità *in vitro* del cemento osseo oggetto di questo lavoro di tesi sono stati la valutazione dell'alone di inibizione e la conta batterica. In Figura 6.16 è possibile osservare gli aloni di inibizione del campione di SBA3 drogato con ioni rame (Figura 6.16(a)) e del campione di SBA3 drogato con ioni rame ridotti chimicamente con acido tannico (Figura 6.16(b)) valutati in un precedente lavoro di tesi [82].

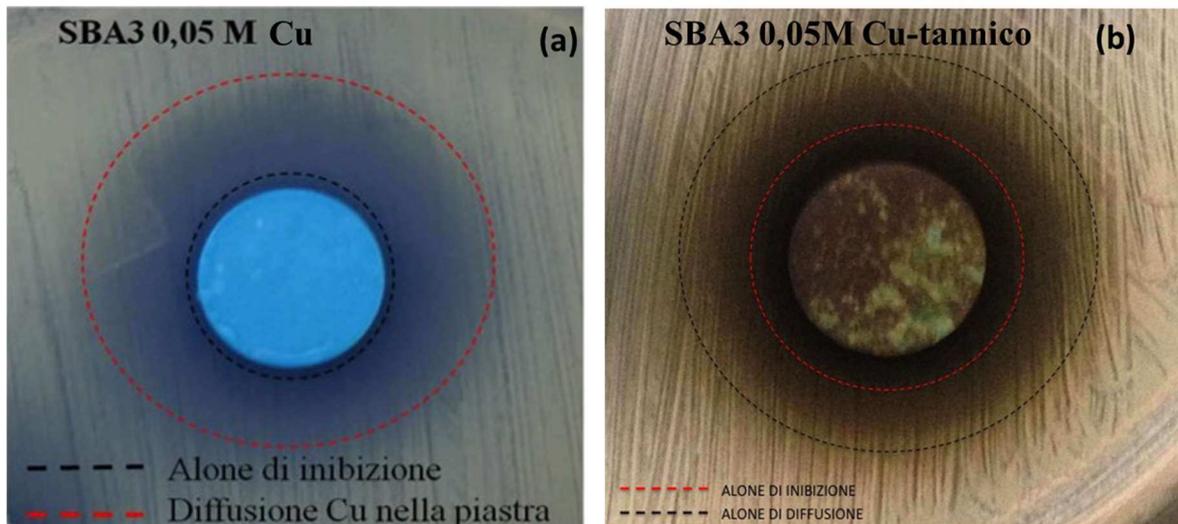


Figura 6.16 Alone di inibizione del campione di vetro SBA3-0.05M Cu(a) e del campione SBA3-0.05M Cu-tannico(b) [82].

Le misure dell'alone di inibizione mostrano un alone leggermente più marcato nel caso del campione di SBA3 drogato con ioni rame ridotti chimicamente con acido tannico (circa 1.5 mm) rispetto al vetro SBA3-0.05Cu (< 1 mm).

Il campione di cemento osseo oggetto di questo lavoro di tesi (CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico) non ha mostrato alone di inibizione e, per tal motivo, si è deciso di valutare le proprietà antibatteriche utilizzando un'altra tipologia di test, la conta delle unità formanti colonie (CFU), valutando sia l'adesione che la proliferazione batterica.

La Figura 6.17 e la Figura 6.18 riportano la conta in scala logaritmica dei batteri appartenenti al ceppo *Staphylococcus aureus* adesi sulla superficie dei campioni preparati in questo lavoro di tesi allo scadere dei due tempi di incubazione: 3 ore e 24 ore.

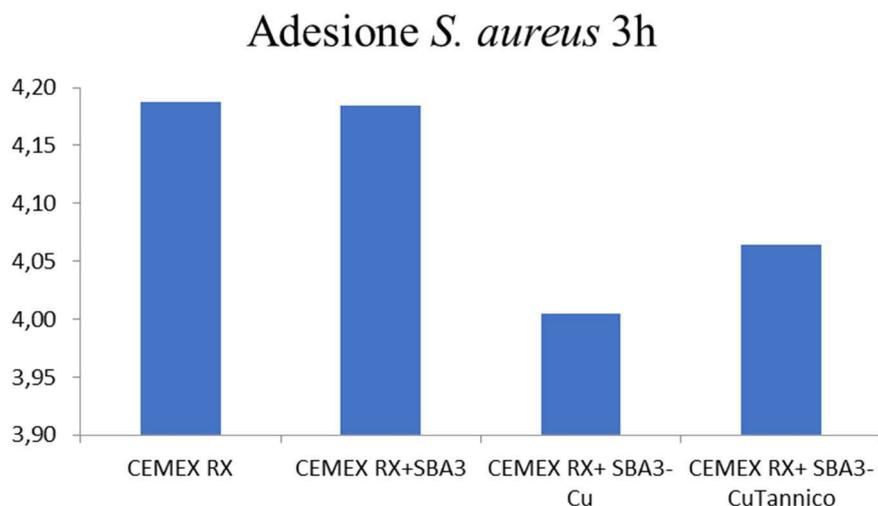


Figura 6.17 Concentrazione in scala logaritmica dei batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* adesi sulla superficie dei campioni dopo 3 ore di incubazione.

Adesione *S. aureus* 24h

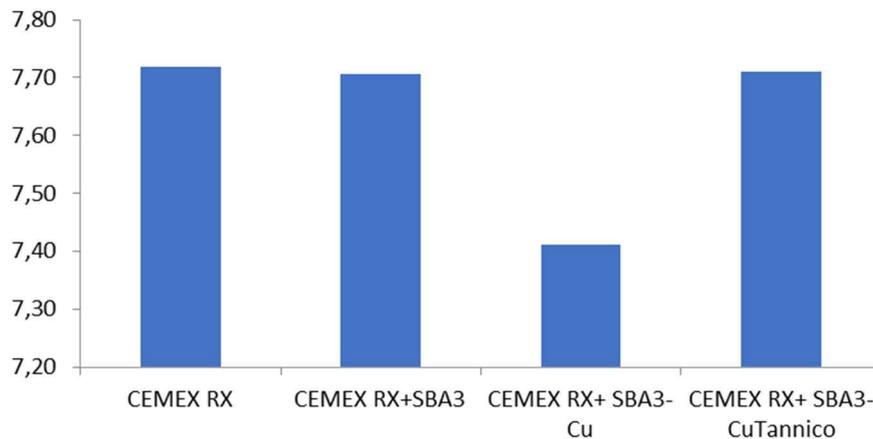


Figura 6.18 Concentrazione in scala logaritmica dei batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* adesi sulla superficie dei campioni dopo 24 ore di incubazione.

Mettendo a confronto le due figure (Figura 6.17 e Figura 6.18) è possibile osservare un incremento nell'adesione batterica sulla superficie dei campioni all'aumentare del tempo di incubazione. Inoltre è possibile osservare che, a differenza del composito caricato con vetro drogato con ioni rame, il composito trattato chimicamente con acido tannico presenta una maggior concentrazione di batteri adesi, in particolar modo a 24 ore.

Dopo 3 ore di incubazione si osserva una riduzione delle colonie adese sia per i campioni CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu che per i compositi CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico. Applicando la formula:

$$P = \frac{(A-B)100}{A} \quad (6.1)$$

Dove P è la percentuale di riduzione, A è il numero di micro-organismi adesi al cemento di controllo e B il numero di micro-organismi adesi sul campione.

Dopo 3 ore di incubazione si ottiene una riduzione dell'adesione batterica di circa 35% per il campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu rispetto sia al cemento di controllo che al cemento CEMEX RX/SBA3, e una riduzione di circa il 25% per il composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu tannico.

Dopo 24 h di incubazione la riduzione dell'adesione batterica del campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu è circa del 51% rispetto al cemento di controllo mentre per il composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu tannico è circa del 2%.

Sembra quindi che il campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu sia in grado di limitare, anche in basse percentuali, l'adesione batterica dopo 3 e 24 h, mentre il campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu tannico abbia solo un debole effetto a 3 ore; probabilmente ciò è dovuto al fatto che la riduzione del Cu da ionico a metallico in seguito al trattamento con acido tannico causa una minor disponibilità e un minor rilascio di ioni rame e quindi un meno efficace effetto antibatterico. Da letterature [88] è noto che anche le particelle di Cu possono

avere un effetto antibatterico, non dovuto a rilascio di ioni, ma dalla loro interazione con la membrana cellulare e lo sviluppo di ROS (reactive oxygen species). Tuttavia in questo caso tali effetti non sono stati osservati probabilmente perché le nanoparticelle di rame, ancorate alla superficie del vetro, a sua volta inglobato nel polimero, non riescono ad interagire con i batteri.

In Figura 6.19 e Figura 6.20 vengono mostrate le conte delle CFU in scala logaritmica dei batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* proliferati nel brodo di cultura allo scadere delle 3 ore e delle 24 ore.

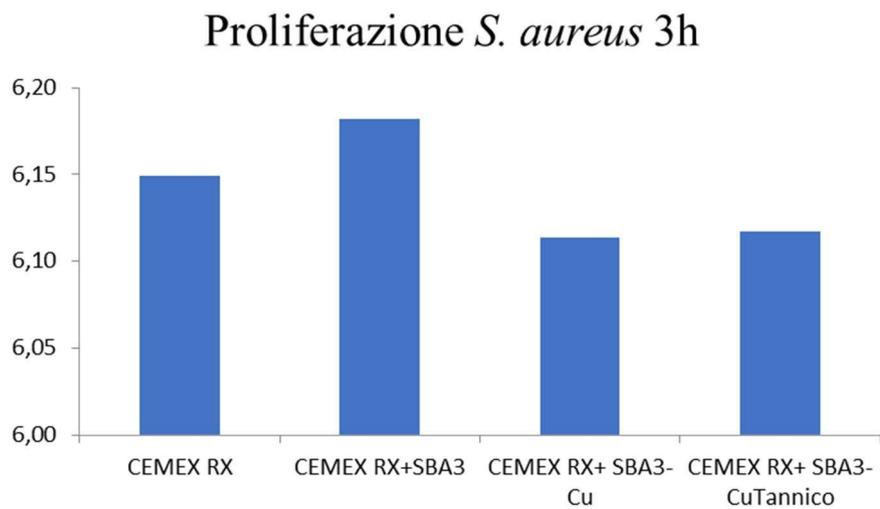


Figura 6.19 Concentrazione in scala logaritmica dei batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* proliferati dopo 3 ore di incubazione.

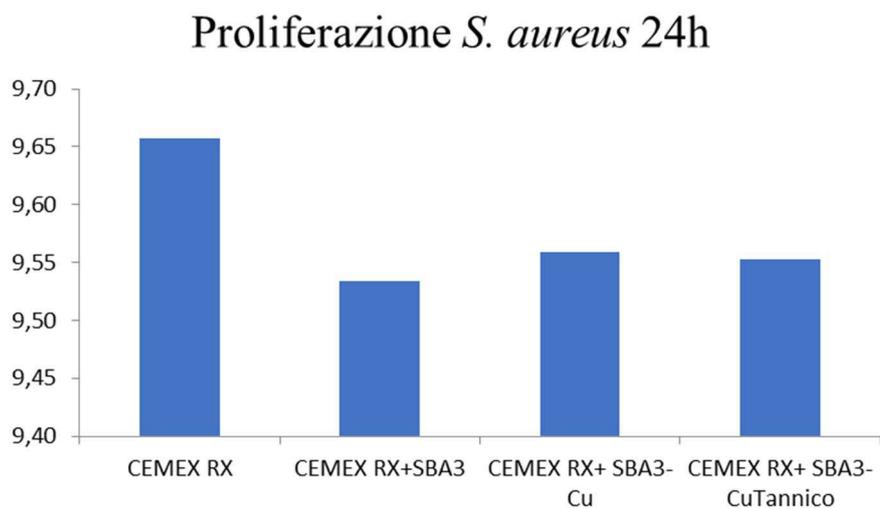


Figura 6.20 Concentrazione in scala logaritmica dei batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* proliferati dopo 24 ore di incubazione.

Osservando la Figura 6.19 e la Figura 6.20 in riferimento al composito oggetto di studio, il CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico, è possibile notare che, sia dopo 3 ore di incubazione sia dopo 24 ore, la concentrazione di batteri proliferanti risulta maggiore rispetto alla concentrazione di batteri adesi. Confrontando i valori ottenuti per il composito con quelli del cemento tal quale si ha una diminuzione della concentrazione di batteri proliferati e ciò indica un effetto antibatterico del composito ottenuto.

Un calcolo analogo al precedente è stato effettuato per valutare la percentuale di riduzione della proliferazione batterica che, sia nel caso del composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu che del composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu tannico rispetto al cemento di controllo è risultata circa dell'8% dopo 3 h di incubazione e circa del 21% dopo 24 h.

6.4 Test di compressione

Le prove meccaniche di compressione sono state condotte su campioni cilindrici di altezza di 12 mm e diametro di 6 mm sia di cemento tal quale che di cemento composito, in accordo con la normativa ISO di riferimento [60].

Poiché l'obiettivo del lavoro è anche quello di non modificare in maniera significativa il comportamento meccanico del composito in seguito all'introduzione di una seconda fase e ai trattamenti effettuati sulla fase dispersa, per ciascun campione di cemento osseo tal quale e di composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico è stata creata la rispettiva curva a per confrontare i comportamenti meccanici delle due classi di materiali.

Nelle immagini seguenti (Figura 6.21 e Figura 6.22) sono rappresentate le curve a compressione del CEMEX RX e del CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

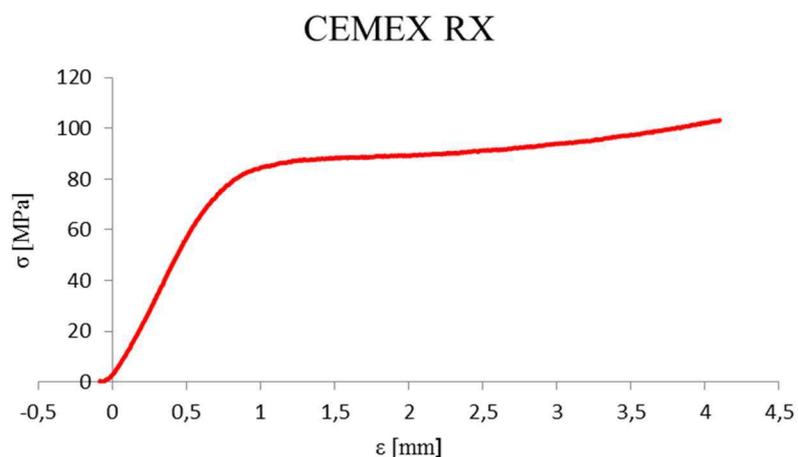


Figura 6.21 Curva a compressione del campione di CEMEX RX tal quale.

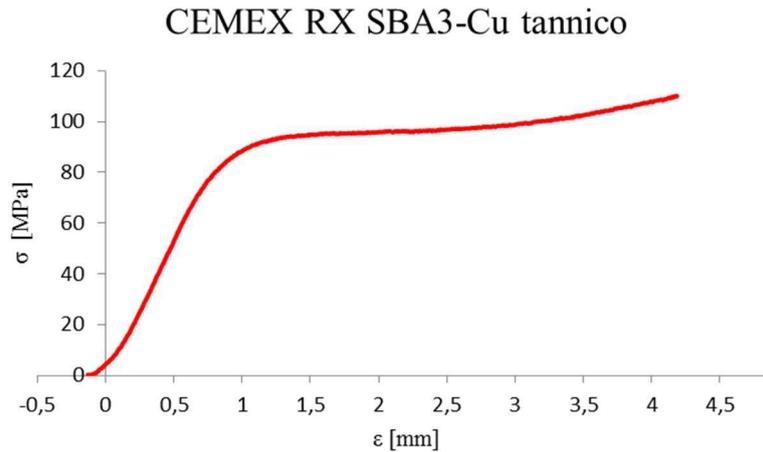


Figura 6.22 Curva a compressione del campione di CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

Le immagini mostrano come l'introduzione del 10% in peso di polvere di vetro non influisca negativamente sulle proprietà meccaniche a compressione del cemento; al contrario è possibile notare un incremento nel carico di snervamento nel composito rispetto al cemento osseo tal quale.

In Figura 6.23 è possibile osservare un confronto tra il carico di snervamento relativo al cemento osseo tal quale e al composito oggetto di questo lavoro di tesi.

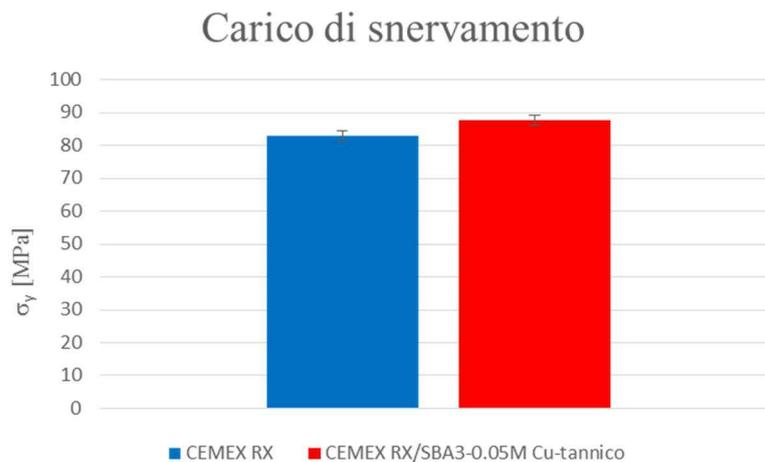


Figura 6.23 Confronto tra carico di snervamento del CEMEX RX e CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

Si può notare un valore di carico di snervamento di circa 87 MPa per il composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico (valore ampiamente superiore rispetto al limite richiesto dalla normativa – 70 MPa) rispetto al cemento osseo tal quale che presenta un valore di circa 83 MPa; ciò conferma un miglioramento, in termini di carico di snervamento e di comportamento a compressione del composito.

Applicando il test ANOVA (Analysis Of Variance) è possibile verificare in maniera statistica che i materiali testati siano effettivamente diversi dal punto di vista della resistenza a compressione. Si tratta di confrontare i due gruppi di dati relativi ai campioni di cemento osseo tal quale (CEMEX RX) e ai campioni di composito oggetto di questo lavoro di tesi (CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico), confrontando la variabilità interna a questi gruppi e la variabilità tra i gruppi. Viene preso come punto di riferimento una *ipotesi nulla*, secondo cui le differenze osservate tra i gruppi siano dovute al puro caso.

Il test ANOVA (Tabella 6.9) prende in considerazione il valore di F, funzione statistica, che rappresenta di quanto la variabilità tra le medie supera il valore previsto dovuto al caso; se il valore di F è *maggiore* di un determinato valore critico, F_{crit} , viene rifiutata l'*ipotesi nulla*, ovvero i materiali appartenenti a due o più gruppi sono effettivamente diversi tra loro e tali differenze non sono dovute al solo caso.

Tabella 6.9 Test ANOVA (Analysis Of Variance) per due gruppi di materiali: CEMEX RX e CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico.

Origine varianza	SQ	gld	MQ	F	Val. significatività	F_{crit}
Tra gruppi	60,4421	1	60,44216	6,752895	0,028802722	5,117355029
In gruppi	80,555003	9	8,950556	-	-	-
Totale	140,99716	10	-	-	-	-

Dalla Tabella 6.9 il valore della funzione statistica F è *maggiore* rispetto al valore di F_{crit} , quindi viene rifiutata l'*ipotesi nulla* e viene confermato da un punto di vista statistico che i campioni di composito oggetto di questo lavoro di tesi (CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico) sono effettivamente più resistenti a compressione rispetto al cemento osseo tal quale.

7. Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un cemento osseo innovativo a base di polimetilmetacrilato, contenente un vetro a base silice con proprietà bioattive e antibatteriche.

Il vetro, noto come SBA3, è stato caricato con ioni rameici Cu^{2+} mediante la tecnica dello scambio ionico e, successivamente, tali ioni sono stati ridotti a Cu^+ e Cu^0 attraverso una riduzione chimica con acido tannico prendendo spunto da studi condotti in letteratura. Tale vetro è stato poi caricato in un cemento commerciale a base di polimetilmetacrilato, il CEMEX RX[®] (Tecres[®] S.p.a).

Le analisi morfologico-composizionali eseguite sul cemento composito hanno evidenziato una buona esposizione del vetro sulla superficie del cemento e con esse è stato possibile valutare la bioattività dei campioni.

Le analisi *in vitro* in soluzione fisiologica simulata (SBF) condotte sui campioni oggetto di questo lavoro di tesi, il composito CEMEX RX/SBA3- 0.05M Cu-tannico, hanno evidenziato che il campione presenta un certo grado di bioattività: dopo 7 giorni di immersione in SBF si osserva la formazione di uno strato di reazione sulla superficie del vetro esposto sulla superficie del cemento. Tale strato è ricco in calcio e con il proseguire del trattamento, dopo 28 giorni, si arricchisce anche in P. Tuttavia, a livello morfologico e composizionale non si osserva la formazione dell'idrossiapatite, osservabile invece dopo 14 giorni sui campioni compositi contenenti il vetro non sottoposto a trattamento con acido tannico. Il meccanismo di bioattività, dopo 28 giorni di immersione, risulta dunque rallentato dal trattamento di riduzione chimica con acido tannico.

Le prove di antibattericità hanno permesso di effettuare un confronto tra il composito oggetto di questo lavoro di tesi e il composito a base di cemento osseo e polveri di vetro SBA3 drogate con ioni rameici Cu^{2+} . Effettuando il test della conta delle unità formanti colonie (CFU), è stata valutata sia la percentuale di riduzione dell'adesione che della proliferazione batterica rispetto al cemento osseo tal quale (CEMEX RX) ed è stato evidenziato che il campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu è in grado di limitare l'adesione batterica dopo 3 e 24 h con una percentuale rispettivamente del 35% e 51%, mentre il campione CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico ha solo un debole effetto a 3 ore (si osserva una riduzione di circa del 25%). Probabilmente ciò è dovuto al fatto che la riduzione del Cu da ionico a metallico in seguito al trattamento con acido tannico causa una minor disponibilità e un minor rilascio di ioni rame e, di conseguenza, un minor effetto antibatterico. In termini di proliferazione batterica entrambi i campioni hanno mostrato una percentuale di riduzione della proliferazione circa dell'8% dopo 3 h e del 21% dopo 24 h.

Le prove meccaniche a compressione eseguite sul cemento osseo tal quale e sul composito CEMEX RX/SBA3-0.05M Cu-tannico hanno permesso di effettuare un confronto tra i due e hanno evidenziato un miglior comportamento a compressione del composito rispetto al cemento tal quale, confermato dal test statistico ANOVA (Analysis Of Variance).

Gli sviluppi futuri di questo lavoro si propongono di trovare la giusta combinazione tra cemento osseo e fase dispersa affinché il materiale sia in grado di soddisfare tutte le proprietà, dalla bioattività all'antibattericità e alle proprietà angiogeniche, attraverso le possibili seguenti modifiche/proposte:

- Variare la percentuale di fase dispersa;
- Variare la concentrazione molare degli agenti riducenti in modo tale da indurre la formazione di nanoparticelle di rame di dimensione di pochi nanometri;
- Adottare tecniche di riduzione degli ioni rameici differenti;
- Valutare le tecniche di rilascio del rame per lo studio delle proprietà antibatteriche;
- Stimare la citocompatibilità del materiale
- Valutare l'effetto del rame sull'angiogenesi;
- Valutare l'antibattericità *in vitro* con normative differenti.

Riferimenti

- [1] E. Vernè, “Dispense del corso ‘Biomateriali e materiali nanostrutturati.’” 2015.
- [2] A. G. Jones, Julian R.; Clare, *Bio-Glasses: An introduction*. 2012.
- [3] M. Salvo, “Dispense del corso ‘Ceramiche Avanzate.’” 2013.
- [4] M. Noceri, “Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica ‘Materiali bioattivi e antibatterici drogati con ioni rame,’” 2015.
- [5] “Rifrazione.” [Online]. Available: http://www.openfisica.com/fisica_ipertesto/openfisica1/rifrazione.php. [Accessed: 25-May-2017].
- [6] L. L. Hench, “The story of Bioglass,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, 2006.
- [7] A. A. Gorustovich, L. A. H. Durand, and A. R. Boccaccini, “Bioactive Glasses and Angiogenesis 6,” pp. 65–76, 2016.
- [8] L. Boccaccini, Aldo R; Brauer, Delia S; Hupa, *Bioactive glasses - Fundamentals, Technology and Applications*. 2016.
- [9] M. N. Rahaman *et al.*, “Bioactive glass in tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2355–2373, 2011.
- [10] Nichola J. Coleman and John W. Nicholson, “Glass bones,” *Royal Society of Chemistry*, 2006. [Online]. Available: <https://eic.rsc.org/feature/glass-bones/2020156.article>. [Accessed: 26-Apr-2017].
- [11] S. Hu, J. Chang, M. Liu, and C. Ning, “Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 281–286, 2009.
- [12] N. A. P. Van Gestel, J. Geurts, D. J. W. Hulsen, B. Van Rietbergen, S. Hofmann, and J. J. Arts, “Clinical Applications of S53P4 Bioactive Glass in Bone Healing and Osteomyelitic Treatment: A Literature Review,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [13] J. T. Silvola, “Mastoidectomy Cavity Obliteration with Bioactive Glass,” *Otolaryngol. Neck Surg.*, vol. 147, no. 1, pp. 119–126, 2012.
- [14] Y. F. Goh, A. Z. Alshemary, M. Akram, M. R. Abdul Kadir, and R. Hussain, “Bioactive Glass: An In-Vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles,” *Int. J. Appl. Glas. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 255–266, 2014.
- [15] V. Mouriño, J. P. Cattalini, and A. R. Boccaccini, “Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 68, pp. 401–19, Mar. 2012.
- [16] A. Hoppe, N. S. Güldal, and A. R. Boccaccini, “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2757–2774, 2011.
- [17] G. Grass, C. Rensing, and M. Solioz, “Metallic copper as an antimicrobial surface,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 5, pp. 1541–1547, 2011.
- [18] “Rame nativo.” [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Rame>.

- [19] P. J. Kuhn, "Doorknobs: a source of nosocomial infection?," *Diagnostic Medicine*, vol. 6. pp. 62–63, 1983.
- [20] "Biologia - Il rame per la salute." [Online]. Available: <http://www.copperalliance.it/istruzione-e-carriera/programmi-per-le-scuole/biologia---il-rame-per-la-salute>. [Accessed: 26-Apr-2017].
- [21] J. Bejarano, P. Caviedes, and H. Palza, "Sol–gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics," *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 2, p. 25001, 2015.
- [22] "Processo sol-gel - Wikipedia." [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Processo_sol-gel. [Accessed: 25-Apr-2017].
- [23] V. Aina, G. Cerrato, G. Martra, G. Malavasi, G. Lusvardi, and L. Menabue, "Towards the controlled release of metal nanoparticles from biomaterials: Physico-chemical, morphological and bioactivity features of Cu-containing sol-gel glasses," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 283, pp. 240–248, 2013.
- [24] M. Miola and E. Vernè, "Bioactive and antibacterial glass powders doped with copper by ion-exchange in aqueous solutions," *Materials (Basel)*, vol. 9, no. 6, pp. 1–16, 2016.
- [25] P. J. Newby, J. Kirkham, X. B. Yang, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, "Ag-doped 45S5 Bioglass®-based bone scaffolds by molten salt ion exchange : processing and characterisation," pp. 557–569, 2011.
- [26] L. Di Palma, *Tecnologia dei Materiali e Chimica Applicata - Terza Edizione*. 2017.
- [27] F. Gonella, F. Caccavale, L. D. Bogomolova, and V. a Jachkin, "Application of electron paramagnetic resonance to the study of Cu²⁺ ions in Cu – Na ion-exchanged glasses," vol. 546, pp. 539–546, 1999.
- [28] F. Gonella *et al.*, "Copper diffusion in ion-exchanged soda-lime glass," *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 81, no. 5, pp. 1065–1071, 2005.
- [29] C. Wu *et al.*, "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity," *Biomaterials*, vol. 34, no. 2, pp. 422–433, Jan. 2013.
- [30] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, "The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2331–2339, Apr. 2006.
- [31] G. Donelli, "Il ruolo del biofilm nella cura delle infezioni," 2010, p. 23.
- [32] P. Yu, C. Wang, J. Zhou, L. Jiang, J. Xue, and W. Li, "Influence of surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of *Streptococcus mutans* to Zirconia In Vitro," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–10, 2016.
- [33] C. C. P. M. Verheyen, W. J. A. Dhert, J. M. A. de Blicck-Hogervorst, T. J. K. van der Reijden, P. L. C. Petit, and K. de Groot, "Adherence to a metal, polymer and composite by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 383–391, 1993.
- [34] H. W. Buchholz, R. A. Elson, E. Engelbrecht, H. Lodenkämper, J. Röttger, and A. Siegel, "Management of deep infection of total hip replacement.," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 63–B, no. 3, pp. 342–53, 1981.

- [35] C. G. Zalavras, M. J. Patzakis, and P. Holtom, "Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 427, pp. 86–93, Oct. 2004.
- [36] B. Moretti, "Razionale dell'utilizzo del cemento antibiotato nelle artroprotesi di ginocchio di primo impianto: review della letteratura." 2010.
- [37] J. P. Davies and W. H. Harris, "Effect of hand mixing tobramycin on the fatigue strength of Simplex P," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 25, no. 11, pp. 1409–1414, 1991.
- [38] R. M. Donlan, "Biofilms: microbial life on surfaces.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 9, pp. 881–90, Sep. 2002.
- [39] "Appunti Biofilm Microbici- Seconda università degli Studi di Napoli." pp. 11–39, 2012.
- [40] K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 95, no. 2, pp. 299–311, 2012.
- [41] M. Crouzet *et al.*, "Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies.," *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 253, pp. 1–12, 2014.
- [42] A. G. Gristina and J. W. Costerton, "Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection.," *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 15, no. 3, pp. 517–35, 1984.
- [43] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, Jul. 2015.
- [44] "Nature Picture Library - Staphylococcus aureus bacteria, the cause of a wide variety of human infections as well as a common cause of food poisoning..." [Online]. Available: https://www.naturepl.com/search/preview/staphylococcus-aureus-bacteria-the-cause-of-a-wide-variety-of-human/0_01338775.html. [Accessed: 22-Apr-2017].
- [45] "Infezioni da Staphylococcus aureus - Infezioni - Manuale MSD, versione per i pazienti." [Online]. Available: <http://www.msdmanuals.com/it-it/casa/infezioni/infezioni-batteriche/infezioni-da-staphylococcus-aureus>. [Accessed: 22-Apr-2017].
- [46] L. Montanaro, C. R. Arciola, L. Baldassarri, and E. Borsetti, "Presence and expression of collagen adhesin gene (cna) and slime production in Staphylococcus aureus strains from orthopaedic prosthesis infections.," *Biomaterials*, vol. 20, no. 20, pp. 1945–9, Oct. 1999.
- [47] "Batteri resistenti agli antibiotici: quello che c'è da sapere - Focus.it." [Online]. Available: <http://www.focus.it/scienza/salute/batteri-resistenti-agli-antibiotici-quello-che-c-e-da-sapere>. [Accessed: 22-Apr-2017].
- [48] "Meccanismi di resistenza agli antibiotici." [Online]. Available: <http://www.microbiologia.unige.it/dpb/Appunti/M-gener05.htm>. [Accessed: 22-Apr-2017].
- [49] "Resistenza agli antibiotici - epidemiologia in Europa." [Online]. Available: http://www.epicentro.iss.it/focus/resistenza_antibiotici/EpidEuropa.asp. [Accessed: 22-

Apr-2017].

- [50] L. Milkovic, A. Hoppe, R. Detsch, A. R. Boccaccini, and N. Zarkovic, "Effects of Cu-doped 45S5 bioactive glass on the lipid peroxidation-associated growth of human osteoblast-like cells *in vitro*," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 102, no. 10, pp. 3556–3561, Oct. 2014.
- [51] "Antimicrobial Copper Site." [Online]. Available: <http://www.antimicrobialcopper.org/>. [Accessed: 04-May-2017].
- [52] V. Loconsolo, "Comunicato stampa - Istituto Italiano del Rame." 2008.
- [53] I. Ospedaliere, "Il rame contro le infezioni nosocomiali," *Progett. per la sanità*, vol. 126, 2012.
- [54] Y. Kim, Y. Choi, K. Kim, and S. Choi, "Evaluation of copper ion of antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and *Helicobacter pylori* and optical, mechanical properties," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 8, pp. 3823–3828, 2012.
- [55] G. Kátay, P. G. Ott, E. Kátay, D. Magyar, and E. Tyihák, "Potential role of formaldehyde in the mechanism of action of ascorbigens on the basis of BioArena studies," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. 4, pp. 412–418, 2009.
- [56] E. A. Abou Neel, I. Ahmed, J. Pratten, S. N. Nazhat, and J. C. Knowles, "Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2247–2254, 2005.
- [57] H. Xie and Y. J. Kang, "Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications," *Curr. Med. Chem.*, vol. 16, no. 10, pp. 1304–1314, 2009.
- [58] C. Gérard, L. J. Bordeleau, J. Barralet, and C. J. Doillon, "The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper," *Biomaterials*, vol. 31, no. 5, pp. 824–831, 2010.
- [59] M. Arora, "Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature," *World J. Orthop.*, vol. 4, no. 2, p. 67, 2013.
- [60] International Organization for Standardization, "ISO 5833:2002(en), Implants for surgery — Acrylic resin cements," 2002.
- [61] G. Lewis, "Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 76B, no. 2, pp. 456–468, Feb. 2006.
- [62] U. Persson, M. Persson, and H. Malchau, "The economics of preventing revisions in total hip replacement," *Acta Orthop. Scand.*, vol. 70, no. 2, pp. 163–9, 1999.
- [63] E. Jämsen *et al.*, "Prevention of deep infection in joint replacement surgery," *Acta Orthop.*, vol. 81, no. 6, pp. 660–666, Dec. 2010.
- [64] A. D. Hanssen, "Prophylactic use of antibiotic bone cement: An emerging standard - In opposition," *J. Arthroplasty*, vol. 19, no. 4 SUPPL. 1, pp. 73–77, 2004.
- [65] M. W. Squire, B. J. Ludwig, J. R. Thompson, J. Jagodzinski, D. Hall, and D. Andes, "Premixed Antibiotic Bone Cement. An In Vitro Comparison of Antimicrobial Efficacy," *J. Arthroplasty*, vol. 23, no. 6 SUPPL., pp. 110–114, 2008.
- [66] E. P. Lautenschlager, G. W. Marshall, K. E. Marks, J. Schwartz, and C. L. Nelson, "Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 837–845, Nov. 1976.

- [67] J. P. Davies and W. H. Harris, "Effect of hand mixing tobramycin on the fatigue strength of Simplex P," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 25, no. 11, pp. 1409–1414, Nov. 1991.
- [68] H. Mau, K. Schelling, C. Heisel, J.-S. Wang, and S. Breusch, "Comparison of various vacuum mixing systems and bone cements as regards reliability, porosity and bending strength," *Acta Orthop. Scand.*, vol. 75, no. 2, pp. 160–172, 2004.
- [69] H. Van de Belt, D. Neut, W. Schenk, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, "Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review," *Acta Orthop. Scand.*, vol. 72, no. 6, pp. 557–571, 2001.
- [70] J. G. E. Hendriks, D. Neut, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, "Bacterial survival in the interfacial gap in gentamicin-loaded acrylic bone cements," *Bone Joint J.*, vol. 87–B, no. 2, 2005.
- [71] D. Neut, H. Van De Belt, J. R. Van Horn, H. C. Van Der Mei, and H. J. Busscher, "Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation," *Biomaterials*, vol. 24, no. 10, pp. 1829–1831, 2003.
- [72] H. Hendriks, "Antibiotic release from bone cement under simulated physiological conditions," *Full Thesis*, 2003.
- [73] M. J. Dalby, L. Di Silvio, E. J. Harper, and W. Bonfield, "Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response," *Biomaterials*, vol. 23, no. 2, pp. 569–576, 2002.
- [74] S. Shinzato, T. Nakamura, J. Tamura, T. Kokubo, and Y. Kitamura, "Bioactive bone cement: Effects of phosphoric ester monomer on mechanical properties and osteoconductivity," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, no. 4, pp. 571–577, 2001.
- [75] V. Alt *et al.*, "An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4383–4391, 2004.
- [76] P. Prokopovich, R. Leech, C. J. Carmalt, I. P. Parkin, and S. Perni, "A novel bone cement impregnated with silver-tiopronin nanoparticles: Its antimicrobial, cytotoxic, and mechanical properties," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, no. June 2013, pp. 2227–2237, 2013.
- [77] M. Miola, M. Bruno, G. Maina, G. Fucale, G. Lucchetta, and E. Vernè, "Antibiotic-free composite bone cements with antibacterial and bioactive properties. A preliminary study," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 65–75, 2014.
- [78] M. Miola, G. Fucale, G. Maina, and E. Verne, "Antibacterial and bioactive composite bone cements containing surface silver-doped glass particles.," *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 5, p. 55014, 2015.
- [79] D. Arcos, C. V. Ragel, and M. Vallet-Regí, "Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system," *Biomaterials*, vol. 22, no. 7, pp. 701–708, 2001.
- [80] W. C. Liu *et al.*, "Gentamicin-loaded strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement-An efficient bioactive antibiotic drug delivery system," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 95 B, no. 2, pp. 397–406, 2010.
- [81] G. Vernè, Enrica; Miola, Marta; Ferraris, Sara; Masse, Alessandro; Bistolfi, Alessandro; Crova, Maurizio; Maina, "Composite bone cements with a pmma matrix, containing bioactive antibacterial glasses or glassceramics," US 20120115981 A1,

2010.

- [82] Giulia Pezzia Fornero, “Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica ‘Sintesi e caratterizzazione di vetri bioattivi drogati con rame,’” 2011.
- [83] H. Křížová and J. Rotková, “Green Synthesis of Copper-Based Nanostructures Using Tannic Acid and Testing of Their Antibacterial Properties,” pp. 1–6, 2014.
- [84] C. Vitale Brovarone, “Dispense del corso ‘Ingegneria dei materiali.’” 2017.
- [85] M. Vanzi, “Dispense del corso ‘Affidabilità e diagnostica.’” 2016.
- [86] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [87] P. Wayne, *NCCLS M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 9th Edn, NCCLS, Villanova, PA, USA 2003*, vol. 26. 2006.
- [88] A. K. Chatterjee, R. Chakraborty, and T. Basu, “Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 135101, 2014.