

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

**DOTTORATO DI RICERCA IN DISCIPLINE DELLE ATTIVITA' MOTORIE E
SPORTIVE**

Ciclo XXI CICLO

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: MED 33

TITOLO TESI

**UTILIZZO DI DISPOSITIVI MAGNETICI NEL TRATTAMENTO
DELLA PATOLOGIA ARTROSICA DEL GINOCCHIO**

Presentata da: Dott. Alessandro Russo

Coordinatore Dottorato

Prof.Salvatore Squatrito

Relatore

Prof.Maurilio Marcacci

Esame finale anno 2009

**” UTILIZZO DI DISPOSITIVI MAGNETICI NEL TRATTAMENTO
DELLA PATOLOGIA ARTROSICA DEL GINOCCHIO”**

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 5
2. APPLICAZIONE DEI CAMPI MAGNETICI IN ORTOPEDIA: REVISIONE DELLA LETTERATURA	pag. 9
3. UTILIZZO DEGLI SCAFFOLD NEL TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSSEE ED OSTEOCONDRALE: LIMITI ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE	pag.14
3.1 <i>Difetti ossei segmentari</i>	pag. 15
3.2 <i>Difetti osteocondrali</i>	pag.17
4. MAGNETIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD	pag.23
4.1 <i>Parte sperimentale</i>	pag.30
5. PROVE DI CITOTOSSICITA’	pag.34
6. CONCLUSIONI	pag.39
7. BIBLIOGRAFIA	pag.40

1.INTRODUZIONE

Le patologie muscolo-scheletriche rappresentano un settore della medicina di notevole impatto sociale ed economico dovuto al progressivo invecchiamento della popolazione, alla progressiva diminuzione dell'età dei pazienti che richiedono trattamenti ricostruttivi e alla crescente richiesta di trattamenti che garantiscano una miglior qualità della vita.

Da un punto di vista biologico, l'osso è un tessuto vivente che svolge molteplici funzioni all'interno del corpo umano. La sua caratteristica principale è la capacità di mantenere una forma e una struttura ottimale lungo tutta la durata della vita, mediante un processo di rinnovamento che lo rende capace di modificarsi in funzione dei diversi stimoli ambientali cui è sottoposto, mantenendo così un equilibrio ottimale fra forma e funzione. Come tutti i tessuti viventi però l'osso richiede un continuo apporto di ossigeno e nutrienti, e la sua capacità rigenerativa è limitata dall'entità del danno che subisce. A causa di patologie quali l'artrosi, i tumori, le infezioni e l'osteoporosi, la funzione ossea spesso può essere ripristinata solo attraverso interventi chirurgici ricostruttivi. Nella medicina moderna l'autotrapianto di tessuto è considerata la metodica ricostruttiva con la più alta percentuale di successo. Tuttavia la quantità di tessuto che può essere prelevata dallo stesso individuo è limitata, pena l'insorgere di patologie nel sito di prelievo. Un'alternativa agli autotrapianti è offerta dagli allotrapianti regolarmente conservati nelle banche dei tessuti muscolo-scheletrici. Purtroppo la richiesta di tessuti alle banche supera di gran lunga l'offerta, non vi è garanzia assoluta di non trasmissione di infezioni e la percentuale di successo nel trattamento ricostruttivo è nettamente inferiore all'autotrapianto. Di conseguenza c'è una crescente domanda nel mercato di sostituti ossei sintetici in grado di evitare complicazioni e per i quali non vi sia limitazione di offerta. Oggi la chirurgia ricostruttiva del sistema muscolo-scheletrica è, nella stragrande maggioranza dei casi, sinonimo di chirurgia protesica in cui vengono utilizzate protesi metalliche.

Ogni anno più di 600000 interventi di protesi articolare vengono eseguiti nei soli Stati Uniti, con un costo complessivo che supera i 3 bilioni di dollari. I metalli in genere sono i materiali di scelta per le protesi articolari e per i mezzi di sintesi in traumatologia. Le eccellenti proprietà meccaniche dei metalli rispondono ai requisiti necessari per sopportare le forze che vengono generate dal sistema muscolo-scheletrico. Tuttavia sia i metalli che i materiali polimerici attualmente in commercio vanno incontro ad usura dovuta alle forze di taglio che agiscono sull'articolazione protesica determinando la mobilizzazione ed il fallimento dell'impianto. Gli interventi di sostituzione protesica si rendono quindi necessari determinando un drastico aumento dei costi per il sistema sanitario e dei tempi di ricovero per il paziente. L'ingegneria tissutale sta emergendo come una promettente alternativa per la ricostruzione di organi e tessuti danneggiati in grado di eliminare le complicazioni associate agli impianti tradizionali. L'ingegneria tissutale propone di riparare o ricostruire i tessuti danneggiati utilizzando tessuti ingegnerizzati, che possono attivamente partecipare al processo di rigenerazione tissutale ed integrarsi con i tessuti sani. Le prime esperienze in questo settore hanno portato alla progettazione di sostituti ossei con adeguate proprietà meccaniche e che allo stesso tempo permettevano l'infiltrazione cellulare e la ristrutturazione propria del tessuto. Sebbene molti di questi prodotti assomigliassero microscopicamente al tessuto da sostituire, il sostituto osseo falliva prima della completa guarigione.

Il primo decennio del terzo millennio è caratterizzato dall'integrazione delle nanotecnologie per la comprensione della fisiopatologia e per il trattamento delle malattie del sistema muscolo-scheletrico. L'approccio nanotecnologico alla medicina avviene poiché i ricercatori nanotecnologi hanno in parte abbandonato, se così si può dire, la scienza di base per affrontare problematiche reali che necessitano per la loro risoluzione di approcci integrati. Gli obiettivi che queste tecnologie si pongono, nascono da una nuova interpretazione del sistema muscolo-scheletrico. L'approccio all'articolazione o al segmento osseo danneggiato non tiene in considerazione unicamente le caratteristiche macroscopiche, meccaniche e tribologiche del

sistema muscolo-scheletrico, ma al contrario parte dalla comprensione dei processi biologici, biomeccanici, biochimici e biofisici a livello nanometrico che inducono le cellule a realizzare un tessuto che macroscopicamente presenti caratteristiche meccaniche e tribologiche adeguate alla funzione che deve svolgere.

Il successo sia degli impianti protesici che dei prodotti di ingegneria tissutale è strettamente dipendente dal biomateriale selezionato. Uno dei fattori chiave identificati nel fallimento di entrambi i tipi d'impianto è la scarsa o assente rigenerazione tissutale intorno all'impianto immediatamente dopo l'intervento. Questo effetto è stato attribuito alla scarsa integrazione all'interfaccia fra il biomateriale e il tessuto ospite. E', infatti, noto che l'introduzione di un materiale estraneo all'interno del corpo umano causa specifiche reazioni biologiche nella regione in cui viene impiantato. Le biomolecole e le cellule insieme alle proprietà intrinseche del biomateriale scelto determinano la biocompatibilità e la sopravvivenza dell'impianto.

La ricerca ha dimostrato che tutti i sistemi viventi sono governati dal comportamento molecolare a livello nanometrico. I mattoni molecolari della vita -proteine, acidi nucleici, lipidi e carboidrati- sono esempi di materiali che possiedono proprietà uniche determinate dalla loro dimensione, geometria, carica elettrica. Inoltre l'organizzazione cellulare e le corrispondenti caratteristiche di un tessuto sono strettamente dipendenti dalla struttura della matrice extracellulare. La matrice extracellulare ha una complessa struttura gerarchica con un livello di organizzazione spaziale e temporale che percorre vari ordini di grandezza (dai nanometri ai centimetri). Per queste ragioni le cellule nel nostro corpo sono predisposte ad interagire con superfici nanostrutturate.

Le nanotecnologie permettono che la strutturazione del materiale avvenga a livello atomico, molecolare conferendo ai prodotti realizzati proprietà vantaggiose la cui applicazione in ambito ortopedico apre la porta ad una nuova generazione di protesi, sostituti ossei e trattamenti medici. Infatti la nanostrutturazione dei materiali consentirà di modulare il rilascio di farmaci e fattori di crescita (drug delivery) durante la rigenerazione tissutale, promuovere una rapida guarigione

contestualmente al loro riassorbimento. La sfida tecnicamente più difficile appare oggi il controllo temporale e spaziale della rigenerazione tessutale nel difetto da trattare e il parallelo riassorbimento del materiale impiantato.

In questa tesi si descrive la progettazione e la creazione di nuovo concetto di scaffold bioattivo nanostrutturato in grado di essere manipolato in sito per mezzo di forze magnetiche. Questo approccio intende generare scaffold con funzioni multiple, la più importante delle quali rappresentata dalla possibilità di rifornire lo scaffold stesso con fattori di crescita, cellule e farmaci, con l'obiettivo di rigenerare segmenti ossei ed osteocondrali di grandi dimensioni.

Il momento magnetico dello scaffold rende possibile l'affascinante possibilità di attuare un controllo spaziale e temporale della rigenerazione tissutale attraverso un rifornimento continuo dall'esterno con fattori di crescita specifici. Lo scaffold magnetico può essere immaginato come una stazione fissa che offre assistenza al processo di rigenerazione del tessuto consentendo di modificare l'attività dello scaffold in funzione delle necessità specifiche del difetto tissutale da trattare.

L'ideazione di questo progetto nasce da un'attiva collaborazione fra tre gruppi di ricerca emiliano-romagnoli: il Laboratorio di Biomeccanica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, l'Istituto per i Materiali Nanostrutturati (ISMN-CNR, Bologna) e l'Istituto per la Scienza e la Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC-CNR, Faneza). Questa ricerca ha ricevuto un finanziamento dalla Comunità Europea nell'ambito del VII Programma Quadro nella linea "nanotecnologie": NMP-2007-4.2.3-1 Magnetic Scaffold for in vivo Tissue Engineering – MAGISTER.

2.APPLICAZIONE DEI CAMPI MAGNETICI IN ORTOPEDIA:

REVISIONE DELLA LETTERATURA

Gli stimoli fisici e meccanici giocano un ruolo fondamentale nella differenziazione e nel mantenimento di molti tessuti, incluso il tessuto osseo. L'osso risponde al carico meccanico stimolando la formazione di nuovo osseo ed inibendone il suo riassorbimento.

Tuttavia, molto poco si sa di come avvenga la risposta agli stimoli fisici a livello cellulare e quali siano i meccanismi molecolari che sono alla base della transduzione-meccanica.

La proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti, responsabili della crescita, del rimodellamento e della guarigione del tessuto osseo sono modulate da molteplici fattori extracellulari fra cui le citochine e gli ormoni.

Nella letteratura scientifica vi è una scarsa evidenza sul meccanismo di azione degli stimoli fisici sulla differenziazione degli osteoblasti mediata dai cosiddetti mecano-recettori.

Matsuda e collaboratori, Peverali e collaboratori, Ziros e collaboratori, hanno dimostrato un aumento della fosforilazione delle proteine chinasi di membrana in colture di osteoblasti sottoposti a continua trazione meccanica. Quando lo stress in tensione è massimale, gli osteoblasti si allungano in direzione parallela allo stress e progressivamente cominciano ad esprimere fattori osteogenici quali ad esempio la BMP-4. Quest'azione avviene ad opera di una chinasi di membrana (MAPK), la quale trasmette segnali di membrana dall'ambiente esterno, attraverso la membrana cellulare, al nucleo e mediante una cascata fosforilativa stimola l'espressione genica. Nei mammiferi sono conosciuti tre gruppi di chinasi (MAPK): ERK1/2 che regola i segnali extracellulari, SAPK/JNK attivata dagli stress di membrana e p38. E' noto che queste chinasi rispondono a vari stimoli fra cui i raggi ultravioletti, gli stress ossidativi, lo shock termico ecc.

In accordo con Owen e coll. (1990) durante la differenziazione del tessuto osseo si possono distinguere tre fasi: la proliferazione, lo sviluppo/maturazione della matrice extracellulare e la mineralizzazione. La transizione fra la fase di proliferazione e quella della maturazione della

matrice extracellulare è contraddistinta dall'*up-regulation* dei geni associati con lo sviluppo e la maturazione della matrice extracellulare stessa, quali la sintesi di collagene e l'attività dell'ALP-chinasi. L'osteocalcina, marker tipico delle ultime fasi di maturazione degli osteoblasti è espresso da osteoblasti altamente differenziati in colture durante la fase di mineralizzazione. Il deposito del calcio inizia nella fase di sviluppo della matrice extracellulare e raggiunge il massimo durante la fase di mineralizzazione.

Come è noto la rigenerazione dell'osso è sensibile ai campi elettromagnetici pulsati. Questi ultimi sono utilizzati in modo estensivo nella pratica clinica ed in particolare nel trattamento dei ritardi di consolidazione, nei trapianti ossei, nelle osteotomie, nelle fratture fresche, nelle osteonecrosi e nell'osteoporosi (Bassett 1993).

Differenti Autori hanno dimostrato che i campi elettromagnetici pulsati stimolano l'attività degli osteoblasti, ovvero la proliferazione cellulare (De Mattei et al.,1999), la differenziazione cellulare (Takano-Yamamoto et al., 1992; Landry et al.,1997), l'espressione di proteine ossee morfogenetiche –in particolare BMP 2 e 4- (Nagai and Ota, 1994; Bodamyali et al., 1998), la produzione di matrice extracellulare (Heermeier et al.,1998), di fosfatasi alcalina (Vander Molen et al., 2000), il flusso e l'up-take del calcio (Ozawa et al., 1989; Fitzsimmons et al., 1994). Altri autori d'altra parte hanno suggerito anche un'azione inibitoria sulla differenziazione osteoblastica (McLeod and Collazo, 2000).

I campi elettromagnetici pulsati hanno dimostrato di avere effetto sulla rigenerazione del tessuto umano negli animali, ma anche nell'uomo. La loro azione osteogenica sembra essere mediata dall'induzione elettrica nel sito di esposizione che determina un cambiamento di permeabilità agli ioni attraverso la membrana cellulare ed influisce sull'attività dell'AMPc e del GMPc intracellulare.

In aggiunta i campi elettromagnetici pulsati invertono periodicamente sia il vettore elettrico e che magnetico a livello della membrana cellulare, entrambi questi effetti potenzialmente responsabili dell'effetto osteogenico.

Poiché i campi elettromagnetici presentano sia campi magnetici che correnti elettriche, non è possibile trarre delle conclusioni definitive rispetto a quale entità sia responsabile della formazione ossea.

Tuttavia poiché i campi magnetici statici non inducono né correnti elettriche, né cambiamenti vettoriali, il meccanismo osteogenetico dei campi magnetici pulsati e dei campi magnetici statici deve essere differente.

I magneti derivati dalle terre rare, i quali generano campi magnetici statici, sono stati utilizzati con successo in vari trattamenti ortodontici come generatori di forza (Vardimon et al., 1989, 1991; Bondemark and Kurol, 1992; Noar and Evans, 1999). In letteratura vi sono poche evidenze scientifiche di trattamento oltre a quest'ultimo. Recentemente alcuni studi hanno suggerito che i campi magnetici statici sono in grado di aumentare la velocità di riparazione dell'osso (Darendeliler et al., 1997), di stimolare la deposizione di nuovo osso e di diminuire il depauperamento osseo dovuto agli interventi chirurgici ed alla immobilità (Yan et al., 1998). Pertanto è implicito che un campo magnetico costante ha il potenziale di indurre direttamente l'orientamento degli osteoblasti, la differenziazione e la formazione di tessuto osseo.

Campi magnetici statici dell'ordine del gauss, generati da magneti di neodimio-boro e di samario-cobalto, hanno dimostrato di generare formazione di tessuto osseo in modelli animali. Camilleri e Mc Donald hanno studiato l'effetto dei campi magnetici statici nel ratto, utilizzando magneti di neodimio-boro posti su una sutura cranica e hanno dimostrato che tali campi magnetici stimolano l'attività mitotica cellulare. Si suppone che l'effetto sia di iniziare ed aumentare i depositi intracellulari del calcio, che neutralizza la carica negativa del tessuto consentendo la conseguente vascolarizzazione ed osteogenesi. Analogamente Bruce e coll. hanno riportato che la stimolazione con campi magnetici statici aumenta la resistenza a livello del callo di frattura del radio nel topo.

Un altro possibile meccanismo d'azione dei campi magnetici statici può essere secondario al riarrangiamento della membrana fosfolipidica la quale possiede anisotropia diamagnetica ed è

sensibile a tali campi magnetici. Il riarrangiamento dei fosfolipidi potrebbe attivare delle molecole associate alla membrana, quali le molecole di adesione provocando un aumento della differenziazione osteoblastica. Un'altra possibilità di azione dei campi magnetici statici è l'alterazione dell'interazione cellula-matrice extracellulare. E' infatti noto che le fibre di collagene si orientano perpendicolarmente al campo magnetico, al contrario delle cellule che a causa della loro adesione si orientano parallelamente al campo magnetico. La differenza nell'anisotropia magnetica fra le cellule e le fibre di collagene può provocare un forte attrito e aumentare l'interazione cellula/matrice extracellulare con l'effetto di accelerare la differenziazione cellulare. I campi magnetici forti in vivo possono alterare la forma della cellula e pertanto possono condizionare sia la direzione che il contenuto del tessuto osseo che sta rigenerando.

Kotani e collaboratori recentemente hanno investigato gli effetti di un campo magnetico statico forte (8 Tesla) sulla rigenerazione ossea sia in vitro che in vivo concludendo che l'allineamento parallelo al campo magnetico degli osteoblasti stimolava il differenziamento cellulare, attraverso l'attivazione dell'ALP, la sintesi di osteocalcina, e della calcificazione. Altri studi hanno dimostrato che la differenziazione osteoblastica è accelerata dalla trasduzione intracellulare del segnale provocato dall'interazione fra la matrice extracellulare e le integrine di membrana. In accordo con l'ipotesi che i recettori delle integrine agiscono come meccano-transduttori, Pommerenke e collaboratori hanno posto delle cellule osteoblastiche in coltura assieme a delle microsfele ricoperte di integrine sotto l'azione di un campo magnetico ed hanno riscontrato l'attivazione di una chinasi di adesione (FAK) e di una chinasi di membrana (MAPK). Le chinasi stress correlate (p38 e SAPK/JNK) possono essere rapidamente attivate da un numero di agenti fisici fra cui lo shock termico, lo shock osmotico, le radiazioni ultraviolette, i raggi x e lo stress ossidativi. E' noto che la chinasi p38 gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione di varie cellule fra cui gli adipociti, i fibroblasti, i mioblasti e le cellule neuronali. Recentemente, Suzuki e collaboratori, Yuge e collaboratori hanno riportato il ruolo della chinasi p38 nella

differenziazione degli osteoblasti, concludendo che la stimolazione con campi magnetici statici aumenta l'attività fosforilativa della p38 chinasi determinando un'accelerazione nella differenziazione degli osteoblasti e che l'inibitore della p38 chinasi inibisce la differenziazione osteoblastica.

L'evidenza scientifica dimostra che l'aumentata differenziazione degli osteoblasti sottoposti a campi magnetici statici è da attribuire all'aumentata fosforilazione della p38 chinasi.

Oden e collaboratori hanno dimostrato che l'aumento della resistenza meccanica dell'osso dopo esposizione a campi magnetici statici è dipendente da un aumento della densità minerale ossea (BMD).

I campi magnetici statici stimolano un aumento localizzato della deposizione del calcio nell'osso che neutralizza la carica negativa del tessuto e permette la neo-angiogenesi e l'osteogenesi. Alcuni Autori sostengono inoltre che i campi magnetici statici aumentino il flusso sanguigno, la concentrazione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e l'immunoreattività per il VEGF stesso, suggerendo che la neo-angiogenesi ha un effetto anabolico sulla formazione di osso.

In conclusione l'evidenza scientifica attuale asserisce che l'applicazione dei campi magnetici statici nel tessuto osseo promuove la differenziazione e l'attivazione degli osteoblasti determinando un aumento della densità minerale ossea nel tessuto stesso.

3.UTILIZZO DEGLI SCAFFOLD NEL TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSSEE ED OSTEOCONDRALE : LIMITI ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE

La ricostruzione di tessuto osseo ed osteocondrale rappresenta un bisogno clinico e socio-economico di grande proporzioni a causa dell'aumentata incidenza delle patologie osteo-articolari e dal parallelo invecchiamento della popolazione.

Le protesi metalliche ed i trapianti ossei rappresentano i trattamenti accessibili attualmente per rispondere a questi problemi, tuttavia le protesi solo parzialmente ripristinano la funzione articolare ed hanno una durata limitata. I trapianti di osso autologo, d'altra parte non sono sempre disponibili in quantità sufficienti ed il loro utilizzo causa problemi nella sede del prelievo.

I trapianti omologhi sono inferiori rispetto all'osso autologo, sono costosi e presentano il rischio di contaminazioni batteriche, di trasmissione virale e di reazioni immunitarie. Come conseguenza di tutto ciò emerge la necessità di una procedura ideale che non richieda né l'utilizzo di sostituti protesici, né trapianti ossei.

L'ingegneria tissutale sta diventando un'alternativa reale per il trattamento dei difetti ossei ed osteocondrali. Si tratta di un approccio "in vivo" basato sull'impianto di scaffold altamente porosi che stimolano l'organismo a produrre matrice ossea. La fattibilità di tale trattamento è stata dimostrata in modo convincente in modelli ectopici o in difetti di dimensione critica nell'animale da esperimento. Tuttavia a giudicare dal numero limitato di studi clinici riportati, la rigenerazione ossea basata sull'ingegneria tissutale nell'uomo non può essere considerata oggi una metodica ripetibile e di successo. Il problema di allargare il trattamento a difetti ossei ed osteocondrali massivi nell'uomo risiede nella mancanza di una rapida ed efficace vascolarizzazione (neo-angiogenesi) nei grandi scaffold tridimensionali. Quando poi è necessario trattare difetti tissutali nelle ossa portanti si deve affrontare un altro livello di

complessità: lo scaffold deve essere in grado di sostenere i carichi dovuti al peso corporeo ed all'azione dei muscoli che, come è noto, sono responsabili del rimodellamento osseo mediato da stimoli meccanici (transduzione meccanica).

Gli stimoli meccanici trasferiti dagli scaffold convenzionali alle cellule dipendono unicamente dalle proprietà intrinseche dello scaffold, quali la rigidità e l'architettura.

Negli ultimi dieci anni lo scopo dei ricercatori in ambito di ingegneria tissutale è stato lo sviluppo di scaffold tridimensionali contenenti cellule che potessero essere impiantati nell'organismo umano per curare una malattia o riparare un difetto tissutale. La rigenerazione e la differenziazione di un tessuto sono regolati dall'avvicinarsi di vari fattori di crescita che agiscono in tempi e spazi diversi. Due sono le più importanti strategie che normalmente vengono perseguite nell'ingegneria tissutale. La prima consiste nella semina delle cellule *in vitro* in uno scaffold sintetico che agisce da supporto e da stimolo per la ricrescita del tessuto nelle tre dimensioni. Il biocomposito viene successivamente impiantato nel paziente e mentre le cellule producono la matrice extra-cellulare, lo scaffold si degrada in sostanze non tossiche.

Una seconda strategia è detta rigenerazione tissutale *in situ*, in cui lo scaffold per la maggior parte riassorbibile viene impiantato direttamente nel sito del difetto da trattare e l'organismo umano è il suo stesso bioreattore (Langer R. Science 1993, Ohgushi H J.Biomed.Mater.Res.1999).

3.1 Difetti ossei diafisari

La perdita di sostanza ossea segmentaria legata a fenomeni traumatici, neoplastici o infettivi costituisce uno dei maggiori problemi che il chirurgo ortopedico può trovarsi ad affrontare nel corso della sua pratica clinica, sia per la sua frequenza che per la sua gravità. Tale condizione costringe il chirurgo a adottare soluzioni che non sempre permettono il ripristino completo della funzionalità, fino ad arrivare alle soluzioni drastiche come artrodesi o addirittura amputazione di un arto. Ciò risulta tanto più problematico in quanto il soggetto nella maggior parte dei casi è

giovane. Il problema di perdita di sostanza ossea è stato affrontato da diversi gruppi di ricerca però ancora non è stato trovato alcun metodo che costituisca la soluzione unica del problema, non tanto riguardo alla tecnica chirurgica, quanto al materiale da utilizzare per colmare le perdite di sostanza che stimoli la crescita di nuovo osso. I materiali proposti finora per il trattamento delle perdite ossee sono difficilmente utilizzabili nei casi di ricostruzione dei grossi segmenti portanti che attualmente vengono riparati con osso autologo o omologo.

Fino ad oggi sono stati proposti svariati biomateriali variamente riassorbibili in grado di sostituire il tessuto osseo: idrossiapatite associata o meno a tricalciofosfato, corallo, biovetri, allumina ed innumerevoli altri. Il problema principale legato all'utilizzo di qualsiasi biomateriale attualmente in uso clinico per le grosse perdite ossee, è rappresentato dalla mancanza delle capacità osteoinduttive, fungendo solo da "scaffold" cioè sostegno, per la ricrescita dell'osso ospite e dalle insufficienti proprietà meccaniche.

Le tipologie dei pazienti che possono beneficiare dallo sviluppo dei biomateriali altamente innovativi per colmare dei grossi difetti ossei segmentari potrebbero essere così riassunte:

- Perdita di sostanza ossea post-traumatica:

- acuta
- in seguito al fallimento di procedimento di osteosintesi (pseudoartrosi lassa o ipertrofica, settica o asettica);
- Perdita di sostanza ossea in seguito al fallimento di impianti protesici d'anca e di ginocchio (scollamenti settici o asettici);
- Perdita di sostanza ossea in seguito agli interventi di resezione per tumori ossei:
- sostituzione di perdite di sostanza ossea segmentarie diafisarie in seguito alla resezione del tumore;
- fallimenti delle ricostruzioni con osso di banca;
- Perdita di sostanza ossea in seguito ai processi infettivi (pregressi o in corso).

Esistono tuttavia, due problemi principali da risolvere nel trattamento di difetti ossei massivi. Il primo è di ordine biologico e risiede nella necessità di ottenere una rapida vascolarizzazione (neo-angiogenesi) soprattutto negli scaffold tridimensionali di grandi dimensioni. Infatti, spesso l'insufficiente trofismo dell'impianto ne determina il suo precoce fallimento. Il secondo problema, di ordine meccanico, risiede nella difficoltà di ottenere una fissazione stabile fra osso ospite e scaffold, con conseguente rischio di micromovimenti a livello dell'interfaccia e fallimento dell'integrazione biologica scaffold-osso ospite.

3.2 Difetti Osteocondrali

La cartilagine articolare, a differenza del tessuto osseo dotato di grandi capacità rigenerative, possiede limitate capacità di riparazione intrinseca, essendo caratterizzata dall'assenza di supporto ematico, linfatico e nervoso indispensabili per la riparazione tessutale. Ciò comporta una scarsa capacità di guarigione, inoltre il tessuto cartilagineo neoformato, sia esso generato in caso di guarigione spontanea o in seguito a procedure chirurgiche, non possiede le caratteristiche biologiche e morfologiche della cartilagine articolare sana, pertanto non consente performance meccaniche paragonabili al tessuto normale.

I difetti osteocondrali, siano essi di natura traumatica o degenerativa, costituiscono un problema di difficile risoluzione per la chirurgia ortopedica, soprattutto nei casi di grave perdita di sostanza.

I motivi sono da imputare all'elevata frequenza di comparsa di tali lesioni, che sempre più spesso coinvolgono soggetti di giovane età, e alla spontanea evoluzione verso processi artrosici, ma soprattutto all'assenza di un metodo che rappresenti una soluzione unica del problema sia per quanto riguarda la tecnica chirurgica che i materiali da utilizzare per colmare la perdita di sostanza osteocondrale.

L'obiettivo comune di tutti i trattamenti è di ripristinare un mantello cartilagineo articolare con caratteristiche biologiche e morfo-funzionali analoghe a quelle della cartilagine sana.

Differenti procedure chirurgiche sono state proposte per il trattamento di complessi difetti tessutali; ottimi risultati si sono ottenuti con il trapianto osteocondrale autologo, massivo o a mosaico, ovvero attraverso il prelievo di tessuto osteocartilagineo da una regione di non carico, come ad esempio il margine mediale o laterale della troclea femorale o della gola intercondiloidea, e l'alloggiamento dello stesso nella sede della lesione osteocondrale. Questa tecnica rappresenta una soluzione interessante per ristabilire la funzionalità biologica e meccanica del giunto, purtroppo però soffre di alcuni limiti quali la modesta disponibilità del materiale, la morbilità del sito donatore e la difficoltà di riprodurre la congruenza della superficie articolare.

La bioingegneria tissutale potenzialmente consente di superare questi limiti attraverso l'utilizzo di biomateriali bioingegnerizzati che permettono all'innesto un'alta adattabilità al sito della lesione, garantendo la congruenza del giunto articolare e offrendo così vantaggi dal punto di vista strutturale, biologico e biomeccanico; necessari per una riparazione riproducibile e durevole.

I progressi fatti dalla scienza dei materiali, nella biologia cellulare e nelle nano-tecnologie hanno permesso lo sviluppo di diversi metodi di assemblaggio degli innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati.

Per quanto riguarda le linee cellulari utilizzate per la colonizzazione degli scaffolds, esse possono derivare da un singolo citotipo avente capacità condrogeniche, da due citotipi, uno con capacità condrogeniche e l'altro con capacità osteogeniche o da un singolo citotipo contemporaneamente con capacità sia osteogeniche che condrogeniche. E' possibile anche un approccio *cell free*, sviluppato con l'obiettivo di fornire specifici segnali "rigeneratori" alle cellule mesenchimali provenienti dal midollo osseo. Naturalmente, occorre che l'impianto sia sufficientemente "intelligente" da stimolare la proliferazione cellulare attesa e, quindi la formazione di due diversi tipi di tessuto (osseo e cartilagineo) con qualità biomeccaniche confrontabili con quelle naturali.

Nonostante l'ampia varietà dei metodi sviluppati finora, in merito agli innesti osteocondrali bioingegnerizzati, si è ancora lontani dal raggiungimento di risultati clinici soddisfacenti.

Attualmente l'indicazione al trattamento delle lesioni osteocondrali è limitata a lesioni di piccole dimensioni. Infatti, quando la lesione articolare è di grandi dimensioni, oppure si sono già instaurate le alterazioni regressive tipiche dei quadri di artrosi conclamate, gli scaffold attualmente disponibili non danno risultati soddisfacenti e l'unica opzione terapeutica che garantisce la risoluzione della sintomatologia dolorosa e della funzione articolare è la sostituzione protesica 'classica'.

Le direzioni che intendiamo perseguire per migliorare la performance degli scaffold e garantire una ricostruzione biologica anche nei casi di degenerazione articolare avanzata sono i seguenti:

- Ottimizzare la struttura dello scaffold per replicare la naturale architettura dell'osso sano;
- Migliorare la vascolarizzazione favorendo la generazione di vasi all'interno dello scaffold
- Realizzare un controllo spaziale e temporale della rigenerazione tissutale;
- Realizzare un tessuto con caratteristiche meccaniche in grado di sopportare i carichi articolari fisiologici.

Il percorso per realizzare una protesi completamente biologica è sicuramente lungo e le problematiche da superare sono state attualmente solo parzialmente esplorate e risolte. L'approccio che ci pare più razionale è la creazione '*step by step*' di compositi protesici ibridi nei quali la componente metallica viene progressivamente sostituita da materiali biomimetici e biorisorbibili.

In questa tesi si descrive la progettazione e la creazione di nuovo concetto di scaffold bioattivo nanostrutturato in grado di essere manipolato in sito per mezzo di forze magnetiche. Questo approccio intende generare scaffold con funzioni multiple, la più importante delle quali

rappresentata dalla possibilità di rifornire lo scaffold stesso con fattori di crescita, cellule e farmaci, con l'obiettivo di rigenerare segmenti ossei ed osteocondrali di grandi dimensioni.

Il momento magnetico dello scaffold rende possibile l'affascinante possibilità di attuare un controllo continuo ed un rifornimento del tessuto che sta rigenerando dall'esterno con fattori di crescita specifici. Lo scaffold magnetico può essere immaginato come una stazione fissa che offre assistenza al processo di rigenerazione del tessuto consentendo di modificare l'attività dello scaffold in funzione delle necessità specifiche del difetto tissutale da trattare.

L'ingegneria tissutale è un complesso processo composto da molte fasi che richiede un tempo relativamente lungo per ricostruire un tessuto con caratteristiche meccaniche e biologiche paragonabili al tessuto sano, pertanto il controllo temporale della differenziazione del tessuto è un obiettivo fondamentale per consentire un buon risultato clinico. Nel tessuto osseo, ad esempio, è possibile ottenere la resistenza meccanica agli stress fisiologici solo se parallelamente viene ripristinata una vasta ed efficace rete vascolare (angiogenesi).

Il controllo temporale è difficilmente ottenibile con gli scaffold tradizionali in cui i fattori di crescita vengono seminati nello scaffold prima dell'impianto. Questa metodologia limita il rilascio localizzato e controllato degli stimoli biochimici, riducendo pertanto il potenziale rigenerativo degli scaffold.

Questo nuovo metodo proposto consente di attivare uno scambio continuo di materiale e fattori di crescita mediante l'uso di nanoparticelle guidate da campi magnetici. Il processo di rifornimento degli scaffold è basato sull'utilizzo di varie nanoparticelle magnetiche biofunzionalizzate in grado di formare aggregati con fattori di crescita selezionati e cellule staminali che agiscono come *shuttles* che trasportano questi bioagenti verso lo scaffold.

La guida di nanoparticelle attraverso campi magnetici è un processo già noto in nanomedicina per il rilascio di farmaci a distanza nel trattamento dei tumori tramite ipertermia, ma non ancora applicato al mondo degli scaffold ed è guidato in questi casi da campi magnetici esterni.

La magnetizzazione degli scaffold rende possibile il rilascio dei bioagenti nello scaffold stesso [J. Dobson, *Drug.Dev.Res.* **60**, 55 (2006)]. Lo scaffold agisce come un amplificatore locale del campo magnetico: la sua relativamente debole magnetizzazione può assumere valori elevati in presenza di un campo magnetico esterno detto *campo coercitivo*, mentre alla rimozione del suddetto campo magnetico esterno la sua magnetizzazione si può ridurre di diversi ordini di grandezza, tanto da poter dire che la sua magnetizzazione può essere spenta a riparazione tissutale avvenuta.

La magnetizzazione dello scaffold offre altre soluzioni innovative nel trattamento dei difetti ossei ed osteocondrali, una delle quali è rappresentata dalla possibilità di ottenere una fissazione ottimale dello scaffold nel difetto da trattare attraverso le forze magnetiche stesse. Questo approccio offre una soluzione elegante e semplice ai problemi di fissazione che si rendono manifesti nel trattamento dei difetti massivi. Infatti a causa delle differenti caratteristiche fisiche fra lo scaffold ed il tessuto osseo la fissazione rappresenta un problema clinico reale, vista la necessità di ottenere un'interfaccia assolutamente stabile fra i due tessuti. Attualmente nel trattamento di piccoli difetti osteocondrali la maggior parte dei chirurghi non utilizza alcun mezzo di fissazione e la stabilità dello scaffold è garantita semplicemente dalla congruenza fra quest'ultimo ed il difetto da trattare

Nel trattamento di difetti ossei massivi la fissazione è ottenuta grazie a complicate procedure estremamente invasive (fissatori esterni, chiodi endomidollari, placche e viti) che richiedono molteplici controlli nel tempo e spesso più di una revisione chirurgica con un ovvio aumento dei costi sanitari e delle complicanze.

Un'altra affascinante possibilità è il controllo preciso della temperatura dello scaffold mediante l'applicazione di campi magnetici esterni. Questa opzione rende possibile due ulteriori applicazioni:

1- utilizzare lo scaffold e le nanoparticelle magnetiche come un sistema dosabile di farmaci controllato dalle variazioni della temperatura; 2- studiare l'effetto dell'innalzamento prolungato della temperatura sulla neo-angiogenesi.

4.MAGNETIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD

La nostra soluzione a tali problematiche è la realizzazione di uno scaffold magnetico in grado di attirare e incamerare fattori di crescita e/o cellule *in vivo* guidati da forze magnetiche. Questo approccio è stato proposto solo recentemente e coinvolge l'uso di nanoparticelle magnetiche funzionalizzate con fattori di crescita o cellule staminali.

Queste nanoparticelle funzionalizzate agiscono come degli *shuttles* che trasportano i bioagenti verso e dentro lo scaffold aumentando il controllo della rigenerazione tissutale e dei processi di angiogenesi. Lo scaffold può essere immaginato come una stazione fissa che fornisce l'opzione di variare l'attività dello scaffold in funzione degli specifici bisogni del tessuto che sta rigenerando.

Il metodo del *magnetic guiding* è già noto in nanomedicina sebbene non sia ancora stato applicato al campo degli scaffold. E' stato sviluppato in passato soprattutto per il rilascio localizzato di farmaci (*drug delivery*) e per il trattamento dei tumori tramite ipertermia ed è basato in entrambi i casi da campi magnetici esterni per aumentare l'accuratezza spaziale e l'efficacia della terapia.

Questi metodi sono applicabili anche per in presenza di uno scaffold magnetico, in presenza del quale, inoltre, le linee di flusso del campo magnetico vengono modificate generando una concentrazione maggiore di flusso magnetico nei pressi ed all'interno degli scaffold. In conseguenza di tale fenomeno si possono raggiungere forze magnetiche attrattive significative.

Utilizzando un materiale magnetico morbido o anche un materiale superparamagnetico, gli scaffold magnetici che ne derivano sono in grado di raggiungere valori di magnetizzazione molto alti se sottoposti ad un campo magnetico esterno e possiedono inoltre un'altra opzione estremamente interessante, possono essere spenti da un punto di vista magnetico dopo la rimozione del campo magnetico esterno.

L'obiettivo di questa tesi è dimostrare la possibilità di magnetizzare scaffold per ricostruzione ossea ed osteocondrale, già utilizzati in pratica clinica, ad un valore di magnetizzazione compatibile con il processo di drug delivery. Inoltre, per la prima volta, viene utilizzato un processo di microfluidica per magnetizzare un materiale non magnetico utilizzando la naturale capillarità dello scaffold.

Sostituti sintetici ossei, composti di collagene e collagene biomineralizzato (cioè composti biomimetici idrossiapatite/collagene) sono stati utilizzati come materiale di partenza per la fabbricazione dei suddetti scaffold magnetici. Questi materiali sono usati routinariamente in pratica clinica per sostituire tessuto osseo e/o cartilagineo danneggiato o ammalato. L'idrossiapatite (HA) è una ceramica bioattiva che viene utilizzata nelle ricostruzioni ortopediche, poiché replica la componente minerale dell'osso e possiede eccellente biocompatibilità. Inoltre gli scaffold di idrossiapatite possono essere processati con una specifica micro e macroporosità in modo tale da ripristinare quell'interconnettività simile all'osso umano che è una caratteristica essenziale per la rigenerazione tissutale.

La nostra tecnica di magnetizzazione è basata su un processo di impregnazione che consiste nel depositare lo scaffold poroso in una soluzione acquosa di ferrofluidi (fig.1b). In questa tecnica la specifica porosità di interconnessione consente alla soluzione ferrofluida di penetrare attraverso la struttura dello scaffold per capillarità. Il successivo processo di congelamento/essiccazione consente l'eliminazione del solvente, mantenendo intatta la forma e la porosità originale dello scaffold. Le rimanenti nanoparticelle magnetiche, che rimangono intrappolate dentro la struttura, determinano la magnetizzazione dello scaffold stesso. (fig.1c).

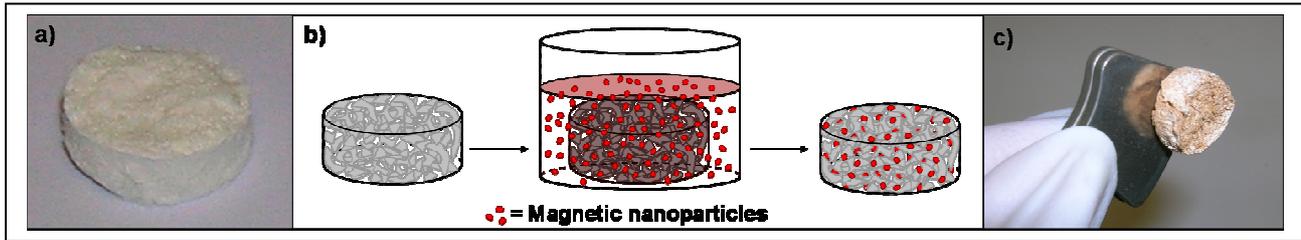


Figura 1. a) Fotografia dello scaffold idrossiapatite/collagene prima della magnetizzazione b) Illustrazione schematica del processo di magnetizzazione c) Fotografia che mostra l'attrazione fra lo scaffold ed un magnete standard dopo il processo di magnetizzazione.

Fra i materiali magnetici standard, le nanoparticelle di ossido di ferro sono state scelte per la loro caratteristica superparamagnetica a temperatura ambiente. La magnetite (Fe_3O_4) funzionalizzata con rivestimenti biocompatibili è il materiale magnetico più utilizzato nelle applicazioni biomedicali (come mezzo di contrasto nella Risonanza Magnetica Nucleare, nel drug delivery e nell'ipertermia).

Sono stati utilizzati quattro tipi di ferrofluidi commerciali per la magnetizzazione degli scaffold. Si tratta di soluzioni acquose di nanoparticelle di magnetite disperse, ricoperte con polimeri normalmente utilizzati nelle applicazioni biomediche.

Sono stati testati due tipi di scaffold. Uno è un materiale composito composto da idrossiapatite e collagene biomimetici (70:30 wt/wt) - identificato come HA/COLL-, mentre l'altro tipo di scaffold è composto da collagene al 100% ed è stato identificato -COLL- . Entrambi i tipi di scaffold sono stati sintetizzati come sfere porose (diametro 10 ± 4 mm, altezza: 5 ± 3 mm).

Vari tipi di scaffold sono stati prodotti con questa tipo di tecnica per impregnazione (tab.1). Le sfere sono state immerse in 1 mL di ferrofluido per 15 minuti per consentire l'assorbimento del ferrofluido all'interno dei pori dello scaffold per capillarità.

Tabella 1. Campioni di scaffold magnetizzati

Name of magnetic scaffold	Type of ferrofluid used for magnetization	Type of scaffold used for magnetization
MAG1	FF-DP	HA/COLL
MAG2	FF-DXS	HA/COLL
MAG3	FF-PAA	HA/COLL
MAG4	FF-DP	COLL
MAG5	FF-DXS	COLL
MAG6	FF-PAA	COLL
MAG7	FF-PVP	COLL

Queste sfere successivamente sono state ghiacciate e essiccate sotto vuoto per mantenere la loro forma originale, per consentire la sublimazione dell'acqua. Un lavaggio è stato eseguito successivamente attraverso l'immersione dello scaffold in acqua deionizzata per 20 minuti sotto l'effetto di ultrasuoni, per lavare via l'eccesso di nanoparticelle. Lo scaffold è stato quindi congelato ed essiccato una seconda volta dopo il lavaggio.

La stabilità dello scaffold è stata valutata *in vitro* in fluidi biologici simulati attraverso la spettrometria indotta ad emissione accoppiata plasma-ottica (ICP-OES). La quantità di magnetite rilasciata dallo scaffold nel mezzo è stata misurata per otto giorni e paragonata alla quantità di magnetite posta inizialmente nello scaffold.

L'analisi ICP ha rivelato una percentuale estremamente bassa di rilascio di magnetite dopo l'immersione per otto giorni in fluidi corporei simulati a flusso costante per entrambi i tipi di scaffold. Gli scaffold del tipo HA/COLL hanno rilasciato 1.16 wt% di magnetite, mentre gli scaffold del tipo COLL hanno rilasciato 2.13wt%. La magnetizzazione non è quindi stata influenzata dai test di rilascio, infatti le variazioni osservate sono al di sotto dell'accuratezza del sistema ($\pm 5\%$).

Questi primi risultato confermano che gli scaffold di idrossiapatite/collagene e collagene sono validi candidati per le applicazioni *in vivo*.

Le caratteristiche magnetiche dei ferrofluidi e degli scaffold sono state valutate sia sotto l'effetto di bassi e/o alti campi magnetici applicati. Indicheremo M_L la magnetizzazione

misurata con un campo magnetico applicato di 34 O e M_H la magnetizzazione misurata con un campo magnetico applicato di 10 kOe.

Abbiamo dimostrato che la magnetizzazione raggiunta dai sette tipi di scaffold testati con la nostra tecnica di impregnazione raggiunge una magnetizzazione ragionevolmente elevata per il drug delivery, con una magnetizzazione M_L compresa fra 0.06 emu/g e 0.60 emu/g (**Tab. 2**).

Tabella 2. Valori di magnetizzazione raggiunta in emu.g⁻¹ per ciascun tipo di scaffold magnetico, dopo 1 e 5 successive impregnazioni rispettivamente. Valori riportati per esposizione a bassi e alti campi magnetici.

Type of magnetic scaffold	Magnetization [emu.g ⁻¹]		
	one-time dip-coated	5-time dip-coated	
	at 34 Oe (M_L)	at 34 Oe (M_L)	at 10 kOe (calculated) (M_H)
MAG1	0.13	1.7	15
MAG2	0.17	1.4	13
MAG3	0.17	1.5	13
MAG4	0.29	1.5	13
MAG5	0.42	1.6	14
MAG6	0.60	1.3	12
MAG7	0.06		

Inoltre per i campioni MAG1, MAG2, MAG3 e MAG7, sono stati ottenuti valori di magnetizzazione notevoli (3 campioni per ciascun tipo di scaffold) con un errore standard compreso fra 0.8% per MAG3 a un massimo del 15.5% per MAG2. Queste variazioni sono state dovute parzialmente alla struttura ed alla composizione degli scaffold stessi, poiché proprio queste caratteristiche possono variare da uno scaffold all'altro durante i processi di sintesi.

Parallelamente siamo riusciti ad aumentare la magnetizzazione degli scaffold eseguendo cinque successive impregnazioni per ciascun scaffold da MAG1 a MAG6.

Abbiamo eseguito un numero limitato di caratterizzazioni in campi magnetici alti di 10 kOe. Le misurazioni sono state eseguite su MAG 1, che è stato utilizzato come campione di calibrazione.

Abbiamo calcolato che applicando un campo magnetico di 10kOe la magnetizzazione raggiunge un valore 9 volte superiore rispetto all'applicazione di un campo di 34 kOe. Abbiamo

utilizzato questo coefficiente per calcolare la magnetizzazione media dei campioni rimanenti (colonna destra della **tabella 2**). E' importante sottolineare che la magnetizzazione del campione di calibrazione ha raggiunto il 74% di saturazione con un campo magnetico esterno applicato di 1 kOe. Tali campi magnetici sono usati di routine nei laboratori e sono facilmente raggiungibili in ambiente clinico.

La valutazione morfologica degli scaffold magnetici è stata eseguita utilizzando un microscopio elettrico a scansione (ESEM Leo 438VP). I campioni sono stati posti direttamente nella camera senza alcun ricoprimento elettroconduttivo e sono stati valutati in stato di vuoto parziale.

La spettrografia EDS ha confermato la presenza di ferro in tutti i tipi di scaffold magnetici. Le microfotografie ottenute al microscopio SEM (**fig.2**) hanno caratterizzato la morfologia degli scaffold magnetici, indicando che la loro porosità specifica non è stata alterata dal processo di magnetizzazione per entrambe le tipologie degli scaffold testati (Collagene e HA/collagene).

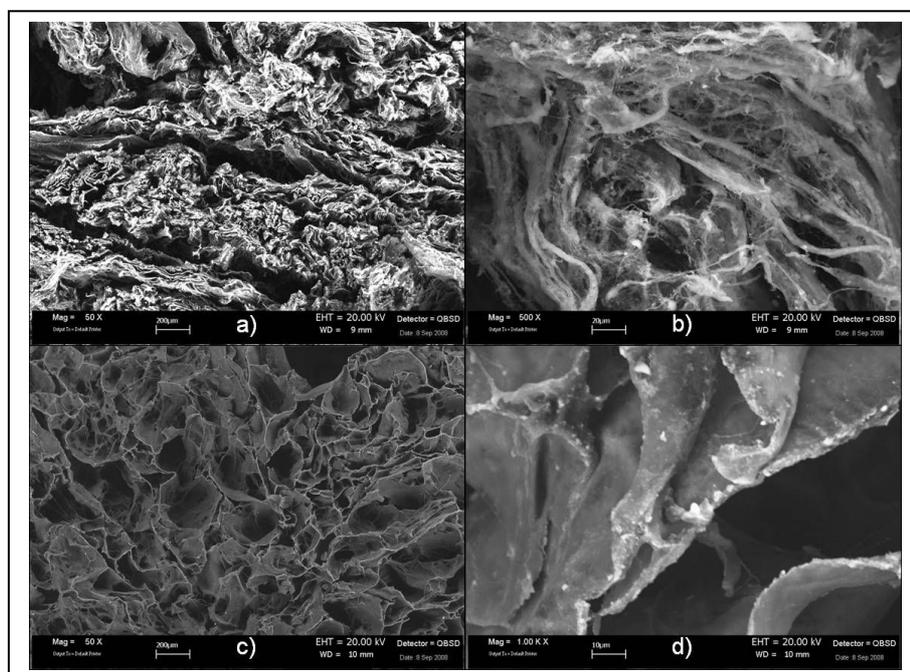


Figura 2. Microfotografie al microscopio SEM degli scaffold magnetici a), b) MAG2 (HA/COLL magnetizzato con FF-DXS) and c), d) MAG4 (COLL magnetizzato con FF-PVP)

In tutti i campioni, l'analisi EDS ha confermato la presenza di calcio e fosfati in un rapporto Ca:P caratteristico per il composto HA calcio fosfato simil-biomimetico (pertanto non stechiometrico).

Puntini bianchi sono chiaramente visibili alle microfotografie eseguite al SEM (**fig.2**) e sono rappresentative della fase inorganica. Esse sono associate all'idrossiapatite così come alla presenza di ossidi di ferro.

Le nanoparticelle di HA si presentano distribuite casualmente sulle fibre di collagene, come è tipico per questo tipo di scaffold e le fibre hanno mantenuto la loro forma durante la magnetizzazione.

Negli scaffold di collagene (**fig.2c, 2d**) i puntini bianchi sono attribuiti completamente agli ossidi di ferro, poiché in tali tipi di scaffold non vi può essere presente altra fase inorganica e inoltre non è stata neanche rilevata dall'analisi EDS.

E' stata inoltre eseguita la diffrattometria ai raggi X (XRD), sui campioni MAG1, MAG2, MAG3, MAG7 con una radiazione $Cu\alpha$ (Rigaku Miniflex, Tokyo Japan). Per valutare l'influenza del processo di magnetizzazione ciascun scaffold è stato diviso in 2 pezzi. Solo una metà è stata magnetizzata, mentre l'altra non è stata modificata. Per tutti i tipi di scaffold la stessa struttura amorfa, dovuta all'HA nanocristallina ed al collagene è stata osservata prima e dopo il processo di magnetizzazione. L'unico cambiamento è stato la comparsa del picco tipico rappresentativo della magnetite. Pertanto il nostro procedimento non ha alterato la struttura cristallina e non ha cambiato la struttura generale degli scaffold.

In aggiunta alla parte sperimentale abbiamo eseguito anche simulazioni al computer sulle forze che un scaffold sferico di un centimetro di diametro può esercitare su una nanoparticella magnetica di magnetite di 100nm. Abbiamo considerato una magnetizzazione dello scaffold di 15 emu/g, ed abbiamo calcolato che la forza supera il peso della particella 5 mm dai poli e 3 mm dall'equatore, valori assolutamente compatibili per il processo del magnetic guiding,

Deve essere tenuto in considerazione che affinché il campo magnetico esterno non interferisca con il processo di magnetic guiding la sua omogeneità deve essere superiore di 10 Oe/cm.

4.1 Parte sperimentale

Preparazione dei ferrofluidi: I ferrofluidi sono soluzioni colloidali di nanoparticelle magnetiche sospese in un mezzo fluido, di solito un solvente organico o acqua. Il primo ferrofluido identificato come FF-PVP è una soluzione acquosa di nanoparticelle di magnetite. Queste nanoparticelle sono state fornite da NanoAmor (Nanostructured & Amorphous Materials Inc., USA) in forma di polvere. Le nanoparticelle hanno un diametro medio di 25 nm e sono ricoperte con Polyvinylpyrrolidone, un polimero solubile in acqua, con l'obiettivo di facilitare la dispersione delle nanoparticelle in acqua.

Le nanoparticelle (15.7mg) sono state miscelate ad acqua deionizzata (10ml) e la soluzione è stata sonificata per 3 ore per rompere possibili aggregati e per ottenere una dispersione omogenea. Il peso finale del volume di FF-PVP è di 1,57 mg/ml.

I ferrofluidi identificati come FF-DXS, FF-PAA e FF-DP sono soluzioni acquose di nanoparticelle di magnetite (diametro medio 200 nm) e sono state vendute come ferrofluidi da Chemicell GmbH (Germany).

Le nanoparticelle di magnetite identificate come FF-DXS sono state ricoperte preventivamente da Chemicell con dextransolfato e funzionalizzate con gruppi funzionali di sodiosolfato ($R-OSO_3^-$, Na^+), mentre le nanoparticelle identificate come FF-PAA sono ricoperte con acido poly-DL-aspartato e funzionalizzate con gruppi funzionali di sodio-carbossilato ($-COO^-$, Na^+).

Pertanto entrambe queste soluzioni presentano caratteristiche utili per l'applicazione richiesta di legare fattori attivi e/o cellule.

Tutti i ferrofluidi sono stati miscelati ad acqua deionizzata per raggiungere una proporzione fra peso finale e volume di 2.5 mg/mL o 10 mg/mL. La prima soluzione è stata utilizzata per gli scaffold che sono stati sottoposti ad impregnazione un'unica volta, mentre la seconda soluzione è stata utilizzata per l'impregnazione degli scaffold 5 volte consecutivamente.

Preparazione degli scaffold: Gli scaffold sono stati preparati da ISTECCNR (Faenza, Italia). Il primo tipo di scaffold identificato come HA/COLL è costituito di HA e collagene (70:30), crosslinkato con BDDGE, in forma di sfere micro e macro porose (diametro: 10 ± 4 mm, altezza: 5 ± 3 mm). Le sfere sono state ottenute attraverso un processo di congelamento/essiccamento del materiale composito sintetizzato attraverso una enucleazione diretta della fase inorganica, nano-apatite biomimetica auto-assemblante sulle fibre di collagene.

Il secondo tipo di scaffold identificato come COLL è collagene al 100% in forma di sfere porose della stessa dimensione degli scaffold HA/COLL.

Misurazioni magnetiche: La magnetizzazione degli scaffold e dei ferrofluidi a campi magnetici bassi è stata eseguita con un susceptometro YSZ 01C|02C da Sartorius Mechatronics Italy S.r.l. a 34 Oe.

Per la misurazione degli scaffold, 4 campioni per ciascun tipo di scaffold sono stati preparati per MAG1, MAG2, MAG3 e MAG7, mentre un solo campione è stato preparato per MAG4, MAG5 e MAG6. La calibrazione per la magnetizzazione in campi magnetici alti è stata determinata per mezzo di un magnetometro superconduttore ad interferenza quantica (SQUID).

Test di stabilità: I test di rilascio degli scaffold magnetici sono stati eseguiti in condizioni dinamiche a 37 °C, in fluidi biologici simulati (SBF, soluzione salina di Hank bilanciata H6648, Sigma Aldrich). La soluzione SBF fresca è stata continuamente aggiunta in un baker contenente il campione con una pompa peristaltica con un flusso di 0.12 ml/min, mentre la stessa quantità di fluido veniva simultaneamente prelevata dal baker, conservata e analizzata mediante metodica ICP per valutare il rilascio di magnetite.

Tabella i. Caratteristiche dei ferrofluidi

Ferrofluid	APS [nm]	Coating	Functional group	Origin
FF-PVP	25	Polyvinylpyrrolidone	None	NanoAmor Inc.(USA)
FF-DXS	200	Dextransulfate	Sodium sulfate	Chemicell GmbH (Germany)
FF-PAA	200	Poly-DL-aspartic acid	Sodium carboxylate	Chemicell GmbH (Germany)
FF-DP	200	Starch	Phosphate	Chemicell GmbH (Germany)

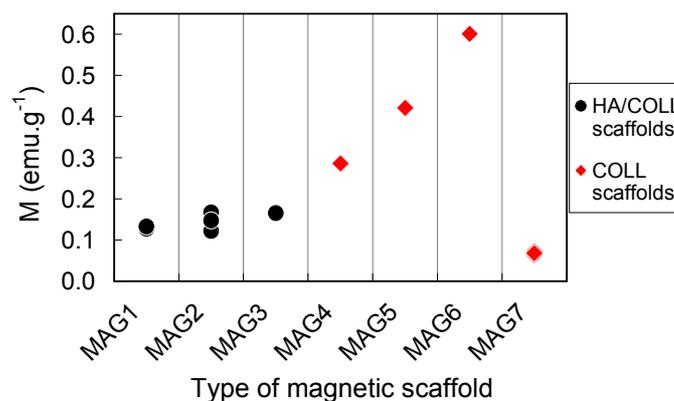
Tabella ii. Proprietà magnetiche dei ferrofluidi

Ferrofluid	Susceptibility	M [$\text{emu}\cdot\text{cm}^{-3}$]
FF-PVP	0.0153 ± 0.0002	0.0413 ± 0.0004
FF-DXS	0.1199 ± 0.0006	0.3238 ± 0.0015
FF-PAA	0.1463 ± 0.0007	0.3951 ± 0.0020
FF-DP	0.1688 ± 0.0060	0.4557 ± 0.0162

Tabella iii. Proprietà magnetiche degli scaffold MAG1, MAG2, MAG3, e MAG7

Type of magnetic scaffold	Average M [$\text{emu}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Average M [$\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$]
MAG1	0.0255 ± 0.0030	0.129 ± 0.003
MAG2	0.0276 ± 0.0023	0.145 ± 0.023
MAG3	0.0268 ± 0.0006	0.166 ± 0.001
MAG7	0.0044 ± 0.0007	0.068 ± 0.005

in $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ **Figura j.** Magnetizzazione per i sette tipi di scaffold magnetici per un campo magnetico applicato di 34 Oe.



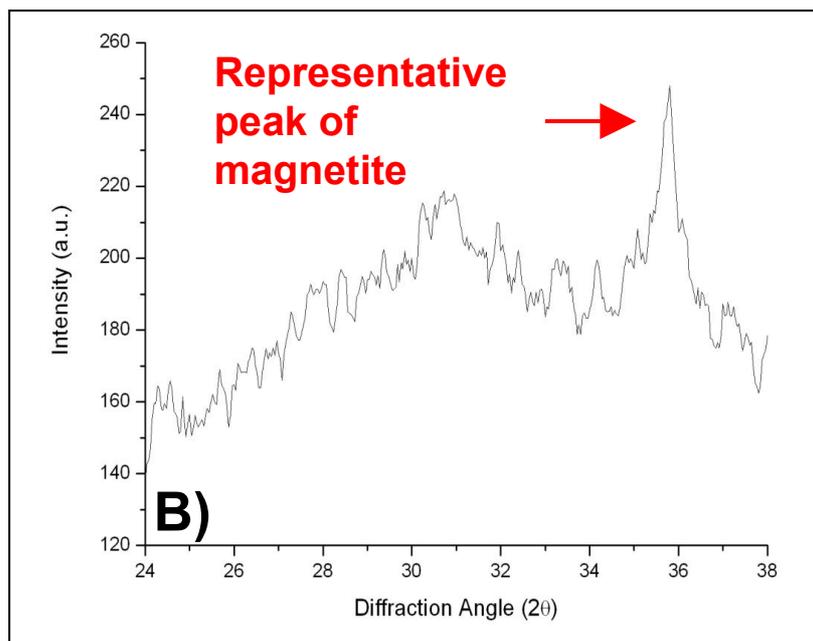
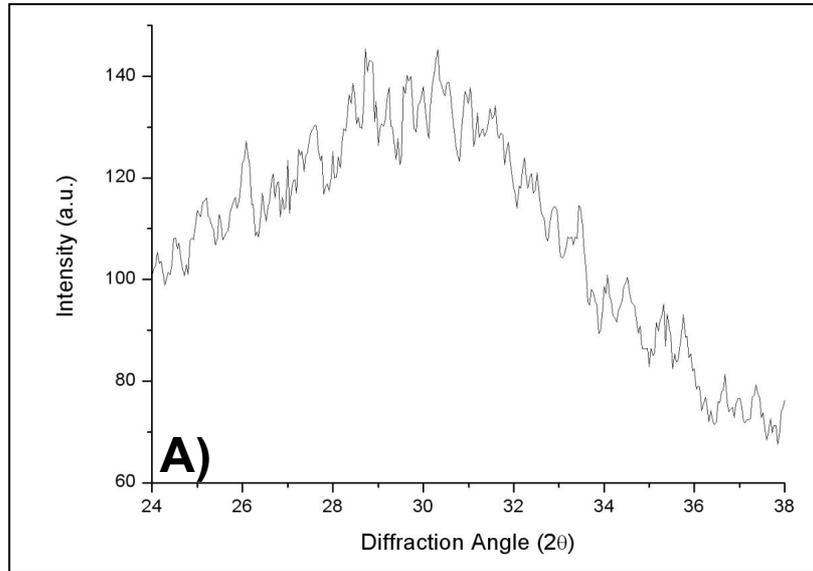


Figura jj Difrattometria ai raggi X (XRD): a: Struttura amorfa dello scaffold standard, **b:** struttura amorfa dello scaffold magnetico in cui l'unica variazione osservata è la comparsa del picco tipico della magnetite.

5.PROVE DI CITOTOSSICITA'

Gi scaffold sono stati testati *in vitro* in colture di osteoblasti e cellule mesenchimali (MSC) dal midollo osseo umano in condizioni di coltura statiche. La proliferazione cellulare all'interno dello scaffold è stata valutata con microscopio elettrico a scansione (SEM), caratterizzazione istologica e con microscopio confocale (LSM).

Per tali esperimenti abbiamo utilizzato dei campioni di scaffold magnetici con una dimensione lineare non superiore a 5 mm in condizioni di coltura statica. Durante l'esperimento si è osservato un rapido sviluppo ed un efficace mantenimento della coltura degli osteoblasti senza una significativa diminuzione della proliferazione cellulare durante tutto il periodo di coltura (40 giorni).

Parallelamente si è osservata una riduzione degli elementi cellulari pari a circa 10 volte negli strati più profondi dello scaffold. Durante il periodo di coltura non abbiamo osservato differenze apparenti di crescita cellulare fra gli scaffold originali e quelli impregnati con nanoparticelle magnetiche rivestite (Blank, DXS, PAA, PAA+collagen).

Gli osteoblasti e le cellule staminali si sono attaccate alla superficie ed hanno penetrato lo scaffold durante i primi giorni di coltura. Le cellule hanno mostrato un alto grado di proliferazione (entrambe le linee cellulari dopo il quindicesimo giorno di coltura hanno ricoperto tutta la superficie e tutti i pori dello scaffold).

Per esempio al quindicesimo giorno di coltura lo scaffold originale (blank) è stato coperto completamente dalle cellule (**fig.3**).

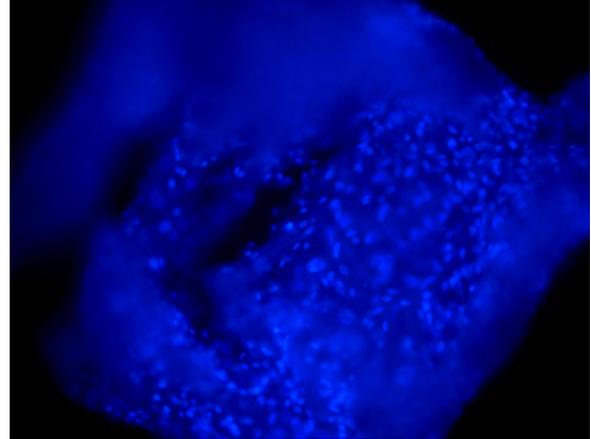
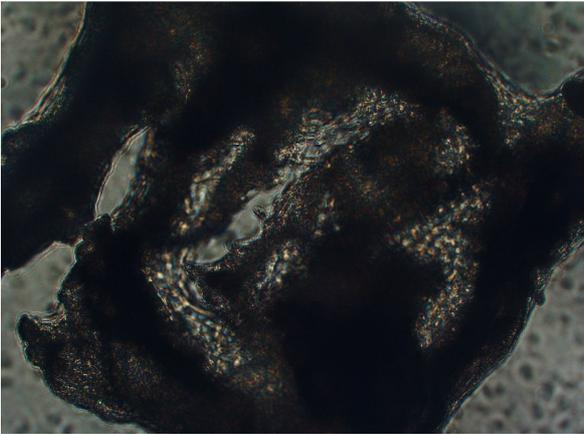


Fig.3: Caratterizzazione istologica DAPI (nuclei fluorescenti, figura destra) ed al microscopio a luce polarizzata (figura sinistra, 20x)

Le immagini al microscopio SEM (**fig.5**) e la caratteristica istologica (**fig.4**) hanno evidenziato un'intensa proliferazione cellulare osservabile sulla superficie dello scaffold, dove gli osteoblasti hanno formato alcuni strati di solito 2-4 (in confronto con la parte interna dello scaffold) e nei macropori.

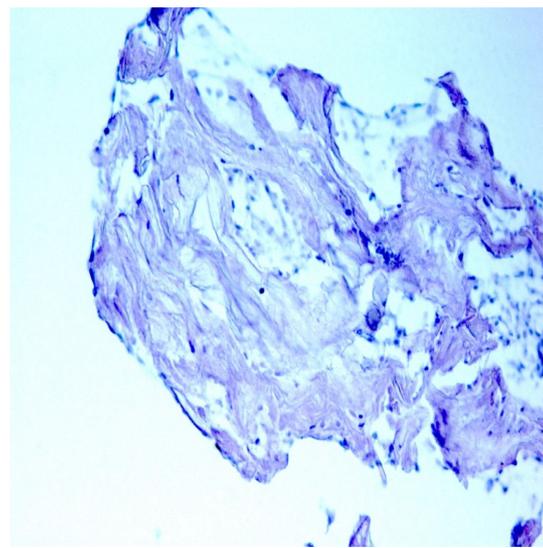
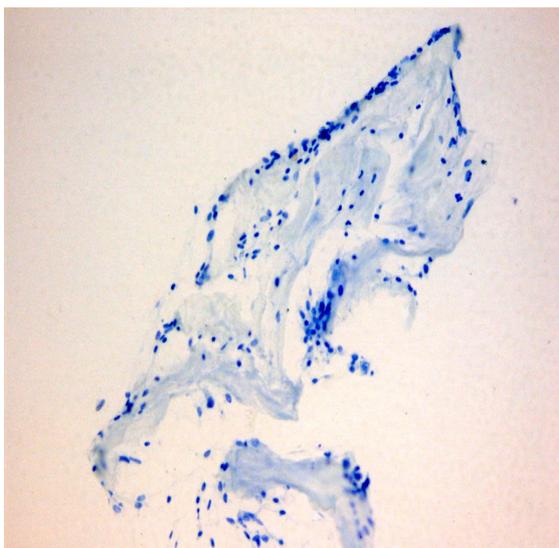


Fig.4: Preparato istologico che evidenzia la proliferazione delle cellule sulla superficie e dentro i pori dello scaffold magnetico

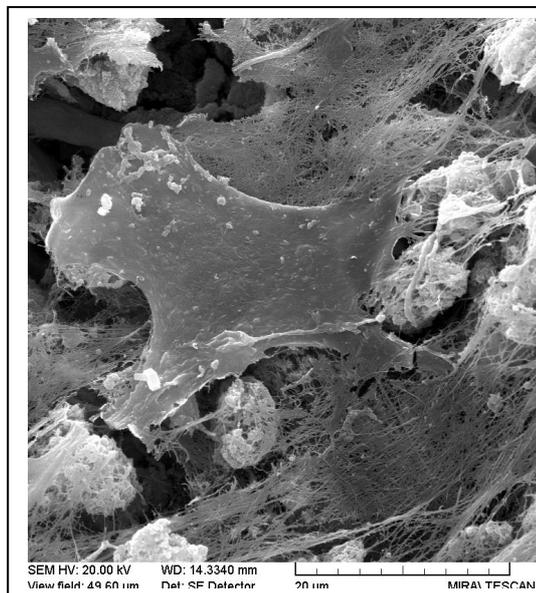
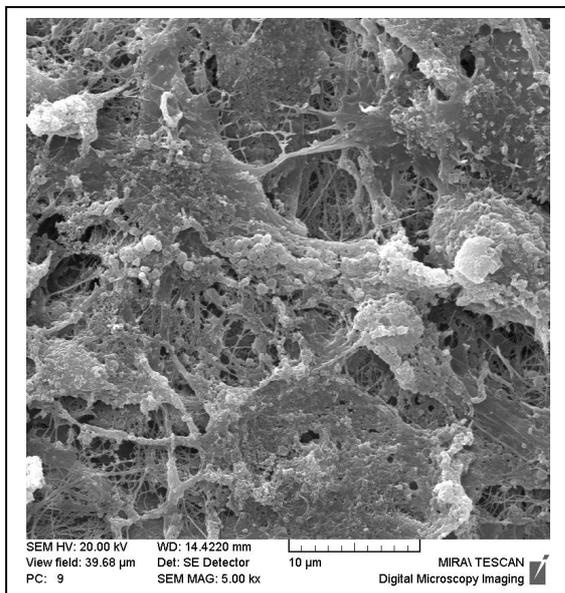


Fig.5: Microfotografie al microscopio SEM che evidenzia la proliferazione delle cellule sulla superficie e dentro i pori dello scaffold magnetico

Le cellule hanno riempito i pori degli scaffold (diametro da 100 a 550 µm), dimostrando che il supporto nutritivo allo scaffold si è verificato fino ad una profondità di 3 mm. Questo risultato suggerisce che una colonizzazione cellulare più profonda e più diffusa si può ottenere attraverso una coltura dinamica con una migliore per fusione dei nutrienti.

Il microscopio ottico confocale è stato utilizzato per studiare la proliferazione e l'attività cellulare nei differenti strati grazie alla colorazione JC-1/PI.

Le cellule più attive da un punto di vista funzionale formano lo strato superiore (citoplasma giallo), lo strato intermedio di cellule ha dimostrato una vitalità intermedia (citoplasma verde). Nello strato profondo si rilevano i nuclei delle cellule morte (**fig.6**).

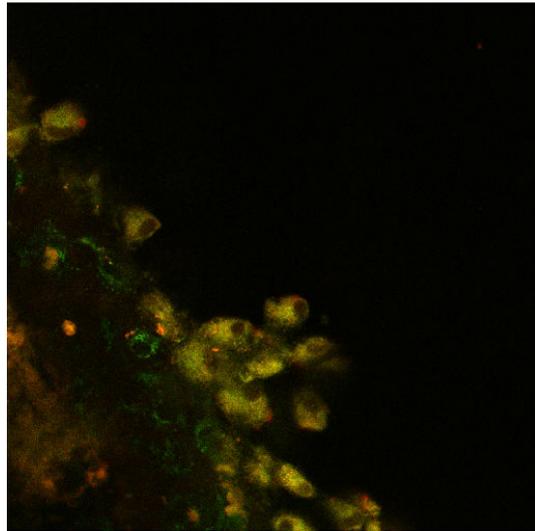


Fig.6: Preparato istologico JC-1/PI per microscopio confocale LSM

La morfologia dei nuclei apoptotici (frammentazione del nucleo) è stata inoltre rilevata negli strati più profondi degli scaffold utilizzando il microscopio ottico confocale LSM (DXS, 40days, scanning depth 50mkm, red nuclei (PI), light-red cytoplasm (Acridine-orange)).

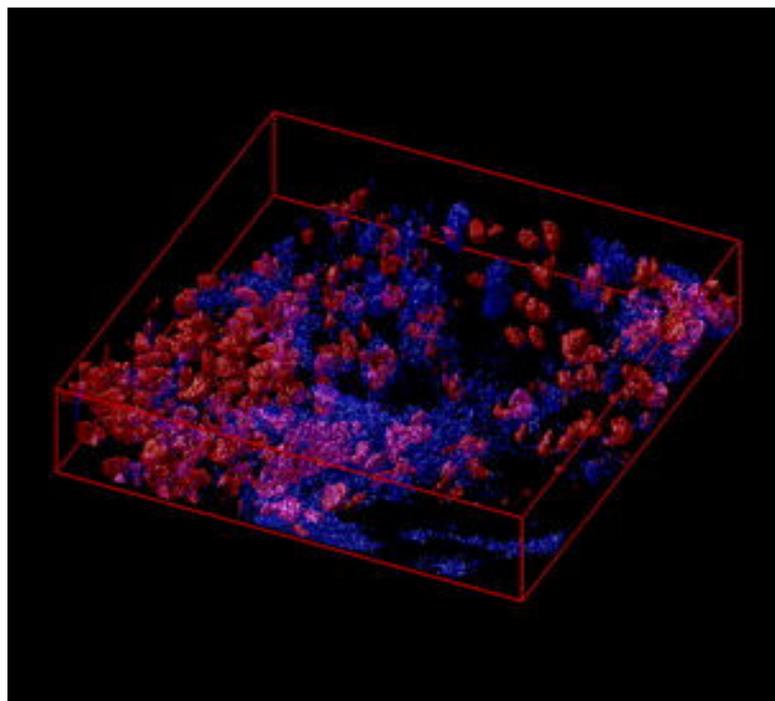


Fig.7: Preparato istologico (Acridine-orange) per microscopio confocale LSM

Poiché abbiamo condotto le prove su piccoli frammenti di scaffold è necessario eseguire gli esperimenti utilizzando campioni più grandi e più omogenei. Abbiamo inoltre intenzione di studiare con test più specifici i processi di proliferazione e differenziazione cellulare (i.e. fosfatasi alcalina, colorazione di Van-Kossa, citometria dinamica) e studiando l'espressione genica specifica.

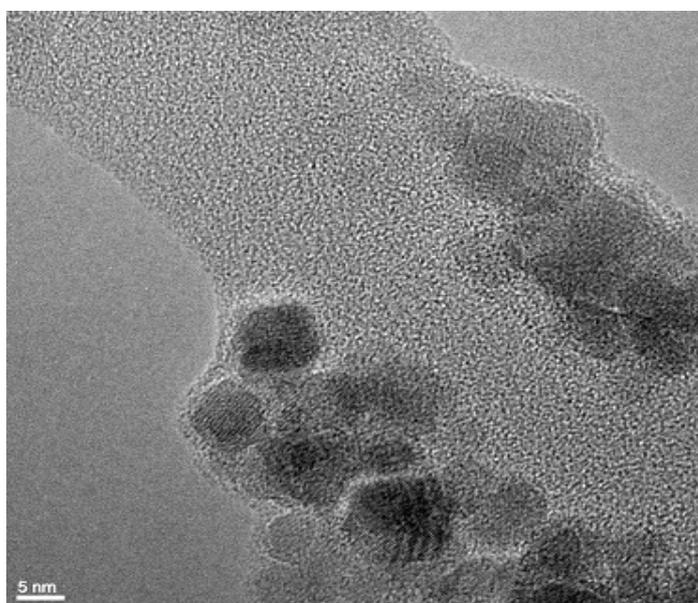
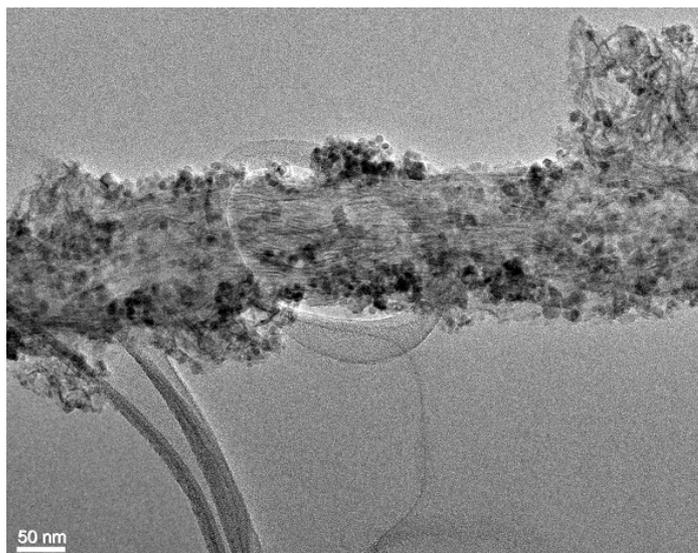


Fig.8,9: Caratterizzazione TEM: **8:** Fibrille di collagene rivestite da nanoparticelle magnetiche, **9:** particolare

6.CONCLUSIONI

In conclusione abbiamo presentato per la prima volta la fabbricazione di uno scaffold magnetico biocompatibile. Con la tecnica di impregnazione abbiamo trattato entrambi i compositi biomimetici HA/ collagene e collagene in vari ferrofluidi contenenti nanoparticelle di ossidi del ferro, raggiungendo una magnetizzazione significativa dello scaffold, considerata tanto efficiente quanto ripetibile. Le nanoparticelle magnetiche si sono omogeneamente distribuite nella struttura dello scaffold come dimostrato dalle microfotografie eseguite al microscopio SEM.

Lo scaffold non ha subito alcuna alterazione strutturale durante il processo di magnetizzazione ed ha mantenuto sia la sua porosità specifica che la sua forma. Abbiamo inoltre dimostrato la stabilità delle nanoparticelle all'interno dello scaffold per un periodo di otto giorni

Sulla base dei test di citotossicità in vitro, possiamo supporre che gli scaffold studiati forniscano un micro-ambiente favorevole per la crescita cellulare. La biocompatibilità dello scaffold facilita la crescita e la proliferazione delle cellule osteogeniche.

Questo nuovo tipo di scaffold ha pertanto la possibilità di attrarre carrier magnetici e sarà di utilità per un gran numero di persone affette da difetti ossei ed osteocondrali massivi, rendendo possibile il rilascio localizzato di fattori di crescita necessari per migliorare l'efficacia del processo di rigenerazione tissutale.

7.BIBLIOGRAFIA

1. **Angiogenesis Is Required for Successful Bone Induction During Distraction Osteogenesis**
TD Fang, A Salim, W Xia, RP Nacamuli, S Guccione, HM Song, RA Carano, EH Filvaroff, MD Bednarski, AJ Giaccia, MT Longaker
Journal of Bone and Mineral Research; 20(7):1114-1124, 2005

2. **Effects of a moderate-intensity static magnetic field on VEGF-A stimulated endothelial capillary tubule formation in vitro**
H Okano, R Onmori, N Tomita, Y Ikada
Bioelectromagnetics; 27(8):628-640, 2006

3. **Recovery of Small-Sized Blood Vessels in Ischemic Bone Under Static Magnetic Field**
S Xu, N Tomita, K Ikeuchi, Y Ikada
eCAM (evidence-based Complementary and Alternative Medicine); 4(1):59-63, 2007

4. **Expandable Non-invasive Prostheses - an Alternative to Pediatric Patients with Bone Sarcoma**
P Borkowski, M Pawlikowski, K Skalski
Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc; 4:4056-4059
Shanghai, China, Sep 1-4, 2005

5. **Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies**
RJ Midura, MO Ibiwoye, KA Powell, Y Sakai, T Doehring, MD Grabiner, TE Patterson, M Zborowski, A Wolfman
J Orthop Res; 23_1035-1046, 2005

6. **Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and**

in vivo

H Kotani, H Kawaguchi, T Shimoaka, M Iwasaka, S Ueno, H Ozawa, K Nakamura, K Hoshi
Journal of Bone and Mineral Research; 17(10):1814-1821, 2002

7. Effects of Static Magnetic Fields on Bone Formation in Rat Osteoblast Cultures

Y Yamamoto, Y Ohsaki, T Goto, A Nakasima, T Iijima
J Dent Res; 82(12):962-966, 2003

8. The effects of electromagnetic field on distraction osteogenesis

CC Kesemenli, M Subasi, H Kaya, C Sert, H Büyükbayram, H Arslan, S Necmioglu
Yonsei Med J; 44(3):385-391, 2003

9. Combined magnetic fields accelerate and increase spine fusion: a double-blind, randomized, placebo controlled study

RJ Linovitz, M Pathria, M Bernhardt, D Green, MD Law, RA McGuire, PX Montesano, G Rehtine, RM Salib, JT Ryaby, JS Faden, R Ponder, LR Muenz, FP Magee, SA Garfin
Spine; 27(13):1383-1389, 2002

10. Application of magnetic devices in otia

AA Kuznetsov, AM Yunin, AA Savichev, OA Kuznetsov, NS Dmitriev, VT Palchun
Journal of Magnetism and Magnetic Materials; 225(1-2): 202-208, 2001

11. Treatment of Nonunions With Electric and Electromagnetic Fields

RK Aaron, D McK. Ciombor, BJ Simon
Clin Orthop; 419: 21-29, 2004

12. Use of Physical Forces in Bone Healing

FRT Nelson, CT Brighton, J Ryaby, BJ Simon, JH Nielson, DJ Lorich, M Bolander, J Seelig
J Am Acad Orthop Surg; 11:344-354, 2003

- 13. Biophysical Stimulation with Pulsed Electromagnetic Fields in Osteonecrosis of the Femoral Head**

L Massari, M Fini, R Cadossi, S Setti, GC Traina

J Bone Joint Surg Am; 88: 56-60, 2006
- 14. Current trends in the enhancement of biomaterial osteointegration: Biophysical stimulation**

M Fini, G Giavaresi, S Setti, L Martini, P Torricelli, R Giardino

Int J Artif Organs; 27: 681-690, 2004
- 15. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts.**

L Yuge , A Okubo, T Miyashita, T Kumagai, T Nikawa, S Takeda, M Kanno, Y Urabe, M Sugiyama, K Kataoka

Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 7;311(1):32-8
- 16. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures.**

L Dini, L Abbro

Micron. 2005;36(3):195-217. Epub 2005 Jan 25. Review.
- 17. Efficacy of Static Magnetic Field for Locomotor Activity of Experimental Osteopenia.**

N Taniguchi, S Kanai

Evid Based Complement Alternat Med. 2007 Mar;4(1):99-105. Epub 2006 Nov 2.
- 18. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs.**

E Puricelli, LM Ulbrich,D Ponzoni, JJ Filho

Head Face Med. 2006 Nov 24;2:43.
- 19. Static magnetic field effects on bone formation of rats with an ischemic bone model.**

S Xu, N Tomita, R Ohata, Q Yan, Y Ikada

Biomed Mater Eng. 2001;11(3):257-63.

- 20. Efficiency of magnetic liposomal transforming growth factor-beta 1 in the repair of articular cartilage defects in a rabbit model.**

H Tanaka, T Sugita, Y Yasunaga, S Shimose, M Deie, T Kubo, T Murakami, M Ochi

J Biomed Mater Res A. 2005; 73(3):255-63.
- 21. Recovery of Small-Sized Blood Vessels in Ischemic Bone Under Static Magnetic Field**

S Xu, N Tomita, K Ikeuchi, Y Ikada

eCAM 2007; 4(1):59-63
- 22. Stimulation of osteoblast growth by an electromagnetic field in a model of bone-like construct**

A Icaro Cornaglia, M Casasco, F Riva, A Farina, L Fassina, L Visai, A Casasco

European Journal of Histochemistry 2006;50(3):199-204
- 23. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs**

QC Yan, N Tomita, Y Ikada

Medical Engineering & Physics 1998;20:397-402
- 24. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits**

Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku, T, Sakaguchi K

Clin Oral Impl Res 2000;11:354-360
- 25. Static Magnetic Fields Enhance Skeletal Muscle Differentiation In Vitro by Improving Myoblast Alignment**

D Coletti, L Teodori, MC Albertini, M Rocchi, A Pristera, M Fini, M Molinaro, S Adamo

Cytometry Part A 2007; 71A:846-856
- 26. Preparation and characterization of magnetic ferroscaffolds for tissue engineering**

S-H Hu, T-Y Liu, C-H Tsai, S-Y Chen

- 27. Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force**
A Ito, K Ino, M Hayashida, T Kobayashi, et al.
Tissue Engineering, 2005; 11(9-10):1553-1561
- 28. Enhanced cell-seeding into 3D porous scaffolds by use of magnetite nanoparticles**
K Shimizu, A Ito, H Honda
J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials, 2005; 77B(2):265-272
- 29. Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force**
A Ito, E Hibino, C Kobayashi, H Terasaki, et al.
Tissue Engineering, 2005; 11(3-4):489-496
- 30. Tissue Engineering Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force: Heterotypic Layers of Cocultured Hepatocytes and Endothelial Cells**
A Ito, Y Takizawa, H Honda, K-I Hata, et al.
Tissue Engineering, 2004; 10(5-6):833-840
- 31. Enhanced cell-seeding into 3D porous scaffolds by use of magnetite nanoparticles**
K Shimizu, A Ito, H Honda
J Biomed Mater Res Part B, 2005: Applied Biomaterials; 77B(2):265-272
- 32. Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering**
K Shimizu, A Ito, M Arinobe, Y Murase, Y Iwata, Y Narita, H Kagami, M Ueda, H Honda
J Biosci Bioeng, 2007;103(5):472-478
- 33. Effects of CD44 antibody-- or RGDS peptide--immobilized magnetic beads on cell**

proliferation and chondrogenesis of mesenchymal stem cells

S Yanada, M Ochi, N Adachi, H Nobuto, M Agung, S Kawamata

J Biomed Mater Res A, 2006; 77(4):773-784

34. In vitro and in vivo analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass

RM Day, V Maquet, AR Boccaccini, R Jerome, A Forbes

J Biomed Mater Res A, 2005 Dec 15;75(4):778-87

35. Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force

K Shimizu, A Ito, JK Lee, T Yoshida, K Miwa, H Ishiguro, Y Numaguchi, T Murohara, I Kodama, H Honda

Biotechnol Bioeng, 2007; 96(4):803-809