

**POLITECNICO DI MILANO**

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**MODIFICHE DI SUPERFICIE PER IMPIEGHI CARDIOVASCOLARI  
SU INNOVATIVA LEGA DI TITANIO TLM**

Relatore: Prof. Ing. Roberto Chiesa

Co-relatore: Dott.ssa Monica Moscatelli

Tesi di Laurea Magistrale di:  
Alessio Zanella Matr. 838046

Anno Accademico 2016-2017



# Indice

<b>Sommario</b>	I
<b>Abstract</b>	XI
<b>Capitolo 1: L'apparato cardiovascolare</b>	
1.1 Funzione e struttura macroscopica	2
1.2 Struttura microscopica	4
1.3 La circolazione coronarica	6
1.4 L'aterosclerosi	7
1.5 Coronaropatia ed infarto del miocardio	11
1.6 Soluzioni per aterosclerosi: graft ed angioplastica	12
<b>Capitolo 2: Stent</b>	
2.1 Introduzione	18
2.2 Caratteristiche	20
2.3 Stent metallici	21
2.4 Stent rivestiti	25
2.5 Stent a rilascio di farmaci e biodegradabili	27
2.5.1 Stent a rilascio di farmaci	27
2.5.2 Stent biodegradabili	29
2.6 Problematiche materiali a contatto con sangue	30
2.7 Problematiche post-impianto: restenosi	32
<b>Capitolo 3: Metalli nell'industria biomedica</b>	
3.1 Introduzione	36
3.2 Acciai inossidabili	37
3.3 Leghe di Cobalto-Cromo	40
3.4 Titanio e le sue leghe	43
3.5 Leghe di titanio $\beta$ : Titanio TLM	47

## **Capitolo 4: Metodi di modifica superficiale**

4.1 Introduzione	51
4.2 Elettrolucidatura	51
4.3 Anodic Spark Deposition (ASD)	54

## **Capitolo 5: Scopo del progetto**

## **Capitolo 6: Materiali e metodi**

6.1 Materiali	62
6.1.1 Elettropolishing	63
6.1.2 ASD	65
6.1.3 Mordenzatura a caldo	65
6.1.4 Lucidatura meccanica	66
6.2 Metodi	67
6.2.1 Metallografia	67
6.2.2 Stereomicroscopio	68
6.2.3 SEM e EDS	69
6.2.4 Profilometria	71
6.2.5 Angolo di contatto	73
6.2.6 Adesione piastrinica	75
6.2.7 Analisi statistica	75

## **Capitolo 7: Risultati**

7.1 Metallografia	77
7.2 Elettrolucidatura	78
7.3 Stereomicroscopio	80
7.4 SEM	82
7.5 EDS	84
7.6 Profilometria	85
7.7 Angolo di contatto	88
7.8 Adesione piastrinica	91

<b>Capitolo 8: Discussione</b>	93
<b>Capitolo 9: Conclusione e prospettive future</b>	99
<b>Bibliografia</b>	102

# Elenco delle figure

1.1	Rappresentazione schematica del sistema circolatorio.	3
1.2	Rappresentazione delle differenze strutturali tra arterie e vene.	4
1.3	Schema dell'organizzazione a strati dei vasi sanguigni.	5
1.4	Rappresentazione dei principali vasi della circolazione coronarica.	6
1.5	Rappresentazione della sezione di un vaso sanguigno all'avanzare della placca.	9
1.6	Esempio di graft vascolare in Dacron.	13
1.7	Rappresentazione schematica del trattamento di angioplastica con palloncino.	15
2.1	Immagine esemplificativa di un generico stent.	18
2.2	Procedura di impianto di uno stent espandibile con palloncino.	19
2.3	Riassunto delle proprietà meccaniche dei metalli impiegati nella fabbricazione di stent.	22
2.4	Schema semplificato delle due vie della cascata della coagulazione.	31
2.5	Fasi temporali del processo di restenosi. A) Trombosi; B) Infiammazione; C) Proliferazione; D) Rimodellamento.	34
3.1	Esempi di utilizzo della lega AISI 316L come stabilizzatore esterno modulare (a sinistra) e chiodo omerale (a destra).	39
3.2	Composizione chimica delle principali leghe di Co-Cr. Da <i>Annual Books of ASTM Standards</i> , Parte 46, American Society for Testing Materials, Philadelphia, 1980.	41
3.3	Diagramma di stato Co-Cr. Da C.J. Smithells, <i>Metals Reference Book</i> , Butterworths, London, 1976.	41
3.4	Principali proprietà meccaniche di leghe di cobalto per applicazione in dispositivi impiantabili (t = temprato, f = forgiato, lf = lavorato a freddo, g = in getto).	42
3.5	Esempi di applicazioni ortopediche della lega di Co-Cr: protesi di ginocchio (a sinistra) e protesi d'anca (a destra).	43
3.6	Esempi applicativi del titanio e delle sue leghe in ambito biomedico: stelo femorale (a sinistra), impianti dentali (al centro) e valvola cardiaca (a destra).	47

4.1	Schema della reazione di rilascio di ossigeno dall'anodo e d'idrogeno dal catodo.	53
4.2	Formazione di bolle di ossigeno sulla superficie del metallo e rimozione di particelle di materiale dai picchi.	53
4.3	Generica curva operativa intensità di corrente/tensione dell'elettrolucidatura.	54
4.4	Esempio dell'evoluzione tensione/tempo del processo di ASD, in condizione galvanostatica, con densità di corrente di 210 A/m <sup>2</sup> . <i>Development of antibacterial surface modification treatments for titanium to improve the osteointegration</i> , Cinzia Della Valle, Ph.D. Thesis.	55
6.1	Campione di titanio TLM (A), acciaio inossidabile (B) e lega Co-Cr (C).	62
6.2	Esempio di circuito elettrochimico utilizzato per trattamento di elettrolucidatura.	63
6.3	Schema del circuito elettrochimico utilizzato per trattamento di ASD.	65
6.4	Immagine dello stereomicroscopio utilizzato in questo lavoro di tesi.	69
6.5	Immagine del SEM utilizzato in questo lavoro di tesi.	70
6.6	Rappresentazione di una goccia di liquido a contatto con una superficie solida e delle tensioni superficiali che agiscono tra le fasi.	74
7.1	Immagini relative all'analisi metallografica del campione TQ: A)Ingrandimento 50X; B) Ingrandimento 100X; C)Ingrandimento 200X.	77
7.2	Immagini allo stereomicroscopio dei campioni di titanio TLM con diversi trattamenti: A)Non trattato; B)Trattato a 60V per 5 min; C)Trattato a 70 V per 5 min; D) Trattato a 70V per 15 min.	78
7.3	Immagini allo stereomicroscopio dei campioni di lega Co-Cr con diversi trattamenti: A)Non trattato; B)Trattato a 15V per 20 min; C)Trattato a 20 V per 3 min; D) Trattato a 20V per 10 min; E) Trattato a 10 V per 5 minuti F)Trattato a 10V per 3 minuti.	79
7.4	Immagini allo stereomicroscopio, con ingrandimento 25X, dei campioni: A)TQ; B)5; C)5ASD; D) 5ASDNa.	80
7.5	Immagini allo stereomicroscopio, con ingrandimenti 6X e 25X, dei campioni: A)Co-Cr (6X); B)Acciaio inox (6X); C)Co-Cr (25X); D) Acciaio inox (25X).	81
7.6	Immagini al SEM ad ingrandimento 100X (A e B) e 500X (C e D) per i campioni 5 (immagini a sinistra) e 15 (immagini a destra).	82
7.7	Immagini al SEM ad ingrandimento 100X (A e B), 500X (C e D) e 3000X (E ed F) per i campioni 5ASD (immagini a sinistra) e	

5ASDNa (immagini a destra).	83
7.8 Analisi EDS del campione di lega di titanio TLM sottoposto ad elettrolucidatura per 5 minuti e a successivo trattamento di ASD (5ASD).	84
7.9 Istogramma del parametro di rugosità media (Ra) dei campioni analizzati.	85
7.10 Istogramma del parametro di altezza massima del profilo (Rt) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.	86
7.11 Istogramma del parametro di curtosi (K) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.	87
7.12 Immagini della goccia depositata sui vari campioni: A) TQ; B) Na; C) 5; D) 15; E) 5ASD; F) 5ASDNa; G) Acciaio inox; H) Co-Cr.	89
7.13 Istogramma del parametro di angolo di contatto (in °) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.	90
7.14 Immagini al SEM (ad ingrandimento 10000X) del campione 5 sottoposto al trattamento di adesione piastrinica.	91
7.15 Immagini al SEM ad ingrandimento 2500X (A) e 7500X (B e C) sul campione in acciaio inox sottoposto al trattamento di adesione piastrinica.	92



# Elenco delle tabelle

4.1	Reazioni di ossidoriduzione che avvengono nella cella elettrolitica nel caso di trattamento ASD su campione in titanio con film TiO <sub>2</sub> ,	55
6.1	Riassunto dei campioni utilizzati e soggetti ad analisi con particolare riferimento al materiale di partenza, al trattamento di lucidatura e ai trattamenti successivi.	66
7.1	Riassunto dei valori Ra, Rt e K (media e deviazione standard) dei campioni analizzati.	85
7.2	Riassunto del valore di angolo di contatto statico (media e deviazione standard) dei campioni analizzati.	89

# Sommario

## 1. Introduzione

Le malattie del sistema cardiovascolare, come gli infarti, sono ad oggi tra le principali cause di mortalità nel mondo. Tra queste, una delle patologie più comuni è l'aterosclerosi coronarica, un ispessimento localizzato della parete del vaso che tende ad occludere il lume vascolare. Potenziali trattamenti per l'aterosclerosi comprendono il trattamento di bypass chirurgico, di angioplastica con palloncino (PTCA) e l'utilizzo di stent. In particolare, lo stent è definito come una struttura cilindrica flessibile a maglie che viene introdotta nel lume del vaso patologico e fatta espandere a livello dell'ostruzione applicando una sollecitazione radiale in grado di mantenere il lume vascolare aperto [8]. Oggigiorno, gli stent utilizzati per trattare l'aterosclerosi possono essere metallici, ad esempio leghe di Co-Cr o acciaio inox, a rilascio di farmaci (DES), per prevenire la restenosi (nuovo restringimento del lume vasale), o biodegradabili, cioè prodotti con materiali in grado di degradarsi all'interno del corpo umano senza causare danni. Negli ultimi anni, gli studi sui materiali metallici per stent sono indirizzati verso lo sviluppo di tecniche di modifica superficiale. Tra queste l'anodic spark deposition (ASD) permette di modificare lo strato di ossido superficiale, spesso inserendo elementi dopanti, e, in certi impieghi, è utilizzata per migliorare l'integrazione tessutale del dispositivo; infatti, questo trattamento trova già largo impiego in settori come l'ortodonzia e l'ortopedia cosicché si è pensato ad un suo utilizzo anche in altri settori, come quello cardiovascolare. Inoltre, questi processi elettrochimici appaiono particolarmente promettenti grazie alla possibilità di trattare geometrie 3D molto complesse e permettendo una modulazione molto fine e avanzata della struttura topografica, della microstruttura e degli elementi chimici della superficie. Infine sono abbastanza economici e relativamente semplici così da permettere uno scale-up industriale.

Il trattamento di ASD, potenzialmente, è in grado di diminuire le probabilità di restenosi, grazie alla nuova superficie modificata, maggiormente emocompatibile. Tuttavia, la finitura superficiale garantita da questo trattamento non è ottimale per dispositivi a contatto con il sangue e per questo si è pensato di pretrattare il materiale con l'elettrolucidatura, un trattamento che permette di eliminare le imperfezioni derivanti dalla fabbricazione degli

stent e conferisce una morfologia superficiale liscia ed uniforme, così da favorire una buona emodinamica ed evitare la formazione di trombi [55].

Lo scopo principale di questo progetto è quindi la verifica di fattibilità dell'esecuzione del trattamento di elettrolucidatura, con la definizione dei migliori parametri di processo, e del trattamento di ASD su una nuova ed innovativa lega  $\beta$  di titanio, la lega TLM. In seguito si è pensato di caratterizzare tale lega con dei test specifici per un suo futuro utilizzo in ambito biomedicale cardiovascolare, confrontando i risultati con quelli dei metalli più comunemente usati quali l'acciaio inox e la lega Co-Cr.

## **2. Materiali e metodi**

### **2.1 Campioni**

#### *Titanio TLM*

Tutti i campioni utilizzati per i trattamenti di elettrolucidatura e ASD sono in lega di titanio TLM (Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb), una lega  $\beta$  di titanio che è stata progettata e sviluppata in modo indipendente da Northwest Institute for Nonferrous Metal Research of China [61,62]. I campioni sono dei parallelepipedi caratterizzati da uno spessore di 0.3 mm e lato di base di 10 mm.

#### *Acciaio inossidabile e Cobalto-Cromo*

Tutti i campioni utilizzati come confronto sono stati ottenuti tramite punzonatura di una lastra di acciaio inossidabile AISI 316L e di Co-Cr L605. Tali campioni sono caratterizzati da una forma discoidale ( $\varnothing = 12$  mm) ed uno spessore di 0.6 mm (fig. 6.1 B). Questi campioni sono stati lucidati a specchio grazie a una prelevigatura con carte abrasive Sic (con granulometria P600 e P1200) e una lappatura con allumina, per conferire una rugosità paragonabile a quella degli stent in commercio.

Prima di ogni processo elettrochimico e di ogni tecnica di analisi, ogni campione è stato trattato con la seguente procedura: lavaggio in bagno ad ultrasuoni in Acetone (Sigma-Aldrich, 32201) per 2 minuti; lavaggio in bagno ad ultrasuoni in acqua Millipore per 2 minuti; asciugatura in stufa a 37°C per 30 minuti.

### **2.2 Elettrolucidatura**

Il trattamento di elettrolucidatura è stato effettuato con la seguente soluzione elettrolitica [64]: 1.4 l di Etanolo (Sigma-Aldrich, 02870); 0.6 l di Propanolo (Sigma-Aldrich, 33539);

120 g di Cloruro di Alluminio (Sigma-Aldrich, 206911); 500 g di Cloruro di Zinco (Sigma-Aldrich, 229997). I parametri utilizzati per il trattamento sono [64]: temperatura di 30°C; densità di corrente di 2 kA/m<sup>2</sup>; tensione massima imposta di 70 V; tempo di esposizione variabile (range 5–15 min). Come catodo sono state utilizzate diverse soluzioni, utilizzando reti cilindriche, reti piane e lastre (sempre di titanio puro grado 2) [63]. L'afferraggio dei campioni è stato realizzato sia con titanio sia con acciaio inox.

### 2.3 ASD

Il set-up sperimentale utilizzato nei trattamenti di ASD è analogo a quello creato per i trattamenti di elettrolucidatura. La soluzione elettrolitica utilizzata, contenente calcio e fosforo come elementi dopanti, precedentemente studiata e sviluppata dal Politecnico di Milano sul titanio, è stata ottenuta tramite la miscelazione dei seguenti reagenti [68]: silicato di sodio (Carlo Erba Reagenti, 373908); acetato di calcio (Fluka, 21052); idrossido di sodio (Fluka, 71690); sale beta-glicerofosfato disodico pentaidratato (Fluka, 50020). I parametri utilizzati per il trattamento ASD, facendo riferimento al lavoro di Della Valle et al. [68], sono stati: temperatura 0°C; intensità di corrente di 30 mA; tensione massima imposta di 175V.

### 2.4 Altri trattamenti

Alcuni campioni di titanio TLM hanno subito un trattamento di mordenzatura a caldo con NaOH 5M (Fluka,71690) per 2 ore alla temperatura di 60°C ed in ambiente controllato.

I campioni creati ed analizzati sono identificati con una sigla in base ai trattamenti ricevuti (tab.1).

Campione	Materiale partenza	Trattamento di lucidatura	Altri trattamenti
TQ	Lega titanio TLM	Nessun trattamento	Nessun trattamento
Na	Lega titanio TLM	Nessun trattamento	Mordenzatura
5	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5min 70 V	Nessun trattamento
15	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 15min 70 V	Nessun trattamento
5ASD	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5min 70 V	ASD 175V 30mA
5ASDNa	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5 min 70 V	ASD 175V 30mA e

			Mordenzatura
Acciaio inox	Acciaio inox	Lucidat. meccanica	Nessun trattamento
Co-Cr	Lega Co-Cr	Lucidat. meccanica	Nessun trattamento

Tabella 1 Riassunto dei campioni utilizzati e soggetti ad analisi con particolare riferimento al materiale di partenza, al trattamento di lucidatura e ai trattamenti successivi.

## 2.5 Metallografia

L'analisi metallografica è stata effettuata sul campione TQ al fine di verificarne la microstruttura e per evidenziare i costituenti della lega. Il campione è stato sezionato ed è stato inglobato in una resina a freddo, la cui superficie è stata accuratamente lucidata per renderla idonea all'immagine microscopica [71].

## 2.6 Osservazione e valutazione della morfologia dei campioni

Per quest'analisi è stato utilizzato uno stereomicroscopio con il quale sono state scattate fotografie dei campioni con fotocamera digitale Leica DFC290 integrata con software LAS (Leica Application Suite); le analisi microscopiche sono state effettuate tramite un microscopio elettronico a scansione (SEM) Stereoscan 360 (Cambridge Instruments).

Entrambe le analisi sono state effettuate sui campioni sia prima sia dopo i trattamenti di elettrolucidatura e ASD, per osservare i cambiamenti morfologici superficiali dei campioni dopo il trattamento.

## 2.7 Analisi EDS

L'analisi dello strato superficiale del campione 5ASD, al fine di verificare l'effettivo dopaggio avvenuto con ASD, è stata effettuata utilizzando l'analisi EDS, con un modello Inca Energy200 (Oxford Instruments).

## 2.8 Profilometria

In questo studio, le analisi con il profilometro sono state effettuate per avere dei valori di rugosità e per verificare l'efficacia dell'elettrolucidatura. Lo strumento utilizzato è un profilometro laser (UBM microfocus, modello 5600). I parametri presi in considerazione sono la rugosità media (Ra), l'altezza massima del profilo (Rt) e la curtosi (K).

## 2.9 Angolo di contatto statico

L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica descritta dall'angolo misurato tra l'interfaccia liquido-vapore e l'interfaccia liquido-solido in equilibrio. Questo parametro è utilizzato per quantificare la bagnabilità di una superficie solida attraverso l'equazione di Young-Laplace per la diffusione di una goccia su di un solido. In questo studio è stato valutato l'angolo di contatto statico tramite il software Drop Shape Analysis (DSA) versione 1.92.1.1 [HS] per Windows, sviluppato dalla Krüss.

## 2.10 Adesione piastrinica

La procedura di adesione piastrinica sui campioni è avvenuta prendendo spunto da una procedura già utilizzata nel lavoro di Huang et al. [72] per il medesimo procedimento su film di ossido di titanio. Dopo l'adesione piastrinica, per verificare l'avvenuta adesione e per caratterizzarne qualitativamente la forma, è stata effettuata un'analisi al SEM.

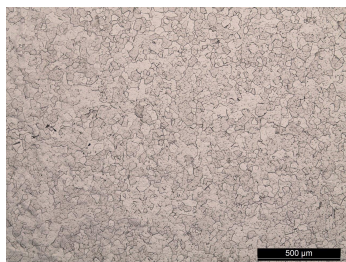
## 2.11 Analisi statistica

Per quanto riguarda i risultati di rugosità e angolo di contatto, per confrontare i diversi campioni, è stato utilizzato un test t di Student, con Office Excel.

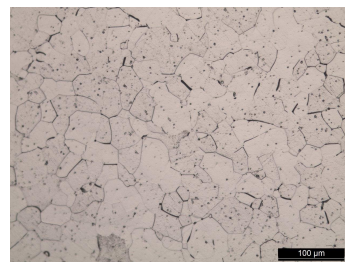
# 3. Risultati

## 3.1 Metallografia

L'analisi metallografica della lega ha evidenziato la presenza di una sola fase microstrutturale  $\beta$  con grani di dimensioni comprese nel range 50-100 (fig.1B).



A)



B)

Figura 1 Immagini relative all'analisi metallurgica del campione TQ: A) Ingrandimento 50X; B) Ingrandimento 200X.

### 3.2 Osservazione e valutazione della morfologia dei campioni

L'analisi allo stereomicroscopio (fig.2) ha confermato che l'elettrolucidatura sul titanio TLM, con parametri di processo ottimali (70V, 5 minuti, 175 rpm) ha reso la superficie lucida ed uniforme.

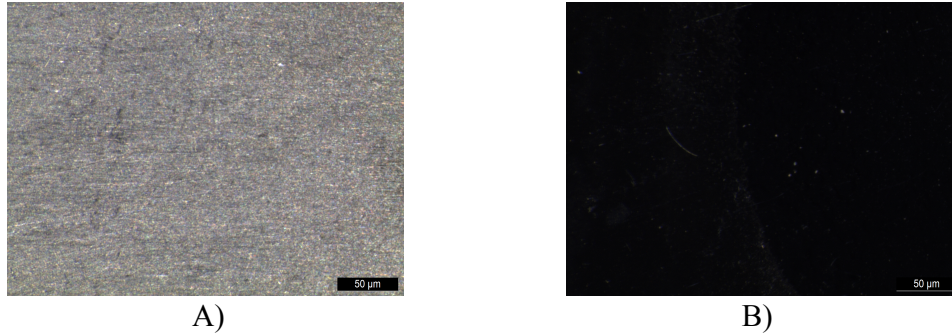


Figura 2 Immagini allo stereomicroscopio dei campioni: A) TQ; B) 5.

Nelle immagini di figura 3 scattate al SEM ad ingrandimento 500X possiamo notare come non ci siano differenze sostanziali tra il campione 5 (fig. 3A) e il campione 15 (fig. 3B), il che conferma l'efficacia del trattamento per entrambe le durate di processo.

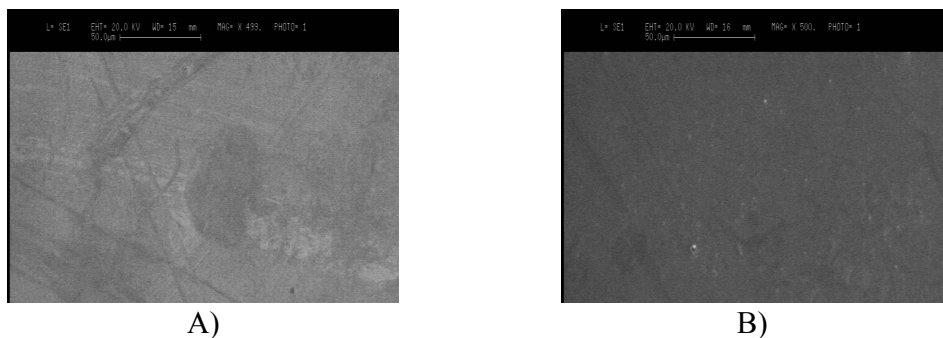


Figura 3 Immagini al SEM a 500X dei campioni: A) 5; B) 15.

L'analisi al SEM del campione ASD (fig.4A) ha evidenziato la formazione di uno strato con pori di ben distribuiti e di varie dimensioni. Differentemente, l'immagine di figura 4B del campione 5ASDNa mostra una morfologia del campione più compatta, ricca di fratture e pressoché priva di pori.

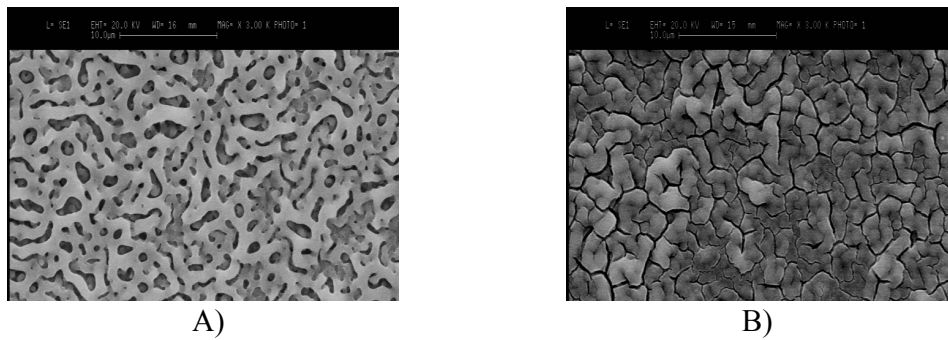


Figura 4 Immagini allo SEM ad ingrandimento 3000X dei campioni: A) 5ASD; B) 5ASDNa.

### 3.3 Analisi EDS

Nello spettro ricavato dall'analisi EDS (fig. 5) sul campione 5ASD si possono notare i picchi di Ti e Nb, elementi componenti la lega, e i picchi di Si, P e Ca, elementi depositati sulla superficie (segnati dalle frecce). Il picco di O è dovuto allo strato di ossido di titanio ( $TiO_2$ ) presente sulla superficie.

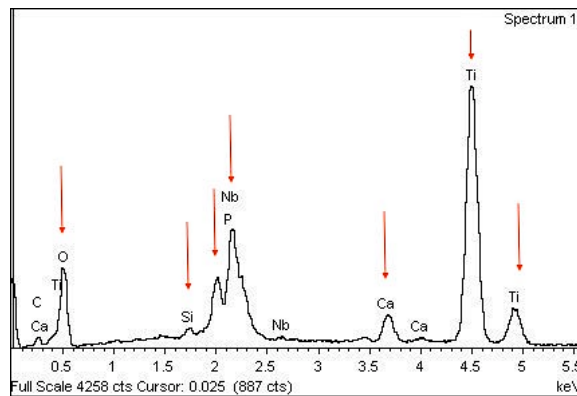


Figura 5 Analisi EDS del campione 5ASD.

### 3.4 Profilometria

Dall'analisi profilometrica si sono ricavati i valori di rugosità presenti in tabella 2; si può notare che i campioni di acciaio inox, lega Co-Cr e i campioni 5 e 15 hanno valori di rugosità bassi rispetto al campione TQ. I campioni trattati con ASD, al contrario, hanno dei valori superiori sia a quelli del campione TQ, sia a quelli trattati con elettrolucidatura.



Campione	Ra (nm)	Rt (nm)
TQ	316±24	2775±457
Na	1085±318	11363±2216
5	180±29	1453±701
15	23±12	429±181
5ASD	1116±349	11175±4165
5ASDNa	464±74	4372±533
Acciaio inox	22±4	261±111
Co-Cr	27±8	264±14

Tabella 2 Riassunto dei valori di rugosità Ra, Rt e K dei campioni analizzati.

### 3.5 Angolo di contatto statico

I valori dell'angolo di contatto statico sono presenti in tabella 3. Si può vedere che i campioni 5 e 15 hanno valori di angolo di contatto più alti rispetto al campione TQ, il che conferma l'efficacia dell'elettrolucidatura. Il campione 15 ha angolo di contatto medio significativamente non differente ( $p < 0,05$ ) dal campione Acciaio inox. I campioni ASD e 5ASDNa hanno dei valori decisamente inferiori, dovuti alla morfologia superficiale microporosa e alla presenza di gruppi OH.

Campione	Angolo di contatto statico (°)
TQ	79,1±4,0
Na	69,9±5,4
5	83,8±7,1
15	90,5±9,5
5ASD	46,0±8,2
5ASDNa	8,1±4,1
Acciaio inox	87,4±7,3
Co-Cr	104,7±4,9

Tabella 3 Riassunto dei valori di angolo di contatto dei campioni analizzati

### 3.6 Adesione piastrinica

L'analisi al SEM dei campioni sottoposti a trattamento di adesione piastrinica ha permesso di osservare qualitativamente la morfologia delle piastrine adese ai campioni. Nel campione di acciaio inox (fig. 6A, ingrandimento 7500X) possiamo notare la presenza di aggregati piastrinici con corpo centrale ed estroflessioni non perfettamente distinguibili; nel campione 5 (fig. 6B, ingrandimento 10000X) possiamo al contrario notare piastrine isolate e con corpo centrale ed estroflessioni distinguibili.

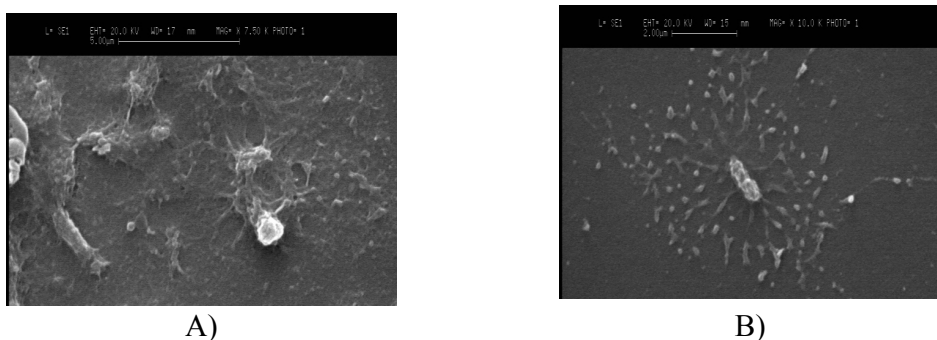


Figura 6 Immagini al SEM dei campioni con adesione piastrinica: A) Acciaio inox; B) 5;

## 4. Conclusioni

Il primo obiettivo raggiunto da questo lavoro di tesi è la definizione dei parametri di processo migliori per l'elettrolucidatura di una lega di titanio innovativa, nell'ottica di un possibile futuro impiego nel settore biomedicale cardiovascolare. I risultati delle prove sperimentali hanno permesso di individuare i parametri di trattamento che consentono di ottenere risultati ripetibili ed omogenei sia in termini di uniformità di trattamento sia di rugosità; in particolare è stato evidenziato che i parametri ottimali di trattamento sono una durata di 5 minuti, una tensione di 70V e un'agitazione a 175 rpm.

Dal confronto con i campioni di acciaio inossidabile e di Co-Cr, materiali attualmente sul mercato per la produzione di stent metallici, sono emerse le buone caratteristiche del lega  $\beta$  di titanio TLM. Questo trattamento, infatti, ha permesso l'ottenimento di una rugosità media paragonabile a quella delle leghe di confronto.

L'elettrolucidatura fornisce un metodo di finitura superficiale del titanio TLM che garantisce risultati omogenei e ripetibili, oltre a richiedere poche risorse economiche e di

tempo. L'elettrolucidatura, oltre a garantire un substrato con rugosità submicrometrica (ovvero di decine di nm) su cui compiere altri processi di modifica superficiale, permette la dissoluzione delle bave di lavorazione create durante la produzione degli stent, che spesso avviene per taglio laser, senza andare a deformarne la complessa geometria 3D. Anche per questo motivo, quindi, il trattamento di elettrolucidatura è utilizzato oggi come gold standard in alternativa ai processi di finitura meccanica che non risultano particolarmente adatti ad un utilizzo su dispositivi biomedicali impiantabili [76].

Un altro obiettivo di questa tesi è la verifica di fattibilità di un trattamento di ASD, precedentemente messo a punto per l'applicazione in ambito ortopedico, in seguito al trattamento di elettrolucidatura. Dallo studio della combinazione dei due trattamenti sono emersi dei buoni risultati; l'ASD infatti, pur aumentando la rugosità del campione con la formazione di uno strato di ossido di titanio che aumenta la bagnabilità, potrebbe portare buone risposte in termini di emocompatibilità [77,78], grazie agli elementi dopanti presenti sulla superficie neodeposta, come evidenziato da studi su materiali contenenti un film superficiale con calcio e fosforo [79], elementi depositi in questo progetto.

In conclusione, quindi, si può affermare la possibilità di un futuro utilizzo in serie dei trattamenti di elettrolucidatura ed ASD sulla lega  $\beta$  di titanio TLM.

Per approfondire lo studio di tale lega innovativa, in futuro si potrebbero effettuare test su campioni con geometria e dimensioni simili agli stent fabbricati con taglio laser.

Inoltre, per confermare l'ipotesi di buona emocompatibilità, fatte alla luce dei risultati di rugosità e bagnabilità della superficie del materiale e su risultati di studi passati [76,77,78], si potrebbero eseguire più ampie prove biologiche in vitro in modo da approfondire la valutazione dell'adesione piastrinica e valutare i fenomeni di adesione cellulare; entrambi i fenomeni, infatti, interessano l'utilizzo degli stent cardiovascolari.

Infine, per quanto riguarda lo studio relativo al trattamento di ASD in particolare, si potrebbe valutare la possibilità di modificare e ottimizzare ulteriormente il dopaggio in modo specifico per l'utilizzo di stent, con elementi che garantiscano la migliore integrazione tissutale tra impianto e pareti dei vasi.

# Abstract

## 1. Introduction

The diseases of the cardiovascular system, such as heart attacks, are one of the main causes of mortality worldwide. Among these, one of the most common diseases is coronary atherosclerosis, a localized thickening of the vessel's wall which tends to occlude the vascular lumen. Potential treatments for atherosclerosis include surgical bypass, balloon angioplasty (PTA) and the use of stents. In particular, the stent is defined as a flexible cylindrical mesh structure that is introduced into the lumen of pathological vessel in order to expand the obstruction level by applying a radial stress and able to maintain the open vascular lumen [8]. Nowadays, stents used to treat atherosclerosis can be metallic, such as alloys of Co-Cr or stainless steel, drug eluting stents (DES), to prevent restenosis (re-narrowing of the lumen), or biodegradable (ie products with materials that degrade in the body without causing damage). In recent years, studies about metallic materials for stents are directed towards the development of surface modification techniques. Among these, the anodic spark deposition (ASD) allows to modify the surface oxide layer, often by inserting doping elements, and, in certain cases, is used to improve the tissue integration of the device; in fact, this treatment is already widely used in orthodontics and orthopedics so that it was thought to use it also in the cardiovascular field. In addition, these electrochemical processes appear particularly promising thanks to the possibility to treat very complex 3D geometries and allowing a very fine and advanced modulation of the topographical structure, the microstructure and chemical elements of the surface. Finally, they are fairly inexpensive and relatively simple to allow an industrial scale-up.

The ASD treatment, potentially, is able to decrease the chances of restenosis, thanks to the new modified surface, more blood-compatible. However, the surface finish ensured by this treatment is not optimal for devices in contact with blood and for this reason it was thought to pretreat the material with electropolishing, a treatment that allows to eliminate the imperfections arising from the manufacturing of stents and give a smooth and uniform surface morphology, as well as to promote good hemodynamics and prevent the formation of thrombi [55].

Therefore, the main purpose of this project is the verification of electropolishing treatment, with the definition of the best process parameters, and the ASD treatment on a new and innovative  $\beta$  titanium alloy, the TLM alloy. At the end, it was decided to characterize this alloy with a specific test for its future use in the cardiovascular field, comparing the results with those of the most commonly used metals such as stainless steel and Co-Cr alloy.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Samples**

#### *Titanium TLM*

All the samples used for electropolishing and ASD treatments are made of titanium alloy TLM (Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb), a  $\beta$ -alloy which has been designed and developed independently by Northwest Institute for Nonferrous Metal Research of China [61,62]. The samples are parallelepipeds characterized by a thickness of 0.3 mm and a base side of 10 mm.

#### *Stainless steel and cobalt-chromium*

All samples used for comparison were obtained through punching of a sheet of stainless steel AISI 316L and Co-Cr L605. These samples are characterized by a discoidal shape ( $\varnothing=12$  mm) and a thickness of 0.6 mm (fig. 6.1 B). These samples were mechanical polished thanks to a grinding with abrasive papers Sic (with granulometry P600 and P1200) and a lapping with alumina, in order to give a roughness comparable to that of commercially available stents. Before each electrochemical process and analysis technique, each sample was treated with the following procedure: washing in an ultrasonic bath in acetone (Sigma-Aldrich, 32201) for 2 minutes; washing in an ultrasonic bath in Millipore water for 2 minutes; drying in an oven at 37 ° C for 30 minutes.

### **2.2 Electropolishing**

The electropolishing treatment was performed with the following electrolytic solution [64]: 1.4 l of ethanol (Sigma-Aldrich, 02870); 0.6 l of propanol (Sigma-Aldrich, 33539); 120 g of aluminum chloride (Sigma-Aldrich, 206911); 500 g of zinc chloride (Sigma-Aldrich, 229997). The parameters used for the treatment are [64]: temperature of 30 ° C; current

density of 2 kA / m<sup>2</sup>; maximum tension set of 70 V; variable exposure time (range 5-15 min). As cathode we have been used different solutions, using cylindrical networks, flat networks and flat sheets (always pure titanium grade 2) [63]. The gripping of the specimen was carried out both with titanium or with stainless steel.

### 2.3 ASD

The experimental set-up used in ASD treatment is similar to that created by the electrotreatments. The electrolytic solution used, containing calcium and phosphorus as doping elements, previously studied and developed by the Politecnico di Milano to promote osseointegration of titanium implants, was obtained by mixing the following reagents [68]: sodium silicate (Carlo Erba Reagents, 373,908); calcium acetate (Fluka, 21052); sodium hydroxide (Fluka, 71690); beta-glycerophosphate disodium salt pentahydrate (Fluka, 50020). The parameters used for the ASD treatment, referring to the work of Della Valle et al. [68], were: temperature 0 ° C; intensity of 30 mA current; maximum tax 175V voltage.

### 2.4 Other treatments

Some of TLM titanium samples have undergone a treatment of hot etching with 5M NaOH (Fluka, 71690) for 2 hours at a temperature of 60 ° C and in a controlled environment.

The created and analyzed samples are identified by a code according to the received treatment (Table 1).

Sample	Material	Polishing treatment	Other treatments
TQ	Titanium alloy TLM	No treatment	No treatment
Na	Titanium alloy TLM	No treatment	Etching
5	Titanium alloy TLM	Electropol. 5min 70 V	No treatment
15	Titanium alloy TLM	Electropol.. 15min 70 V	No treatment
5ASD	Titanium alloy TLM	Electropol. 5min 70 V	ASD 175V 30mA
5ASDNa	Titanium alloy TLM	Electropol. 5 min 70 V	ASD 175V 30mA and etching
Acciaio	Stainless steel	Mechanical polishing	No treatment

inox			
Co-Cr	Co-Cr alloy	Mechanical polishing	No treatment

Table 1 Summary of the samples used and subjected to analysis with particular reference to the starting material, the polishing treatment and the subsequent treatments.

## 2.5 Metallography

The metallographic analysis was performed on TQ sample in order to verify the microstructure and to highlight the elements present in the alloy. The sample was sectioned and incorporated into a hard resin, the surface of which has been carefully polished to make it suitable microscopic image [71].

## 2.6 Observation and evaluation of samples morphology

For this analysis, it was used a stereo microscope with whom the samples were taken photographs with Leica DFC290 digital camera integrated with LAS software (Leica Application Suite); microscopic analyzes were performed using a scanning electron microscope (SEM) Stereoscan 360 (Cambridge Instruments).

Both analyzes were performed on the samples before and after the electropolishing treatment and ASD treatment, to observe the surface morphological changes of the samples after the treatment.

## 2.7 EDS

The analysis of the surface layer of the 5ASD sample, in order to verify the effective dopant elements inserted with ASD, was performed using the EDS analysis, with an Inca Energy200 model (Oxford Instruments).

## 2.8 Profilometry

In this study, the analysis with the profilometer were carried out to obtain values of the roughness and to verify the effectiveness electropolishing. The instrument used is a laser profilometer (UBM microfocus, 5600). The parameters taken into consider are the average roughness (Ra), the maximum height of the profile (Rt) and kurtosis (K).

## 2.9 Static contact angle

The contact angle is a thermodynamic quantity described from the measured angle between the liquid-vapor interface and the liquid-solid interface in equilibrium. This parameter is used to quantify the wettability of a solid surface through the Young-Laplace equation for the diffusion of a droplet on a solid. In this study it was evaluated the static contact angle via the Drop Shape Analysis software (DSA) version 1.92.1.1 [HS] for Windows, developed by Krüss.

## 2.10 Platelet adhesion

The platelet adhesion procedure on the samples was carried out by taking a cue from an already used in the procedure of Huang et al. [72] to the same procedure on the titanium oxide film. After the platelet adhesion, to verify the adhesion occurred and for qualitatively characterize the shape, it has been carried out a SEM analysis

## 2.11 Statistical analysis

In order to compare the results of roughness and contact angle of different samples, a Student's t test, with Office Excel, was performed.

# 3. Results

## 3.1 Metallography

The metallographic analysis of the alloy showed the presence of a single phase  $\beta$  and a microstructure with grain size with dimension in the range 50-100  $\mu\text{m}$  (fig.1B).

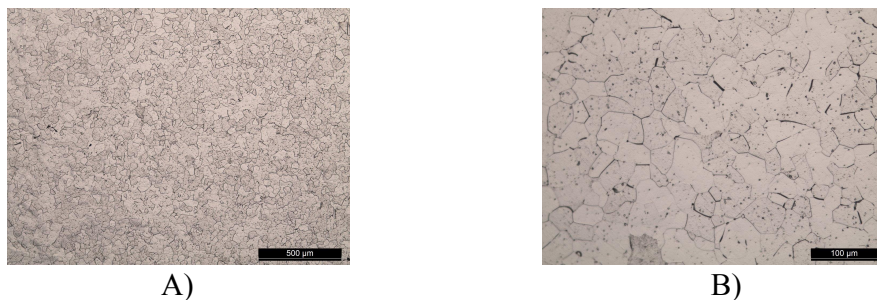


Figure 1 Images related metallurgical analysis of the sample TQ: A) 50X magnification; B) 200X magnification.



### 3.2 Observation and evaluation of morphology of the samples

The analysis with the stereomicroscope (fig.2) has confirmed that the electropolishing on TLM titanium, with optimum process parameters (70V, 5 minutes, 175 rpm) made glossy and uniform surface.

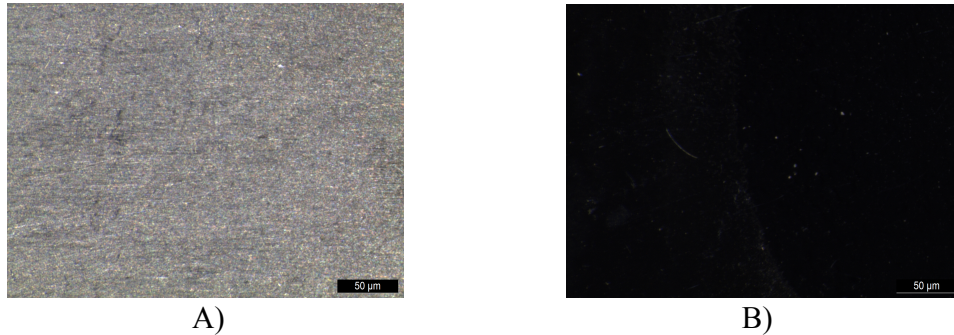


Figure 2 Images with stereomicroscope of the samples: A) TQ; B) 5.

In the Figure 3 taken with the SEM at 500X magnification, we can see that there are no substantial differences between the sample 5 (Fig. 3A) and the sample 15 (Fig. 3B), so that confirms the effectiveness of treatment for both durations of process.

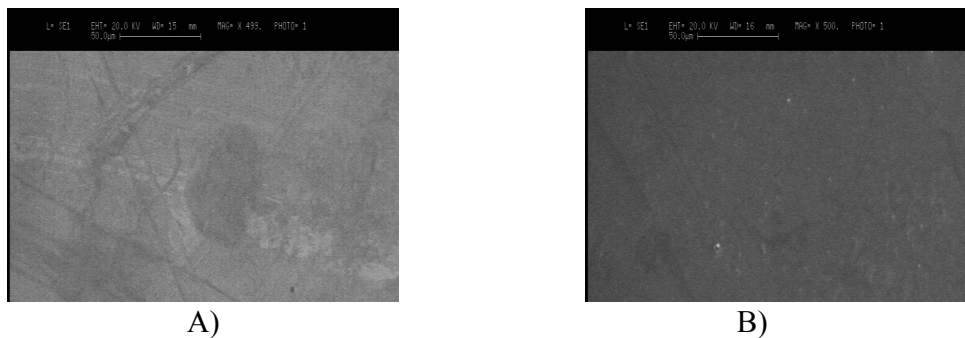


Figure 3 Images with SEM at 500X of the samples: A) 5; B) 15.

The SEM analysis of the ASD sample (4A) showed the formation of a layer with micropores evenly distributed and of various sizes. In contrast, the image of Figure 4B 5ASDNa of the sample shows a more compact morphology of the sample, rich in fractures and almost no pores.

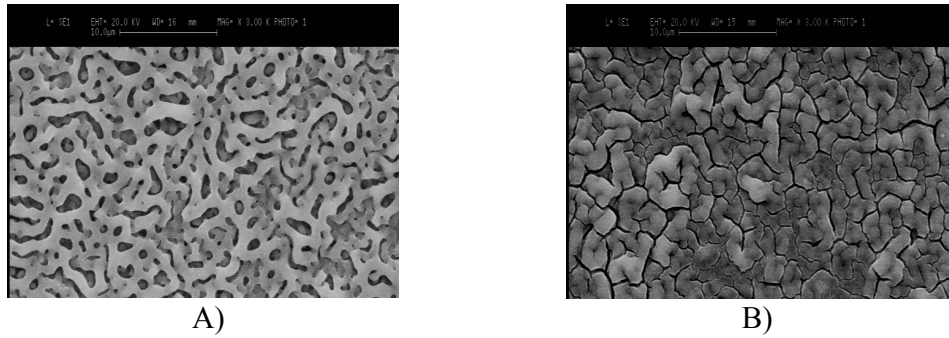


Figure 4 Images with SEM at 3000X of the samples: A) 5ASD; B) 5ASDNa.

### 3.3 EDS

In EDS spectrum analysis (Fig. 5) on sample 5ASD we can see peaks of Ti and Nb, component elements of the alloy, and peaks of Si, P and Ca, elements deposited on the surface (marked by arrows). The O peak is due to the titanium oxide layer (TiO<sub>2</sub>) present on the surface.

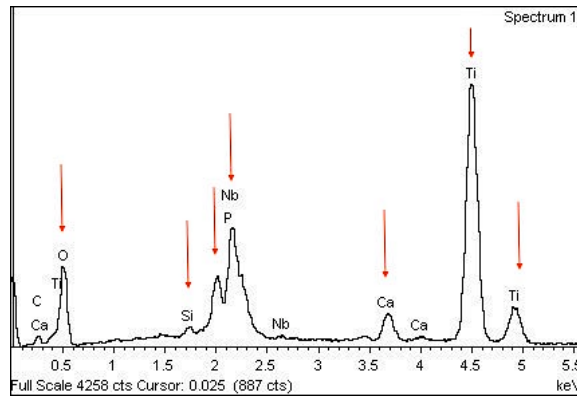


Figure 5 EDS analysis of the sample 5ASD.

### 3.4 Profilometry

From the profilometric analysis were derived the roughness values shown in Table 2; it can be seen that the samples of stainless steel, Co-Cr alloy and the samples 5:15 have low roughness values compared to TQ sample. The samples treated with ASD, on the contrary, have higher values as well as those of the TQ sample, both those treated with electropolishing.

Sample	Ra (nm)	Rt (nm)
TQ	316±24	2775±457
Na	1085±318	11363±2216
5	180±29	1453±701
15	23±12	429±181
5ASD	1116±349	11175±4165
5ASDNa	464±74	4372±533
Acciaio inox	22±4	261±111
Co-Cr	27±8	264±14

Table 2 Summary of the values of rugosity Ra, Rt e K of the analyzed samples

### 3.5 Static contact angle

The static contact angle values are shown in Table 3. It can be seen that the samples 5 and 15 angle values of higher contact with respect to the TQ sample, which confirms the effectiveness electropolishing. The sample 15 has medium angle not significantly different ( $p < 0.05$ ) from the sample of stainless steel. The ASD and 5ASDNa samples have significantly lower values, due to the microporous surface morphology and the presence of OH groups.

Sample	Static contact angle (°)
TQ	79,1±4,0
Na	69,9±5,4
5	83,8±7,1
15	90,5±9,5
5ASD	46,0±8,2
5ASDNa	8,1±4,1
Acciaio inox	87,4±7,3
Co-Cr	104,7±4,9

Table 3 Summary of the values pf static contact angle of the samples.

### 3.6 Platelet adhesion

SEM analysis of the samples subjected to platelet adhesion treatment made it possible to observe qualitatively the morphology of adherent platelets to the samples. In stainless steel sample (Fig. 6A, 7500X magnification) we can notice the presence of platelet aggregates with a central body and protrusions are not perfectly distinguishable; in the sample 5 (Fig. 6B, magnification 10000X) can on the contrary note isolated platelets and with a central body and protrusions distinguishable.

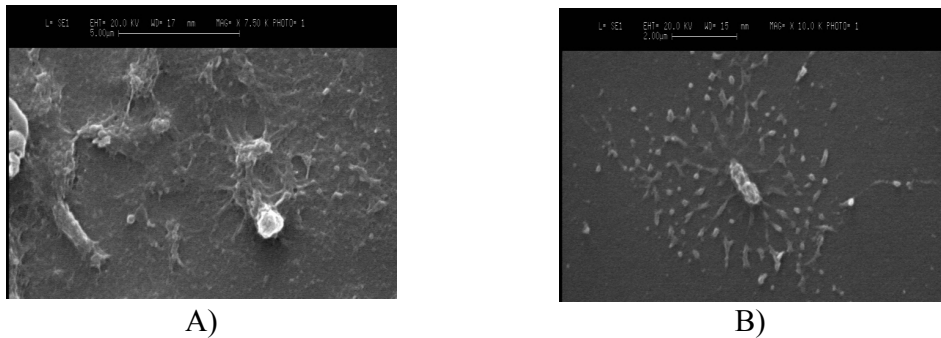


Figure 6 Images with SEM of the samples subject to platelet adhesion: A) Acciaio inox; B) 5;

## 4. Conclusions

The first objective achieved by this thesis is the definition of the best process parameters for the electropolishing of an innovative titanium alloy, with a view to a possible future use in biomedical cardiovascular field. The results of experimental tests have allowed to identify the treatment parameters which allow to obtain repeatable and consistent results in terms of uniformity of treatment and roughness; in particular it was shown that the optimal treatment parameters are a duration of 5 minutes, a voltage of 70V and agitation at 175 rpm.

From the comparison with the samples of stainless steel and Co-Cr, materials currently on the market for the production of metallic stents, have emerged the good characteristics of the alloy of  $\beta$  TLM titanium. This treatment, in fact, has allowed us to obtain an average roughness comparable to that of the comparison alloys.

Electropolishing provides a method of TLM titanium surface finish that ensures consistent, repeatable results, in addition to requiring few resources and time. The electropolishing guarantee also a substrate with submicron roughness (tens of nm) on which make other

surface modification processes and allows the dissolution of machining burrs created during the production of the stent, which is often the case for laser cutting, without going to deform the complex 3D geometry. Therefore, also for this reasons, the treatment of electropolishing is used today as the gold standard with respect to alternative mechanical finishing processes, that are not particularly suitable for use on biomedical implantable devices [76].

Another goal of this thesis is the verification of feasibility of a ASD treatment, previously developed for the application in the orthopedic field, following treatment of electropolishing. The study of the combination of the two treatments have emerged of good results; the ASD treatment, while increasing the roughness of the sample with the formation of a layer of titanium oxide which increases the wettability, may bring good responses in terms of hemocompatibility [77,78]. This fact is due to the doping elements present on the new surface, such as highlighted by studies of materials that contain a surface film with calcium and phosphorus [79].

In conclusion, it can be stated the possibility of a future use in series of electropolishing treatments and ASD on the titanium  $\beta$ -alloy TLM.

To deepen the study of such innovative alloy, in the future it may carry out tests on samples with geometry and dimensions similar to the laser cut stents.

In addition, to confirm the hypothesis of good hemocompatibility, made thanks to the results of roughness and wettability of the surface of the material and on past studies results [76,77,78], one could perform more extensive biological tests in vitro in order to deepen the platelet adhesion evaluation and evaluate cell adhesion phenomena; both phenomena, in fact, affect the use of cardiovascular stents.

Finally, with regard to the study relative to the ASD treatment in particular, you might consider the possibility of modifying and further optimize the electrolytic solution in a specific way for the use of stents, with elements which ensure the best tissue integration between the implant and the walls of the vessels.

# **Capitolo 1**

## **L'apparato cardiovascolare**

## **1.1. Funzione e struttura macroscopica**

Il corpo umano è in continua comunicazione chimica con l'ambiente esterno. Sostanze nutrienti sono assorbite attraverso l'epitelio del canale alimentare ed i gas passano attraverso l'epitelio polmonare, mentre sostanze di rifiuto sono escrete attraverso feci ed urine. Questi scambi chimici avvengono a livello di sedi o organi specializzati, grazie al fatto che tutte le parti del corpo sono tenute in comunicazione tra loro da una rete di trasporto, detta apparato cardiovascolare (ACV).

Le componenti di base di questo apparato comprendono un fluido circolante (il sangue), una pompa (il cuore) e un sistema di tubi di trasporto (il sistema circolatorio).

Il sangue è un tessuto connettivo specializzato che distribuisce nutrienti, ossigeno e ormoni a ciascuna delle cellule del corpo umano, trasporta le sostanze di rifiuto da esse prodotte (cataboliti e diossido di carbonio) e trasporta cellule specializzate che servono alla difesa dei tessuti dalle infezioni e dalle malattie; inoltre serve come stabilizzatore del pH, degli elettroliti dei fluidi interstiziali e della temperatura corporea.

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato poiché funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente a permettere la circolazione del sangue; l'organo si divide in due cavità, la sinistra dove circola sangue arterioso (sangue ricco di ossigeno) e la destra dove circola sangue venoso (privo di ossigeno e carico di anidride carbonica); ognuna di queste cavità comprende una parte superiore, chiamata atrio, e una parte inferiore, chiamato ventricolo.

Il sistema circolatorio è la rete di tubi all'interno della quale si muove il sangue; può essere suddiviso in circolazione polmonare, costituita da vasi che trasportano sangue ricco di anidride carbonica dal cuore alle superfici atte agli scambi gassosi dei polmoni e che successivamente riportano sangue ossigenato al cuore, e circolazione sistemica, dove il sangue ossigenato, assieme ai nutrienti, è trasportato dal cuore a tutti gli organi e tessuti e in seguito è riportato al cuore ricco di anidride carbonica, attraverso un percorso che coinvolge distanze più lunghe rispetto al precedente (fig. 1.1).

I vasi che compongono questo sistema sono chiamati arterie e vene, a seconda della loro ubicazione all'interno del circuito: le arterie trasportano il sangue che si allontana dal cuore, mentre le vene lo riportano allo stesso. I capillari, chiamati anche vasi di scambio, poiché in essi avviene lo scambio di gas, nutrienti e sostanze di rifiuto tra sangue e tessuti,

sono piccoli vasi a parete sottile che mettono in comunicazione le arterie e le vene più piccole in ogni distretto corporeo.

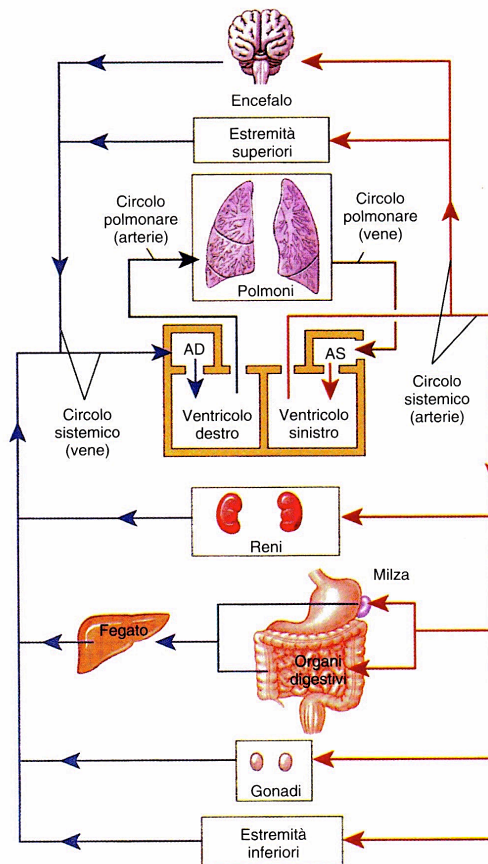


Figura 1.1 Rappresentazione schematica del sistema circolatorio.

Oltre ad una differenza di provenienza, le arterie e le vene si differenziano anche dal punto di vista strutturale e funzionale (fig. 1.2). Le arterie sono più piccole e biancastre, ma hanno una parete più spessa e sono sottoposte ad una pressione più elevata; questo perché il cuore spinge violentemente il sangue in esse per fargli raggiungere tutto l'organismo. Oltre all'elevata resistenza alla pressione esercitata dal cuore, le arterie devono possedere anche molta elasticità sia per sopportare la spinta del cuore sia per poterla redistribuire al sangue così da far continuare la circolazione dello stesso in maniera continua e non pulsatile.

Le vene, d'altro canto, hanno una parete più sottile e sono di colore rosso scuro; quando sono vuote si presentano flaccide e appiattite. Una grande differenza tra arterie e vene è che queste ultime possiedono le cosiddette "valvole a nido di rondine" che impediscono al



sangue di refluire per effetto della forza di gravità; tali valvole non sono necessarie nelle arterie, dove il reflusso è ostacolato dall'alta pressione che il cuore fornisce al sangue stesso mentre sono indispensabili nelle vene [1].

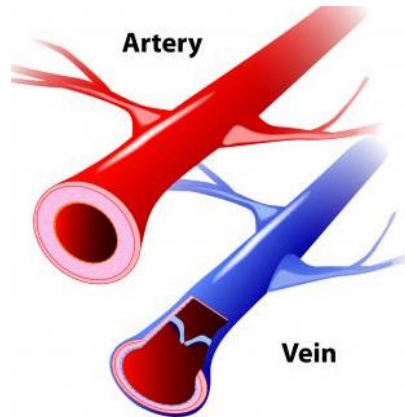


Figura 1.2 Rappresentazione delle differenze strutturali tra arterie e vene.

## 1.2. Struttura microscopica

Le pareti delle arterie e delle vene sono costituite da tre strati, ognuno dei quali contiene differenti quantità di elastina, collagene, cellule muscolari lisce vascolari e matrice extracellulare a seconda della posizione e della funzione.

La funzione delle fibre di elastina e di collagene è quella di mantenere una tensione passiva costante all'interno dei vasi così da contrastare la pressione trasmurale che agisce su di essi. D'altro canto, la funzione della muscolatura liscia vascolare è quella di fornire una tensione attiva attraverso contrazioni controllate fisiologicamente. Infine, le cellule endoteliali non influiscono sui vasi dal punto di vista meccanico ma agiscono come sensori, e mediatori, dei cambiamenti fisiologici [2].

Tornando alla struttura dei vasi, i tre strati vengono chiamati tonache: la tonaca intima è lo strato più interno, la tonaca media, quello intermedio, e la tonaca avventizia, il più esterno (fig. 1.3) [3,4].

La tonaca intima include il rivestimento endoteliale e uno strato sottostante di tessuto connettivo contenente fibre elastiche in quantità variabile. Il ruolo delle cellule endoteliali è quello di fornire una parete liscia che garantisca permeabilità all'acqua, agli elettroliti, agli zuccheri e ad altre sostanze tra i tessuti e il flusso sanguigno. Nelle arterie, il margine esterno della tonaca interna contiene uno spesso strato di fibre elastiche, detto membrana elastica interna.

La tonaca media contiene fasci concentrici di tessuto muscolare liscio, disposti circolarmente al lume del vaso, immersi in una rete di tessuto connettivo lasso. Questa particolarità strutturale permette il fenomeno della vasocostrizione e della vasodilatazione in quanto, a seguito di uno stimolo, il diametro del lume vascolare può diminuire o aumentare. Nelle arterie, tra la tonaca media e avventizia, si trova la membrana elastica esterna, un sottile strato di fibre elastiche.

La tonaca avventizia forma una guaina di tessuto connettivo intorno al vaso. Questo strato è molto spesso ed è costituito principalmente da fibre collagene con fascetti dispersi di fibre elastiche. Le fibre di questo strato generalmente si disperdono in quelle dei tessuti adiacenti fornendo così stabilità e ancoraggio ai vasi ematici.

Questa struttura a strati della parete conferisce ad arterie e vene una considerevole resistenza. Inoltre, la parete delle arterie e delle vene è troppo spessa per permettere gli scambi tra le sostanze contenute nel torrente ematico e nei tessuti circostanti, ma anche, a volte, tra il sangue e i tessuti della parete del vaso stesso. Per questo motivo, le pareti dei vasi di più grosso calibro contengono piccole arterie e vene che apportano sangue alle fibrocellule muscolari e ai fibroblasti della tonaca media e della tonaca esterna; questi vasi ematici sono detti vasa vasorum [1].

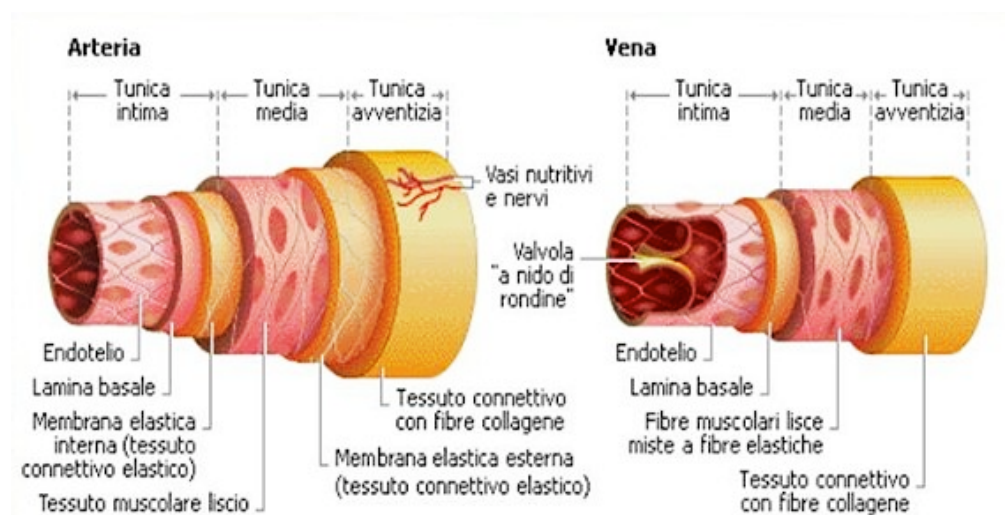


Figura 1.3 Schema dell'organizzazione a strati dei vasi sanguigni.

### 1.3. La circolazione coronarica

La circolazione coronarica fornisce il sangue alla muscolatura cardiaca che, composta da fibrocellule cardiache le quali richiedono una notevole quantità di ossigeno e nutrienti, lavora continuamente. Durante l'esercizio massimale, la richiesta di ossigeno s'innalza considerevolmente e il flusso ematico al cuore può incrementarsi fino a nove volte rispetto a ciò che si verifica in condizioni basali, quando il flusso coronarico è di circa 225ml/min. La circolazione coronarica comprende un'estesa rete di vasi (fig. 1.4): i più importanti sono l'arteria coronaria destra e sinistra che originano alla base dell'aorta ascendente, precisamente nell'ostia coronarica, posizionata nei seni destro e sinistro di Valsalva [2]. In questo tratto la pressione ematica è più elevata che in tutta la circolazione sistemica poiché questa pressione deve assicurare quel flusso di sangue continuo necessario per soddisfare le richieste metaboliche del muscolo cardiaco.

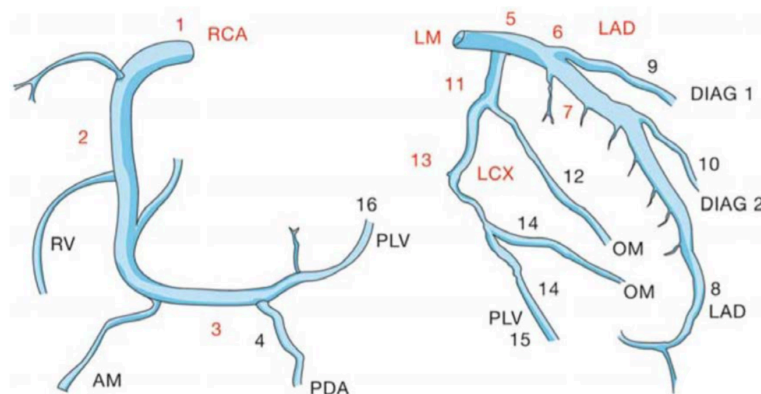


Figura 1.4 Rappresentazione dei principali vasi della circolazione coronarica.

L'arteria coronaria destra (RCA), che segue il solco coronario intorno al cuore, fornisce il sangue all'atrio destro, a parte del sistema di conduzione del cuore, inclusi i nodi senoatriali e atrioventricolari, e parte di entrambi i ventricoli. Dopo aver curvato sulla superficie anteriore del cuore, l'arteria coronaria destra dà origine ai rami atriali che vascolarizzano il sistema di conduzione del cuore. Quindi, essa si dirige sulla superficie posteriore del cuore, dando origine all'arteria discendente posteriore (PDA), che fornisce sangue al setto interventricolare e alla porzione adiacente dei ventricoli. Un piccolo ramo vicino alla base dell'arteria coronaria destra penetra la parete atriale per raggiungere il

nodo senoatriale, conosciuto anche come pacemaker cardiaco. Un'ulteriore arteriola per il nodo atrioventricolare origina dall'arteria coronaria destra, in prossimità dell'arteria interventricolare posteriore (PLV).

L'arteria coronaria sinistra (LCA) fornisce sangue al ventricolo e all'atrio sinistro e al setto interventricolare. Raggiunta la superficie anteriore del cuore, essa dà origine ad un ramo circonflesso (LCX) e ad un ramo interventricolare anteriore. Il ramo circonflesso curva a sinistra, attorno al solco coronario, mentre il ramo interventricolare anteriore, o arteria discendente anteriore (LAD), molto più grande, gira attorno al tronco polmonare e scende lungo la superficie anteriore nel solco interventricolare. Quest'arteria fornisce sangue al miocardio ventricolare anteriore ed al setto interventricolare. Questo ramo dà origine a piccole collaterali che terminano dopo il margine ottuso e non si anastomizzano [1].

#### **1.4. L'aterosclerosi**

Le malattie del sistema cardiovascolare, come gli infarti, sono tra le maggiori cause di mortalità nel mondo; basti pensare che, negli Stati Uniti, sono responsabili, ogni anno, di quasi la metà delle morti [2]. La causa di queste morti è principalmente l'arteriosclerosi, un ispessimento ed un indurimento delle pareti arteriose.

Questa malattia assume due forme diverse, la calcificazione focale e l'aterosclerosi; la calcificazione focale è la graduale degenerazione della muscolatura liscia della tonaca media con successiva deposizione di sali di calcio, processo che coinvolge solitamente le arterie degli arti. La calcificazione focale si verifica come parte del processo di invecchiamento e può svilupparsi in associazione con l'aterosclerosi. Una calcificazione rapida e grave può verificarsi anche come complicazione del diabete mellito, un disturbo endocrino [1].

Con il termine aterosclerosi si indica un ispessimento localizzato della parete del vaso, che tende così ad occludere il lume del condotto. Tale patologia può condurre a gravi complicanze, quali infarto del miocardio e ischemia, e nei casi più gravi, fino alla morte [5].

In particolare, l'aterosclerosi è la formazione di una lesione, nota come placca aterosclerotica, che ha luogo, solitamente, nelle coronarie e nelle arterie di medio e largo calibro del corpo umano specialmente nei punti dove ci sono curvature o ramificazioni.

Questo perché è ormai noto come l'anormale fluidodinamica del sangue influisca sulla nascita e crescita della placca aterosclerotica [2].

Nello sviluppo dell'aterosclerosi sono coinvolti molti fattori, tra cui un'anomala dinamica del sangue, l'ipertensione e l'elevato livello ematico di lipidi. Questa malattia è associata al danno del rivestimento endoteliale dovuto alla formazione di depositi lipidici nello spazio sub-endoteliale, specialmente nella tonaca media, tra endotelio e tessuto connettivo. L'aterosclerosi, infatti, tende a svilupparsi in individui il cui sangue contiene elevati livelli di lipidi plasmatici, in special modo colesterolo. Il colesterolo è un lipide che è assorbito dal tratto digestivo e non è solubile in soluzioni acquose; il colesterolo può però combinarsi con le lipoproteine, complessi di lipidi e proteine, così da potersi dissolvere nel plasma. Il colesterolo che si combina con le HDL (lipoproteine ad alto peso molecolare) è associato ad un alto rischio di infarto, mentre dove ci sono elevati livelli di complessi LDL (lipoproteine a basso peso molecolare) e colesterolo, sono più frequenti malattie delle arterie. L'aumento accumulato di lipidi e lipoproteine nello spazio sub-endoteliale è reso possibile grazie all'aumento locale di permeabilità. Quando le lipoproteine ricche di colesterolo restano in circolo per un certo periodo, i monociti vengono attivati e cominciano a circolare rimuovendoli dal circolo. Oltre ai monociti, si attivano anche i linfociti, causando così una risposta immunologica [6]. Successivamente i monociti si riempiono di goccioline lipidiche formando così cellule schiumose che si attaccano alle pareti endoteliali dei vasi sanguigni dove rilasciano fattori di crescita, come le citochine. Questi fattori stimolano le divisioni delle cellule muscolari lisce in prossimità della tonaca interna provocando così l'ispessimento della parete vasale grazie alla deposizione di nuova matrice fibrosa extracellulare. Altri monociti poi invadono l'area migrando tra le cellule endoteliali. Quando si verificano questi cambiamenti, i monociti, le cellule muscolari lisce e le cellule endoteliali cominciano a fagocitare lipidi [7]. Ne risulta una placca, una massa grassa di tessuto che si proietta nel lume del vaso. A questo punto la placca ha una struttura relativamente semplice e le prove indicano che il processo è reversibile se si seguono appropriate norme alimentari [1,6]. Se la condizione persiste, le cellule endoteliali si riempiono continuamente di lipidi e si creano breccie nel rivestimento endoteliale. In seguito hanno luogo anche l'aggregazione e l'adesione piastrinica che portano alla formazione di un coagulo sanguigno localizzato, che limiterà ulteriormente il flusso sanguigno attraverso l'arteria. La struttura della placca è ora relativamente complessa; la

sua crescita può essere arrestata, ma i cambiamenti strutturali sono in genere permanenti. Se queste placca cresce ulteriormente di dimensioni, può occludere l'arteria e precludere il passaggio del sangue verso i tessuti a valle. Inoltre, se la placca contiene calcio, può anche rompersi, formare coaguli (trombi), che possono essere trasportati nel sistema circolatorio e andare ad occludere piccoli vasi. Placche formate nelle arterie coronarie possono portare ad infarto del miocardio, mentre quelle formate nella circolazione cerebrale possono portare a ictus [1,2,6].

L'inizio e lo sviluppo della placca aterosclerotica è illustrato in figura 1.5 che rappresenta lo schema della sezione del vaso all'avanzare della placca.

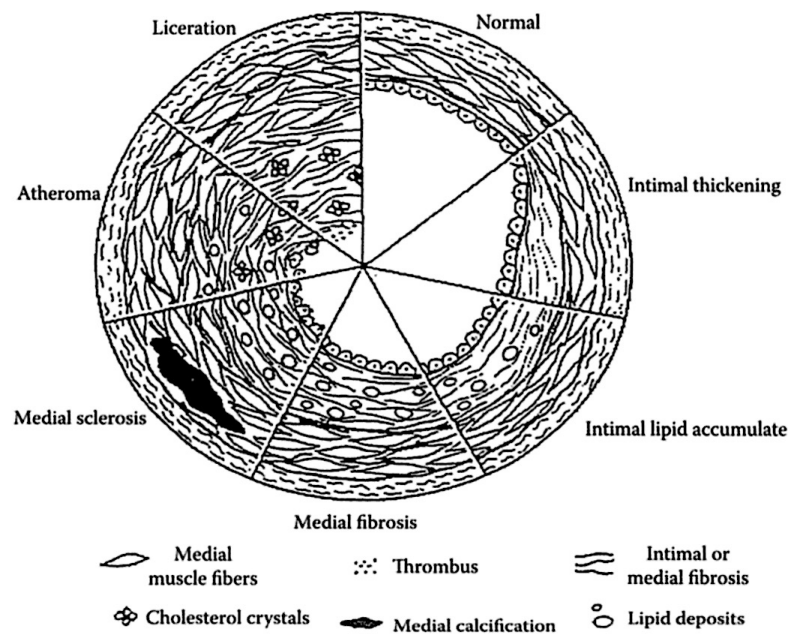


Figura 1.5 Rappresentazione della sezione di un vaso sanguigno all'avanzare della placca.

Il risultato dell'aterosclerosi è lo sviluppo di un'ostruzione, o stenosi, all'interno del vaso che può portare alla riduzione o alla completa ostruzione del flusso sanguigno. Inizialmente, la parete delle arterie si rimodella e s'ispessisce per mantenere intatta l'area di passaggio del sangue. Tuttavia, quando si raggiunge il limite del rimodellamento del vaso, la lesione inizia a protrudere verso l'interno del lume ed inizia ad occludere l'area di passaggio del flusso sanguigno. Con l'aumento dell'occlusione, la dinamica del flusso sanguigno dopo la zona di stenosi inizia a diventare complicata. Fino a quando la lesione non è ad uno stadio avanzato, non ci sono sintomi per l'organismo e ad ora non ci sono metodi per individuare lesioni che, in questo periodo, potrebbero essere fermate o ridotte

grazie all'utilizzo di farmaci o appropriate metodologie cliniche. In generale, la placca aterosclerotica spesso progredisce fino ad un livello moderato; si può così formare un coagulo di sangue in grado di fermare il flusso sanguigno e causare la morte di un tessuto o un'ischemia.

Le stenosi possono produrre cambiamenti relativamente grandi per quella che riguarda la velocità locale del flusso sanguigno; infatti, per la legge di conservazione della massa

$$V_1 A_1 = V_2 A_2 \quad \text{e quindi} \quad V_2 = V_1 \left( \frac{A_1}{A_2} \right)$$

se l'area  $A_1 > A_2$ , cioè l'area nella zona di stenosi è inferiore all'area del vaso a monte della stenosi, la velocità del fluido nella zona di stenosi sarà maggiore rispetto alla velocità a monte. Questo aumento di velocità può portare alla formazione di un *jet* nella zona di stenosi e, grazie all'effetto Bernoulli, ad una riduzione della pressione locale. Con l'aumento della stenosi, la pressione locale può diminuire e, di conseguenza, può provocare il collasso del vaso. In alcuni casi, il sangue nel *jet* può accelerare fino a velocità che danno un numero di Reynolds correlabile a un moto turbolento. Una conseguenza di questo moto è la produzione di calore e di suoni diagnosticamente utili per rilevare la presenza di arterie stenotiche.

Nelle zone a valle della stenosi, si possono creare dei vortici e il sangue può avere un rimescolamento causando inoltre un lento movimento dello stesso verso valle [2].

Individui anziani, specialmente uomini, sono la categoria più a rischio di manifestare questa patologia. Molte prove, infatti, indicano che gli estrogeni possono rallentare la formazione della placca e ciò può giustificare la minor incidenza di malattie coronariche, infarto del miocardio ed ictus tra le donne. Oltre all'anzianità e al sesso, altri fattori importanti per lo sviluppo della placca sono l'ipertensione, l'obesità, lo stress e il fumo. Gli uomini di mezza età che presentano questi fattori di rischio sono quattro volte più predisposti ad infarto del miocardio o ad arresto cardiaco rispetto ad uomini della stessa età. Prove indicano che alcune forme di aterosclerosi possono essere legate ad infezione cronica da *Chlamydia pneumoniae*, un batterio responsabile di parecchi tipi di infezioni respiratorie, incluse alcune forme di polmonite. Per evitare l'insorgere della malattia, il miglior approccio è quello di eliminare o ridurre i fattori di rischio, riducendo la quantità di

acidi grassi e colesterolo nella dieta, smettendo di fumare, controllando la pressione arteriosa, controllando il peso corporeo ed effettuando esercizio fisico [1].

## **1.5. Coronaropatia ed infarto del miocardio**

Il termine coronaropatia si riferisce ai cambiamenti degenerativi che avvengono a livello della circolazione coronarica. Le fibre muscolari necessitano di un costante apporto di ossigeno e nutrienti e ogni riduzione nella circolazione coronarica produce una corrispondente riduzione della funzione cardiaca. Questo ridotto apporto vascolare, noto come ischemia coronarica, di solito è la conseguenza di una stenosi parziale o completa delle arterie coronarie. La causa più comune è la formazione di un deposito lipidico, o placca aterosclerotica, nella parete di un vaso coronario. La placca, o il trombo associato, quindi restringe il lume e riduce l'afflusso ematico. Spasmi della muscolatura liscia del vaso possono ulteriormente ridurre il flusso ematico o interromperlo del tutto. Numerose procedure di imaging possono essere adoperate per visualizzare la circolazione coronaria, incluso l'angiografia delle coronarie. Uno dei primi sintomi della coronaropatia è spesso l'angina pectoris. Nella sua forma più comune, si sviluppa una temporanea insufficienza di O<sub>2</sub> e una ischemia durante un aumento transitorio del lavoro cardiaco. Sebbene gli individui possano sentirsi meglio in seguito ad un periodo di riposo, ogni attività insolita o semplicemente uno stress emozionale può produrre una sensazione di pressione, una costrizione toracica e un dolore che può irradiarsi dall'area sternale al braccio, al dorso e al collo. L'angina può essere spesso controllata da una combinazione di interventi farmacologici e cambiamenti nello stile di vita.

Durante un infarto miocardio (IM), o attacco cardiaco, si ha un arresto della circolazione coronarica e le cellule muscolari cardiache muoiono per carenza di O<sub>2</sub>. Il tessuto colpito da questo evento quindi degenera, creando un'area non funzionante chiamata infarto. Questi attacchi cardiaci sono molto spesso dovuti ad una malattia delle arterie coronarie. Le conseguenze di tale attacco dipendono dal sito e dalla natura del blocco circolatorio: se avviene in prossimità della base di una delle arterie coronarie il danno sarà ampio e il cuore probabilmente cesserà di battere; se il blocco coinvolge uno dei rami più piccoli, il soggetto può sopravvivere alla situazione critica, ma possono insorgere varie complicazioni, tutte spiacevoli. Nell'area danneggiata si formerà un tessuto cicatriziale, il



battito cardiaco potrà diventare irregolare e altri vasi potranno andare incontro a costrizione, creando ulteriori problemi circolatori. Gli infarti miocardici si associano più frequentemente a stenosi fisse; il formarsi di un trombo in un'area sede di una placca determina una stenosi che porta ad una condizione detta trombosi coronaria. Un vaso il cui lume è già ristretto dalla presenza di una placca può occludersi e determinare uno spasmo improvviso della muscolatura liscia dei vasi. L'individuo avverte un intenso dolore, simile ad un attacco anginoso, ma che perdura nel tempo. Circa il 25% dei pazienti con infarto miocardico muore prima di ottenere assistenza medica e il 65% delle morti per infarto avviene nell'ora successiva. Negli USA ogni anno si verificano 1,3 milioni di infarti miocardici e metà dei soggetti muore entro un anno dall'insorgenza [1].

## **1.6. Soluzioni per aterosclerosi: graft ed angioplastica**

Potenziati trattamenti per le placche aterosclerotiche comprendono il trattamento di bypass chirurgico, di angioplastica con palloncino e l'utilizzo di stent, che verrà discusso in un capitolo dedicato. In questo paragrafo parleremo delle prime due soluzioni.

### *Graft per bypass*

Il primo metodo per trattare le placche aterosclerotiche consiste nel fornire un'altra strada, il cosiddetto bypass, per il sangue, in modo da aggirare l'ostruzione e raggiungere gli organi a valle. Il bypass arterioso può essere facilmente realizzato impiantando un graft vascolare attorno all'area colpita, poiché la stenosi è un fenomeno molto localizzato che non interessa le zone immediatamente vicine. In questa procedura chirurgica il vaso malato è tagliato, il graft viene posizionato accanto al vaso nativo e in seguito cucito a monte e a valle della stenosi attraverso delle giunture che vengono chiamate anastomosi. Una volta che il graft è posizionato, il flusso sanguigno è prevalente nel bypass, con qualche residuo di flusso passante nell'arteria nativa, permettendo così di ripristinare il fisiologico apporto di sangue nei tessuti a valle della placca. Durante questa operazione si possono rivascolizzare fino a quattro arterie coronarie contemporaneamente. Questa procedura prende il nome dal numero di vasi riparati; si parlerà dunque di singolo, doppio, triplo o quadruplo by-pass coronarico. Le raccomandazioni generali riguardano il fatto che questo intervento deve essere effettuato su pazienti con patologie coronariche severe, che non è possibile trattarle con nessun altro intervento [1].

Per la produzione di graft per bypass è utilizzati una grande varietà di materiali biologici e sintetici. La scelta preferita dai chirurghi è quella di utilizzare un vaso del paziente malato poiché questo possiede la miglior compatibilità con lo stesso. In pratica, vengono usate o una vena intratoracica, l'arteria mammaria interna, o una vena della gamba, la vena safena. L'arteria mammaria interna è usata solamente in caso di bypass delle arterie coronarie ed è pressoché perfetta per quanto riguarda le dimensioni, la disponibilità e la struttura (tipica delle arterie). Dall'altro canto ha un uso limitato perché possiede una lunghezza ridotta e ne sono presenti solo due per essere umano (destra e sinistra). La vena safena è usata sia per bypass coronarici sia per bypass che coinvolgono tratti di vasi nelle basse estremità dell'organismo. La vena safena è anch'essa un ottimo graft autologo con bassa trombogenicità ma è anch'esso limitato dal punto di vista della quantità e alcune volte anche dalla qualità, nel caso di pazienti anziani. Inoltre prima dell'impianto deve andare incontro al processo di arterializzazione in quanto la vena deve adattarsi all'aumentata pressione dell'ambiente arterioso, che causa un ispessimento delle pareti vasali [2].

Per queste ragioni, sono utilizzati anche materiali sintetici come graft per bypass vascolari, tra cui il polietilentereftalato (PET), o Dacron (fig. 1.6), il politetrafluoroetilene (PTFE), o Teflon, e i poliuretani.

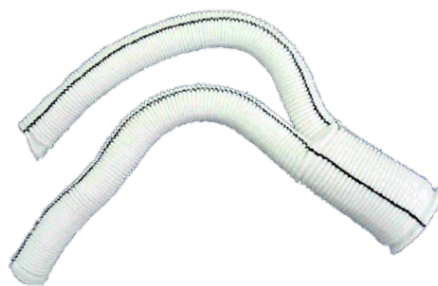


Figura 1.6 Esempio di graft vascolare in Dacron.

Il Dacron è un tessuto resistente con una vita molto lunga ed è normalmente usato come materiale per riparare vasi dal grosso calibro (aneurisma dell'aorta addominale). Per graft di minor spessore, specialmente quello per gli arti inferiori, il PTFE è il materiale maggiormente usato, grazie alle sue proprietà superficiali inerti. Uno svantaggio di questo materiale è l'elevata rigidità; pertanto è stato sviluppato un materiale più espandibile e di

più facile inserimento come il e-PTFE (PTFE espanso) che è usato tuttora come materiale chirurgico standard. Il poliuretano, dal canto suo, ha il vantaggio di essere particolarmente facile da produrre e di avere buone proprietà meccaniche per questi dispositivi ma non possiede proprietà di tromboresistenza comparabili con quelle del e-PTFE.

Un tentativo di migliorare le proprietà antitrombogeniche dei materiali sintetici e di sfruttare il grande vantaggio della loro disponibilità è stato fatto deponendo su di essi delle cellule, in modo di creare un'interfaccia biologica tra dispositivo e vaso. Questa procedura, nota come semina di cellule endoteliali, prevede il posizionamento delle cellule endoteliali vascolari, derivanti direttamente dal paziente, sulla superficie del graft prima dell'intervento in modo che il dispositivo, una volta impiantato, presenti una superficie non estranea al sangue. La tecnica in questione utilizza metodi gravitazionali, adesivi o elettrostatici, e prevede la successiva replicazione delle cellule fino alla copertura completa del graft. Una volta eseguita questa operazione, il dispositivo sintetico è pronto per essere impiantato; le cellule endoteliali prevengono la risposta da corpo estraneo e attivamente riducono il potenziale di eventi negativi come la trombosi e l'iperplasia dell'intima attraverso la produzione di agenti, come le prostaglandine [2].

### *Angioplastica*

L'angioplastica è una metodica mini-invasiva che consente di dilatare un restringimento del lume di un vaso sanguigno (stenosi) per mezzo di uno speciale catetere a palloncino.

L'angioplastica con palloncino (PTA, angioplastica transluminare percutanea) prevede l'introduzione del catetere attraverso un'arteria (generalmente l'arteria femorale) e il movimento dello stesso fino al vaso stenotico, grazie ad una guida metallica di calibro estremamente ridotto. Successivamente il palloncino viene gonfiato, comprimendo e "frantumando" la placca contro la parete del vaso, in corrispondenza della stenosi, in modo da ripristinare il normale diametro del vaso e permettere un incremento del flusso sanguigno (fig. 1.7).

I cateteri "a palloncino" sono capaci di tollerare una pressione di gonfiaggio fino a 20atm, ciò consente loro di raggiungere, una volta completamente gonfi, un diametro variabile da 2 a 4 mm in base al diametro del vaso normale.

La procedura di angioplastica è particolarmente semplice e poco costosa; infatti si esegue in anestesia locale (il paziente è quindi sveglio e cosciente) ed è particolarmente indicata in caso di piccole placche [1]. Un altro vantaggio è che praticamente qualsiasi vaso stenotico può essere sottoposto ad angioplastica: le applicazioni più comuni sono nel campo della cardiologia interventistica (angioplastica delle arterie coronarie) e nel trattamento delle lesioni stenotiche degli arti inferiori.

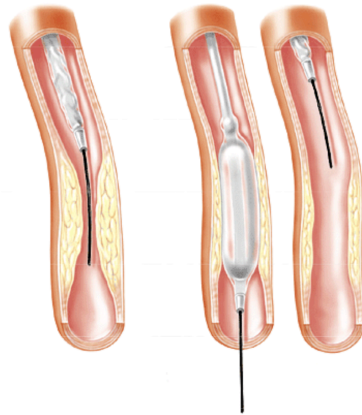


Figura 1.7 Rappresentazione schematica del trattamento di angioplastica con palloncino.

Solitamente, i risultati iniziali di questo trattamento sono molto buoni e assai meno traumatici rispetto ad un trattamento chirurgico di bypass; molti pazienti trattati recuperano velocemente ed a basso costo la funzionalità del vaso. È anche noto che molti pazienti trattati con questa procedura manifestano sintomi simili a quelli presenti in origine a meno di pochi mesi o anni dal trattamento di angioplastica, poiché i risultati del trattamento (successo tecnico e durata dello stesso) dipendono da numerosi fattori, tra i quali la sede e l'entità della stenosi sono quelli più rilevanti. Deve inoltre essere considerata la composizione della placca che determina la stenosi, infatti placche con maggiore componente di calcio sono più "resistenti" alla dilatazione.

Nel 20-30% dei casi, entro 6 mesi dalla procedura, la stenosi coronarica precedentemente dilatata tende a riformarsi (restenosi) costituendo nuovamente un ostacolo al flusso sanguigno ed impedendo così una normale irrorazione del corrispondente territorio miocardico. Quando questo accade, si può vedere come la placca aterosclerotica è ricomparsa nella zona dove preesisteva (tramite angiografia di contrasto). Questa è una conseguenza del fatto che l'angioplastica non rimuove la placca ma la appiattisce solamente sulla parete del vaso che esibisce un effetto di ritorno elastico dovuto alla natura

intrinseca dell'arteria. In questi casi la PTA può essere ripetuta con le stesse probabilità di successo e senza aumento dei rischi [2].

Esistono poi altri aspetti negativi di questo trattamento; infatti, le esigenze legate al raggiungimento di una buona dilatazione del vaso possono scontrarsi con la necessità di mantenere integra la placca esistente poiché fratturando la placca aterosclerotica si possono creare emboli. Altri problemi sono legati alla possibile sovradilatazione del vaso che può causare riuclusione immediata (per collasso della parete), dilatazione aneurismatica e restenosi per iperplasia intimale.

Nasce da qui l'esigenza di installare permanentemente una protesi endoluminare in grado di mantenere pervio il lume nel tempo, cioè di impiantare il cosiddetto stent che consente di mantenere, dopo l'angioplastica, il calibro arterioso voluto e di schiacciare i frammenti parietali lasciando un lume cilindrico esente da turbolenze [6].

## **Capitolo 2**

### **Stent**

## 2.1. Introduzione

Lo stent è definito come una struttura cilindrica flessibile a maglie (fig 2.1) che viene introdotta nel lume dell'arteria, che presenta ostruzioni parziali o totali, e viene fatta espandere a livello dell'ostruzione fino a che il suo diametro è pari a quello originario del vaso, applicando dunque una sollecitazione radiale in grado di mantenere il lume vascolare aperto [8]. Questa struttura a rete espandibile, è stata una grande rivoluzione nel trattamento della stenosi vascolare ed è utilizzata spesso in seguito al trattamento di angioplastica con palloncino (PTA) [5]. L'invenzione dello stent deriva da Charles Stent, un dentista inglese, inventore di un dispositivo per protesi dentale che è stato successivamente utilizzato per mantenere vari tessuti in posizione, permettendo così la guarigione dopo l'intervento chirurgico. La parola "stent", da quel momento, è stata utilizzata genericamente per qualsiasi dispositivo destinato a mantenere i tessuti in posizione durante la guarigione. Nel 1978, il Dr. Julio Palmaz utilizzò questa idea per risolvere il problema dell'aterosclerosi coronarica, che in quel tempo era trattata solamente attraverso l'utilizzo di bypass chirurgico. Unendo l'idea di Stent con quella del Dr. Andreas Gruntzig, ideatore di una nuova tecnica per rimuovere le placche aterosclerotiche coronariche senza la necessità di un intervento chirurgico a torace aperto ma utilizzando i cateteri a palloncino, il Dr. Palmaz creò un dispositivo in grado di risolvere il problema della stenosi arteriosa senza l'utilizzo di graft [9].

In questo modo si riduce la stenosi (ossia il restringimento del vaso sanguigno), sia in fase acuta sia a lungo termine, si ristabilisce un flusso ematico simil-fisiologico e si previene il ritorno elastico del vaso. Oltre che all'interno di arterie, gli stent vengono utilizzati in presenza di varie sindromi venose nelle quali è necessario ripristinare la pervietà del vaso (come, ad esempio, in caso di tumori che ne comprimono le pareti), oppure in distretti non strettamente circolatori, come le vie biliari.

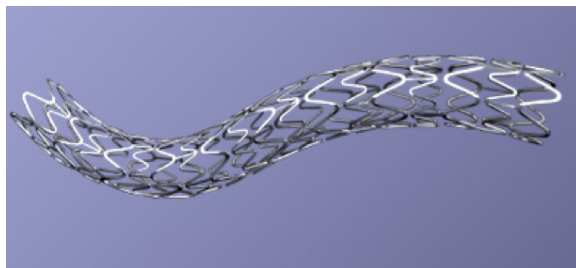


Figura 2.1 Immagine esemplificativa di un generico stent.

L'intervento di posizionamento dello stent avviene come in una qualsiasi angioplastica ed è per questo un intervento mininvasivo. Lo stent è montato sulla punta di un catetere, provvisto di un palloncino, e inserito tramite un accesso percutaneo come, per esempio, l'arteria femorale. Quando si raggiunge la zona di stenosi del vaso, il palloncino viene espanso: questa espansione porta ad una compressione della placca e al ripristino del flusso sanguigno. Mentre la placca viene compressa contro la parete del vaso, avviene l'espansione dello stent, mediante il palloncino, permettendo così al dispositivo di compiere la sua funzione di sostegno. Il palloncino viene quindi sgonfiato e rimosso lasciando lo stent in sede, affinché il vaso rimanga pervio. La procedura è riassunta, in modo esemplificato, in figura 2.2.

Al giorno d'oggi più dell' 80 % dei casi di angioplastica coronarica percutanea (PTCA) viene trattato con l'impianto di stent [10].

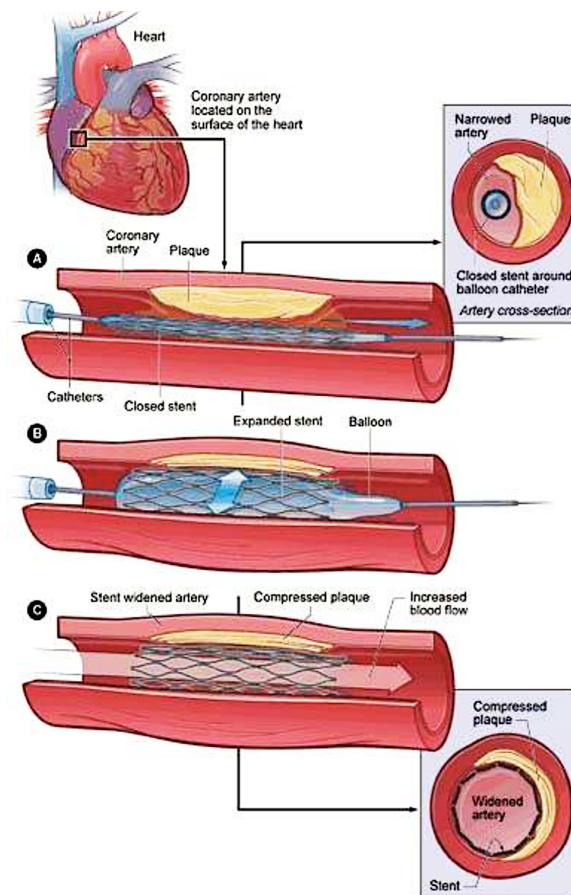


Fig. 2.2 Procedura di impianto di uno stent espandibile con palloncino.



## 2.2. Caratteristiche

Le caratteristiche meccaniche del materiale costituente il dispositivo, i parametri di forma che ne caratterizzano la geometria e l'interazione biologica vaso/stent rappresentano fattori che rivestono un ruolo determinante nelle scelte progettuali e cliniche di questi dispositivi. Tuttavia la caratteristica principale per uno stent, un dispositivo che deve essere impiantato e deve rimanere nell'organismo per diverso tempo, è sicuramente la biocompatibilità. Un materiale biocompatibile è definito come un materiale che “non deve causare irritazioni, reazioni di tipo allergico, immunitario o cancerogeno nei tessuti e non deve subire processi di degradazione dipendenti dalle interazioni con i tessuti”.

Come già accennato in precedenza, questi dispositivi devono possedere anche adeguate caratteristiche meccaniche, come un'elevata resistenza e rigidità radiale, per minimizzare il ritorno elastico dell'arteria, e flessibilità longitudinale in configurazione aperta per consentire la mobilità del vaso (necessaria per esempio quando lo stent è in prossimità di giunture degli arti). Inoltre devono possedere una compliance simile a quella del vaso, per non generare stress sulla parete durante la normale pulsazione delle arterie, e garantire un ancoraggio sicuro, fondamentale per evitare complicanze come la migrazione dello stent lungo il vaso. Inoltre, sono necessarie un'ottima flessibilità, maneggevolezza ed un elevato rapporto tra i diametri post/pre-apertura, così da rispettare l'anatomia vascolare nella fase di raggiungimento del sito d'impianto anche nel caso di ramificazioni secondarie (come nel caso di vasi iliaci).

Dal punto di vista della struttura geometrica, questi dispositivi devono essere prodotti in modo tale da produrre il minor attrito possibile al contatto con le pareti delle arterie. Per questo è necessario utilizzare materiali che, oltre alla biocompatibilità, possiedano caratteristiche tali da minimizzare la tendenza alla formazione di trombi e/o effetti di restenosi e siano resistenti alla corrosione, visto l'ambiente aggressivo al quale è sottoposto il dispositivo. Un'altra caratteristica che il materiale deve possedere è la visibilità radioscopica, per consentirne una chiara visualizzazione in fase di posizionamento.

Inoltre, è necessario possedere un sistema di rilascio facile e preciso; da questo punto di vista esistono diverse possibilità:

- stent espandibili con palloncino: hanno il vantaggio di poter essere espansi con palloncino con la massima precisione, di potersi sovradilatare, di esercitare

un'elevata forza in direzione radiale; tuttavia sono meno flessibili e non si possono riposizionare;

- stent autoespandibili meccanicamente: vengono rilasciati dal catetere quando si raggiunge il sito di stenosi; sono molto flessibili (basso modulo elastico, proprietà di superelasticità), hanno elevata resistenza a snervamento (per garantire grandi deformazioni) e si possono riposizionare (se il catetere non è stata ritirato interamente) ma sono meno precisi nel rilascio;
- stent a memoria di forma: vengono inseriti nel vaso stenotico con un catetere; possiedono la caratteristica peculiare di cambiare forma e dimensioni al variare di certi parametri, come ad esempio la temperatura.

Come ultimo requisito, ma non meno importante degli altri già citati, questi dispositivi devono possedere una certa disponibilità in termini di differenti lunghezze e diametri, così da trovare applicazione nei vasi più colpiti da aterosclerosi (coronarie e carotidi) [8,11].

Nei prossimi paragrafi, verranno discusse le caratteristiche delle principali categorie di stent coronarici:

- gli stent metallici (bare metal stents o BMS);
- gli stent rivestiti;
- gli stent a rilascio di farmaco (drug eluting stents o DES) e biodegradabili.

### **2.3. Stent metallici**

Gli stent metallici sono stati i primi stent ad essere progettati ed utilizzati per risolvere il problema dell'aterosclerosi; in particolare furono pensati per un sistema di posizionamento che prevedeva l'utilizzo di un catetere con palloncino, sistema che era già largamente sviluppato. Per tale applicazione sono quindi necessari dei dispositivi che si deformano principalmente in campo plastico, cosicché, una volta aperti, rimangano in configurazione aperta, fatta eccezione per un leggero ritorno elastico. Per questo motivo è necessario che il materiale possieda una bassa resistenza a snervamento, così da avere deformabilità plastica, ed elevato modulo elastico, per garantire un lieve ritorno elastico; la famiglia di materiali che possiede queste proprietà è quella dei metalli.

Nonostante gli stent metallici svolgano perfettamente il loro compito dal punto di vista meccanico, rispettando molte delle caratteristiche meccaniche citate in precedenza, questa tipologia di stent ha delle limitazioni dovute alla biocompatibilità; infatti, i vasi aterosclerotici trattati con stent metallici sono soggetti ad un reintervento in un arco di tempo di 3-6 mesi a causa del fenomeno che prende il nome di restenosi. Questo fenomeno è dovuto principalmente all'operazione di posizionamento dello stent che causa un trauma alla parete vascolare; come risposta del tessuto si ha la creazione di una cicatrice che porta nuovamente alla formazione della placca aterosclerotica. Un altro limite di questi stent è il necessario utilizzo di una terapia anticoagulante, che influisce direttamente sullo stile di vita del paziente, per alcune settimane successive all'impianto; questo periodo, infatti, è necessario affinché lo stent venga ricoperto dalle cellule endoteliali formando così un nuovo endotelio. Le cellule endoteliali che normalmente formano lo strato più esterno della parete delle arterie hanno, infatti, la funzione di regolare l'equilibrio tra trombogenesi (formazione di coagulo) e fibrinolisi (distruzione degli aggregati piastrinici). La terapia anticoagulante serve dunque a prevenire la formazione di coaguli vista l'assenza dell'azione regolatrice dell'endotelio.

Un ulteriore limite degli stent metallici è quello di creare degli artefatti quando soggetti alle moderne tecnologie di imaging (es. risonanza magnetica) usate per il posizionamento e la diagnosi.

Di seguito, saranno elencati i principali metalli, specialmente leghe, usati attualmente per la produzione di stent metallici.

La figura 2.3 è riassuntiva delle proprietà meccaniche dei principali metalli usati per la produzione di stent.

Mechanical properties of the metals that are used for making stents				
Metal	Elastic modulus (GPa)	Yield strength (MPa)	Tensile strength (MPa)	Density (g/cm <sup>3</sup> )
316L stainless steel (ASTM F138 and F139; annealed)	190	331	586	7.9
Tantalum (annealed)	185	138	207	16.6
Cp-Titanium (F67; 30% cold worked)	110	485	760	4.5
Nitinol	83 (Austenite phase)	195-690 (Austenite phase)	895	6.7
	28-41 (Martensite phase)	70-140 (Martensite phase)		
Cobalt-chromium (ASTM F90)	210	448-648	951-1220	9.2
Pure iron	211.4	120-150	180-210	7.87
Mg alloy (WE43)	44	162	250	1.84

Figura 2.3 Riassunto delle proprietà meccaniche dei metalli impiegati nella fabbricazione di stent.

### *Acciai inossidabili*

L'acciaio inossidabile AISI 316L è stato uno dei primi materiali utilizzati e lo è tutt'ora, visto che garantisce ottime caratteristiche meccaniche e un'eccellente resistenza alla corrosione, dovuta al basso contenuto di carbonio ( $C < 0.030$  wt%), all'aggiunta, come elementi di lega, di molibdeno (Mo) e cromo (Cr) e alla sua elettropositività [12]. Proprio questa sua caratteristica, tuttavia, ne limita la biocompatibilità e ne aumenta la trombogenicità. Gli elementi corpuscolati del sangue, come già accennato, possiedono una carica intrinseca negativa per cui i materiali elettronegativi risultano essere più emocompatibili; questo può, quindi, causare fenomeni trombotici o restenosi nei vasi dove è stato impiantato il dispositivo.

In aggiunta, la natura ferromagnetica del materiale (contenuto in Fe è circa 60-65 wt%) e la bassa densità, associate alla piccola massa dello stent ed alla struttura a maglie non continua, gli conferiscono una scarsa radiopacità con conseguenti difficoltà di visualizzazione con le attuali tecniche di imaging. La biocompatibilità, inoltre, peggiora a causa dalla presenza di nickel (circa 12 wt%), che può provocare fenomeni infiammatori e attivazione della risposta immunitaria che, a loro volta, possono indurre iperplasia intimale e restenosi [13]. Per prevenire questi fenomeni sono stati sviluppati stent a ridotto contenuto di Ni; tuttavia, è stato dimostrato che maggiori concentrazioni di Ni (circa 10-14 %wt) causano una diminuzione delle proprietà ferromagnetiche dell'acciaio inossidabile. Perciò, gli acciai inossidabili 321 e 321H con concentrazioni ottimali di nickel e carbonio (rispettivamente del 10.5% e 0.08%) garantiscono sia buona biocompatibilità sia ridotta ferromagneticità, oltre ad ottime caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione.

### *Leghe Cobalto-Cromo*

Un altro materiale utilizzato da tempo per la realizzazione di stent vascolari è la lega Co-Cr, materiale utilizzato in precedenza anche in ambito ortopedico e dentale. Allo stato dell'arte, questo materiale è considerato il "golden standard" per la realizzazione di stent coronarici, poiché possiedono una eccellente resistenza meccanica radiale, dovuta all'elevato modulo elastico. Questa caratteristica permette quindi di fabbricare stent più sottili di quelli di acciaio inox pur mantenendo un'elevata resistenza meccanica. In aggiunta, questi materiali sono radiopachi e compatibili con la risonanza magnetica [14]. Queste leghe consentono inoltre di produrre sia stent espandibili con palloncino, sia stent

autoespandibili (Wallstent), il cui comportamento elastico dipende dalle caratteristiche del materiale e dalla struttura e geometria del dispositivo.

### *Titanio*

Il titanio e le sue leghe hanno trovato applicazione in ambito biomedico, soprattutto in ambito ortopedico e dentale, per l'elevata biocompatibilità. Questa caratteristica ha portato ad un loro utilizzo anche in ambito cardiovascolare. Infatti, il titanio possiede per sua natura un film di TiO<sub>2</sub> superficiale stabile a contatto con l'organismo. Inoltre questo strato superficiale dona al titanio un'eccellente resistenza a corrosione. Inoltre, la caratteristica di bassa densità, unita alle ottime proprietà meccaniche, rende il materiale adatto ad un futuro utilizzo come materiale per stent. In passato questo materiale era utilizzato per la fabbricazione di stent; tuttavia, lo svantaggio della bassa resistenza a trazione che rende questo materiale più propenso al fallimento, durante l'espansione con palloncino, rispetto al già citato Co-Cr, non permette attualmente un suo utilizzo come materiale di "bulk". Ad oggi esistono invece stent con una struttura in lega metallica ed un film superficiale di ossido di titanio (Titan Optimax, Helix, Heliflex Ti). Tuttavia, progettando leghe di titanio con resistenza a trazione maggiore e con adeguate proprietà meccaniche, in futuro, non è da escludere un suo largo impiego come materiale d'elezione per gli stent.

### *Nitinol*

Un altro materiale, alternativo a quelli già citati in precedenza, è il nitinol (49,5-57,5%wt Ni, il rimanente Ti), un materiale caratterizzato da avere la proprietà di memoria di forma termica, oltre a buone proprietà meccaniche. La proprietà di memoria di forma è dovuta ad una trasformazione termoelastica martensitica che lo fa ritornare alla configurazione indeformata e per questo motivo è utilizzato come materiale per stent. Gli stent così formati hanno dimensioni ridotte a temperatura ambiente e si espandono autonomamente quando sono a contatto con il corpo umano, cioè a circa 37°C; per questo motivo, l'utilizzo del palloncino per l'espansione dello stent non è più richiesto. D'altro canto, la presenza del Ni in concentrazioni così elevate può portare ad infiammazioni locali e a risposta immunogenica dell'organismo, portando così possibile formazione di trombi e restenosi. Per superare questo problema, si è pensato di aumentare la concentrazione di TiO<sub>2</sub> sulla superficie così da creare un'interfaccia inerte. Dal punto di vista della visibilità con le

tecniche di imaging, come la risonanza magnetica, questo materiale non produce artefatti ed è dunque ben visibile [15,16].

#### *Altri metalli*

Gli altri materiali usati per la produzione di stent metallici sono il tantalio (Ta) e le leghe in platino (Pt). Entrambi i materiali possiedono adeguate caratteristiche di radiopacità e alta resistenza a corrosione, ma difettano dal punto di vista delle caratteristiche meccaniche. Il tantalio ha il vantaggio dell'elevata biocompatibilità ma, quando impiantato, può causare recoil elastico della parete del vaso e restenosi. Le leghe di platino, da canto loro, hanno il vantaggio di non generare reazioni allergiche o proliferazione di tessuto di neointima, ma lo svantaggio di non contrastare il recoil elastico del vaso [17,18,19].

## **2.4. Stent rivestiti**

Come è possibile leggere nel capitolo precedente, i più grandi limiti dell'utilizzo dei metalli come stent sono riconducibili alla biocompatibilità e alla emocompatibilità. Una soluzione a questo problema è quella di rivestire la superficie degli stent con materiali che, oltre a ridurre la trombogenicità e l'iperplasia neointimale, conferiscano caratteristiche biomimetiche al dispositivo, senza che si intacchino le proprietà meccaniche.

Questi materiali depositati sulla superficie permettono di ridurre l'energia superficiale e di modificare la rugosità, cercando così di migliorare l'integrazione tra parete vasale e dispositivo e di non alterare il flusso sanguigno, così da prevenire la possibilità di restenosi.

Tuttavia, anche questa tipologia presenta degli svantaggi che riguardano direttamente il rivestimento; questo, infatti, viene depositato sui dispositivi quando questi sono nella configurazione non espansa e quindi, dopo l'espansione nel luogo di stenosi, si possono generare delle cricche, fessurazioni o pori nel rivestimento, con conseguente rilascio localizzato di particelle che possono generare risposta infiammatoria.

I materiali utilizzati come rivestimento possono essere suddivisi in:

- materiali inorganici non porosi;
- materiali inorganici porosi;
- cellule endoteliali.

### *Materiali inorganici non porosi*

Tra i materiali garantiscono un'ottima resistenza alla corrosione, proprietà strettamente collegata alla biocompatibilità. Tra questi, è importante citare l'oro (Au), utilizzato per aumentare la visibilità fluoroscopica degli stent in acciaio inox. Questo perché la radiopacità dell'oro è di molto superiore (fino a sei volte) rispetto a quella dell'acciaio e quindi, con un sottile strato (anche 5 $\mu$ m) è possibile vedere questi stent con la risonanza magnetica [20]. Tuttavia, alcuni studi hanno visto un verificarsi di un aumento della proliferazione neointimale [21] e della restenosi [22].

Un altro materiale usato come rivestimento è l'ossido di iridio (IrO<sub>2</sub>), un materiale ceramico inerte, generalmente utilizzato per la sua alta biocompatibilità. Infatti, è stato dimostrato che alcuni metalli, quali il cobalto, lo zinco, il nickel, il cromo ed altre leghe, producono perossido di idrogeno durante la corrosione; questa sostanza può rivelarsi estremamente dannosa per la parete vasale e causare reazioni infiammatorie. Per questo motivo si utilizzano stent rivestiti con questo materiale, che permette la conversione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno, diminuendo così la probabilità di eventuali reazioni infiammatorie [23,24].

Il rivestimento di stent con carbonio diamond-like, materiale chimicamente inerte e con ottime caratteristiche di biocompatibilità, è un'altra possibilità. Infatti, stent ricoperti con questo materiale hanno mostrato una diminuzione di reazioni immunitarie ed infiammatorie nei pazienti [25]. I risultati di un follow-up di 6 mesi del Carbostent (Sorin biomedica, Italia) ha dimostrato che questo tipo di rivestimento può ridurre in maniera significativa la percentuale di trombosi e restenosi in pazienti ad alto rischio [26]; tuttavia questi risultati non sono coerenti con altri più recenti, fermando, per ora, uno sviluppo significativo di questo rivestimento.

### *Materiali inorganici porosi*

Un altro modo di agire sulla superficie dello stent è quello di creare una superficie microporosa in grado di promuovere una rapida endotelizzazione e prevenire effetti trombogenici. Una morfologia porosa, infatti, permette alle cellule endoteliali di migrare attraverso le fessure e quindi di creare tessuto neointimale. Tuttavia anche questa metodologia ha uno svantaggio: durante l'espansione dello stent si possono creare delle

particelle provocanti risposta infiammatoria o si può modificare la morfologia della superficie prima creata, vanificando così il trattamento.

### *Cellule endoteliali*

Quest'approccio, a differenza dei precedenti, utilizza materiale biologico come rivestimento per gli stent. Infatti, è stata verificata l'importanza delle cellule endoteliali nella prevenzione della formazione di trombi e della proliferazione neointimale [27]. Per questo motivo, le cellule endoteliali vengono seminate prima dell'impianto con lo scopo di proliferare, differenziare e rilasciare fattori di crescita in modo che, dopo l'impianto del dispositivo, vengano inibiti i fenomeni sopraccitati [28]. La principale limitazione di questa tecnica è data dalla poca aderenza delle cellule sul dispositivo che si possono distaccare durante l'espansione dello stent nell'intervento, come avveniva per i materiali organici, o a causa del flusso sanguigno [27].

## **2.5. Stent a rilascio di farmaci e biodegradabili**

Il principale limite degli stent rivestiti è che non eliminano la proliferazione neointimale, causata da fattori di crescita e citochine (stimolati a loro volta da cellule infiammatorie richiamate dal distacco di particelle del rivestimento).

### **2.7.1 Stent a rilascio di farmaco**

Lo sviluppo successivo nella tecnologia di fabbricazione degli stents, quindi, è stato quello di rivestirne la superficie con sostanze attive, realizzando così una protesi vascolare che funga da veicolo per il rilascio controllato di farmaci (Drug eluting stents, DES) mirati alla soppressione della proliferazione neointimale della parete cellulare. Deve essere sottolineato, comunque, che i danni meccanici alle pareti del vaso sono presenti anche utilizzando questo tipo di stent.

Le tecniche per il caricamento del farmaco sullo stent sono di vari tipi, ognuno con le proprie peculiarità:

- adesione del farmaco direttamente alla superficie metallica: il rilascio avviene per diffusione semplice con una velocità dipendente dai legami chimici di adesione tra farmaco e superficie;



- caricamento del farmaco nelle porosità presenti su uno stent metallico poroso: il rilascio avviene, anche in questo caso, per diffusione semplice ma è possibile caricare una quantità maggiore di farmaco; inoltre, controllando la dimensione dei pori è possibile controllare la velocità rilascio;
- farmaco incorporato in polimeri non biodegradabili: viene rilasciato tramite diffusione e la quantità di farmaco rilasciato dipende dallo spessore del rivestimento superficiale;
- farmaco incorporato in polimeri biodegradabili: rilascio tramite biodegradazione del polimero con velocità di rilascio dipendente dalla velocità di degradazione di quest'ultimo.

I farmaci maggiormente studiati per questi stent sono: l'eparina, il sirolimus ed il paclitaxel.

#### *Eparina*

È stato il primo tipo di farmaco studiato; è un glicosamminoglicano utilizzato per modificare la superficie di impianti cardiovascolari a causa delle sue proprietà anticoagulanti [29]. Esistono vari modi con i quali l'eparina può essere legata sulla superficie di un dispositivo e questi includono l'adsorbimento fisico, il legame ionico, la copolimerizzazione e l'incapsulazione in rivestimento polimerico.

#### *Sirolimus eluting stents (SES)*

Il sirolimus è un immunosoppressore collegato alla riduzione di proliferazione neointimale tramite l'inibizione di citochine e fattori di crescita [30]. Per il suo caricamento sul corpo dello stent sono stati studiati numerosi rivestimenti polimerici biodegradabili e non biodegradabili.

#### *Paclitaxel eluting stents (PES)*

Il paclitaxel è un agente anticancerogeno che riduce la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule muscolari lisce, legando le tubuline dei microtubuli e bloccando questi ultimi. Il caricamento di questo farmaco può essere fatto con o senza rivestimento polimerico.

I numerosi studi che sono stati effettuati sugli stent a rilascio di farmaci hanno evidenziato la loro efficacia nel diminuire la restenosi. Tuttavia, i risultati non sono ancora completamente soddisfacenti a causa di alcuni problemi come ad esempio la mancata dissoluzione del rivestimento polimerico dopo il rilascio del farmaco. È dunque evidente la necessità di continuare ad ottimizzare tali dispositivi in termini di cinetica di rilascio del farmaco e di presenza e tipologia del dispositivo.

### **2.7.2 Stent biodegradabili**

Un'evoluzione degli stent a rilascio di farmaci sono gli stent biodegradabili; infatti, il problema dei DES è la permanenza della struttura dello stent all'interno del vaso dopo aver terminato la sua azione farmacologica. Poiché il compito principale di uno stent è quello di fare da impalcatura al vaso patologico, questo dispositivo deve durare per 6-12 mesi così da assicurare il rimodellamento e la guarigione fisiologica della parete vasale. Per questo motivo sono stati studiati e sviluppati dei dispositivi atti a sostenere il vaso durante questo periodo di guarigione e poi degradarsi. Le caratteristiche fondamentali per la produzione di questo tipo di stent devono quindi essere: la biocompatibilità del materiale stesso, una cinetica di degradazione controllata, la capacità che i prodotti di degrado vengano eliminati con meccanismi fisiologici da parte del corpo umano e l'adeguata resistenza meccanica radiale.

Sulla base di queste caratteristiche progettuali sono stati studiati diversi materiali, sia polimerici che metallici.

Tra i materiali utilizzati, quelli polimerici presentano alcuni limiti: la bassa resistenza meccanica, che può comportare il recoil elastico della parete vasale, la lenta cinetica di riassorbimento, che può provocare infiammazioni locali, e la radiotrasparenza, che ne può compromettere la visualizzazione ed il posizionamento durante l'impianto.

La seconda classe di materiali utilizzati per gli stent biodegradabili è quella dei materiali metallici, dei quali fanno parte il ferro e il magnesio. Rispetto ai materiali polimerici, i metalli utilizzati per gli stent biodegradabili garantiscono elevate caratteristiche meccaniche (in particolare il ferro presenta proprietà meccaniche analoghe agli acciai inossidabili). Questo metallo usato come metallo puro ( $Fe > 99.8\%$ ) è altamente biocompatibile e non produce composti tossici per l'organismo [31], quindi può essere

usato in completa sicurezza per applicazioni biomedicali. La problematica di questo metallo è la lenta cinetica di degradazione (6-12 mesi) [32]. Una possibile soluzione a questo problema è quella di creare delle leghe ibride con materiali che facciano accelerare la cinetica di biorisorbimento. Come il ferro, anche il magnesio garantisce adeguate caratteristiche meccaniche. Esso, inoltre, è un materiale non trombogenico e altamente biocompatibile. La biocompatibilità è dovuta al fatto che il magnesio è largamente presente in forma di ione nel corpo umano che è in grado di eliminarlo metabolicamente tramite l'urina. La principale problematica del magnesio è l'eccessiva velocità di degradazione nel corpo umano: a pH fisiologico (pH 7,4-7,6) la permanenza del dispositivo è considerevolmente inferiore alla durata ottimale di 4-6 mesi per le applicazioni nel cardiovascolare.

## **2.6. Problematiche materiali a contatto con il sangue**

Il requisito più importante per dispositivi a contatto diretto con il sangue è l'emocompatibilità; questi dispositivi, infatti, non devono provocare l'aggregazione del sangue, cioè non devono portare alla formazione di coaguli. Inoltre, i dispositivi non devono danneggiare le proteine, gli enzimi e gli elementi corpuscolati del sangue (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine). In particolare, non si deve verificare il fenomeno dell'emolisi (rottura dei globuli rossi) e l'aggregazione piastrinica [4].

### *Emolisi*

Il flusso sanguigno può innescare la formazione di trombi o può causare danni alle cellule del sangue. Tale danno può portare alla morte dei globuli rossi con conseguente rilascio del loro contenuto; questo fenomeno viene definito emolisi. Il livello di emolisi del sangue può essere rilevato grazie ad un conteggio degli eritrociti (globuli rossi) o dell'emoglobina libera nel sangue.

Infatti, la presenza di emoglobina libera nel sangue è un risultato diretto della "lisi" degli eritrociti.

Il fenomeno di emolisi può verificarsi nel sangue anche in assenza di strutture non biologiche; infatti, un flusso sanguigno turbolento generante sforzi di taglio di 150-300 Pa può causare lesione degli eritrociti. Come si può dedurre, questo fenomeno di "lisi" dei

globuli rossi è direttamente collegato ad una fluidodinamica non fisiologica, che sia essa dovuta a restrizioni del vaso (stenosi), dilatazioni dello stesso (aneurismi) o impianto di stent [6].

### *Coagulazione*

Il primo step prevede il restringimento del vaso lesionato così da ridurre al minimo il flusso di sangue; successivamente le piastrine aderiscono alle pareti dei vasi attraverso il collagene, esposto precedentemente sulla parete vasale. Infine l'aggregazione piastrinica è ottenuta attraverso il rilascio di ADP da parte dei globuli rossi danneggiati, dalle pareti dei vasi e dalle piastrine aderenti. In figura 2.4 sono schematizzate le due vie della cascata della coagulazione, che può avere inizio sia con una lesione delle pareti dei vasi sanguigni sia con una lesione tessutale.

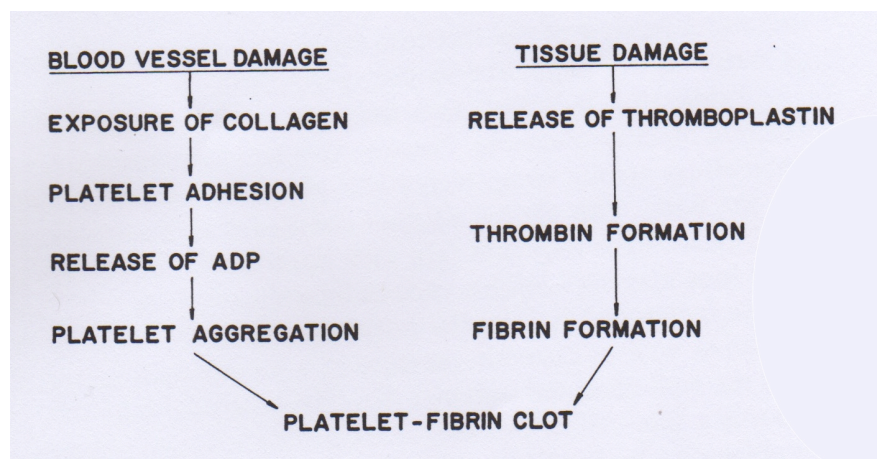


Figura 2.4 Schema semplificato delle due vie della cascata della coagulazione.

I più importanti parametri che influenzano la trombogenicità dei dispositivi sono: la morfologia, la bagnabilità e la carica elettrica della superficie. Infatti un impianto con una superficie più rugosa sarà più trombogenico, a causa della maggior estensione del dispositivo.

Nella scelta dei materiali da utilizzare negli stent bisogna anche tener conto del fatto che il sangue coagula preferenzialmente su superfici elettropositive. Questo comportamento deriva dal fatto che i componenti della parte corpuscolata del sangue, in particolar modo le piastrine, sono elettronegative (come la tonaca intima del vaso, così da avere una repulsione elettrica) e quindi non aderiscono a superfici aventi la stessa carica. Risultano

quindi essere molto più emocompatibili i metalli con superfici elettronegative, mentre quelli elettropositivi risultano più trombogenici [4,11].

Per quello che riguarda la bagnabilità della superficie, questo parametro influenza relativamente la trombogenicità; infatti angoli di contatto maggiori di 90° spesso sono collegati a superfici lievemente trombogeniche. Questo parametro non è invece correlato con il tempo di coagulazione del sangue.

Per rendere non trombogeniche le superfici dei dispositivi esistono approcci che prevedono l'utilizzo di: eparina, superfici biologiche, superfici con radicali anionici e superfici inerti [4].

## **2.7. Problematiche post-impianto: restenosi**

La restenosi è un processo mecano-biologico caratterizzato da una iperplasia della neointima causata da uno stato di sforzo sulla parete del vaso non fisiologico; generalmente questo processo è dovuto al posizionamento e all'espansione dello stent. Questa problematica, quindi, rappresenta la maggiore limitazione della procedura d'impianto di stent in un vaso stenotico, soprattutto a lungo termine. In dettaglio, la restenosi consiste nell'attivazione di meccanismi fisiologici in sequenza; dall'iniziale risposta infiammatoria si passa alla granulazione e alla produzione di matrice extracellulare nella parete del vaso.

Il processo di restenosi può essere suddiviso in 4 fasi temporali ben distinte [5]:

1. Trombosi (fig. 2.5.A): consiste nella rapida formazione di un trombo, durante la quale vi è un'attivazione, aggregazione e deposizione di piastrine; questo fenomeno è osservabile entro i primi tre giorni dall'impianto. E' una normale reazione dovuta alla presenza di materiale estraneo e al danneggiamento che lo stent provoca alla parete dell'endotelio che, se parzialmente rimosso, costituisce una zona trombogenica.
2. Infiammazione (fig 2.5.B): parallelamente alla formazione del trombo, presso la zona danneggiata, vengono reclutate le cellule infiammatorie, in particolare cellule di tipo SAM (Surface Adherent Monocytes). Tra il terzo e il settimo giorno post-impianto queste cellule lasciano il posto a cellule TIM (Tissue Infiltrating

Monocytes) che migrano dalla superficie del lume danneggiato sempre più in profondità, verso la zona subendoteliale, per sviluppare neointima.

3. Proliferazione (fig. 2.5.C): questa terza fase coincide con l'afflusso delle cellule infiammatorie dalla superficie del lume agli strati più interni. Sia le cellule muscolari lisce sia i monociti sono coinvolti nella fase proliferativa ed entrambi contribuiscono alla ricostruzione della zona lesionata. La loro proliferazione raggiunge il picco dopo sette giorni dall'impianto e continua nelle settimane successive. Il trombo viene riassorbito e sostituito con cellule neointimali. Si assiste ad un evidente ispessimento della parete del vaso definito iperplasia dell'intima.
4. Rimodellamento (fig. 2.5.D): consiste nella variazione di metabolismo, sintesi, geometria e struttura delle cellule in risposta ad alterazioni dello stato omeostatico fisiologico. Questo, dal punto di vista meccanico, si traduce in una variazione delle proprietà elastiche del tessuto; per contrastare i cambiamenti di tensione sulla parete, il tessuto si adatta alla nuova condizione in modo che sforzi e deformazioni tendano a tornare quelli fisiologici. Quest'ultima fase inizia approssimativamente dopo tre settimane ed è caratterizzata da un cambiamento dimensionale del vaso. Dapprima si assiste al ritorno elastico seguito poi dal vero rimodellamento geometrico, durante il quale l'arteria si restringe in seguito alla deposizione di collagene nell'intima e nella media.

Tutto il processo ha origine dal momento d'impianto dello stent; lo sforzo e la deformazione attorno al dispositivo provocano una lesione della parete vasale e la presenza di un materiale non biologico a contatto con sangue scatena l'aggregazione piastrinica. Questi due fenomeni, quindi, possono portare nuovamente all'occlusione del lume vasale e, di conseguenza, alla necessità di un nuovo intervento. Per limitare il rischio di restenosi sono stati introdotti stent a rilascio di farmaco (DES, dei quali parleremo in seguito), in grado di inibire il processo infiammatorio e la proliferazione di tessuto neointimale. Occorre quindi prestare particolare attenzione alla geometria ed alla cinetica di espansione degli stent, oltre alle tecniche per il loro corretto posizionamento, per prevenire così il rischio di restenosi del vaso trattato.

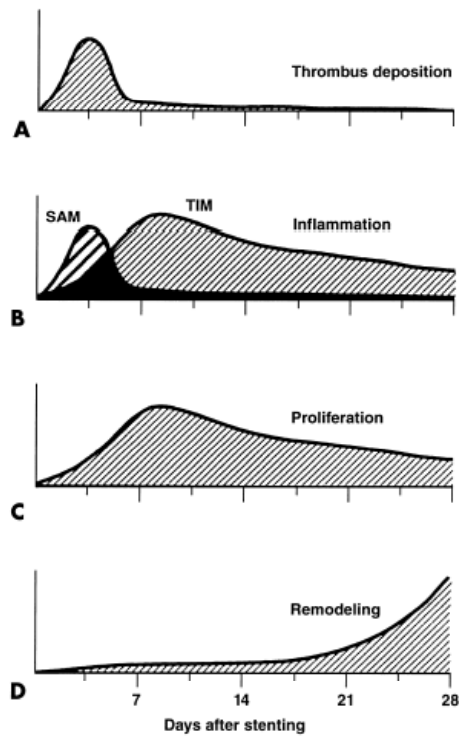


Figura 2.5 Fasi temporali del processo di restenosi. A) Trombosi; B) Infiammazione; C) Proliferazione; D) Rimodellamento.

Nel caso di applicazione di stent intravascolari, diversamente da quello che accade, per esempio, in seguito ad intervento di angioplastica, quest'ultima fase non ricopre assolutamente un ruolo predominante in quanto la struttura dello stent limita notevolmente il recupero elastico della parete del vaso e il conseguente rimodellamento. La principale causa di ristenosi è perciò da identificarsi nell'iperplasia dell'intima (fase di proliferazione).

## **Capitolo 3**

### **Metalli nell'industria biomedica**



### **3.1. Introduzione**

Un biomateriale è un materiale sintetico usato per sostituire parte di un sistema vivente o di funzionare in intimo contatto con tessuti viventi. I biomateriali sono definiti come materiali progettati per l'utilizzo a contatto o all'interno di organismi viventi allo scopo di valutare, monitorare, trattare, accrescere, sostituire o facilitare la rigenerazione di ogni tessuto, organo o funzione del corpo umano in condizioni patologiche [33,34].

Oggi, il concetto di biomateriali è stato leggermente rivisto poiché negli ultimi periodi si sta cercando di sviluppare materiali bioattivi e biomimetici così da creare una migliore interfaccia con il tessuto ospite, cercando di imitare e riprodurre la struttura gerarchica e i meccanismi naturali così da stimolare una risposta cellulare che porti a un processo di rigenerazione veloce del tessuto/organo e migliorare la durata dell'impianto [35,36].

Questi materiali, quindi, offrono una soluzione alla necessità di ripristinare la condizione fisiologica di tessuti o organi soggetti ad una condizione patologica. Negli ultimi anni, le varie attività di ricerca hanno portato ad un forte aumento del numero di applicazioni e le innovazioni terapeutiche attuali ormai consentono di ripristinare diverse capacità e funzioni del corpo umano.

Ad oggi sono disponibili numerosi tipi di biomateriali: metalli, polimeri, ceramici e compositi. Essi presentano diversi vantaggi e svantaggi e la loro scelta dipende dall'applicazione medica specifica.

Come è stato già accennato nel cap.2, tutti i biomateriali necessitano di una caratteristica fondamentale, la biocompatibilità. Questa caratteristica riguarda l'accettazione del dispositivo artificiale da parte dei tessuti circostanti e dalla totalità dell'organismo. Il materiale, oltre a non provocare risposta infiammatoria, irritazione delle strutture circostanti, incitare reazioni allergiche, causare cancro (fattori legati alla biocompatibilità), deve anche possedere adeguate proprietà meccaniche ed ottiche, appropriata densità ed essere producibile con le tecnologie attuali [4,6].

In particolare, questo capitolo tratterà dei materiali metallici utilizzati in ambito biomedico; infatti, beneficiando di una domanda crescente d'impianti ortopedici, impianti dentali e dispositivi cardiovascolari, il mercato dei metalli biomedici si sta ampliando con grande velocità.

Questo è confermato dai dati del mercato biomedico negli Stati Uniti: se nel 2013 il mercato aveva prodotto un giro d'affari di 14,52 miliardi di dollari, entro il 2022 è previsto un incremento fino a 26,54 miliardi, quindi un incremento annuo di circa il 7% [37].

I materiali metallici, oltre all'utilizzo per l'impianto di stent, dei quali abbiamo già parlato nel capitolo precedente, risultano essere utilizzati, per esempio, come placche e viti per osteointegrazione, componenti di protesi d'anca e di ginocchio, apparecchi odontoiatrici, strumentario chirurgico ed elementi di valvole cardiache.

### **3.2. Acciai inossidabili**

Gli acciai inossidabili (o acciai inox) furono inventati negli anni immediatamente precedenti alla prima guerra mondiale, sviluppati in laboratorio tra le due guerre e commercializzati in modo diffuso solo dopo la seconda guerra mondiale. Questi materiali, pur rappresentando solo il 2 % della produzione totale di acciaio, costituiscono per la loro particolare resistenza alla corrosione una delle classi di maggiore interesse tecnologico e, tra tutti i materiali metallici, sono attualmente quelli maggiormente impiegati in campo biomedico sia per il costo contenuto sia per la facilità di lavorazione.

Gli acciai inossidabili sono leghe Fe-Cr-C, o più frequentemente, leghe Fe-Ni-Cr-C caratterizzate dall'elevata resistenza ai fenomeni corrosivi (sia ad alta che a bassa temperatura) contenenti al massimo il 1,2% di carbonio. La presenza di almeno tre elementi che compongono la lega comporta delle difficoltà di rappresentazione grafica e di classificazione e per questo si tende ad utilizzare la designazione americana AISI (American Iron and Steel Institute), organizzata in tabelle raggruppate in serie; ad ogni acciaio in commercio è associato un numero contenuto nella serie corrispondente. La normativa AISI fissa per ogni acciaio la composizione chimica e le proprietà meccaniche (tutte ovviamente all'interno di un certo intervallo di variazione). E' opportuno ricordare che alle composizioni nominali corrispondono degli intervalli compositivi più o meno ampi (ad esempio  $\pm 1\%$  Cr e Ni), per cui ogni acciaio inossidabile commerciale è potenzialmente diverso da un altro.

Gli acciai inox contengono elementi volutamente aggiunti durante il processo di fabbricazione per migliorarne la qualità e che sarebbe inutile rimuovere. Il manganese e il silicio sono aggiunti durante la fabbricazione per le loro proprietà deossigenanti e

desolforanti; questo permette di eliminare lo zolfo (S) e l'ossigeno (O) dalla lega (eliminati durante la produzione).

In genere, per aumentare la resistenza alla corrosione, in fase di formazione si aumenta il contenuto di Cr e di Mo, il quale deve essere bilanciato da una certa quantità di Ni per non avere proprietà meccaniche troppo basse.

Gli acciai inossidabili possono essere divisi in quattro macrocategorie a seconda della fase microstrutturale.

- Acciai inossidabili martensitici - Sono suscettibili di tempra martensitica, anche con modeste velocità di raffreddamento. Presentano tradizionalmente tenori di carbonio superiori a 0,12%, di cromo superiori a 13% e piccoli quantitativi di nichel e molibdeno. Presentano elevati valori di durezza e sono usati per parti meccaniche soggette ad usura, per lame, stampi, sfere di cuscinetti, ugelli, iniettori, alberi e parti di pompe. Vengono impiegati in campo biomedico per strumentazione che ha bisogno di punte (aghi da sutura) o parti affilate (bisturi, seghe, scalpelli, etc).
- Acciai inossidabili ferritici - Hanno tenori di carbonio tra 0,06 e 0,16%; cromo tra 13 e 26 %; non hanno nichel. Sono suscettibili d'infragilimento per permanenze in range di temperature tra 475°C e 850°C a causa della formazione di fasi microstrutturali fragili. La facilità di permanere o di transitare nel campo di temperature critiche a seguito di trattamenti termici o di saldature, rende molto concreto il pericolo di avere un comportamento fragile e, quindi, limita l'impiego di tali acciai. Nel tentativo di sostituire il costoso nichel degli inossidabili austenitici, si è recentemente sviluppata una classe di ferritici a basso tenore di carbonio e di azoto, stabilizzati con titanio e/o niobio e con molibdeno per la resistenza al pitting. Tuttora sono presenti pochi esempi di un loro utilizzo in ambito biomedico.
- Acciai inossidabili austenitici - Sono leghe Fe-Cr-Ni con tenori particolarmente bassi di carbonio. Hanno ottima resistenza alla corrosione in molti campi applicativi, garantita dalla presenza di un tenore minimo di cromo del 12% (per effetto della formazione sulla superficie del metallo di film di ossido di cromo), duttilità e tenacità. Non essendo suscettibili a trasformazioni strutturali da trattamento termico, per ottenere buona resistenza meccanica si deve ricorrere

all'incrudimento. Hanno elevata tenacità anche a bassa temperatura e non presentano un'evidente transizione duttile/fragile. L'aumento delle caratteristiche resistenziali può essere annullato da un trattamento termico di ricottura e non è, quindi, utilizzabile per applicazioni ad alta temperatura. Gli acciai inossidabili austenitici AISI 316L, anche se contengono nichel, hanno trovato impiego in campo ortopedico (per esempio come dispositivi temporanei di osteosintesi come lo stabilizzatore esterno modulare e il chiodo omerale, figura 3.1) ed odontoiatrico, perché garantiscono una buona resistenza alla corrosione con costi decisamente inferiori a quelli dei metalli concorrenti, quali sono le leghe a base di Co e di Ti.

- Acciai inossidabili duplex - Costituiscono una nuova categoria di acciai inossidabili, nei quali è prevista la presenza contemporanea di due fasi, come la ferrite e l'austenite; hanno caratteristiche meccaniche superiori a quelle degli inossidabili monofasici (sia austenitici che ferritici) e resistenza alla corrosione molto soddisfacente, soprattutto nel campo della corrosione localizzata (pitting corrosion). I costi di produzione sono ridotti, a causa del minor impiego di nichel [38]. Anche per questa tipologia di lega non è molto utilizzata in ambito biomedicale.



Figura 3.1 Esempi di utilizzo della lega AISI 316L come stabilizzatore esterno modulare (a sinistra) e chiodo omerale (a destra).

### 3.3. Leghe di Cobalto-Cromo

Le leghe di cobalto sono state proposte per impianti chirurgici più di 60 anni fa. La lega con composizione a basso tenore di carbonio Co-26Cr-6Mo è stata introdotta nel 1980 ed utilizzata per protesi articolari. Altre versioni sono state poi utilizzate per dispositivi in ambito ortopedico, odontoiatrico, neurologico e cardiovascolare poiché queste leghe forniscono una buona combinazione di proprietà meccaniche, resistenza alla corrosione e biocompatibilità. Quando i disegni dei dispositivi sono diventati più complessi e le applicazioni cliniche sono state ampliate, si è dovuto ottimizzare la resistenza corrosione, a sfregamento, all'abrasione e all'usura modificando in primis la superficie. Queste leghe sono generalmente utilizzate in applicazioni che richiedono resistenza all'usura, resistenza alla corrosione e/o resistenza termica. Molte delle attuali leghe commerciali a base cobalto sono derivate dal lavoro di Elwood Haynes [39] che ha scoperto l'effetto di rafforzamento della resistenza alla corrosione impartita dal Cr, brevettando così le leghe CoCr nel 1907. Successivamente sono stati scoperti gli effetti benefici del molibdeno (Mo) e del tungsteno (W) e sono state brevettate leghe ternarie CoCrMo e CoCrW [40].

Ad oggi, esistono sostanzialmente quattro tipologie di leghe a base di cobalto normalmente impiegate nell'ambito delle applicazioni biomedicali, in particolare per la realizzazione di impianti chirurgici:

- lega CoCrMo (utilizzate sia come F75 sia come F76);
- lega CoCrW<sub>Ni</sub> (F90);
- lega CoNiCrMo (F562);
- lega CoNiCrMoWFe (F563).

In figura 3.2 viene riportata la composizione chimica di ciascuna delle precedenti leghe. Attualmente, solamente due delle quattro leghe vengono impiegate intensivamente per la realizzazione di impianti chirurgici, ossia la lega CoCrMo (F76) e la lega CoNiCrMo (F562). L'impiego degli altri due tipi di lega risulta abbastanza marginale.

I due principali elementi costitutivi delle leghe a base di cobalto, ossia il cobalto e il cromo, vengono usati per formare una lega solo per percentuali in peso di Cr inferiori al 35%, come è possibile osservare dal diagramma di stato Co-Cr riportato in figura 3.3.

	Cast CoCrMo (F76)		Wrought CoCrWNi (F90)		Wrought CoNiCrMo (F562)		Wrought CoNiCrMoWFe (F563)	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
Cr	27.0	30.0	19.0	21.0	19.0	21.0	18.00	22.00
Mo	5.0	7.0	—	—	9.0	10.5	3.00	4.00
Ni	—	2.5	9.0	11.0	33.0	37.0	15.00	25.00
Fe	—	0.75	—	3.0	—	1.0	4.00	6.00
C	—	0.35	0.05	0.15	—	0.025	—	0.05
Si	—	1.00	—	1.00	—	0.15	—	0.50
Mn	—	1.00	—	2.00	—	0.15	—	1.00
W	—	—	14.0	16.0	—	—	3.00	4.00
P	—	—	—	—	—	0.015	—	—
S	—	—	—	—	—	0.010	—	0.010
Ti	—	—	—	—	—	1.0	0.50	3.50
Co					Balance			

Figura 3.2 Composizione chimica delle principali leghe di Co-Cr. Da *Annual Books of ASTM Standards*, Parte 46, American Society for Testing Materials, Philadelphia, 1980.

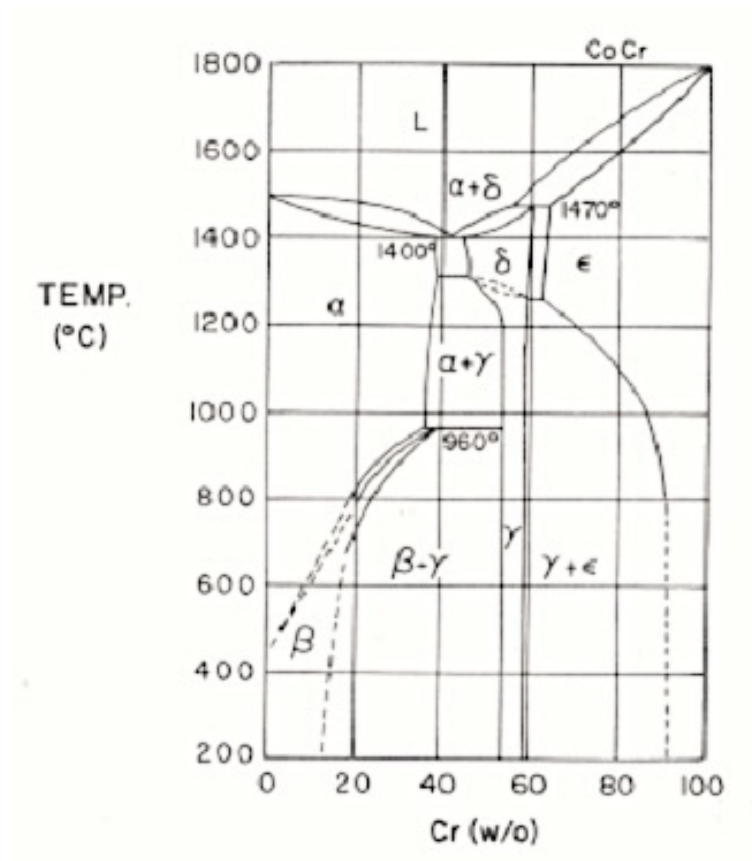


Figura 3.3 Diagramma di stato Co-Cr. Da C.J. Smithells, *Metals Reference Book*, Butterworths, London, 1976.

L'aggiunta del molibdeno permette l'ottenimento di una grana fina che a sua volta si traduce in un'elevata resistenza meccanica delle leghe anche dopo il processo di colata o di forgiatura.

La lega F562 presenta un'elevata resistenza alla corrosione, anche in presenza di cloruri e sotto sforzo. Inoltre, la lavorazione a freddo e il conseguente incrudimento possono aumentare considerevolmente la resistenza meccanica di tale lega.

Le caratteristiche di usura delle leghe CoCrMo e CoNiCrMo sono simili, ma quest'ultima presenta coefficienti di attrito superiori, sia per quanto riguarda accoppiamenti con se stessa, sia con altri materiali. Per questo motivo, l'utilizzo di tale lega è sconsigliato nel caso si debbano avere zone superficiali di contatto di protesi di giuntura. La lega F562 presenta tuttavia una maggiore resistenza a fatica rispetto alla lega F75. In figura 3.4 vengono mostrate le principali proprietà meccaniche delle leghe a base di cobalto per applicazioni in dispositivi impiantabili.

Proprietà	F75	F90	F563	F562
Densità di massa [g/cm <sup>3</sup> ]	7.8 f 9.15 lf			
Modulo di Young [GPa]	195	210	195	195
Sforzo per 0.2% di deformazione plastica [MPa]	450 g 890 f	310 t	276	240 t 1585 lf
Sforzo a rottura [MPa]	65 g 1400 f	860 t	600 t 827 lf	795 t 1790 lf
Allungamento a rottura [%]	8 g 28 g	30 t	50 t 18lf	50 t 8 lf

Figura 3.4 Principali proprietà meccaniche di leghe di cobalto per applicazione in dispositivi impiantabili (t=temprato, f=forgiato, lf=lavorato a freddo, g=in getto).

L'elevata resistenza tensile della lega CoNiCrMo, unita all'elevata resistenza a cicli di fatica, rendono tale lega particolarmente adatta alle applicazioni che richiedono elevati periodi di utilizzo senza che si verificano fratture. Questo è ad esempio il caso degli steli per la realizzazione di protesi d'anca. La manutenzione di una protesi danneggiata creerebbe infatti non pochi problemi, sia dal punto di vista della difficoltà dell'operazione

che dal punto di vista dei costi. La resistenza alla corrosione è in generale elevata per qualunque tipologia di lega.

I valori di modulo elastico per queste leghe sono compresi nell'intervallo tra i 220 e i 234 GPa (gli acciai inossidabili hanno modulo elastico solitamente compreso tra 200 e 210 GPa). Per questo, le leghe Co-Cr sono utilizzate anche in ambito dentale [41] e in particolare la lega F76 è ampiamente usata in molte applicazioni ortopediche, come la componente femorale della protesi di ginocchio, la componente omerale della protesi di spalla e le testine di protesi d'anca [40] (fig. 3.5).

Il modulo elastico di un impianto chirurgico ha un'importanza fondamentale, in quanto determina il modo in cui i carichi vengono trasferiti dall'impianto stesso alle ossa. La relazione che lega tale trasferimento dei carichi con la rigidità del materiale protesico non è tuttavia ancor ben definita.



Figura 3.5 Esempi di applicazioni ortopediche della lega di Co-Cr: protesi di ginocchio (a sinistra) e protesi d'anca (a destra).

### 3.4. Titanio e le sue leghe

I primi studi e le prime applicazioni del titanio in ambito biomedicale sono risalenti agli anni '30. Ad oggi, il titanio, nella sua forma pura o in lega, è uno dei materiali metallici più comunemente utilizzato, soprattutto nelle applicazioni cardiovascolari, ortopediche e dentali. Questo perché, oltre alle sue proprietà meccaniche (basso modulo di elasticità, elevata resistenza meccanica agli urti, all'usura ed alla fatica), presenta anche facilità di



lavorazione, elevata biocompatibilità, bassa densità (leggerezza) e buona resistenza alla corrosione, derivante dalla formazione di un film di ossido superficiale stabile *in vivo*.

Questa costituzione spontanea di uno strato di ossido stabile ed inerte porta il titanio e le sue leghe ad avere un ottimo comportamento in materia di sicurezza biologica. Inoltre, il titanio è utilizzato in ambito biomedico anche grazie alla sua specifica caratteristica di resistenza specifica (resistenza per densità), maggiore rispetto ai materiali citati in precedenza [42].

Una classificazione del titanio è stata creata dall'ASTM (American Society for Testing and Materials) e consiste in 6 gruppi detti rispettivamente: grado 1, grado 2, grado 3, grado 4, grado 5, grado 9, definiti a seconda del contenuto massimo di azoto, carbonio, idrogeno, ossigeno e ferro e dai valori minimi di alcune caratteristiche meccaniche [43].

- *Grado 1*: titanio commercialmente puro con basso contenuto di ossigeno. Questa qualità ha basso carico di rottura ed alta duttilità, adatto alla deformazione a freddo.
- *Grado 2*: titanio commercialmente puro con un più alto contenuto di ossigeno ed una maggior resistenza rispetto al grado 1. E' il titanio commercialmente puro più largamente usato e offre il miglior compromesso di resistenza, saldabilità e formabilità.
- *Grado 3*: titanio commercialmente puro con contenuto di ossigeno ancora maggiore del grado 1 e 2 (maggior resistenza e minor duttilità); inoltre è ben saldabile. Viene utilizzato per la costruzione di recipienti in pressione.
- *Grado 4*: titanio commercialmente puro con le caratteristiche di resistenza più elevate. Viene utilizzato per organi di trasmissione e nell'industria aeronautica.
- *Grado 5 (Ti6Al4V)*: è la lega di titanio più utilizzata, ha altissimo carico di rottura ma relativamente bassa duttilità. Viene utilizzata principalmente nell'industria aeronautica e aerospaziale.
- *Grado 9 (Ti3Al2.5V)*: lega di titanio con il 3% di alluminio e il 2,5% di vanadio. Ha alto carico di rottura e buona resistenza alla corrosione.

Il titanio è un materiale allotropico, cioè esiste sia in una struttura impacchettata esagonale ( $\alpha$ -Ti) fino alla temperatura di 882°C, sia in una struttura cubica a corpo centrato ( $\beta$ -Ti) sopra quella temperatura. L'aggiunta di elementi di lega al titanio permette di avere una

grande varietà di proprietà: l'aggiunta dell'alluminio innalza la temperatura di transizione, stabilizzando la fase  $\alpha$ , mentre l'aggiunta del vanadio ha l'effetto opposto (abbassamento temperatura transizione e stabilizzazione fase  $\beta$ ).

Le leghe di titanio sono per questo divise in leghe  $\alpha$ , leghe  $\alpha$ - $\beta$  e leghe  $\beta$ .

- Le leghe  $\alpha$  hanno essenzialmente una sola fase microstrutturale ( $\alpha$  appunto) e l'alto contenuto di alluminio, che spesso è presente come stabilizzante, produce un'eccellente resistenza meccanica e un'elevata resistenza a corrosione per alte temperature (300-600°C). Hanno un range di resistenza di 830-1030 MPa ma, non consentendo nessun trattamento termico, hanno un limitato impiego nei componenti particolarmente sollecitati.
- Le leghe  $\alpha$ - $\beta$  contengono una miscela di fasi  $\alpha$  e  $\beta$  a temperatura ambiente. All'interno di questa classe, una lega che contiene meno del 2-3% di fase  $\beta$ , come ad esempio il Ti-8AL-1Mo-1V, può anche essere indicata come lega "quasi- $\alpha$ " o "super- $\alpha$ ". Rientrano in questo gruppo le leghe di maggior impiego poiché sono caratterizzate da elevate caratteristiche meccaniche. Queste includono la più comune lega di titanio Ti6Al4V che possiede una resistenza meccanica pari a 900 MPa, valore che può essere incrementato di circa 200 MPa per indurimento. Questa lega vanta innumerevoli applicazioni in campo biomedico, specialmente in ambito dentale, ortopedico e come strumentazione chirurgica.
- Le leghe  $\beta$  possono essere ulteriormente suddivise in  $\beta$  e "quasi- $\beta$ ." Questa distinzione è necessaria, perché le trasformazioni di fase che si verificano, la cinetica di reazione, e il trattamento di formazione risultano diversi tra le due; infatti la lega quasi- $\beta$ , come Ti-10V-2Fe-3Al, e la lega  $\beta$ , come Ti-13V-11CR-3Al, hanno caratteristiche differenti. Quest'ultima lega, avendo solo fase  $\beta$ , può essere trattata termicamente per ottenere un materiale più resistente e per questo viene impiegata nelle costruzioni di bulloni, molle e parti fortemente sollecitate [44].

Il titanio, quindi, per le sue ottime caratteristiche, sia come materiale puro sia in lega, è largamente impiegato in molteplici settori industriali quali: l'aeronautico, l'aerospaziale, il militare, l'energetico, l'elettrochimico e quello degli articoli sportivi. Per quanto riguarda l'ambito biomedico, di seguito è presente un riassunto delle applicazioni del titanio.

### *Ortopedia*

L'utilizzo su vasta scala del titanio e delle sue leghe per applicazioni ortopediche è iniziato nei primi anni '70 in Inghilterra. A causa di un numero crescente di fratture per fatica degli steli in CoCr, nonché un riassorbimento osseo prossimale, l'interesse per la lega di titanio, più elastica (modulo elastico di circa 110GPa) e con resistenza più elevata, crebbe rapidamente nella seconda metà di quei anni. Le prove di corrosione e biocompatibilità hanno dimostrato le eccellenti caratteristiche del titanio e delle sue leghe, portando ad un loro utilizzo come materiali per endoprotesi destinate a restare permanentemente all'interno del corpo umano [45] (fig. 3.6).

La lega di titanio utilizzata all'inizio, Ti-6Al-4V, è stata ulteriormente sviluppata nel corso degli anni, e nuove leghe (con migliori proprietà), come Ti-6Al-7Nb [46], sono state prodotte. Anche nuove leghe  $\beta$  di titanio con un modulo di Young di 85 GPa e con elevate proprietà meccaniche, come resistenza statica e dinamica, sono state studiate di recente per questo impiego [47].

Un altro impiego del titanio in ambito ortopedico è quello di dispositivi per l'osteointegrazione descritto per primo dai due gruppi di ricerca di Brånemark et al. [48] e Schroeder et al. [49]. Entrambi i gruppi hanno descritto questo fenomeno biologico come "deposizione diretta di osso su una superficie implantare". Infatti, nel corso degli anni si era notato che il punto debole delle protesi ortopediche era il cemento, ossia i differenti materiali che venivano usati per "fissare" la protesi all'osso nativo. Da qui è nata l'idea di eliminare questa componente attraverso lo sfruttamento dell'osteointegrazione; la funzione dell'impianto, quindi, consiste, non solo nel mantenimento della corretta forma dell'osso sotto carico funzionale, per consentire una guarigione solida e rapida, ma anche, e soprattutto, nel ripristino della piena funzionalità dell'arto.

### *Dentale*

Il concetto di osteointegrazione ha rivoluzionato anche la pratica odontoiatrica negli anni 80, migliorando la tecnica implantare orale così da migliorare la capacità di masticazione di pazienti edentuli o parzialmente dentati, con tutte le relative implicazioni psicologiche. Inoltre, sfruttando questo concetto, è stato possibile progettare dispositivi in grado di sostituire i denti mancanti senza sacrificio osseo, come invece accadeva nel caso di protesi

fisse convenzionali. Oggi, il titanio puro commerciale (CP) è diventato il materiale di elezione in implantologia dentale [42].

### *Cardiovascolare*

Grazie alle sue proprietà, il titanio e le sue leghe hanno trovato numerose applicazioni anche in medicina cardiovascolare. Alcuni vantaggi del titanio in queste applicazioni sono l'elevata resistenza, la scarsa inerzia e la non magneticità. Infatti questo metallo produce pochi artefatti quando sottoposto alla risonanza magnetica (MR), una modalità diagnostica sempre più usata. Uno svantaggio è che non è sufficientemente radio-opaco in caso di componenti molto sottili.

Alcune applicazioni cardiovascolari del titanio sono: la sostituzione di valvole cardiache (fig. 3.6) e l'utilizzo in parti di pacemaker. Il titanio è stato utilizzato anche per costruire parti di cuori artificiali e nei dispositivi di assistenza alla circolazione. Inoltre, a partire da fine anni '80, si è visto un crescente utilizzo della lega a memoria di forma titanio-nichel (Nitinol) per la produzione di stent [42].



Figura 3.6 Esempi applicativi del titanio e delle sue leghe in ambito biomedico: stelo femorale (a sinistra), impianti dentali (al centro) e valvola cardiaca (a destra).

### **3.5. Leghe di titanio $\beta$ : Titanio TLM**

Negli ultimi decenni, le leghe  $\beta$  di titanio (contenenti Nb, Zr, Ta, Mo e Sn) hanno suscitato notevole interesse nella comunità scientifica; in particolare si è pensato ad un loro utilizzo in ambito ortopedico vista la combinazione pressoché unica di basso modulo elastico (che porta a diminuzione del rischio di mobilizzazione asettica delle protesi), alta resistenza a corrosione, assenza di problemi allergici (poiché sono leghe progettate senza l'utilizzo di

elementi tossici), ed eccellente biocompatibilità (leghe biologicamente inerti). In aggiunta, queste leghe possiedono enormi vantaggi rispetto ad altre leghe di titanio legati alla loro lavorazione; infatti hanno buona fucinabilità, eccellente temprabilità e costi di lavorazione termomeccanica relativamente bassi. Diversamente dalle leghe  $\alpha$ - $\beta$ , questi materiali non hanno trasformazione martensitica quando sottoposti a tempra a temperatura ambiente così da avere una microstruttura uniforme. Per questi motivi, le leghe di titanio  $\beta$  risultano essere molto interessanti per applicazioni commerciali nelle quali è necessaria alta resistenza meccanica.

Inoltre, si è trovato che il loro modulo elastico può essere notevolmente ridotto regolando la concentrazione di elementi stabilizzanti la fase  $\beta$ . Infine, questo tipo di leghe di titanio mostra una straordinaria resistenza alla corrosione quando è a contatto con i fluidi corporei umani; questo comportamento è dovuto alla formazione di un film di ossido protettivo, duro e aderente [50,51,52].

La lega di titanio TLM (composizione chimica Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb) è una nuova lega di tipo  $\beta$  indipendentemente progettata e sviluppata da Northwest Institute for Nonferrous Metal Research of China nel 2005 per applicazioni biomediche [20]. Questa lega presenta un insieme di proprietà che la rendono utilizzabile in molte applicazioni che richiedono il contatto con il sangue umano e risulta essere un significativo miglioramento rispetto alle precedenti leghe di titanio, come la lega Ti-6Al-4V, e rispetto al titanio puro [52].

Infatti, mentre le proprietà meccaniche e di resistenza alla corrosione del Ti-6Al-4V sono ideali per applicazioni biomediche, studi hanno dimostrato che sia V sia Al possono causare problemi di salute a lungo termine. Inoltre, il modulo di Ti-6Al-4V (110 GPa) è di molto superiore a quella dell'osso nativo (10-40 GPa). Questa grande disparità di modulo elastico provoca un'insufficiente sollecitazione dell'osso adiacente all'impianto e quindi il fallimento dell'intervento. La lega TLM sviluppata recentemente, presenta, al contrario, modulo elastico relativamente basso pur mantenendo resistenza meccanica sufficiente, ed è composta da elementi (titanio, zirconio, stagno, molibdeno e niobio) che sono ritenuti non tossici poiché ampiamente utilizzati in diverse parti del corpo umano (vasi sanguigni, valvole artificiali nel cuore, protesi di spalle, ginocchia, gomiti, etc.). Tuttavia questa lega non può essere usata a contatto diretto con l'osso nativo perché non possiede capacità osteointegrativa. Pertanto, sono state studiate varie modifiche superficiali (MAO, Micro-

arc oxidation, ASD) per migliorare questa capacità bioattiva. Negli ultimi anni, inoltre, sono stati intrapresi anche altri studi riguardanti il conferimento di proprietà antibatteriche alla superficie, il miglioramento dell'emocompatibilità (come metodi di eparinizzazione e deposizione di elementi dopanti sulla superficie), delle proprietà meccaniche (elettrolucidatura) e del processo di produzione [50,51,53].

## **Capitolo 4**

### **Metodi di modifica superficiale**

## **4.1. Introduzione**

In seguito ai processi produttivi, i manufatti possono presentare uno strato superficiale contaminato, non morfologicamente e chimicamente uniforme. Una superficie di questo tipo non è adatta ad applicazioni biomedicali, per cui risulta necessario mettere a punto dei trattamenti di modifica superficiale [54]. I processi di finitura, infatti, sono utilizzati su manufatti di vari settori come, ad esempio, quello aeronautico e automobilistico, al fine di migliorare le proprietà del materiale. Questi trattamenti sono molto studiati all'interno dei processi industriali poiché, scegliendo un trattamento rispetto ad un altro e impostando diversi parametri di processo, è possibile utilizzare lo stesso materiale per molteplici impieghi. Caratteristiche come la bagnabilità, la saldabilità, la durezza e la resistenza alla corrosione, possono essere modificate, ed in genere aumentate, utilizzando queste tecniche. In questo lavoro di tesi sono presi in considerazione due metodi di finitura superficiale elettrochimici, cioè quei particolari processi che, utilizzando la corrente elettrica e soluzioni ad hoc, modificano la superficie di un materiale.

Infatti questi processi appaiono particolarmente promettenti grazie alla possibilità di trattare geometrie 3D molto complesse quali gli stent vascolari permettendo una modulazione molto fine e avanzata della struttura topografica, della microstruttura e degli elementi chimici della superficie. Infine sono abbastanza economici e relativamente semplici così da permettere uno scale-up industriale.

## **4.2. Elettrolucidatura**

L'elettrolucidatura (o lucidatura elettrochimica/elettrolitica) è un processo che permette la rimozione di particelle metalliche dalla superficie di un metallo, immerso nella soluzione elettrolitica, tramite il passaggio di una corrente elettrica. L'elettrolucidatura, essenzialmente, è il processo elettrochimico inverso dell'elettrodeposizione galvanica; mentre in questo processo gli ioni metallici liberi contenuti nella soluzione elettrolitica vengono depositati sulla superficie del campione, nel trattamento di elettrolucidatura le particelle superficiali si staccano dal campione (anodo), si trasformano in ioni e vanno ad aggiungersi a quelli già presenti nella soluzione elettrolitica o a depositarsi sul catodo. Questo metodo di finitura superficiale presenta numerosi vantaggi rispetto alla lucidatura meccanica: oltre ad essere relativamente semplice e poco costoso, garantisce una bassa rugosità della superficie trattata e la rimozione di particelle metalliche ed impurità dalla



superficie senza causarne deformazioni, fratture o scalfiture, aumentandone anche la resistenza alla corrosione [55]. Questo aspetto è fondamentale per dispositivi biomedicali che andranno a svolgere una funzione particolare all'interno dell'organismo, poiché il trattamento garantisce una maggior protezione dai fluidi a pH aggressivo del corpo umano. Inoltre possono essere trattati molteplici manufatti contemporaneamente, anche caratterizzati da geometrie complesse, dato che vengono tutti completamente immersi nella soluzione elettrolitica. È anche importante sottolineare che l'elettrolucidatura è una tecnica per la lavorazione finale del materiale e non una tecnica per la lucidatura di una superficie irruvidita e grezza [56].

L'elettrolucidatura è un processo di dissoluzione anodica differenziale il cui meccanismo agisce in due modi differenti, a seconda delle caratteristiche superficiali del materiale. Durante l'applicazione della corrente, infatti, mentre i picchi più bassi vengono dissolti in maniera lieve a causa dello strato di ossido che li ricopre, rendendoli quindi più isolati, quelli più alti, non ricoperti da tale strato, vengono dissolti molto più facilmente e velocemente a causa della maggior quantità di corrente ricevuta. È stato infatti dimostrato che un dispositivo metallico lavorato e caricato elettricamente, tende ad assumere una maggiore concentrazione di carica ai bordi ed in corrispondenza dei picchi più pronunciati ed appuntiti della superficie [57]. Durante l'elettrolucidatura, quindi, tutti i picchi che sporgono dalla superficie del film di ossido del manufatto avranno una carica superficiale maggiore rispetto a quella delle valli e, di conseguenza, subiranno una rimozione di materiale più veloce e significativa.

Nel momento in cui inizia il processo di elettrolucidatura, l'ossigeno che si forma sulla superficie dell'anodo viene rilasciato sotto forma di particelle gassose, con conseguente dissoluzione del manufatto, mentre l'idrogeno viene rilasciato dal catodo, senza alcuna sua dissoluzione (fig. 4.1) [58]. Queste particelle d'ossigeno formano delle bolle che si muovono lungo tutta la superficie dell'anodo e, con il loro movimento, creano un moto convettivo che permette il miglior mescolamento degli elettroliti e la miglior azione di elettrolucidatura, permettendo di raggiungere ogni punto sulla superficie del manufatto (fig. 4.2).

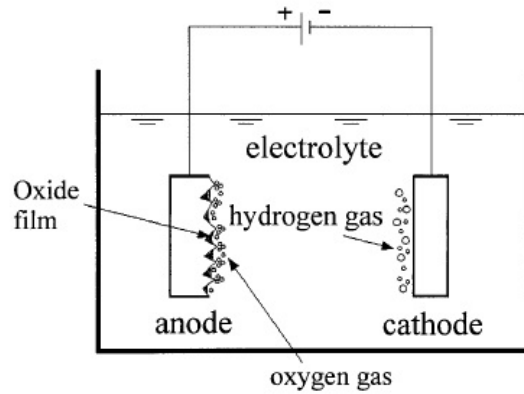


Figura 4.1 Schema della reazione di rilascio di ossigeno dall'anodo e d'idrogeno dal catodo.

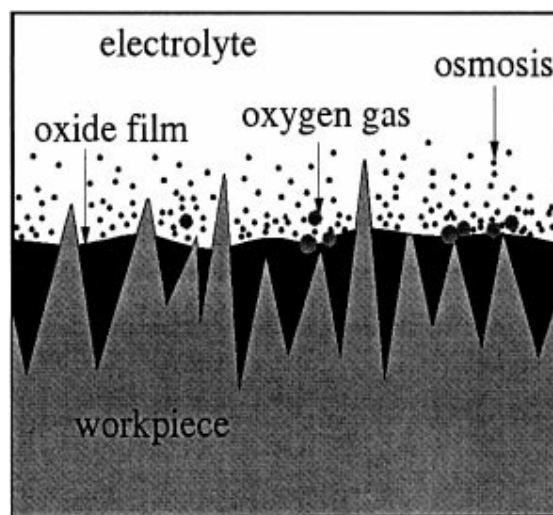


Figura 4.2 Formazione di bolle di ossigeno sulla superficie del metallo e rimozione di particelle di materiale dai picchi.

Esiste inoltre una relazione tra la qualità della finitura superficiale e la densità di corrente-tensione applicata (VDC, Voltage Direct Current): all'aumentare di quest'ultima, infatti, si verificano cambiamenti riguardanti *“la natura della rimozione delle particelle dalla superficie del materiale”* [56]. La figura 4.3 mostra una generica curva operativa I/V per il processo di elettrolucidatura. Nel primo tratto della curva, per valori di VDC troppo bassi, la superficie del materiale non viene trattata in maniera uniforme divenendo, così, scavata. Anche per valori di VDC troppo elevati il processo di elettrolucidatura non agisce in maniera uniforme generando, questa volta, una superficie vaiolata con valori di rugosità addirittura superiori rispetto a quelli del materiale non trattato. La regione centrale della curva, anche detta a plateau, rappresenta la zona di corretto funzionamento del processo d'elettrolucidatura, cioè dove l'asportazione del metallo è uniforme e costante (da notare che il plateau si trova in un range limitato di tensione applicata) [56].

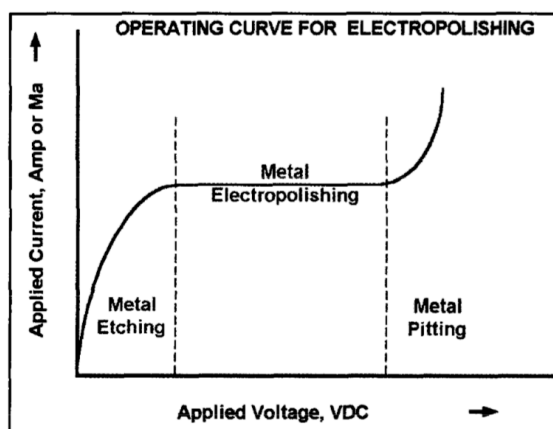


Figura 4.3 Generica curva operativa intensità di corrente/tensione dell'elettrolucidatura.

Infine, grazie alla legge di Faraday (1) per l'elettrolisi, si può calcolare la quantità di materiale rimosso dalla superficie del materiale durante l'elettrolucidatura.

$$(1) \quad W_{loss} = itM/nF$$

$W_{loss}$  è la quantità di materiale rimossa,  $n$  è la valenza dello ione metallico,  $F$  è la costante di Faraday (96.500 Coulomb),  $M$  è la massa molare dell'anodo,  $i$  e  $t$  sono rispettivamente l'intensità di corrente ed il tempo del processo. Dato che  $M$ ,  $n$  ed  $F$  sono costanti, la perdita di materiale è dipendente solamente dall'intensità di corrente ed dal tempo [59].

### 4.3. Anodic Spark Deposition (ASD)

L'Anodic Spark Deposition (ASD) è una tecnica elettrochimica biomimetica che permette la deposizione, sulla superficie del materiale trattato, di un sottile strato ceramico nanoporoso composto dalle specie chimiche presenti nella soluzione elettrolitica. La deposizione avviene in una cella elettrolitica, in cui il metallo rappresenta l'elettrodo positivo (anodo). Nel caso dell'ASD su campioni di titanio, il quale, per sua natura, presenta sulla superficie un film di ossido  $TiO_2$ , il campo elettrico applicato fa sì che gli ioni di titanio e di ossigeno, ottenuti dalle reazioni di ossidoriduzione (tab. 4.1), si combinino e aumentino lo spessore del film di ossido. Un diagramma schematico dell'evoluzione tensione/tempo del processo, eseguito con densità di corrente costante, è riportato in figura 4.4.

All'interfaccia Ti/TiO <sub>2</sub>	Ti ↔ Ti <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup>
All'interfaccia TiO <sub>2</sub> /elettrolita	2H <sub>2</sub> O ↔ 2O <sup>2-</sup> + 4H <sup>+</sup>
	2H <sub>2</sub> O ↔ O <sub>2</sub> (gas) + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup>
Ad entrambe le interfacce	Ti <sup>2+</sup> + 2O <sup>2-</sup> ↔ TiO <sub>2</sub> + 2e <sup>-</sup>

Tabella 4.1 Reazioni di ossidoriduzione che avvengono nella cella elettrolitica nel caso di trattamento ASD su campione in titanio con film TiO<sub>2</sub>.

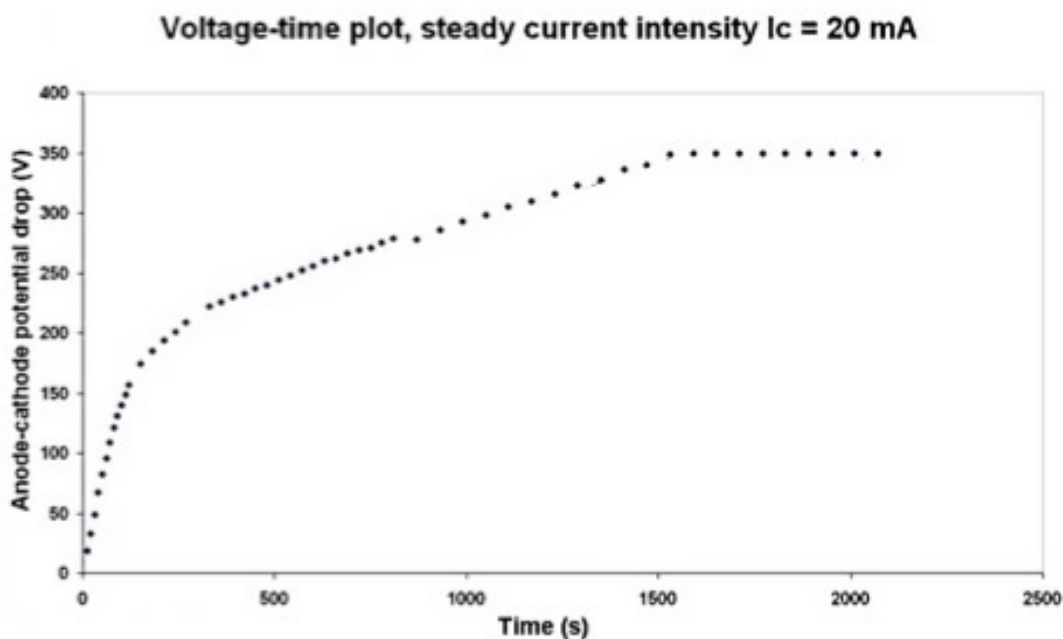


Figura 4.4 Esempio dell'evoluzione tensione/tempo del processo di ASD, in condizione galvanostatica, con densità di corrente di 210 A/m<sup>2</sup>. *Development of antibacterial surface modification treatments for titanium to improve the osteointegration*, Cinzia Della Valle, Ph.D. Thesis.

L'ASD può essere diviso in tre fasi: la prima di anodizzazione, la seconda in cui si raggiunge la tensione di breakdown del dielettrico e la terza detta di "build-up". Nell'anodizzazione lo spessore del film di ossido aumenta finché il campo elettrico è in grado di muovere le particelle cariche attraverso il film di ossido e il suo aumento è proporzionale al potenziale elettrico applicato finché questo non supera una certa tensione detta di breakdown. Prima della tensione di breakdown la caduta del potenziale elettrico dovrebbe essere uniforme sulla superficie e aumentare in modo proporzionale all'aumento

di spessore dello strato di ossido, ma in realtà questo non avviene poiché il rivestimento anodizzato non presenta uno spessore costante e sono presenti alcuni punti della superficie resi deboli da difetti o imperfezioni, in cui un ulteriore aumento della caduta di potenziale fa sì che questo sia maggiore della forza del dielettrico e si abbia un passaggio di corrente che genera le scintille. La fase di “build-up” è caratterizzata dalla presenza di un gran numero di piccole scintille (spark) che sembrano muoversi lungo l’intera superficie del metallo anodizzato. Nei punti dove avviene il passaggio di corrente la temperatura locale può variare dai 1727°C ai 7727°C, temperature superiori a quella di fusione di molti metalli. Questo comporta la parziale fusione del rivestimento che causa una modifica della sua morfologia e della sua composizione dato che quando lo strato ritorna allo stato solido, in esso sono incorporati anche gli ioni disciolti nella soluzione elettrolitica. Anche se nessuna delle teorie sulla generazione delle scintille è univocamente accettata, l’ipotesi più accreditata sostiene che le scintille vengano generate dai punti deboli del rivestimento [60].

Scegliendo appropriate soluzioni elettrolitiche da utilizzare per l’ASD è possibile depositare sulla superficie gli elementi voluti. Modulando le variabili elettriche e la soluzione elettrolitica è quindi possibile controllare la topografia, la composizione chimica e la struttura cristallografica della superficie del materiale.

Tutti questi aspetti sono stati esaminati da Chiesa et al. [60] e possono essere sintetizzati come segue:

- variabili elettriche: lo spessore dello strato superficiale è funzione della corrente totale, nel caso di condizioni galvanostatiche, e della tensione, nel caso di tensione statica. Inoltre, la densità di corrente ha effetti sulla porosità e sulla rugosità dello strato di ossido. Solitamente, il diametro dei pori e la rugosità del film aumentano con l’aumentare della densità di corrente.
- soluzione elettrolitica: la composizione chimica superficiale è direttamente influenzata dalla composizione della soluzione elettrolitica. Inoltre, poiché la soluzione contiene specie ioniche, bisogna evitare la loro precipitazione, così da migliorare la riproducibilità del processo; infine, la soluzione elettrolitica deve essere esente da ioni cloruro, per evitare la dissoluzione dello strato di ossido metallico provocato dalla presenza di tali ioni.

Grazie all'elevata stabilità meccanica del film ottenuto, unita alla possibilità di adattare la composizione chimica e la struttura topografica della superficie del materiale, l'ASD rappresenta uno dei metodi di trattamento più versatile e potente per applicazioni in ambito biomedico. Questo metodo di modifica chimica e morfologica della superficie del materiale ha già riscontrato ottimi risultati per quanto riguarda l'osteointegrazione in ambito dentale.

Scopo principale di tale trattamento è il miglioramento dell'integrazione tessutale, ossia l'interazione tra tessuto biologico e sistema impiantato, dei dispositivi cardiovascolari grazie alla creazione di un'interfaccia favorevole per una corretta colonizzazione cellulare.

## **Capitolo 5**

### **Scopo del progetto**

Il titanio e le sue leghe vengono largamente utilizzate in ambito biomedicale in vari settori, che vanno dall'odontoiatrico, all'ortopedico e al cardiovascolare, ma non sono tuttora utilizzate per la produzione di stent endovascolari metallici a causa delle proprietà meccaniche non perfettamente adeguate. Lo stato dell'arte per quanto riguarda la produzione di tali dispositivi metallici prevede l'utilizzo di acciai inossidabili e leghe di cobalto-cromo.

Caratteristiche come l'ottima biocompatibilità, la resistenza alla corrosione e le buone proprietà meccaniche, rendono possibile l'utilizzo del titanio, e delle sue leghe, nei settori precedentemente indicati e in particolare per la produzione di pace-makers, componenti di protesi vascolari, protesi dentali, e protesi articolari, come l'anca e il ginocchio.

L'attività di laboratorio, quindi, è iniziata partendo dall'idea di valutare la possibilità dell'utilizzo di una particolare lega di titanio, la lega TLM  $\beta$  (Ti-3Zn-2Sn-3Mb-25Nb), per la realizzazione di impianti biomedicali nell'ambito cardiovascolare. In particolare questa lega di titanio presenta delle caratteristiche meccaniche migliori rispetto alle leghe di titanio classiche per quanto riguarda la realizzazione di stent, poiché possiede un minor modulo elastico E, maggior duttilità, alta tenacità, un'elevata resistenza a usura e un alto limite di fatica.

Oltre che per le caratteristiche meccaniche, il titanio si presta ad essere trattato con trattamenti superficiali attraverso numerosi metodi di modifica morfologica e chimica che sono stati sviluppati negli ultimi anni, sia nel settore ortopedico sia in quello odontoiatrico. Queste modifiche offrirebbero notevoli vantaggi per la produzione di stent e dispositivi cardiovascolari poiché esiste la prova evidente che le prestazioni biologiche di un materiale dipendono in gran parte dalle sue proprietà di superficie. Infatti, è generalmente accettato che gli strati più esterni del materiale possono giocare un ruolo chiave nella risposta tessutale dell'organismo.

I principali trattamenti superficiali riguardanti il titanio e le sue leghe sono metodi meccanici, come tornitura, fresatura e sabbiatura, metodi chimici, come etching e passivazione, e metodi elettrochimici, come l'elettrolucidatura (elettropolishing) e l'Anodic Spark Deposition (ASD). Tra questi, i trattamenti più adeguati per un utilizzo su stent sono sicuramente i trattamenti elettrochimici poiché permettono di modificare in



modo pressoché uniforme la finitura superficiale di dispositivi dalla geometria complessa e dalle ridotte dimensioni; ciò risulterebbe molto più difficoltoso, ad esempio, con una lavorazione meccanica.

In particolare, l'elettropolishing permette di rimuovere bave o imperfezioni lasciate sui bordi dello stent durante la fase di lavorazione, che spesso avviene tramite taglio laser a partire da tubi cavi. Inoltre, l'elettrolucidatura migliora la resistenza a corrosione e permette di effettuare, in seguito, il trattamento di ASD su una superficie liscia anziché rugosa.

Il trattamento di ASD, che consente di modificare le proprietà superficiali del metallo attraverso la deposizione di uno strato di ossido. Un particolare trattamento di ASD, sviluppato e largamente studiato presso il Politecnico di Milano, permette la deposizione di un sottile strato di elementi dopanti sulla superficie che, grazie a test eseguiti in passato, si è visto migliorare la biocompatibilità e l'integrazione tissutale del materiale.

Lo scopo principale di questo progetto è la verifica di fattibilità dell'esecuzione, in serie, del trattamento di elettropolishing e del trattamento di ASD su questa nuova ed innovativa lega  $\beta$  di titanio, sfruttando le conoscenze pregresse di questi trattamenti, ed in seguito caratterizzarla con dei test specifici per un suo utilizzo futuro in ambito cardiovascolare confrontando i risultati con quelli dei più comunemente usati acciaio inox e lega CoCr.

## **Capitolo 6**

### **Materiali e metodi**

## 6.1 Materiali

### *Titanio TLM*

Tutti i campioni utilizzati per i trattamenti di elettrolucidatura e ASD sono della lega di titanio TLM (Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb), una lega  $\beta$  di titanio che è stata progettata e sviluppata in modo indipendente da Northwest Institute for Nonferrous Metal Research of China [61,62]. I campioni sono dei parallelepipedi a base quadrata caratterizzati da uno spessore di 0.3 mm ed hanno lato di base di 10 mm (fig. 6.1 A).

### *Acciaio inossidabile*

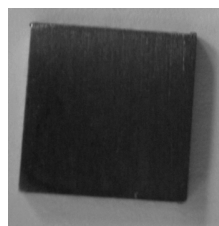
Tutti i campioni utilizzati per i trattamenti di lucidatura meccanica sono stati ottenuti tramite punzonatura di una lastra di acciaio inossidabile AISI 316L. Tali campioni sono caratterizzati da una forma discoidale ( $\varnothing = 12$  mm) ed uno spessore di 0.6 mm (fig. 6.1 B).

### *Cobalto-Cromo*

Tutti i campioni utilizzati per i trattamenti di elettrolucidatura e lucidatura meccanica sono stati ottenuti tramite punzonatura di una lastra di Co-Cr L605. Tali campioni sono caratterizzati da una forma discoidale ( $\varnothing = 12$  mm) ed uno spessore di 0.6 mm (fig. 6.1 C).

Prima di ogni processo elettrochimico e di ogni tecnica di analisi, ogni campione (titanio TLM, acciaio inossidabile e Co-Cr) è stato trattato con la seguente procedura:

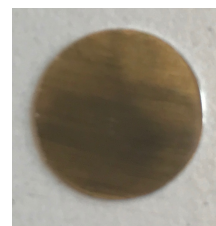
- lavaggio in bagno ad ultrasuoni in Acetone (Sigma-Aldrich, 32201) per 2 min;
- lavaggio in bagno ad ultrasuoni in acqua Millipore per 2 min;
- asciugatura in stufa a 37°C per 30 min.



A)



B)



C)

Figura 6.1 Campione di titanio TLM (A), acciaio inossidabile (B) e lega Co-Cr (C).

### 6.1.1 Elettrolucidatura

Come base per la cella elettrolitica è stato utilizzato un beaker a cappotto, all'interno del quale è contenuto del liquido refrigerante. Questo è collegato ad un termocriostato di circolazione (Julabo F32-HL), che permette di controllare automaticamente la temperatura della soluzione elettrolitica all'interno del beaker durante tutto il processo. Come catodo sono state utilizzate diverse soluzioni:

- una rete cilindrica di titanio puro grado 2 inserita all'interno del recipiente [63];
- due lastre di titanio puro grado 2, distanziate tra loro di 40mm da un apposito supporto di PMMA realizzato ad hoc;
- due reti piane, sempre di titanio puro grado 2, distanziate anch'esse di 40mm da un apposito supporto di PMMA.

La figura 6.2 rappresenta il circuito elettrochimico utilizzato in questo studio per il trattamento di elettrolucidatura di tutti i campioni.

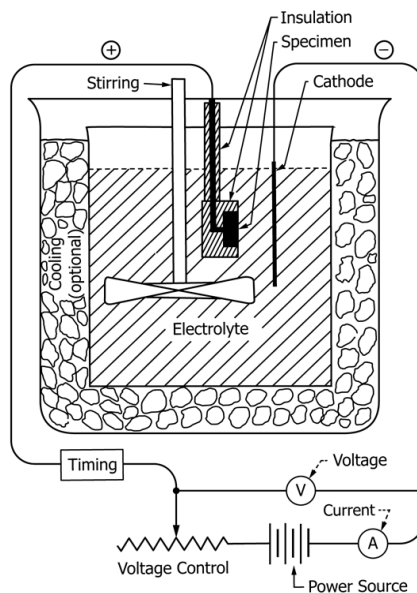


Figura 6.2 Esempio di circuito elettrochimico utilizzato per trattamento di elettrolucidatura.

Queste diverse tipologie di catodo sono state connesse al polo negativo di un generatore programmabile tensione-corrente (Agilent Technologies, N5772A). I campioni, invece, sono stati sospesi al centro del beaker contenente la soluzione elettrolitica tramite un sistema ad afferraggi, per i quali sono stati utilizzati sia l'acciaio inossidabile sia il titanio, e sono stati collegati al polo positivo ed utilizzati come anodo.

Per garantire l'omogeneità del trattamento di elettrolucidatura, la soluzione è stata messa in agitazione tramite ancoretta magnetica a 250 rpm. Di seguito elenchiamo la composizione delle soluzioni elettrolitiche e i parametri di processo utilizzati per le due tipologie di materiali trattati.

#### *Titanio TLM*

La composizione della soluzione elettrolitica utilizzata è la seguente [64]:

- 1.4 l di Etanolo (Sigma-Aldrich, 02870);
- 0.6 l di Propanolo (Sigma-Aldrich, 33539);
- 120 g di Cloruro di Alluminio (Sigma-Aldrich, 206911);
- 500 g di Cloruro di Zinco (Sigma-Aldrich, 229997).

I parametri del processo di elettrolucidatura sono [64]:

- temperatura di 30°C;
- densità di corrente di 2 kA/m<sup>2</sup> (quindi, per esempio, per parallelepipedi di l=10 mm e spessore 0,3mm corrisponde una corrente di 640 mA);
- tensione massima imposta di 70 V;
- tempo di esposizione variabile (range 5 – 15 min).

#### *Cobalto-Cromo*

La soluzione elettrolitica utilizzata è la seguente [65,67]:

- 850 ml glicole etilenico (Sigma-Aldrich, 324558);
- 150 ml di acido fosforico (Sigma-Aldrich, 438081).

I parametri del processo di elettrolucidatura sono [66,67]:

- temperatura di 50°C;
- densità di corrente di 1 A/cm<sup>2</sup>;
- tensione massima imposta variabile (10 – 25 V);
- tempo di esposizione variabile (range 1-15 min).

### 6.1.2 ASD

La figura 6.3 rappresenta lo schema del circuito elettrochimico utilizzato per il trattamento dei campioni in titanio con la tecnica di ASD; il set-up sperimentale è analogo a quello creato per i trattamenti di elettrolucidatura. La soluzione elettrolitica utilizzata, detta SUM, precedentemente studiata e sviluppata dal Politecnico di Milano per favorire l'osteointegrazione di impianti in titanio, è stata ottenuta tramite la miscelazione dei seguenti reagenti [68]:

- silicato di sodio (Carlo Erba Reagenti, 373908);
- acetato di calcio (Fluka, 21052);
- idrossido di sodio (Fluka, 71690);
- sale beta-glicerofosfato disodico pentaidratato (Fluka, 50020).

I parametri utilizzati per il trattamento ASD, facendo riferimento al lavoro di Della Valle et al. [68], sono stati:

- temperatura 0°C;
- intensità di corrente di 30 mA;
- tensione massima imposta 175 V.

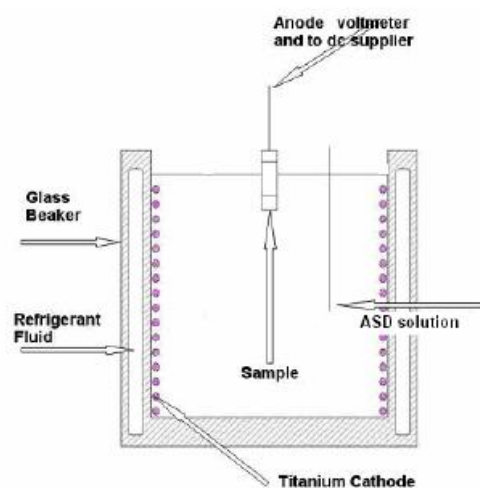


Figura 6.3 Schema del circuito elettrochimico utilizzato per trattamento di ASD.

### 6.1.3 Mordenzatura alcalina a caldo

Il campione elettrolucidato 5 minuti e in seguito anodizzato con soluzione SUM e il campione non trattato della lega di titanio TLM, hanno subito un trattamento di

mordenzatura a caldo con NaOH 5M (Fluka,71690) per 2 ore alla temperatura di 60°C ed in ambiente controllato. Alla fine del trattamento, i campioni sono stati lavati con acqua millipore e asciugati in stufa a 37°C per 30 minuti. Questo etching alcalino é stato effettuato per produrre una superficie più ricca di sodio (Na) e per aumentare il rapporto tra calcio (Ca) e fosforo (P) nel campione sottoposto a ASD [69,70]. Questi campioni trattati porteranno come identificativo "Na" per il riconoscimento.

#### 6.1.4 Lucidatura meccanica

I campioni di Co-Cr e acciaio inox, materiali utilizzati ad oggi per la produzione di stent vascolari, sono stati utilizzati come confronto per la lega di titanio TLM. Per rendere entrambe le superfici aventi una rugosità confrontabile con quella degli stent prodotti attualmente, tali campioni sono stati lucidati a specchio utilizzando un metodo meccanico (su entrambe le superfici). Per prima cosa si é eseguito un trattamento di prelevigatura con carte abrasive Sic con granulometria P600 e P1200. Dopo aver risciacquato i campioni, è stato effettuato un trattamento di lappatura con allumina, così da rendere i campioni lucidi.

Di seguito, nella tabella 6.1, si definiscono i nomi dei campioni che sono stati creati ed analizzati con le tecniche di analisi definite nelle prossime pagine. Ogni campione prende il nome dal materiale di partenza, dal trattamento di lucidatura effettuato e dai successivi trattamenti (ASD o mordenzatura alcalina) compiuti su di esso.

Campione	Materiale partenza	Trattamento di lucidatura	Altri trattamenti
TQ	Lega titanio TLM	Nessun trattamento	Nessun trattamento
Na	Lega titanio TLM	Nessun trattamento	Mordenzatura
5	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5min 70 V	Nessun trattamento
15	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 15min 70 V	Nessun trattamento
5ASD	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5min 70 V	ASD 175V 30mA
5ASDNa	Lega titanio TLM	Elettrolucidat. 5 min 70 V	ASD 175V 30mA e Mordenzatura
Acciaio inox	Acciaio inox	Lucidat. meccanica	Nessun trattamento
Co-Cr	Lega Co-Cr	Lucidat. meccanica	Nessun trattamento

Tabella 6.1 Riassunto dei campioni utilizzati e soggetti ad analisi con particolare riferimento al materiale di partenza, al trattamento di lucidatura e ai trattamenti successivi.

## 6.2 Metodi

### 6.2.1 Metallografia

La metallografia è lo studio delle caratteristiche strutturali e morfologiche dei materiali metallici, comprese le rilevazioni di proprietà non geometriche ma intrinseche dei vari costituenti dei metalli. L'analisi serve per:

- la comprensione delle caratteristiche e delle proprietà chimiche, fisiche, meccaniche e tecnologiche dei materiali metallici;
- la previsione del comportamento dei materiali metallici nelle condizioni d'esercizio;
- il riconoscimento delle eventuali anomalie.

Le determinazioni metallografiche traggono le loro possibilità operative dalla preliminare conoscenza della composizione del materiale esaminato, permettendo di stabilire i tipi e la natura delle fasi possibili in un materiale, noti la natura e la composizione specifica.

I provini da sottoporre ad analisi microstrutturali mediante microscopi ottici o elettronici devono essere sottoposti ad una preventiva preparazione che include le operazioni di:

- taglio e dimensionamento;
- montaggio in resina (eventuale);
- spianatura e lucidatura;
- attacco chimico, fisico o elettrochimico delle superfici lucidate.

Le lavorazioni meccaniche interessano il taglio, la spianatura e lucidatura dei provini. Il taglio può essere eseguito anche a mano con lame dentate di metallo duro. Di solito, si ricorre al taglio mediante troncatrici elettriche a disco o a nastro la cui lama in metallo è dotata d'abrasivo ceramico nella parte tagliente. I dischi da taglio possono essere anche costituiti interamente con un impasto di resine con granuli abrasivi. Per le operazioni di spianatura, si usano macchine utensili oppure carte o tele con una superficie spalmata con l'impasto d'abrasivi.

L'analisi condotta è stata effettuata sul campione TQ (senza alcun trattamento) al fine di verificarne la microstruttura e per evidenziare i costituenti della lega. Il campione è stato



sezionato tramite un tranchesino in diamante ed è stato inglobato in una resina a freddo, la cui superficie è stata accuratamente lucidata per renderla idonea all'immagine microscopica [71].

### **6.2.2 Stereomicroscopio**

L'occhio e la mente umana collaborano per produrre una visione stereoscopica, ossia una visione che ci fornisce la percezione di immagini tridimensionali degli oggetti intorno a noi. Questo è dovuto al fatto che la mente interpreta le immagini bidimensionali ricevute dalle due retine. Il microscopio stereoscopico, o stereomicroscopio, utilizza questa nostra caratteristica di percepire la profondità trasmettendo ai nostri occhi due immagini leggermente inclinate (solitamente tra i 10 e i 12 gradi) del campione sottoposto ad esame, permettendo così di ricreare la visione stereoscopica. Lo stereomicroscopio è quindi prezioso nei casi dove la percezione della profondità, della tridimensionalità e del contrasto sono fondamentali per l'interpretazione della struttura del campione. La profondità di campo è un concetto importante in stereomicroscopia ed è fortemente influenzata dall'ingrandimento totale dello strumento, che vede la partecipazione sia dell'obiettivo sia delle lenti supplementari.

In alcuni stereomicroscopi, come la configurazione di Greenough utilizzata in laboratorio, i campioni sono visibili utilizzando due microscopi ottici separati, ciascuno dei quali composto da un obiettivo, una lente intermedia e un oculare. Infatti, si compone di due sistemi ottici identici (e simmetrici) ognuno dei quali contiene un oculare e un obiettivo allineati accuratamente all'interno di ogni singolo alloggiamento. Una coppia di prismi o un sistema di specchi è utilizzata per ruotare e invertire l'immagine ingrandita ricevuta dagli obiettivi e presentarla all'osservatore, come sembrerebbe senza un microscopio.

Per questo studio è stato utilizzato uno stereomicroscopio (fig. 6.4) con il quale sono state scattate fotografie dei campioni con fotocamera digitale Leica DFC290 integrata con software LAS (Leica Application Suite).



Figura 6.4 Immagine dello stereomicroscopio utilizzato in questo lavoro di tesi.

### 6.2.3 SEM e EDS

#### *SEM (Scanning Electron Microscope)*

I microscopi ottici convenzionali hanno un limite di risoluzione di circa 250 nanometri, approssimativamente la lunghezza d'onda della luce utilizzata per illuminare il campione. Ciò significa che due punti sul campione meno distanti di tale dimensione, non possono essere distinti l'uno dall'altro. Per vedere i dettagli più piccoli, è necessario quindi un microscopio che utilizza una fonte d'illuminazione con una lunghezza d'onda più piccola. Un esempio di tale tipologia di microscopi è il SEM (microscopio elettronico a scansione). Il SEM produce immagini grazie alla scansione del campione con un fascio di elettroni ad alta energia, che sono utilizzati come sorgente per bombardare il campione, per poi trasformare i risultati di tale interazione elettrone-campione in un'immagine visibile.

I segnali che derivano da tale interazione elettrone-campione danno informazioni sulla morfologia esterna, la composizione chimica e la struttura cristallina del campione. Questi segnali includono:

- elettroni secondari (scattering anelastico) sono elettroni a bassa energia prodotti dall'espulsione dai k-orbitali degli atomi del campione grazie al fascio di elettroni incidente. Essi sono utili per mostrare la morfologia e la topografia del campione;
- elettroni retrodiffusi (backscattered electron, derivanti da scattering elastico) sono elettroni di energia superiore che sono elasticamente retrodiffusi dagli atomi del campione (elementi con numero atomico più alto sono retrodiffusi più efficientemente). I BSE possono dare informazioni sulla composizione del

campione e sono preziosi per illustrare i contrasti nella composizione di campioni multifase (vale a dire per la discriminazione di fasi);

- elettroni retrodiffusi diffratti (EBSD) che vengono utilizzati per determinare le strutture cristalline e gli orientamenti di minerali.

L'ingrandimento (M) dell'immagine del SEM è dato dalla lunghezza della linea di scan sullo schermo (LD, un valore fisso) e quella del fascio sul campione (LS, che può essere variata); per esempio

$$M = \frac{LD}{LS} \cong \frac{0.2mm}{0.2nm} \cong 10000X$$

La risoluzione massima ottenuta con il SEM dipende da diversi fattori, come la dimensione del fascio di elettroni e la diffusione del segnale all'interno della camera. In genere, i moderni SEM offrono una risoluzione tra 1-20 nm, mentre i sistemi desktop sono in grado di fornire una risoluzione di 20 nm o più. Quando si utilizza il SEM con materiali non conduttivi o biologici, i campioni vengono prima rivestiti con un conduttore come l'oro, mentre per i campioni metallici non è necessaria alcuna preparazione speciale.

In questo studio, le analisi microscopiche sono state effettuate tramite un microscopio elettronico a scansione Stereoscan 360 (Cambridge Instruments), con varie tensioni di accelerazione ed a vari ingrandimenti (fig. 6.5). Questo strumento è in grado di operare solamente in condizioni di alto vuoto (10<sup>-5</sup>mmHg). Le analisi sono state effettuate sui campioni sia prima sia dopo i trattamenti di elettrolucidatura e ASD, per osservare la morfologia superficiale dei campioni pre/post trattamento, e dopo l'adesione piastrinica, per verificare l'avvenuta adesione e per caratterizzare qualitativamente la forma delle piastrine.



Figura 6.5 Immagine del SEM utilizzato in questo lavoro di tesi.

### *EDS (Energy Dispersion Spectroscopy)*

La spettroscopia a dispersione di energia (EDS) è un sistema affidabile per l'analisi chimica elementare della superficie di un materiale. Questa tecnica analitica permette l'analisi elementare e la caratterizzazione chimica della superficie del campione in esame misurando l'energia e la distribuzione delle intensità dei fotoni (raggi X); questi vengono emessi dal campione sotto esame quando questo è eccitato da un fascio di elettroni. Infatti, con questa tecnica è possibile rilevare la presenza di tutti gli elementi superficiali poiché le emissioni di raggi X di ogni diverso elemento sono particolari dal punto di vista delle frequenze. Queste emissioni vengono analizzate grazie ad un rivelatore a dispersione di energia spettroscopico che permette di registrare le intensità di energia al variare della frequenza.

Lo strumento utilizzato per questo studio è stato un EDS modello Inca Energy200 (Oxford Instruments).

### **6.2.4 Profilometria**

La profilometria è una tecnica utilizzata nella scienza dei materiali per misurare il profilo reale di una superficie e per caratterizzare quantitativamente la topografia superficiale (ad esempio, micro-geometria, rugosità, disposizione, difetti). Con questa tecnica è possibile definire le proprietà dei materiali legati alla topografia della superficie, come l'adesione chimica o fisica, il comportamento a fatica e la resistenza alla corrosione.

Al fine di valutare una misura quantitativa della topografia è necessario distinguere tra rugosità (irregolarità microscopiche del profilo) e ondulazione (del profilo). Questo viene eseguito filtrando il profilo acquisito utilizzando  $\lambda_c$ , lunghezza d'onda di cut-off, che dovrebbe essere almeno 2,5 volte la distanza tra picchi nel profilo di rugosità per evitare di filtrare informazioni sulla rugosità. Una volta che  $\lambda_c$  è stato determinato, la lunghezza totale di scansione dovrebbe essere di circa 6 volte la lunghezza di cut-off, per valutare così una parte significativa del materiale.

Ci sono due differenti metodologie per effettuare la profilometria:

- Metodi di contatto: una punta di diamante conica/piramidale viene trascinata lungo la superficie del campione, lungo una traiettoria parallela alla superficie, e il suo

spostamento verticale è misurato dal macchinario. Di conseguenza la risoluzione spaziale laterale è limitata mentre la verticale varia da decine a centinaia di nm.

- Metodi ottici: la profilometria ottica si differenzia da quella meccanica per l'uso di un fascio di luce al posto dello stilo ed è quindi una profilometria senza contatto. Il fascio utilizzato, viene scomposto in due ulteriori fasci: uno di essi viene indirizzato verso il campione e poi riflesso dalla sua superficie, l'altro va a colpire una superficie di riferimento. In seguito i due fasci vengono ricombinati e inviati ad una telecamera digitale che ne ricostruisce la superficie. La risoluzione laterale è migliorata (1  $\mu\text{m}$ ), mentre quella verticale è di circa 0,01  $\mu\text{m}$  (microfocus).

Mentre la profilometria meccanica non ha bisogno di particolari requisiti da soddisfare per il materiale, i metodi ottici in genere richiedono superfici riflettenti; inoltre offrono il vantaggio di essere non distruttivi.

I parametri più significativi e più utilizzati in questa tipologia di analisi sono:

- Rugosità media (Ra): la media aritmetica delle deviazioni dalla linea mediana, presi in valore assoluto (coordinata verticale per la quale la stessa quantità di materiale è contenuta sopra e sotto questa linea);
- Altezza massima del profilo (Rt): la distanza tra il picco più alto e la valle più profonda;
- Rz: media aritmetica dei 5 massimi dislivelli picco-valle per 5 lunghezze di campionamento; questo indice è un indicatore di rugosità massima;
- Simmetria (Sk o Skewness): questo parametro indica la prevalenza di valli (nel caso in cui  $Sk < 0$ ) o di picchi ( per  $Sk > 0$ ) sulla superficie del campione;
- Curtosi (K): misura la nitidezza della distribuzione delle altezze del profilo (se  $K < 3$  ci sono molti picchi e valli ma piccoli e arrotondati, mentre se  $K > 3$  ci sono picchi e valli grandi e taglienti).

In questo studio, le analisi con il profilometro sono state effettuate su tutti i campioni precedentemente creati, per avere dei valori di rugosità e per verificare l'efficacia sia dell'elettrolucidatura che dell'ASD. Per questi motivi, i parametri presi in considerazione

sono la rugosità media (Ra), l'altezza massima del profilo (Rt) e la curvatura (K). Lo strumento utilizzato è un profilometro laser (UBM microfocus, modello 5600). Le misurazioni sui campioni sono state fatte su una linea di 4 mm e con una densità di 500 punti/mm effettuando 3 o 5 misure per campione.

### 6.2.5 Angolo di contatto

L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica descritta dall'angolo misurato tra l'interfaccia liquido-vapore e l'interfaccia liquido-solido in equilibrio. Quantifica la bagnabilità di una superficie solida attraverso l'equazione di Young-Laplace per la diffusione di una goccia su di un solido.

La bagnabilità della superficie di un biomateriale, in combinazione con altre proprietà superficiali quali la topografia, l'energia superficiale, la carica e i gruppi funzionali, influenza l'interazione tra materiale e corpo umano, dall'adsorbimento di proteine, all'adesione cellulare, alla risposta infiammatoria, contribuendo alla biocompatibilità complessiva del materiale.

La forma di un'interfaccia liquido-vapore (fig. 6.6) è descritta dall'equazione di Young-Laplace:

$$\gamma^{SV} = \gamma^{SL} + \gamma^{LV} \cos \theta_{SL}$$

con  $\gamma^{SL}$  energia libera all'interfaccia solido-liquido;  $\gamma^{SV}$  energia libera all'interfaccia solido-vapore;  $\gamma^{LV}$  energia libera all'interfaccia liquido-vapore;  $\theta_{SL}$  angolo di contatto.

La teoria del contatto nasce dalla considerazione dell'esistenza di un equilibrio termodinamico tra le tre fasi: la fase liquida (L), la fase solida (S), e il gas o la fase vapore (V); questo angolo di contatto di equilibrio riflette la forza relativa delle interazioni molecolari liquido, solido, e gas/vapore.

L'angolo di contatto ci dà una stima circa l'idrofobia e idrofilia del campione. Quando l'angolo di contatto  $\theta_{SL}=0^\circ$  la superficie è altamente idrofila; quando  $0^\circ < \theta_{SL} < 90^\circ$  è idrofila; quando  $90^\circ < \theta_{SL} < 180^\circ$  è idrofobico; e quando  $\theta=180^\circ$  la superficie è altamente idrofobica.

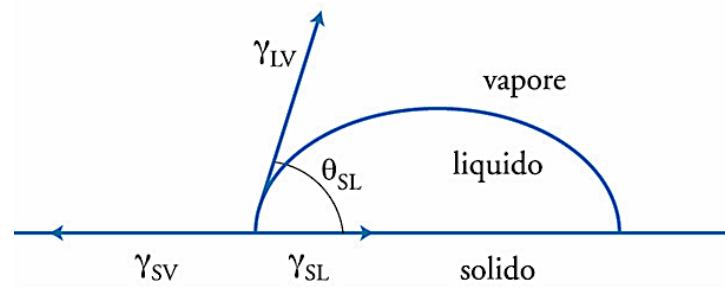


Figura 6.6 Rappresentazione di una goccia di liquido a contatto con una superficie solida e delle tensioni superficiali che agiscono tra le fasi.

Per misurare la bagnabilità di una superficie possiamo scegliere diverse tecniche, tutte basate sull'equazione di Young:

- tecnica della goccia sessile statica: utilizzata per misurare l'angolo di contatto attraverso un sottosistema ottico in grado di catturare il profilo di un liquido puro su un substrato solido;
- tecnica dell'angolo di contatto dinamico: eseguita aumentando o diminuendo il volume della goccia fino a quando il bordo trifase si muove sulla superficie;
- tecnica Wilhelmy: metodo per calcolare gli angoli di contatto medi su solidi dalla geometria uniforme e con entrambi i lati aventi le stesse proprietà;
- tecnica della bolla d'aria: consiste nell'imprigionare una bolla d'aria sulla superficie inferiore di un campione immerso in un liquido.

Le misurazioni possono soffrire di una significativa variabilità (fino a 10 °) per motivi estranei alla bagnabilità del materiale: la principale fonte di errore è generalmente l'operatore, ma la superficie rugosa, le caratteristiche del liquido e le condizioni ambientali possono anch'esse contribuire a questa variabilità.

La tecnica usata in questo studio è la tecnica della goccia sessile statica; i sistemi attuali utilizzano telecamere ad alta risoluzione e software per catturare e analizzare angoli e curvatura della goccia. L'algoritmo per valutare l'angolo di contatto utilizza l'equazione di Laplace-Young tenendo conto del perimetro complessivo della goccia anziché degli angoli tra tangente della goccia e la superficie del campione. In questo studio è stato valutato l'angolo di contatto statico tramite il software Drop Shape Analysis (DSA) versione 1.92.1.1 [HS] per Windows, sviluppato dalla Krüss. Ciascuna goccia, delle dimensioni di circa 0,5 $\mu$ l, è stata messa manualmente a contatto con il materiale tramite una siringa.

### **6.2.6 Adesione piastrinica**

La procedura di adesione piastrinica sui campioni è avvenuta prendendo spunto da una particolare procedura già utilizzata nel lavoro di Huang et al. [72] per il medesimo procedimento su film di ossido di titanio.

La procedura è così definita:

- A. Lavaggio dei campioni con acqua millipore;
- B. Asciugatura in stufa a 37°C per 30 minuti;
- C. Incubazione a 37°C di coppie di campioni uguali in singola provetta Falcon contenente 2,5 ml di PRP per 2 h;
- D. Risciacquo dei campioni con soluzione NaCl (0,9%=0,9g/100ml);
- E. Fissaggio con soluzione al 2,5% di gluteraldeide in tampone PBS per 4 h;
- F. Deidratazione dei campioni con soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti (10,20,40,50,60,80,90,100%);
- G. Raffreddamento in congelatore a bassa pressione fino a -80°C per 30 minuti;
- H. Liofilizzazione per 16 h.

Il PRP (Platelet-rich plasma) è stato precedentemente preparato da un laboratorio esterno seguendo il protocollo “PRP method” e compiendo la prima centrifugazione (soft) a 2200g/min per 5 minuti e la seconda centrifugazione (hard) a 400g/min per 5 minuti [73].

I campioni, in seguito, sono stati rivestiti con uno strato di oro per poter effettuare l’analisi qualitativa dell’adesione piastrinica al SEM.

### **6.2.7 Analisi statistica**

Durante questo studio, sono stati effettuati dei test statistici tramite il programma Office Excel. Per quanto riguarda i dati relativi alla rugosità (Ra,Rt) ed all’angolo di contatto è stato utilizzato un test t di Student per confrontare i diversi campioni, mentre per la valutazione dei dati di uno stesso campione si è ritenuto opportuno accompagnare i valori di media e deviazione standard con un intervallo di valori plausibili per quel parametro, utilizzando un livello di confidenza del 95%.



## **Capitolo 7**

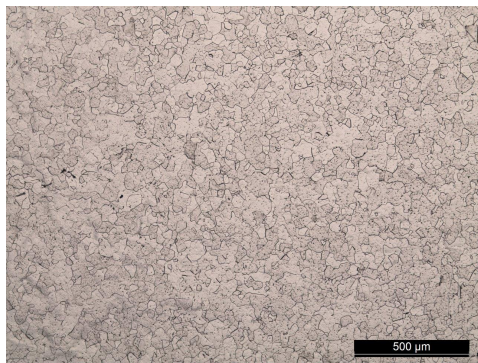
### **Risultati**

## 7.1 Metallografia

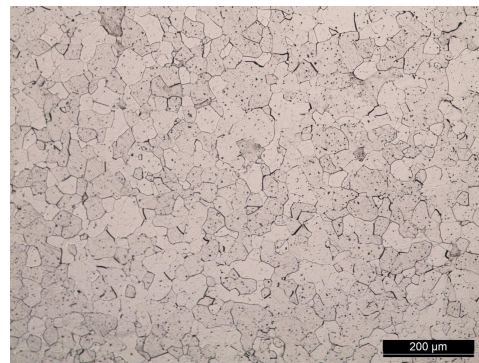
Dall'analisi metallografica del campione TQ si è ricavata una serie d'immagini raggruppate in figura 7.1. Le immagini sono state scattate con ingrandimenti a 50X (A), 100X (B) e 200X (C).

Nelle immagini A) e B) si può notare come la lega sia costituita da molti grani di varie dimensioni, forma e orientazioni.

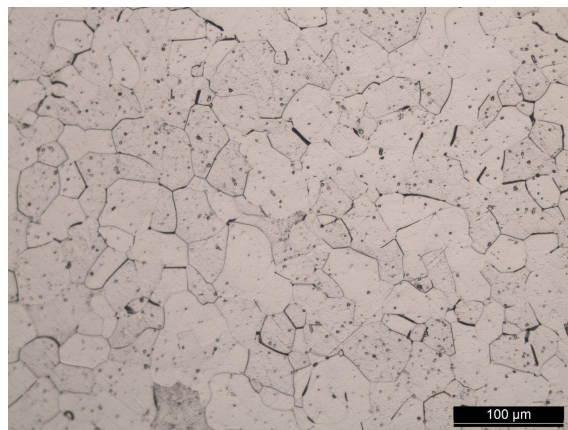
Osservando l'immagine C) si nota che la granulometria media è di 50-100  $\mu\text{m}$ , che la lega è formata da una sola fase ( $\beta$ ) e possiede bordi grano prevalentemente sottili; i bordi grano più spessi sono associati all'evoluzione delle dislocazioni [20].



A)



B)



C)

Figura 7.1 Immagini relative all'analisi metallografica del campione TQ: A)Ingrandimento 50X; B) Ingrandimento 100X; C)Ingrandimento 200X.

## 7.2 Elettrolucidatura

Per definire al meglio i parametri di elettrolucidatura per il titanio TLM e per la lega Co-Cr, ci siamo affidati ad un'analisi allo stereomicroscopio. La serie d'immagini nelle figure 7.2 e 7.3 (tutte ad ingrandimenti 25X) mostrano rispettivamente i campioni di titanio TLM e di Co-Cr trattati con differenti parametri.

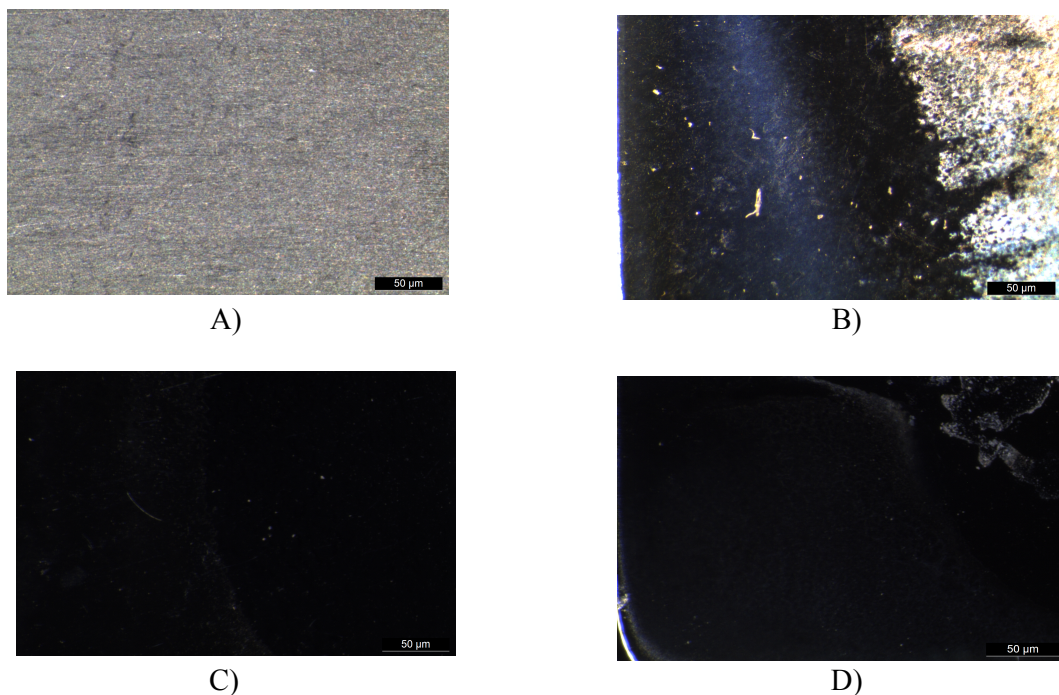


Figura 7.2 Immagini allo stereomicroscopio dei campioni di titanio TLM con diversi trattamenti: A) Non trattato; B) Trattato a 60V per 5 min; C) Trattato a 70 V per 5 min; D) Trattato a 70V per 15 min.

Nella figura 7.2 si può vedere che il trattamento di elettrolucidatura sui campioni di titanio TLM agisce già con voltaggi di 60V; infatti, da un confronto fra l'immagine A e B possiamo vedere come il campione elettrolucidato presenti zone lucide. Confrontando l'immagine B (60V) e C (70V), invece, si può vedere che i due trattamenti danno risultati diversi, in termini di omogeneità di trattamento. Analizzando le immagini C (5 min) e D (15 min), entrambe di campioni trattati a 70V ma con tempi differenti, possiamo notare che i due trattamenti danno ottimi risultati in termini di superfici lucide ed omogenee.

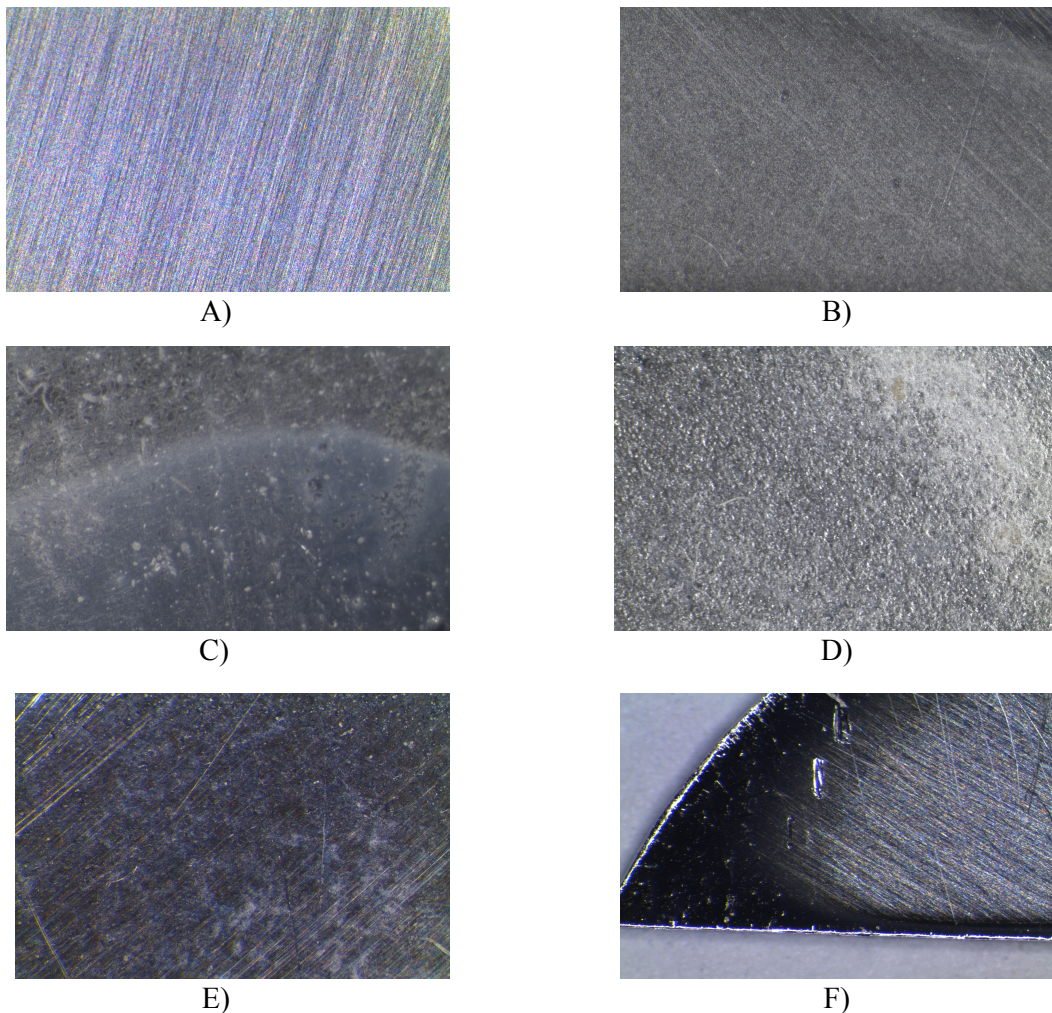


Figura 7.3 Immagini allo stereomicroscopio dei campioni di lega Co-Cr con diversi trattamenti: A) Non trattato; B) Trattato a 15V per 20 min; C) Trattato a 20 V per 3 min; D) Trattato a 20V per 10 min; E) Trattato a 10 V per 5 minuti F) Trattato a 10V per 3 minuti.

Nella figura 7.3 si può vedere come agisce il trattamento di elettrolucidatura sui campioni di Co-Cr; osservando le immagini A (non trattato) e B (15V per 20 min) si può vedere la differenza di morfologia superficiale tra campione trattato e non trattato. Passando alle immagini C e D, si nota come agisce il parametro tempo sul trattamento; mentre per tempi brevi (3 minuti) abbiamo una superficie abbastanza lucida, per tempi prolungati (20 minuti) la superficie presenta il fenomeno del pitting, ossia una morfologia ricca di piccoli danneggiamenti. Infine, analizzando le immagini E ed F, possiamo vedere che un voltaggio di 10V permette di ottenere superfici abbastanza uniformi; in particolare, il trattamento a 3 minuti permette di creare delle superfici lucide, anche se solamente sui bordi del campione.

### 7.3 Stereomicroscopio

Le analisi allo stereomicroscopio hanno portato come risultato le figure 7.4,7.5 scattate con ingrandimenti a 6X e 25X.

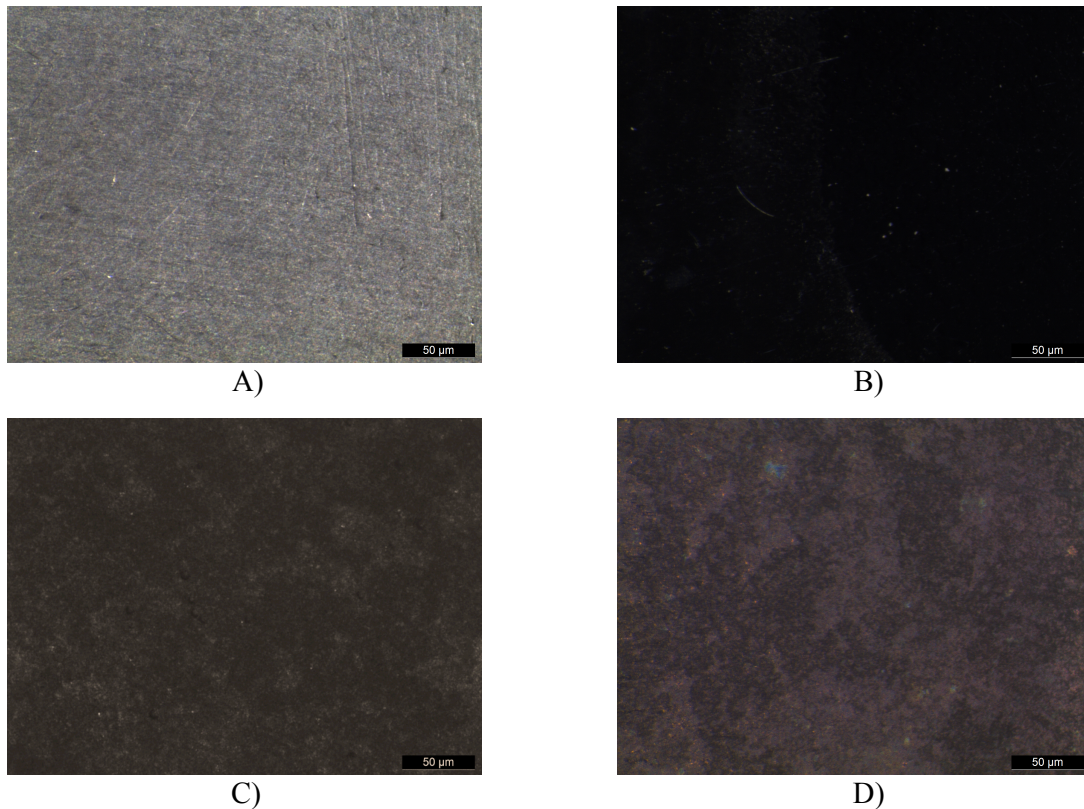


Figura 7.4 Immagini allo stereomicroscopio, con ingrandimento 25X, dei campioni: A)TQ; B)5; C)5ASD; D) 5ASDNa.

Osservando le immagini A e B di figura 7.4 (scattate con ingrandimento 25X) si può vedere come ci sia una differenza morfologica sostanziale tra il campione TQ (A) e il campione 5 (B), entrambi campioni di lega TLM. Nel campione elettrolucidato la morfologia appare liscia ed omogenea, a differenza del campione TQ, caratterizzato da presenza di solchi.

Per quanto riguarda le immagini C e D (rispettivamente campione 5ASD e 5ASDNa), possiamo osservare che la morfologia dei campioni non è poi così diversa tra di loro; tuttavia la loro morfologia differisce sia dal campione TQ, sia dal campione 5.

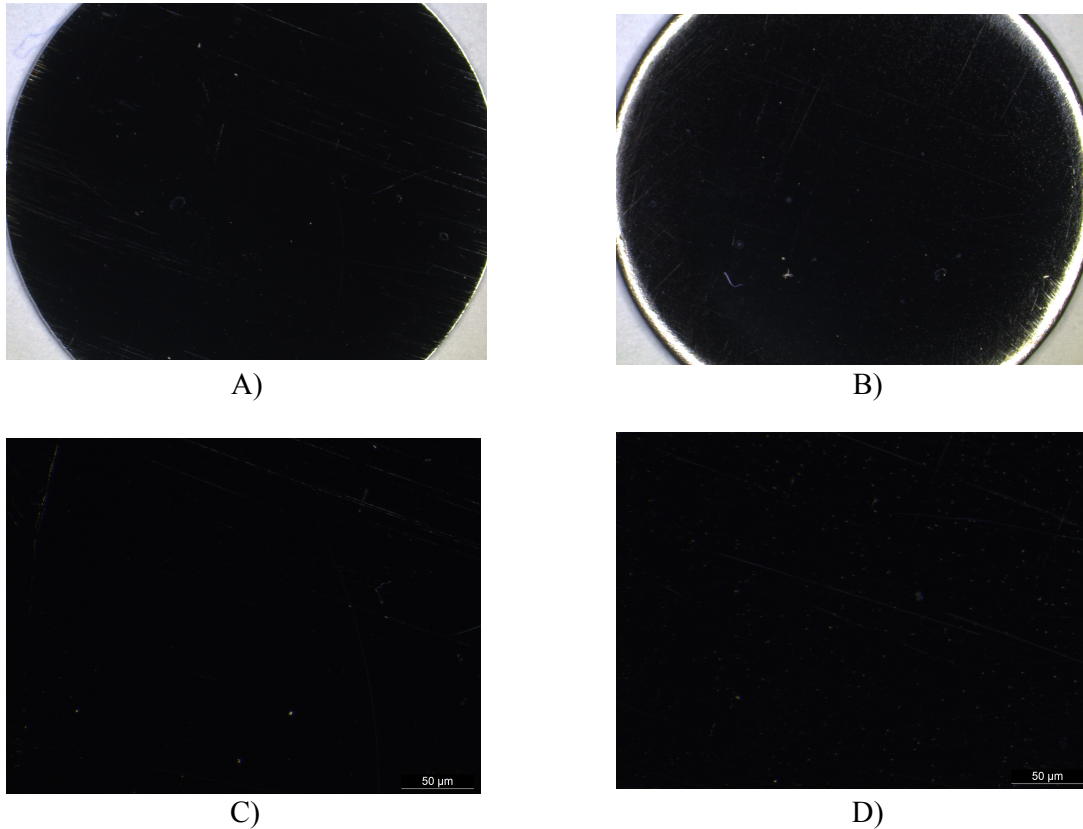


Figura 7.5 Immagini allo stereomicroscopio, con ingrandimenti 6X e 25X, dei campioni: A)Co-Cr (6X); B)Acciaio inox (6X); C)Co-Cr (25X); D) Acciaio inox (25X).

Per quanto riguarda la figura 7.5, il campione di Co-Cr L605 (immagini A e C) ha una morfologia pressoché uguale a quella del campione di acciaio inox AISI 316L (immagini B e D) sia ad ingrandimento 6X sia a 25X. Entrambi i campioni, lucidati meccanicamente al fine di ottenere una superficie omogenea e poco rugosa, sono stati analizzati per poter avere un confronto tra lega TLM e materiali già in uso per la fabbricazione di stent.

## 7.4 SEM

Le immagini scattate al SEM per caratterizzare la morfologia superficiale dei campioni sono raggruppate in figura 7.6 e 7.7.

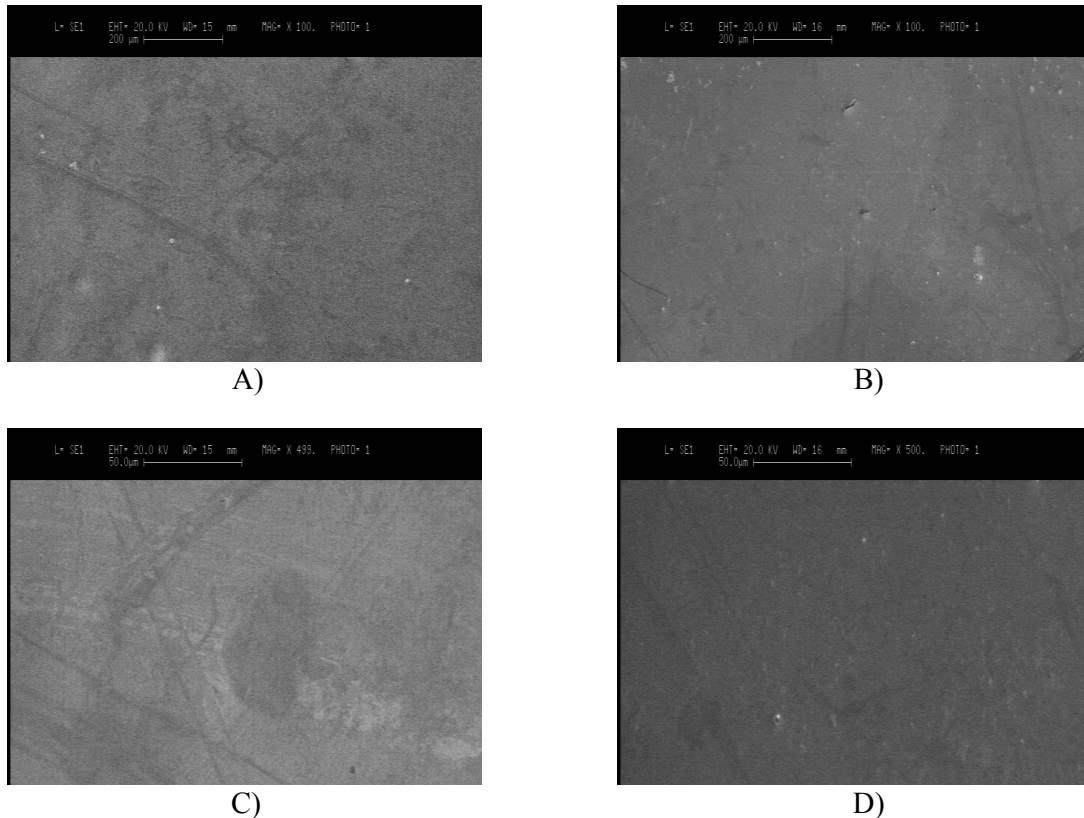
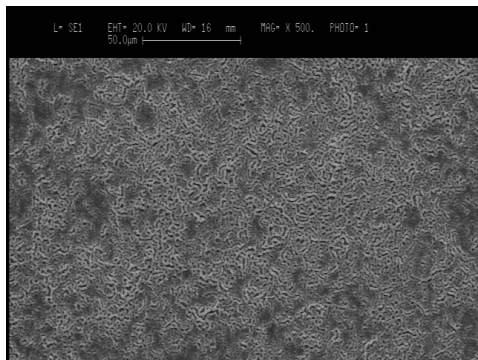
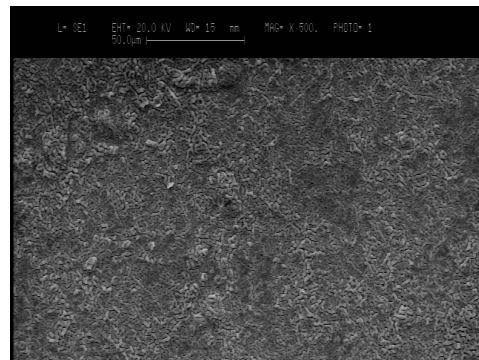


Figura 7.6 Immagini al SEM ad ingrandimento 100X (A e B) e 500X (C e D) per i campioni 5 (immagini a sinistra) e 15 (immagini a destra).

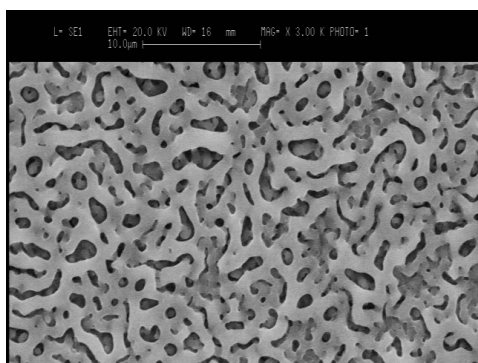
Osservando le immagini di figura 7.6, le cui immagini sono tutte scattate ad ingrandimenti sia 100X (A e B) sia 500X (C e D), possiamo notare i risultati del processo di lucidatura della lega TLM. Confrontando le immagini A e C (campione 5) e B e D (campione 15), possiamo notare che è presente una piccola differenza morfologica provocata dal diverso tempo di trattamento. Infatti, il campione trattato per un tempo di 5 minuti presentano ancora dei segni superficiali ben visibili derivanti dal processo di formazione del campione; al contrario, il campione elettrolucidato per 15 minuti presentano una morfologia superficiale pressoché liscia ed uniforme, soprattutto ad ingrandimento 500X.



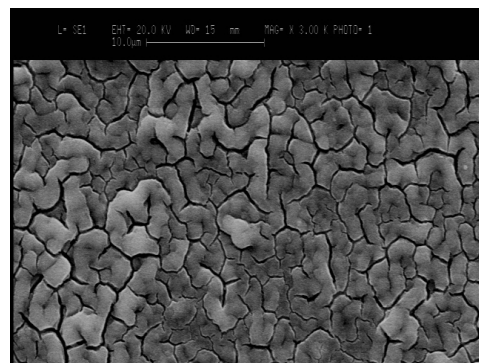
A)



B)



C)



D)

Figura 7.7 Immagini al SEM ad ingrandimento 100X (A e B), 500X (C e D) e 3000X (E ed F) per i campioni 5ASD (immagini a sinistra) e 5ASDNa (immagini a destra).

Passando ad osservare la serie d'immagini di figura 7.7, riguardanti il campione 5ASD (immagini di sinistra) e il campione 5ASDNa (immagini di destra), si possono notare differenze morfologiche. Anche se nelle immagini ad ingrandimenti 100X (A e B) non si notano differenze morfologiche, nelle immagini ad ingrandimenti maggiori (500X le immagini C e D, 3000X le immagini E ed F) queste differenze sono riscontrabili. Infatti, nel campione 5ASDNa si nota una struttura più compatta, ricca di fratture e priva di pori di piccole dimensioni; il campione 5ASD mostra una morfologia più porosa, con pori di dimensioni pressoché comprese tra 0,5 e 4 $\mu$ m.



## 7.5 EDS

È riportato in figura 7.8 lo spettro del campione 5ASD. Nello spettro si possono notare i picchi di titanio (Ti) e niobio (Nb), elementi componenti la lega, e i picchi di silicio (Si), fosforo (P) e calcio (Ca), elementi dopanti depositati sulla superficie del campione grazie al trattamento di ASD. Il picco di ossigeno (O) è dovuto allo strato di ossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) che ricopre la superficie del campione. Le frecce indicano i picchi, relativi ai singoli elementi, più visibili.

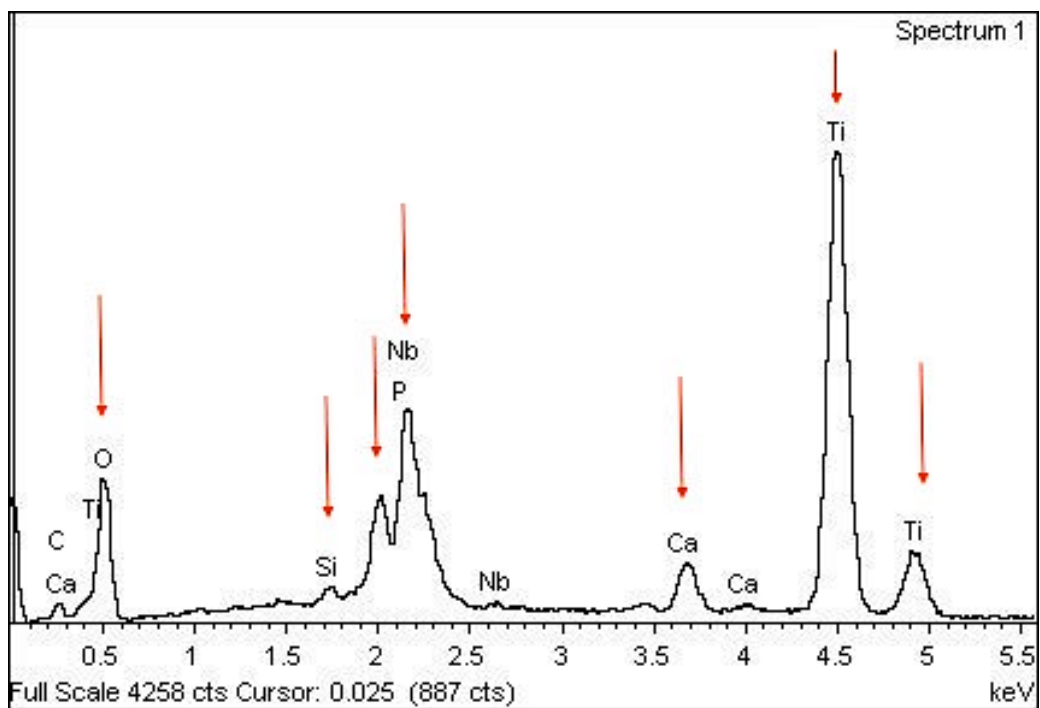


Figura 7.8 Analisi EDS del campione di lega di titanio TLM sottoposto ad elettrolucidatura per 5 minuti e a successivo trattamento di ASD (5ASD).

## 7.6 Profilometria

In tabella 7.1 sono riassunti i valori di rugosità media (Ra), altezza massima del profilo (Rt) e curtosi (K), con le rispettive deviazioni standard, dei campioni analizzati.

Le figure 7.9, 7.10 e 7.11 mostrano gli istogrammi dei parametri precedenti.

Campione	Ra (nm)	Rt (nm)	K
TQ	316±24	2775±457	3,205±0,322
Na	1085±318	11363±2216	5,446±1,234
5	180±29	1453±701	5,583±4,429
15	23±12	429±181	17,694±10,443
5ASD	1116±349	11175±4165	4,772±0,958
5ASDNa	464±74	4372±533	4,282±0,636
Acciaio inox	22±4	261±111	5,773±3,851
Co-Cr	27±8	264±14	7,105±3,156

Tabella 7.1 Riassunto dei valori Ra,Rt e K (media e deviazione standard) dei campioni analizzati.

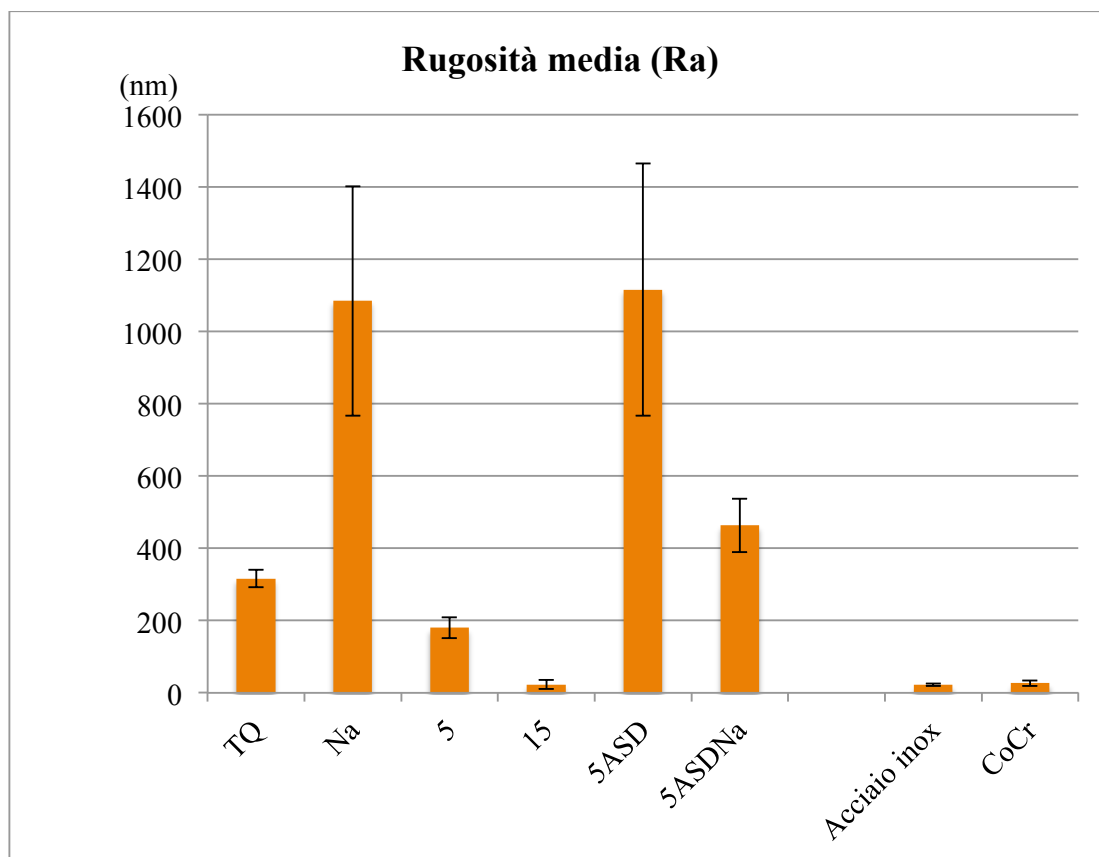


Figura 7.9 Istogramma del parametro di rugosità media (Ra) dei campioni analizzati.

Osservando il parametro Ra per i campioni TQ ( $316\pm 24\text{nm}$ ), 5 ( $180\pm 29\text{nm}$ ) e 15 ( $23\pm 12\text{nm}$ ), possiamo dire che il trattamento di elettrolucidatura porta ad una diminuzione proporzionale di questo parametro rispetto al tempo di trattamento; inoltre, attraverso l'analisi statistica, è possibile affermare che la differenza fra le medie osservate è significativa ( $p < 0,05$ ). Dal confronto tra i valori di rugosità del campione 5 e del campione 5ASD, possiamo inoltre valutare l'azione del trattamento di ASD sui campioni elettrolucidati; si nota, infatti, che il trattamento aumenta la rugosità del campione, e l'analisi statistica denota una differenza significativa tra i valori medi ( $p < 0,05$ ). Passando all'osservazione dei valori dei campioni 5ASD ( $1116\pm 349\text{nm}$ ) ed 5ASDNa ( $464\pm 74\text{nm}$ ) e così valutare l'azione della mordenzatura alcalina, possiamo rilevare che questo trattamento diminuisce la rugosità, con una differenza tra i valori medi statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Al contrario, valutando statisticamente la differenza tra i campioni 15, acciaio inox ( $22\pm 4\text{nm}$ ) e Co-Cr ( $27\pm 8\text{nm}$ ), si può rilevare come non sia presente una differenza molto significativa ( $p < 0,01$ ), il che ci permette di equiparare, in termini di rugosità media, il campione così elettrolucidato a quelli relativi ai materiali utilizzati come confronto.

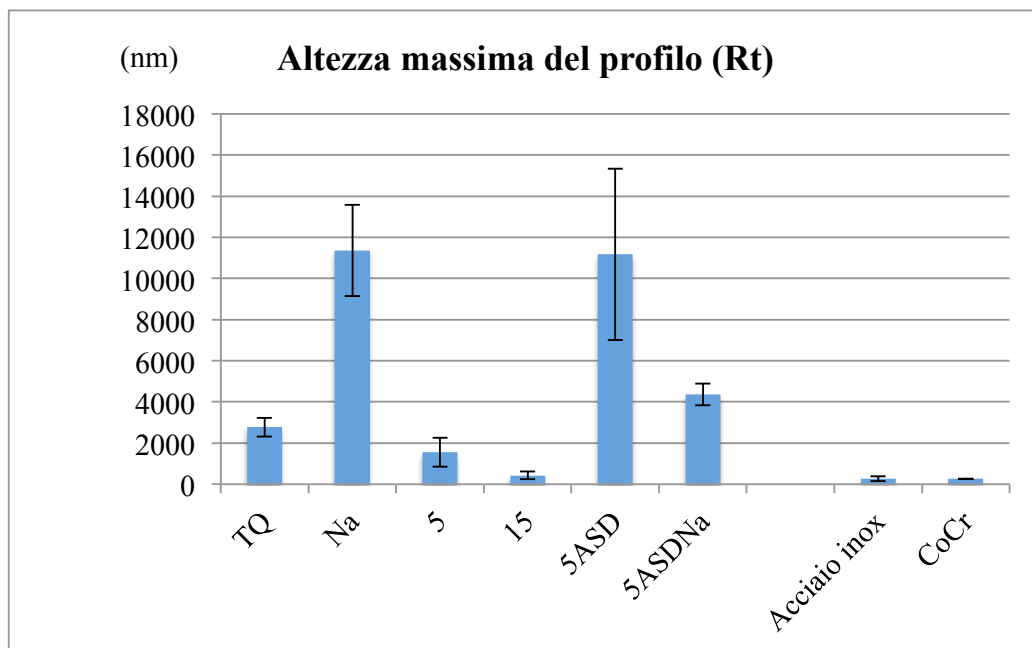


Figura 7.10 Istogramma del parametro di altezza massima del profilo (Rt) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.

Passando alla figura 7.10 possiamo notare che il parametro  $R_t$  segue all'incirca l'andamento del parametro  $R_a$ . Infatti i campioni 15 ( $429\pm 181\text{nm}$ ), acciaio inox ( $261\pm 111\text{nm}$ ) e Co-Cr ( $264\pm 14\text{nm}$ ) risultano essere quelli con il valore medio più basso e, come in precedenza, la differenza fra le medie osservate non è statisticamente molto significativa ( $p < 0,01$ ).

Se invece osserviamo il campione TQ ( $2775\pm 457\text{nm}$ ) e, al fine di valutare l'elettrolucidatura, lo confrontiamo statisticamente con i campioni 5 ( $1543\pm 701\text{nm}$ ) e 15, possiamo affermare che la differenza fra le medie è significativa ( $p < 0,05$ ).

Per valutare gli effetti del trattamento di ASD, confrontiamo, come in precedenza, i valori dei campioni 5 e 5ASD ( $11175\pm 4165\text{nm}$ ); dall'analisi statistica risulta che esiste una differenza significativa tra le medie ( $p < 0,05$ ).

Anche per questo parametro, come già riscontrato per il valore  $R_a$ , il campione 5ASD e 5ASDNa ( $4372\pm 533\text{nm}$ ) possiedono differenze tra i valori medi statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) il che ci permette di verificare l'effetto di diminuzione della rugosità dovuto al trattamento di mordenzatura alcalina.

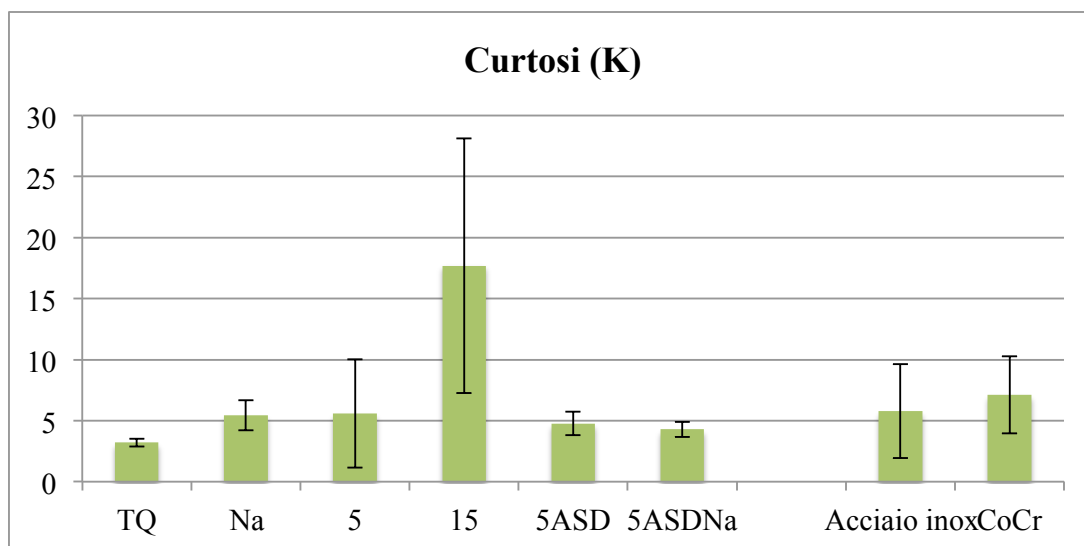


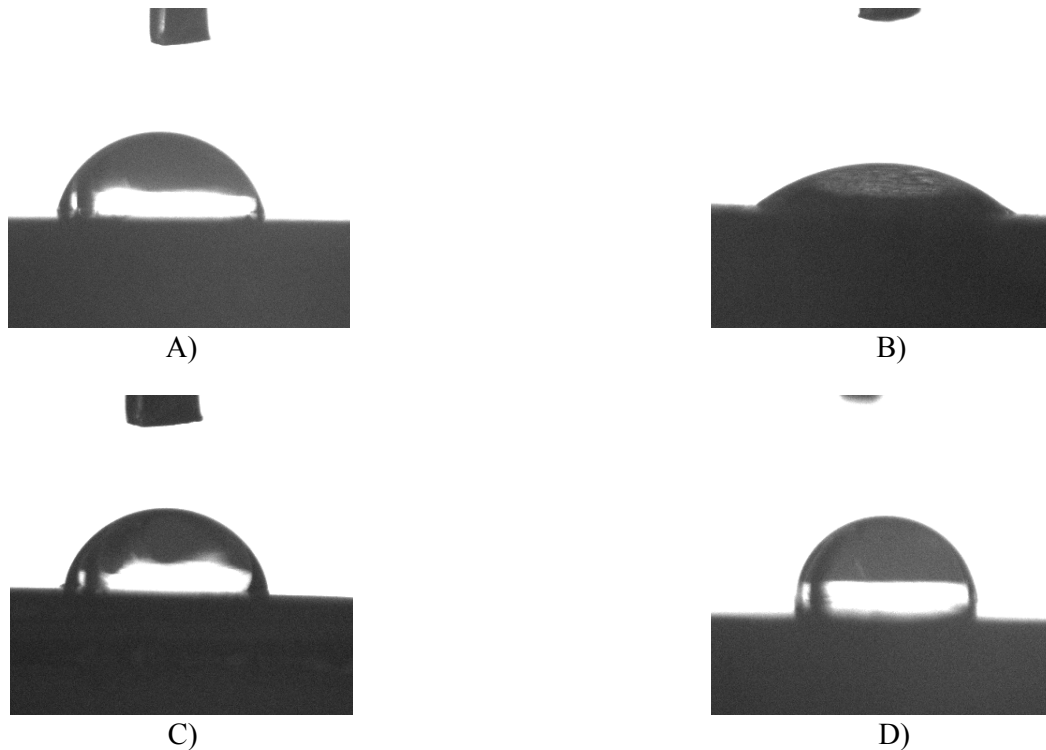
Figura 7.11 Istogramma del parametro di curtosi (K) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.

Nella figura 7.11 è rappresentato il parametro di curtosi rilevato durante le misurazioni profilometriche. In particolare, questo coefficiente risulta non avere significative differenze ( $p < 0,05$ ) fra le medie dei campioni Na ( $5,446\pm 1,234$ ), 5 ( $5,583\pm 4,429$ ), 5ASD ( $4,772\pm 0,958$ ), 5ASDNa ( $4,282\pm 0,636$ ), acciaio inox ( $5,773\pm 3,851$ ) e Co-Cr

(7,105±3,156). Al contrario, l'analisi statistica sui campioni TQ (3,205±0,322) e 15 (17,694±10,443) denota differenze significative con gli altri campioni ( $p < 0,05$ ). In particolare, il campione 15 ha un valore di curtosi elevato, che indica la presenza di una morfologia molto appuntita.

## 7.7 Angolo di contatto

Nella serie d'immagini di figura 7.12 si possono osservare le fotografie della goccia d'acqua sui campioni. Da queste immagini possiamo notare come i campioni più bagnabili (immagini B, E e F) hanno profili di gocce ellittici; in particolare nell'immagine F, a causa del bassissimo angolo di contatto, non si riesce a distinguere l'interfaccia goccia/campione. Al contrario, i campioni con bagnabilità inferiore (angolo contatto più alto) presentano gocce dalla morfologia più sferica.



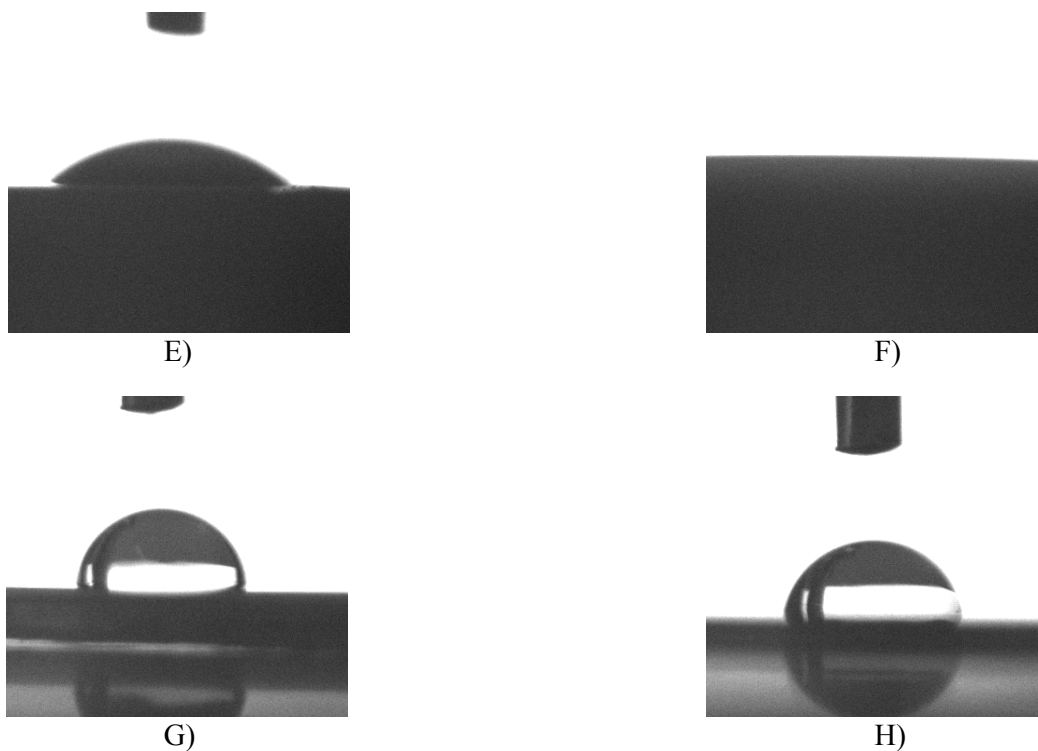


Figura 7.12 Immagini della goccia depositata sui vari campioni: A) TQ; B) Na; C) 5; D) 15; E) 5ASD; F) 5ASDNa; G) Acciaio inox; H) Co-Cr.

La tabella 7.2 è riassuntiva dell'angolo di contatto statico medio (in °) e deviazione standard ( $\sigma$ ) dei campioni analizzati.

Campione	Angolo di contatto statico (°)
TQ	79,1±4,0
Na	69,9±5,4
5	83,8±7,1
15	90,5±9,5
5ASD	46,0±8,2
5ASDNa	8,1±4,1
Acciaio inox	87,4±7,3
Co-Cr	104,7±4,9

Tabella 7.2 Riassunto del valore di angolo di contatto statico (media e deviazione standard) dei campioni analizzati.

La figura 7.13 mostra gli istogrammi, comprensivi della deviazione standard, rappresentanti i parametri di angolo di contatto medio (in °) dei campioni analizzati con la tecnica della goccia sessile statica.

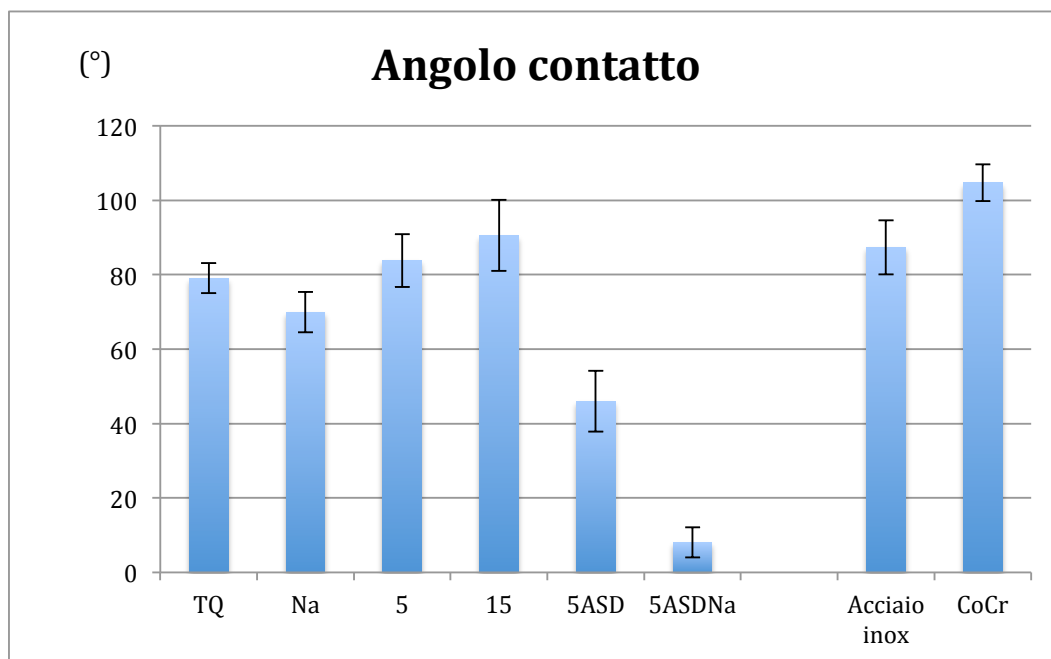


Figura 7.13 Istogramma del parametro di angolo di contatto (in °) dei campioni TQ, Na, 5, 15, 5ASD, 5ASDNa, Acciaio inox e CoCr.

Confrontando il valore medio dell'angolo di contatto per i campioni TQ ( $79,1 \pm 4,0^\circ$ ) e Na ( $69,9 \pm 5,4^\circ$ ), al fine di valutare il trattamento di mordenzatura, si nota che la differenza tra i valori medi è significativa ( $p < 0,05$ ). Anche il confronto fra i campioni 5ASD ( $46,0 \pm 8,2^\circ$ ) e 5ASDNa ( $8,1 \pm 4,1^\circ$ ), eseguito sempre per la verifica della mordenzatura, porta come risultato che la differenza fra le medie è significativa ( $p < 0,05$ ).

Lo stesso non possiamo affermare confrontando il valore medio del parametro di bagnabilità dei campioni di acciaio inox ( $87,4 \pm 7,3^\circ$ ), 5 ( $83,8 \pm 7,1^\circ$ ) e 15 ( $90,5 \pm 9,5^\circ$ ); infatti, i valori medi di questi campioni non presentano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). Questo confronto, come già avvenuto per la profilometria, è stato eseguito per valutare i diversi processi di lucidatura riguardanti i campioni.

Puntando l'attenzione sul campione lucidato meccanicamente di Co-Cr ( $104,7 \pm 4,9^\circ$ ), possiamo dire che la media del parametro di questo campione differisce significativamente ( $p < 0,05$ ) da tutte le altre; inoltre, come si può vedere dal grafico, possiede il parametro più elevato.

## 7.8 Adesione piastrinica

L'analisi al SEM dei campioni sottoposti a trattamento di adesione piastrinica ha permesso di osservare qualitativamente la morfologia delle piastrine adese ai campioni (fig. 7.14 e 7.15).

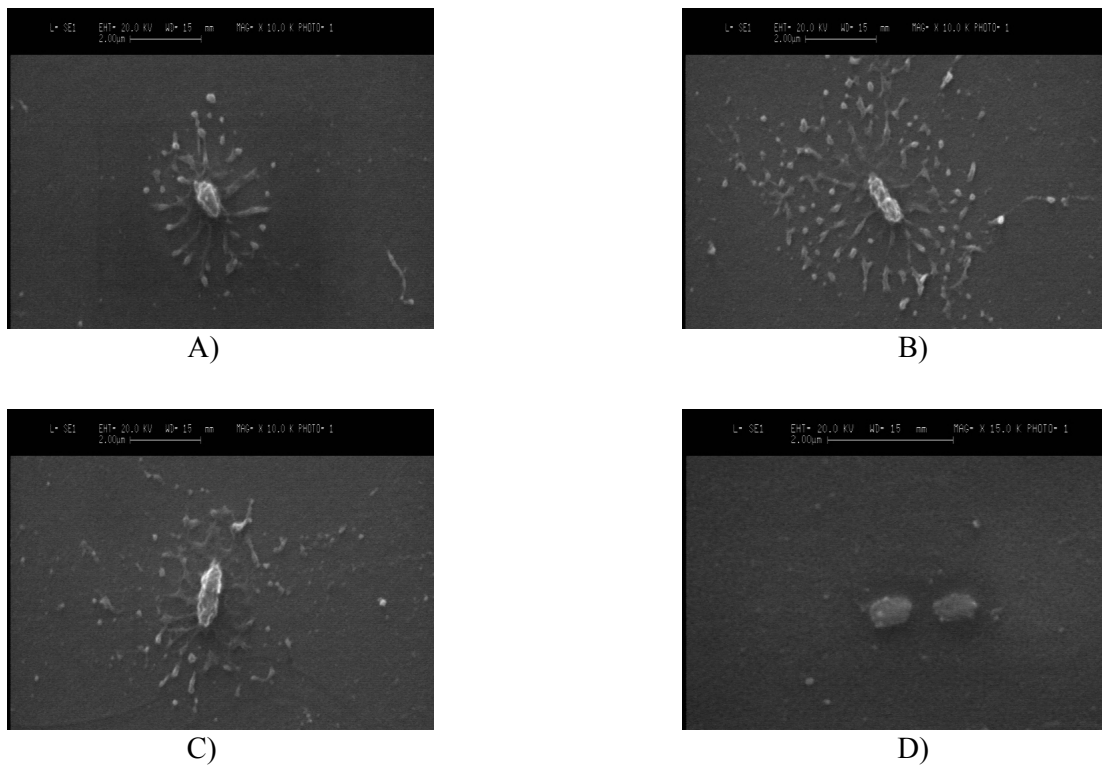


Figura 7.14 Immagini al SEM (ad ingrandimento 10000X) del campione 5 sottoposto al trattamento di adesione piastrinica.

Osservando la serie d'immagini in figura 7.14, scattate tutte ad ingrandimenti 10000X sul campione 5, possiamo notare che le piastrine adese sono isolate e presentano un corpo centrale (di circa 2  $\mu\text{m}$ ) con estroflessioni (immagini A,B e C); solamente nell'immagine D si notano due piastrine non isolate e senza estroflessioni, quindi con struttura puramente corpuscolare.



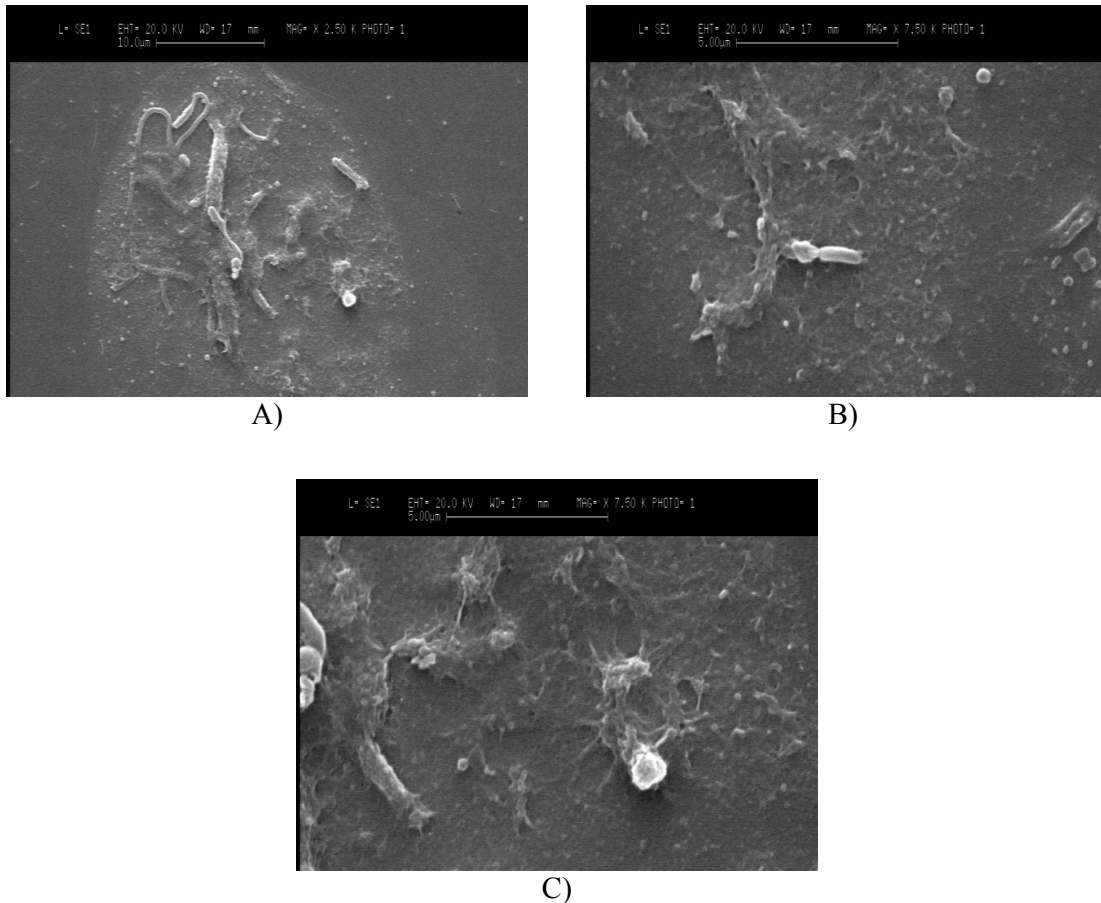


Figura 7.15 Immagini al SEM ad ingrandimento 2500X (A) e 7500X (B e C) sul campione in acciaio inox sottoposto al trattamento di adesione piastrinica.

Nella serie d'immagini 7.15, scattate con ingrandimenti a 2500X (A) e 7500X (B e C) sul campione di acciaio inox, possiamo notare la presenza di strutture più grandi rispetto al campione analizzato in precedenza, fatto probabilmente dovuto all'aggregazione piastrinica. Inoltre, in queste immagini possiamo notare che la morfologia delle piastrine è notevolmente cambiata; infatti, il corpo centrale e le estroflessioni non sono più ben distinguibili.

## **Capitolo 8**

### **Discussione**

Il presente lavoro di tesi è iniziato con lo scopo di verificare la fattibilità dell'esecuzione di un trattamento di elettrolucidatura e di un trattamento di ASD su una nuova ed innovativa lega  $\beta$  di titanio, la lega TLM, partendo da trattamenti già sviluppati sul titanio [71,74].

Si è iniziato dunque ad effettuare prove di elettrolucidatura su questa lega utilizzando una soluzione elettrolitica già nota per avere dato ottimi risultati sul titanio [64], mentre i parametri di processo, come la tensione, il tempo di trattamento e l'agitazione della soluzione, non erano ancora ben definiti. Dopo varie prove effettuate variando i precedenti parametri, i migliori risultati sono stati ottenuti per voltaggi di 70V ed agitazioni comprese tra i 150 e i 200 rpm. Per quanto riguarda il tempo di trattamento, si è visto che questo parametro produce la morfologia superficiale desiderata solamente per valori superiori o uguali ai 5 minuti; al di sotto di questo valore, infatti, il trattamento non produce superfici lisce ed uniformi, obiettivo di questo trattamento. Una superficie morfologicamente più liscia ed uniforme è meno soggetta ad aggregazione piastrinica ed adesione cellulare rispetto ad una superficie con rugosità più elevata [75].

Un altro fattore da tener presente è il notevole asporto di materiale che caratterizza la prova quando il tempo di trattamento è superiore ai 10 minuti; per valori maggiori, il trattamento diminuisce lievemente la rugosità fino al raggiungimento di un plateau (a 15 minuti circa) ma produce una considerevole perdita di materiale.

Al fine di mantenere le caratteristiche meccaniche e geometriche del campione, parametri molto importanti per un dispositivo cardiovascolare come lo stent, si è perciò scelto il miglior compromesso tra rugosità ottimale, paragonabile a quella di stent presenti sul mercato, e minor perdita di materiale; dunque il trattamento con tempo di 5 minuti. Per tale durata di trattamento, l'analisi allo stereomicroscopio e al SEM hanno confermato che l'elettrolucidatura ha agito in maniera uniforme e senza deformarne la geometria iniziale e andando ad eliminare efficacemente le imperfezioni presenti nei campioni non trattati, tutti obiettivi di questo trattamento.

Le analisi al profilometro hanno avvalorato questa scelta; infatti, nonostante non siano riscontrabili molte differenze morfologiche tra i campioni trattati con tempi differenti, come dimostrano i parametri  $R_a$  e  $R_t$  non significativamente differenti, sono riscontrabili delle diversità nella curvatura del profilo; il parametro, infatti, è peggiore per il campione trattato per 15 minuti, che risulta essere ricco di picchi e valli appuntite.

Il passo successivo, dopo la verifica di fattibilità dell'elettrolucidatura, la scelta dei parametri ottimali di processo e la produzione dei campioni lucidati, è stato quello di compiere il trattamento di ASD.

I parametri di processo di questo trattamento erano già stati oggetto di studio in un precedente lavoro di tesi al Politecnico di Milano [54] ed erano concepiti allo scopo di promuovere l'osteointegrazione attraverso la presenza nello strato superficiale di titanio di elementi chimici dopanti come il calcio, il fosforo e il silicio; da studi riguardanti il dopaggio della superficie con questi elementi [79] si è pensato ad un suo utilizzo anche in ambito cardiovascolare. Basandoci su quel lavoro, è stato scelto un set-up sperimentale con soluzione elettrolitica contenente elementi dopanti (calcio e fosforo) e come parametri di processo un'intensità di corrente costante di 30 mA e una tensione massima di 175V. L'analisi morfologica al SEM dei campioni così trattati ha confermato l'effettiva formazione di uno strato uniforme e poroso di ossido di titanio. Successivamente, l'analisi con EDS ha permesso di verificare la composizione dello strato ceramico creato con il trattamento di ASD sulla specifica lega di titanio TLM. L'analisi ha confermato la presenza, nella lega, dell'elemento niobio (Nb), presente in essa per il 25% [61,62]. Inoltre, con questa analisi, è stato possibile verificare l'efficacia del trattamento poiché sono stati rilevati, nello spettro, picchi di tutti gli elementi dopanti presenti nello strato ceramico.

Un ulteriore passo è stato quello di utilizzare una mordenzatura alcalina a caldo (con NaOH) sui campioni elettrolucidati e trattati con ASD in modo da arricchire lo strato superficiale ceramico neoformatosi con gruppi OH. La procedura è stata effettuata anche su un campione di lega di titanio TLM non trattato che è stato utilizzato come confronto.

In parallelo sono state effettuate delle prove sul trattamento di elettrolucidatura per campioni di Co-Cr L605, con lo scopo di definire al meglio i parametri di processo per questo trattamento. Questo materiale metallico, infatti, è ad oggi largamente utilizzato come stent cardiovascolare e serviva come campione di riferimento per la lega TLM.

In particolare, utilizzando un set-up sperimentale già messo a punto in precedenti lavori di tesi, si è cercato di trovare la soluzione elettrolitica, il range di tensione e il tempo ottimali per il trattamento di elettrolucidatura. Come primo passo, cambiando strada rispetto ad altri studi [66], si è deciso di modificare la soluzione elettrolitica; infatti, una delle soluzioni più citate in letteratura non permetteva un trattamento soddisfacente e ripetibile [66]. Quindi, dopo aver scelto la nuova soluzione elettrolitica, si è passati alla definizione dei parametri.

Il primo ad essere analizzato è stato il voltaggio, in quanto, è noto che questo condizioni pesantemente il trattamento. Infatti, il processo di elettrolucidatura avviene correttamente solo all'interno di un determinato range di tensione [56], dipendente dal materiale da rifinire. Le prove hanno portato all'individuazione di questo range: la zona di ottimo della prova è compresa tra i 5 e i 15V; infatti, campioni trattati con tensioni più alte hanno portato al fenomeno del pitting, cioè erosione localizzata del materiale dovuta a corrosione, mentre tensioni al di sotto di questo range hanno dato come risultato un etching del materiale.

Successivamente si è studiato l'effetto del tempo; mantenendo costante la tensione applicata, sono state effettuate prove con tempo crescente osservando che, come ci si poteva aspettare, l'asporto del materiale è direttamente proporzionale a questo parametro. Dopo varie prove, si è determinato che il range di durata migliore è tra i 2 e i 5 minuti. Tuttavia, tutte le prove hanno portato ad una buona riuscita del trattamento solamente sui bordi del campione, mentre la zona centrale non veniva interessata. Si è dunque provato a cambiare l'afferraggio del campione: sono state provate diverse geometrie e diversi tipi di contatto, puntuali o più estesi, e anche diversi tipi di materiale, come il titanio e l'acciaio, per verificare l'influenza di diversi set-up sul trattamento. È stata inoltre valutata l'influenza del catodo metallico, sia come geometria, passando da un cilindro a rete a due lastre, sia come distanza dall'anodo, per cercare di omogeneizzare le linee di corrente agenti durante il trattamento.

Inoltre, sono state fatte prove a diversi gradi di agitazione della soluzione ed è stato confermato quanto era presente in letteratura [65,67], ovvero che questo parametro ha un range ottimale di 250-375 rpm.

Tuttavia, questi cambiamenti di set-up non hanno dato gli esiti desiderati in termini di omogeneità e rugosità della superficie e si è dunque deciso di lucidare i campioni in modo differente, così da avere comunque dei campioni di confronto aventi parametri di rugosità paragonabili a quelli degli stent attualmente in commercio. Per fare ciò è stata scelta una lucidatura meccanica, la lappatura, utilizzata per creare anche campioni di acciaio inox AISI 316L, un altro materiale metallico usato ad oggi per la produzione di stent.

Per quello che concerne le prove di analisi, la prima ad essere effettuata è stata la metallografia, così da conoscere più a fondo la microstruttura della lega cardine del

progetto. Come si presupponeva, questa lega è formata da una sola fase microstrutturale, la fase  $\beta$  [71]; inoltre, dall'analisi è stato possibile ricavare la grandezza media dei grani, compresa nel range 50-100  $\mu\text{m}$ , e notare che questi sono abbastanza omogenei dal punto di vista delle dimensioni.

Un ulteriore parametro analizzato è stato l'angolo di contatto statico per fare una valutazione generale della bagnabilità dei campioni, caratteristica che influenza l'adesione cellulare ed è direttamente correlata alla rugosità. Una superficie morfologicamente liscia ed uniforme, infatti, è più idrofobica rispetto ad una ruvida ed irregolare, e ciò contribuisce alla diminuzione dell'adesione piastrinica e cellulare in generale. Dal confronto tra i campioni analizzati, si può osservare che quelli trattati con l'elettrolucidatura, o lucidati meccanicamente, hanno dei valori di angolo di contatto più elevati, indice di una minor bagnabilità. I campioni trattati con tecnica ASD, e soprattutto quello con mordenzatura alcalina, invece, restituiscono valori di angolo di contatto bassi; questo è dovuto al fatto che le superfici trattate con questa modifica, come già detto, presentano sulla superficie gruppi chimici che le rendono più bagnabili.

L'ultima parte della tesi ha visto l'esecuzione di una prova biologica preliminare di adesione piastrinica, effettuata basandosi su lavori presenti in letteratura [72], sui campioni di lega TLM, acciaio inox e lega Co-Cr; la valutazione qualitativa della morfologia è stata possibile grazie all'analisi al SEM. Quest'analisi è risultata abbastanza difficoltosa sia sui campioni lucidati, sia sui campioni rugosi, per la scarsa possibilità di distinzione tra piastrine e struttura sottostante.

Osservando il campione di titanio TLM elettrolucidato 5 minuti, si è visto che le piastrine adese sono per lo più isolate e presentano un corpo centrale, di dimensioni confrontabili a quelle rilevate in altri studi [72], e la presenza di estroflessioni che solo in pochi casi sono assenti.

Al contrario, sul campione di acciaio inox, è stato possibile notare la presenza di strutture di dimensioni maggiori rispetto al campione analizzato in precedenza; questo è dovuto probabilmente all'aggregazione piastrinica. Infatti, in queste immagini possiamo notare anche una morfologia delle piastrine notevolmente differente: il corpo centrale e le estroflessioni non sono più ben distinguibili.

Negli altri campioni analizzati al SEM non è stato possibile rilevare con certezza la presenza di piastrine, da sole o in aggregato, e quindi caratterizzare la morfologia di tale componente corpuscolata; questo può essere dovuto ad una preparazione del PRP non ottimale o alle caratteristiche dei campioni utilizzati.

## **Capitolo 9**

### **Conclusione e prospettive future**



Lo scopo del presente lavoro di tesi è la verifica di fattibilità dell'esecuzione del trattamento di elettropolishing e del trattamento di ASD su una nuova ed innovativa lega  $\beta$  di titanio ed in seguito caratterizzarla con dei test specifici per un suo utilizzo futuro in ambito cardiovascolare, confrontando i risultati con quelli dei più comunemente usati acciaio inox e lega CoCr.

Il primo obiettivo di questo lavoro è la definizione dei parametri di processo migliori per l'elettrolucidatura del titanio TLM, oltre che la verifica dell'efficacia di tale trattamento per un possibile futuro impiego nel settore biomedicale cardiovascolare. I risultati delle prove sperimentali hanno permesso di individuare i parametri di trattamento che consentono di ottenere risultati ripetibili ed omogenei sia in termini di uniformità di trattamento sia di rugosità; in particolare è stato evidenziato che i parametri ottimali di trattamento sono una durata di 5 minuti, una tensione di 70V e un'agitazione a 175 rpm.

Pensando al potenziale utilizzo di tale processo di elettrolucidatura a livello industriale, quindi, è possibile concludere che questo trattamento fornisce un metodo di finitura superficiale del titanio TLM che garantisce risultati omogenei e ripetibili, oltre a richiedere poche risorse economiche e di tempo. L'elettrolucidatura, oltre a garantire un substrato ottimale (con rugosità submicrometrica, ovvero di decine di nm) su cui compiere altri processi di modifica superficiale, permette la dissoluzione delle bave di lavorazione create durante la produzione degli stent, che spesso avviene per taglio laser, senza andare a deformarne la complessa geometria 3D. Anche per questo motivo, quindi, il trattamento di elettrolucidatura è utilizzato oggi come gold standard in alternativa ai processi di finitura meccanica che non risultano particolarmente adatti ad un utilizzo su dispositivi biomedici impiantabili [76].

Un altro obiettivo di questa tesi è la verifica di fattibilità del processo di Anodic Spark Deposition, precedentemente messo a punto per l'applicazione in ambito ortopedico, in seguito al trattamento di elettrolucidatura. Dallo studio della combinazione dei due trattamenti sono emersi dei buoni risultati; l'ASD infatti, pur aumentando la rugosità del campione con la formazione di uno strato di ossido di titanio che aumenta la bagnabilità, potrebbe portare buone risposte in termini di emocompatibilità [77,78], grazie agli elementi dopanti presenti sulla superficie neodeposta, come evidenziato da studi su materiali contenenti un film superficiale con calcio e fosforo [79], elementi depositi in questo progetto.

In conclusione, quindi, si può affermare la possibilità di un futuro utilizzo in serie dei trattamenti di elettrolucidatura ed ASD sulla lega  $\beta$  di titanio TLM.

Dal confronto con i campioni di acciaio inossidabile e di Co-Cr, materiali attualmente sul mercato per la produzione di stent metallici, sono emerse le buone caratteristiche del lega  $\beta$  di titanio TLM. Questo trattamento, infatti, ha permesso l'ottenimento di una rugosità media paragonabile a quella delle leghe di confronto e un valore di angolo di contatto paragonabile a quello dell'acciaio inox.

Per approfondire lo studio di tale lega innovativa, in futuro si potrebbero effettuare test su campioni con geometria e dimensioni simili agli stent fabbricati con taglio laser. Inoltre, per verificare l'effettiva efficacia dei trattamenti di elettrolucidatura e ASD sulla lega TLM e confermare l'ipotesi di buona emocompatibilità, fatte alla luce dei risultati di rugosità e bagnabilità della superficie del materiale e su risultati di studi passati [76,77,78], si potrebbero eseguire più ampie prove biologiche in vitro in modo da rivalutare l'adesione piastrinica, visti i risultati non ottimali ottenuti in questo lavoro, e valutare i fenomeni di adesione cellulare; entrambi i fenomeni, infatti, interessano l'utilizzo degli stent cardiovascolari. Per quanto riguarda lo studio relativo al trattamento di ASD in particolare, si potrebbe valutare la possibilità di modificare e ottimizzare ulteriormente il dopaggio in modo specifico per l'utilizzo di stent, con elementi che garantiscano la migliore integrazione tissutale tra impianto e pareti dei vasi.

## Bibliografia

- [1] F. H. Martini, M. J. Timmons, R. B. Tallisch, *Anatomia umana*, quinta edizione, Edises, 2012.
- [2] K. B. Chandran, S.E. Rittgers, A.P. Yoganathan, *Biofluid Mechanics: The Human Circulation*, seconda edizione, CRC Press, 2012.
- [3] A.Redaeli, F.Montevecchi, *Biomeccanica. Analisi multiscala dei tessuti biologici*, Patron Editore, 2007.
- [4] J. B. Park, R. S. Lakes, *Biomaterials : an introduction*, seconda edizione, New York: Plenum press, 1992.
- [5] R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi ed organi artificiali*, Pàtron editore, 1996
- [6] J. Black, *Biological performance of materials : fundamentals of biocompatibility*, quarta edizione, CRC Press, 2005.
- [7] Ali F. AbuRahma, Mark C. Bates, Patrick A. Stone and John T. Wulu, *Comparative study of operative treatment and percutaneous transluminal angioplasty/stenting for recurrent carotid disease*, Charleston, WVa.
- [8] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons, *A History of Biomaterials*, Biomaterials Science, 2013, terza edizione.
- [9] Yuexuan Wang, Hong Yi, and Zhonghua Ni, *Computational Biomechanics and Experimental Verification of Vascular Stent*, 2005.
- [10] A. L. Ong, J. Aoki, E. McFadden, P. Serruys, *Classification and current treatment options of in-stent restenosis*. Herz, 2004.
- [11] Feroze Nazneen, Gregoire Herzog, Damien W.M. Arrigan, Noel Caplice, Pasquale Benvenuto, Paul Galvin, Michael Thompson, *Surface chemical and physical modification in stent technology for the treatment of coronary artery disease*, 2012.
- [12] Taylor A. Metals. In: Sigwart U, editor. *Endoluminal stenting*. London: W.B. Saunders Company Ltd; 1996. p. 28–33.
- [13] Köster R, Sommerauer M, Kahler J, Baldus S, Meinertz T, Hamm CW, et al. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet* 2000;356(9245):1895–7.
- [14] Kereiakes D, Cox D, Hermiller J, Midei M, Bachinsky W, Nukta E, et al. Usefulness of a cobalt chromium coronary stent alloy. *Am J Cardiol*.

- [15] Sumita M, Teoh SH. Durability of metallic implant materials. In: Teoh SH, editor. Engineering materials for biomedical applications. Singapore: World Scientific Publishing Co; 2004. p. 2-1-2-31.
- [16] Stoeckel D, Pelton A, Duerig T. Self-expanding nitinol stents: material and design considerations. *Eur Radiol* 2004;14(2):292-301.
- [17] Teitelbaum G, Raney M, Carvlin M, Matsumoto A, Barth K. Evaluation of ferromagnetism and magnetic resonance imaging artifacts of the Strecker tantalum vascular stent. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1989;12(3):125-7.
- [18] Hijazi Z, Homoud M, Aronovitz M, Smith J, Faller G. A new platinum balloon-expandable stent (Angiostent) mounted on a high pressure balloon: acute and late results in an atherogenic swine model. *J Invas Cardiol* 1995;7(5):127-34.
- [19] Bhargava B, Scheerder ID, Ping Q, Yanming H, Chan R, Kim HS, et al. A novel platinum-iridium, potentially gamma radioactive stent: evaluation in a porcine model. *Cathet Cardiovasc Interv* 2000;51(3):364-8.
- [20] Herman RA, Rybnikar A, Resch A, Marki B, Alt E, Stemberger A. Thrombogenicity of stainless steel coronary stents with a completely gold coated surface. *JACC* 1998; Suppl.(Feb):413A.
- [21] Dahl JRV, Haager PK, Grube E, Gross M, Beythien C, Kromer EP, et al. Effects of gold coating of coronary stents on neointimal proliferation following stent implantation. *Am J Cardiol* 2002;89 (7): 801-5.
- [22] Danzi G, Capuano C, Sesana M, Blasi AD, Predolini S, Antonucci D. Patterns of in-stent restenosis after placement of NIR goldcoated stents in unselected patients. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002;55 (2):157-62.
- [23] Seliger C, Schwennicke K, Schaffar C. Influence of a rough, ceramic-like stent surface made of iridium oxide on neointimal structure and thickening. *Eur Heart J* 2000;21 (Suppl.):286.
- [24] Zhao Z-H, Sakagami Y, Osaka T. Toxicity of hydrogen peroxide produced by electroplated coatings to pathogenic bacteria. *Can J Microbiol* 1998;44 (5):441-7.
- [25] Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, et al. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents. Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thromb Res* 2000;99 (6):577-85.

- [26] Antonucci D, Bartorelli A, Valenti R, Montorsi P, Santoro GM, Fabbiochi F, et al. Clinical and angiographic outcome after coronary arterial stenting with the carbostent. *Am J Cardiol* 2000; 85:821–5.
- [27] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(4):733–9.
- [28] Consigny P. Endothelial cell seeding on prosthetic surfaces. *J Long Term Eff Med Implants* 2000;10(1–2):79–95.
- [29] Day JRS, Landis RC, Taylor KM. Heparin is much more than just an anticoagulant. *J Cardiothor Vascul Anesth* 2004;18(1):93–100.
- [30] Poon M, Marx S, Gallo R, Badimon J, Taubman M, Marks A. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98(10):2277–83.
- [31] Mueller PP, May T, Perz A, Hauser H, Peuster M. Control of smooth muscle cell proliferation by ferrous iron. *Biomaterials* 2006;27(10):2193–200.
- [32] Peuster M, Hesse C, Schloo T, Fink C, Beerbaum P, Schnakenburg Cv. Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. *Biomaterials* 2006;27(28):4955–62.
- [33] ESB, Satellite Consensus Conference, Sorrento, 2006
- [34] Clemson University Advisory Board for Biomaterials.
- [35] Boris Michael Holzapfel, Johannes Christian Reichert, Jan-Thorsten Schantz, Maximilian Rudert, Jürgen Groll, Dietmar Werner Hutmacher, "How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view", Elsevier, ADR-12336
- [36] N. Huebsch, D.J. Mooney, Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature* 462 (2009) 426–432.
- [37] Global Biomedical Metal Market, Acmite Market Intelligence, Third edition, June 2014.
- [38] M.Cavallini, V. Di Cocco, F. Iacoviello, *Materiali metallici*, terza edizione
- [39] ASM handbook, ASM International, Materials Park, OH, 1993, vol 2, pp. 446.
- [40] John A. Disegi, Richard L. Kenned and Robert Pilliar, *Cobalt-Base Alloys for Biomedical Applications*.

- [41] Cobalt Facts, The Cobalt Development Institute, Wickford, Essex, U.K., August 1996.
- [42] Donald M. Brunette, Pentti Tengvall, Marcus Textor, Peter Thomsen, Titanium in Medicine, Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications.
- [43] Il titanio e le sue applicazioni in campo biomedico, risorsa web, <http://www.ing.unitn.it>.
- [44] Luther M. Gammon, Robert D. Briggs, John M. Packard, Kurt W. Batson, Rodney Boyer, and Charles W. Dombay, Metallography and Microstructures of Titanium and Its Alloys, The Boeing Company, 2004
- [45] Bannon BP, Mild EE, Titanium alloys for biomaterial application: an overview. Titanium Alloys in Surgical Implants. 1983, Symposium Phoenix (796):7–15.
- [46] Perren SM, Geret V, Meier D, Rahn BA (1986) Quantitative evaluation of biocompatibility of vanadium free titanium alloys. In: Christel P, Meunier A, Lee AJC (eds) Advances in Bio- materials. Elsevier, Amsterdam, pp 397–402.
- [47] Ito A, Tateishi T (1995) New titanium alloys to be considered for medical implants. In: Brown SA, Lemon JE (eds) Medical Applications of Titanium and Its Alloys: The Material and Biological Issues. American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, pp 45–59.
- [48] Black J, Sherk H, Bonini J, Rostoker WR, Schajowicz F, Galante JO (1990) Metallosis associated with a stable titanium-alloy femoral component in total hip replacement. A case report. J Bone Joint Surg Am 72(1):126–130.
- [49] Hozack WJ, Rothman RH, Eng K, Mesa J, Primary cementless hip arthroplasty with a titanium plasma sprayed prosthesis, 1996.
- [50] Sen Yua, Zhentao Yua, Gui Wangb, Jianye Hana, Xiqun Maa, Matthew S. Dargusch, Biocompatibility and osteoconduction of active porous calcium–phosphate films on a novel Ti–3Zr–2Sn–3Mo–25Nb biomedical alloy, 2011.
- [51] Bai Xinfang, Zhao Yongqing, Zeng Weidong, Zhang Yusheng, Li Bo, Deformation Mechanism and Microstructure Evolution of TLM Titanium Alloy during Cold and Hot Compression, 2015.
- [52] Mohsin Talib Mohammed, Zahid A. Khan, Arshad N. Siddiquee, Beta Titanium Alloys: The Lowest Elastic Modulus for Biomedical Applications: A Review, 2014.

- [53] Yu Sen, Yu Zhen-tao, Han Jian-ye, Wang Gui, Niu Jin-long, Matthew S. Dargusch, Haemocompatibility of Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb biomedical alloy with surface heparinization using electrostatic self assembly technology, 2012.
- [54] Simone Panzuto, Development and characterization of antibacterial treatment for titanium obtained by anodic spark deposition. Master's thesis, Politecnico di Milano, 2011.
- [55] Kenneth B. Hensel, Surface treatments, Electropolishing.
- [56] John B. Durkee II, Ph.D., P.E., Creative EnterpriZes, Another kind of cleaning, part II, 54.
- [57] T. Hryniewicz, "Towards a new conception of electropolishing of metals and alloys", Proceedings of First East-West Symposium on Materials and Processes, UK, pp. 243-252, 1990.
- [58] E.-S. Lee, Machining Characteristics of the Electropolishing of Stainless Steel (STS316L), 2000.
- [59] Le leggi quantitative dell'elettrolisi: le leggi di Faraday, risorsa web, <http://www.chimica-online.it>
- [60] R. Chiesa, M. Santin, E. Sandrini, G. Rondelli and A. Cigada, Osteointegration of titanium and its alloys by anodic spark deposition and other electrochemical techniques: A review. Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics, 1:91-107, 2003.
- [61] Yu Zhengtao, Zhou Lian, Wang Keguang. Rare Metals Letters[J], 2004(1): 5 (in Chinese).
- [62] Yu Zhentao, Yu Sen, Zhang Minghua et al., Materials China[J], 2010, 29: 35 (in Chinese).
- [63] Anthony S. Andreacchi, Process for Electropolishing a device made from Cobalt-Chromium, United States Patent n° 7357854 B1, 2008.
- [64] Tajima, K., Hironaka, M., Chen, K., Nagamatsu, Y., Kakigawa, H. & Kozono, Y., Electropolishing of CP titanium and its alloys in an alcoholic solution-based electrolyte, Dental materials journal, 2008, vol. 27, no. 2.
- [65] Electropolishing and Chemical Etching Processes for Cobalt Chromium, Bruce Dean, Central Point, Oregon, USA, risorsa web, <http://www.finishing.com>
- [66] Christopher Kaufmann, Gopinath Mani, Denes Marton, David Johnson, C. Mauli Agrawal, Long-term stability of self-assembled monolayers on electropolished L605 cobalt chromium alloy for stent applications, 2011.

- [67] Standard Guide for Electrolytic Polishing of Metallographic Specimens, Designation: E1558-09, Reapproved 2014.
- [68] Della Valle C, Rondelli G, Cigada A, Bianchi A.E, Chiesa R, “A novel silicon- based electrochemical treatment to improve osteointegration of titanium implants” , J Appl Biomater Function Mater, 2012.
- [69] Sandrini E, Morris C, Chiesa R, Cigada A., Santin E, “In vitro Assessment of the Osteointegrative Potential of a novel Multiphase Anodic Spark Deposition Coating for Orthopaedic and Dental Implants”, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2005;73(2):392-9.
- [70] Cinzia Della Valle, Development of antibacterial surface modification treatments for titanium to improve the osteointegration.
- [71] Luther M. Gammon, Robert D. Briggs, John M. Packard, Kurt W. Batson, Rodney Boyer, and Charles W. Domby, Metallography and Microstructures of Titanium and Its Alloys, The Boeing Company, ASM Handbook, Volume 9: Metallography and Microstructures, 2004.
- [72] N. Huang, P. Yang, Y.X. Leng, J.Y. Chen, H. Suna, J. Wang, G.J. Wang, P.D. Ding, T.F. Xi, Y. Leng, Hemocompatibility of titanium oxide films, Biomaterials, 2003.
- [73] Rachita Dhurat, MS Sukesh. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective.
- [74] Gabriele Colombo, Sviluppo di trattamenti di elettrolucidatura su titanio per il settore biomedico cardiovascolare, Tesi di Laurea magistrale.
- [75] Jones, M. I., McColl, I. R., Grant, D. M., Parker, K. G., & Parker, T. L. (2000). Protein adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. Journal of Biomedical Materials Research, 52(2), 413-421.
- [76] Stent manufacturing process, surface treatments, risorsa web, [http:// http://www.sti-laser.com](http://www.sti-laser.com).
- [77] Jing Lu, Ph.D., Chang Yao, Ph.D., Lei Yang, Ph.D., and Thomas J. Webster, Ph.D., Decreased Platelet Adhesion and Enhanced Endothelial Cell Functions on Nano and Submicron-Rough Titanium Stents, Tissue Engineering: Part A Volume 18, Numbers 13 and 14, 2012.



[78] Jing Lu, Thomas J. Webster, Reduced immune cell responses on nano and submicron rough titanium, *Acta Biomaterialia* 16 (2015) 223–231.

[79] S.C.H. Kwok, P.C.T. Ha, D.R. McKenzie, M.M.M. Bilek, Paul K. Chu, Biocompatibility of calcium and phosphorus doped diamond-like carbon thin films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition, *Diamond & Related Materials* 15, 2006.