

Effetti della chimica superficiale sulla modificazione topografica delle superfici degli impianti odontoiatrici in titanio: esperimenti in vitro

Clara Cassinelli, Marco Morra, Giuseppe Bruzzone, Angelo Carpi, Giuseppe Di Santi, Roberto Giardino, Milena Fini

Scopo: determinare, in vitro, la citotossicità e l'adesione cellulare su 3 diverse superfici implantari. Materiali e metodi: tutti i campioni avevano superfici levigate a macchina, ma sono stati sottoposti a differenti procedure di pulizia, che hanno prodotto 3 diverse composizioni chimiche superficiali. Uno dei campioni era come prodotto dagli strumenti di levigatura a macchina, gli altri campioni sono stati sottoposti a trattamenti di pulizia parziale e totale. La citotossicità è stata valutata per mezzo di colture di fibroblasti di topi, e l'adesione cellulare è stata valutata con cellule SaOS-2 simili a osteoblasti. Risultati: Il campione come prodotto presentava una marcata contaminazione superficiale da parte di oli lubrificanti. Per i campioni soggetti a pulizia parziale e totale è stata osservata una quantità crescente di titanio e un rapporto decrescente carbonio/titanio all'aumentare del grado di pulizia. Discussione: Le differenze a livello di chimica superficiale come quelle normalmente rilevate sulle superfici degli impianti odontoiatrici possono determinare gli stessi effetti che, negli esperimenti in vitro, vengono normalmente attribuiti alla sola topografia superficiale. Conclusione: Gli effetti relativi alla chimica superficiale possono agire in aggiunta alla topografia superficiale sulle superfici implantari in titanio, rendendo impossibile, senza un'opportuna caratterizzazione, formulare affermazioni precise sul ruolo della sola topografia. (Int J Oral Maxillofac Implants 2003;18:46-52)

Parole chiave: Adesione cellulare; Citotossicità; Impianti odontoiatrici; Proprietà di superficie; Topografia superficiale; Titanio.

Gli esperimenti sulle colture cellulari sono diventati sempre più interessanti nel tentativo di comprendere, controllare e guidare le interazioni interfacciali sulle superfici degli impianti odontoiatrici¹⁻³. In particolare le colture di osteoblasti - cellule embrionali o tumorali - ven-

gono frequentemente utilizzate per valutare l'effetto della rugosità superficiale sul comportamento cellulare e sul metabolismo. Cooper et al.⁴ hanno studiato l'uso di colture di osteoblasti su superfici in titanio dalle differenti rugosità superficiali al fine di valutare l'effe-

to della topografia sulla mineralizzazione. Boyan et al. hanno indagato l'effetto della topografia superficiale sulla densità delle cellule superficiali, fosfatasi alcalina e produzione dell'ormone della crescita, e sulla sintesi delle proteine⁵⁻⁸.

Studi precedenti hanno dimostrato che la risposta delle cellule sulle superfici in titanio varia su superfici con gradi diversi di rugosità. Il comportamento delle cellule in coltura (e l'esito degli impianti odontoiatrici nella pratica clinica^{9,10}) viene molto spesso valutato in termini della sola topografia superficiale: cioè dell'effetto che la topografia superficiale esercita sul comportamento cellulare. Tale visione implica un presupposto implicito, ossia nel confronto di campioni con differente rugosità la topografia è l'unica variabile e la chimica superficiale è costante¹¹. Ciò fa concludere che la topografia superficiale è responsabile di tutte le differenze misurate a livello di risposta cellulare. Negli studi sopra descritti questa è una seria premessa, poiché notoriamente la chimica superficiale influisce in modo certo sul comportamento cellulare¹². Effettivamente la modificazione della chimica superficiale al fine di guidare il comportamento cellulare è un campo assai intrigante relativo alla modificazione superficiale di materiali medici^{12,13}.

I risultati di uno studio correlato, un'analisi radiografica fotoelettronica spettroscopica (XPS) di 34 diversi impianti odontoiatrici in commercio¹¹, hanno messo in evidenza che esiste una relazione statisticamente significativa tra la chimica superficiale e i trattamenti usati per aumentare la rugosità superficiale, a conferma che la topografia superficiale e la chimica superficiale sono indissolubilmente legate. L'utilità della presente indagine è di dimostrare che le variazioni della chimica superficiale come quelle precedentemente osservate¹¹ possono determinare gli stessi effetti biologici in vitro che vengono generalmente attribuiti alla sola topografia superficiale. A tale scopo sono stati condotti test di citotossicità ed esperimenti di adesione cellulare su superfici di impianti aventi la stessa topografia (superfici levigate a macchina) e diverse composizioni chimiche superficiali, ottenute utilizzando differenti metodiche di pulizia. I fibroblasti murini da linea cellulare continua L-929 sono stati utilizzati per i test di citotossicità, mentre le cellule tumorali SaOS-2, simili a osteoblasti¹⁴, sono state impiegate per esperimenti sull'adesione cellulare.

Materiali e metodi

Gli impianti in titanio sono stati forniti dalla Dentaltech (Misinto, Milano, Italia). Tutti gli impianti erano levigati a macchina, senza trattamenti per aumentare la rugosità superficiale. I campioni sono stati suddivisi in 3 gruppi. Il primo gruppo comprendeva gli impianti come prodotti, cioè impianti levigati a macchina senza alcuna pulizia; tali campioni sono stati codificati nc (not cleaned = non puliti). Per simulare diverse composizioni chimiche superficiali tra quelle comunemente rinvenute sugli impianti in titanio sono stati adottati diversi trattamenti di pulizia. Il secondo gruppo è stato sottoposto al solo lavaggio con acqua (pc, partially cleaned implants = impianti con pulizia parziale), e il terzo gruppo di impianti è stato sottoposto a pulizia completa in conformità al protocollo specifico di pulizia indicato dalla casa produttrice (che non comprende il decapaggio con acido); tali campioni sono stati codificati cc (impianti con pulizia completa).

Analisi XPS

L'analisi XPS è stata eseguita con un sistema Perkin-Elmer PHI 5500 ESCA (Shelton, CT). Questo strumento è dotato di una sorgente di raggi x monocromatici (anodo Al Ka) che opera a 14 kV e 250 W. Il diametro della superficie analizzata era di circa 400 µm, la pressione base era di 10-8 Pa, l'angolo tra l'analizzatore elettronico e la superficie del campione era di 45 gradi e la pass energy era di 187.8 eV. La misurazione della quantità degli elementi è stata ottenuta utilizzando il software e i fattori di sensibilità forniti dalla casa produttrice. La correttezza dei fattori di sensibilità utilizzati è stata controllata in maniera indipendente mediante la valutazione di campioni di riferimento in diossido di titanio vaporizzati (Sigma, Milano, Italia).

Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

La morfologia dei campioni è stata osservata attraverso un microscopio elettronico a scansione (SEM) LEO 420 (LEO Electron Microscopy, Cambridge, Regno

Tabella 1 Composizione della superficie degli impianti allo studio rilevata dall'analisi XPS.

Campione	C	O	Ti	N	Si	Na	Mg	Ca	Cl
nc	79.8	15.6			4.3				0.3
pc	61.7	30.2	4.6	1.1	1.5		0.2	0.4	0.3
cc	36.4	42.9	17.0	1.5	1.3	0.2	0.2	0.3	0.2

Le misurazioni sono state eseguite in 3 diversi punti. I dati raffigurati sono valori medi, la deviazione standard era $\pm 1\%$.

Unito). Il voltaggio di accelerazione è stato mantenuto tra 1.5 e 2 kV (SEM a bassa tensione [LV-SEM]), come discusso qui di seguito.

Test di citotossicità

La citotossicità è stata valutata utilizzando i fibroblasti murini di linea continua L-929. Trattasi di una linea di cellule comunemente usata per questo tipo di test. Il terreno di coltura sperimentale (Sigma) era composto da brodo di coltura di Eagle minimo essenziale senza L-glutamina, 10% siero bovino fetale, streptomicina (100 µg/l), penicillina (100 U/ml), e 2 mmol/l di L-glutamina in un flacone di coltura (flask) di plastica da 250 ml (Falcon, Franklin Lakes, NJ). Le cellule sono state coltivate a 37°C in un'incubatrice umidificata equilibrata con 5% di CO₂. I fibroblasti sono stati prelevati dai fiaschi di coltura prima della confluenza per mezzo di una soluzione sterile tripsina-EDTA (0.05 tripsina, 0.02 EDTA in una normale soluzione salina tamponata con fosfato [PBS], pH 7.4), sospesi nuovamente nel terreno di coltura sperimentale e diluiti a 1.3 10⁵ cellule/ml. Da questa situazione, 3.5 ml di sospensione cellulare sono stati seminati in piastre di coltura per tessuti in polistirene con 6 pozzetti (area di crescita 9.6 cm²; Falcon) contenenti i campioni.

Un cilindro d'oro delle stesse dimensioni degli impianti è stato usato come controllo negativo, un cilindro in lega rame-nichel-alluminio è stato scelto invece come controllo positivo¹⁵. Dopo 3 giorni di crescita a 37°C

e 5% CO₂ in un'incubatrice umidificata, sono state eseguite le seguenti valutazioni:

1. morte cellulare e morfologia cellulare. Il monostrato di cellule intorno ai campioni è stato osservato attraverso un microscopio invertito (DM IL, Leica, Wetzlar, Germany). Il limite tra i campioni e il monostrato di cellule è stato attentamente controllato per verificare la morte o la riduzione in numero delle cellule. Inoltre la morfologia cellulare è stata attentamente controllata e confrontata con i risultati ottenuti con il controllo negativo.
2. Attività biosintetica. A un livello più approfondito, è stata effettuata un'analisi biochimica per la valutazione della salute cellulare attraverso l'attività biosintetica. In particolare è stato eseguito il test di tossicità di Mosmann (MTT), assai diffuso. Questo test consente di misurare l'attività di deidrogenasi dell'acido succinico (SDH) delle cellule dopo 72 ore di contatto col campione della lega. L'SDH è un enzima fondamentale del ciclo di Krebs (cioè del ciclo dell'acido citrico) e la sua valutazione mediante test biochimici è un metodo comunemente impiegato per la verifica della salute cellulare.

In breve, al termine del contatto di 72 ore, le cellule sono state lavate con soluzione sterile salina tamponata con fosfato (PBS), poi la soluzione PBS è stata sostituita con soluzione MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ile]-2,5-difenil tetrazolo-bromuro) di succinato di sodio, 2 ml/contenitore. Le cellule e la soluzione MTT sono state incubate a 37°C per 3 ore nell'incubatrice. Durante questo lasso di tempo la soluzione gialla MTT viene tra-

sformata in formazan blu insolubile dalla deidrogenasi da parte dei mitocondri delle cellule. Misurando la quantità prodotta di formazan, è possibile misurare l'attività mitocondriale e, di conseguenza, la vitalità cellulare. Al termine del periodo d'incubazione la soluzione MMT è stata eliminata e sostituita da idrossido di sodio in dimetilsolfossido 6.25% v/v 0.1 mol/l, 2 ml/contenitore, per dissolvere il formazan presente. I contenitori sono stati fatti girare vorticosamente per 5 minuti fino al raggiungimento di un colore porpora uniforme e l'assorbimento è stato valutato a 560 nm. È stata fatta poi la media dei valori di assorbimento ottenuti e la media è stata espressa come percentuale del controllo negativo (che per definizione è il 100%).

Adesione cellulare

Per gli esperimenti sull'adesione cellulare sono state utilizzate cellule SaOS-2 simili a osteoblasti¹⁴. Il terreno di coltura sperimentale (Biochrom KG, Berlino, Germania) era composto da brodo di coltura di Eagle minimo essenziale senza L-glutamina, 10% di siero bovino fetale, streptomina (100 µg/l), penicillina (100 U/ml), e 2 mmol/l di L-glutamina in un flacone di coltura (flask) di plastica da 250 ml (Corning, Milano, Italia). Le cellule sono state coltivate a 37°C in un'incubatrice umidificata equilibrata con 5% di CO₂. Le cellule sono state prelevate prima della confluenza per mezzo di una soluzione sterile tripsina-EDTA (0.5 g/l tripsina, 0.2 g/l EDTA in una normale soluzione salina tamponata con fosfato [PBS], pH 7.4), sospesi nuovamente nel terreno di coltura sperimentale e diluiti a 1-3 · 10⁵ cellule/ml. Per gli esperimenti, 5 ml di sospensione cellulare sono stati seminati in piastre di coltura per tessuti in polistirene con 6 pozzetti (area di crescita 9.6 cm²; Falcon) contenenti i campioni. Gli esperimenti sono stati fatti in serie di tre. Dopo 3 giorni, i campioni sono stati sottoposti con cautela al lavaggio con soluzione PBS e fissati in soluzione PBS con glutaraldeide al 5%. I campioni sono stati disidratati con concentrazioni crescenti di etanolo in soluzioni acquose di etanolo fino al 100% di etanolo. Per la fase finale di disidratazione è stato impiegato esametildisilazano (HMDS, Aldrich, Milano, Italia). I campioni disidratati sono stati vaporizzati con oro (AGAR Auto Sputter Coater, Stansted, Regno Unito) e osservati con un SEM LEO 420.

Risultati

Analisi XPS

I risultati dell'analisi della superficie dei 3 (gruppi di) impianti in titanio allo studio sono riportati nella tabella 1. Nel caso degli impianti nc (non soggetti a pulizia) non è stato individuato titanio: chiaramente gli idrocarburi contaminanti hanno mascherato completamente il materiale sottostante, un'osservazione che sottolinea l'importanza dei trattamenti di pulizia nella produzione di impianti odontoiatrici.

Per i campioni pc e cc (sottoposti a pulizia parziale e completa) è stata osservata una quantità crescente di titanio e un rapporto decrescente carbonio/titanio all'aumentare del grado di pulizia. Mentre il campione nc era al di fuori della gamma di composizioni chimiche superficiali comunemente rilevate sulle superfici degli impianti in commercio (vedi Tabella 1 di Morra et al.¹¹), le composizioni delle superfici individuate sui campioni pc e cc erano ampiamente all'interno dei valori riportati. Per quanto concerne gli aspetti quantitativi, cc potrebbe essere definita una buona superficie dal punto di vista della pulizia (sempre facendo riferimento allo studio precedente¹¹), mentre pc non è molto soddisfacente.

Analisi SEM

La figura 1 mostra un'immagine SEM 1003 dell'impianto nc. Questa fotografia documenta chiaramente i risultati dell'analisi XPS, poiché la superficie dell'impianto appare coperta da uno strato spesso di agenti contaminanti. Ciò sembra essere il risultato di liquidi lubrificanti utilizzati negli strumenti di levigatura meccanica. È importante rendersi conto che questa superficie contaminata – e non una superficie di titanio ideale – potrebbe essere il punto di partenza di ogni campione destinato alle applicazioni implantologiche e agli esperimenti in vitro, in vivo o nella pratica clinica. Perciò, da questa condizione, la pulizia della superficie e gli effetti chimici correlati ai trattamenti volti alla modificazione della topografia superficiale determineranno la chimica superficiale finale dell'impianto.

Le figure 2a e 2b mostrano immagini SEM 3003 di un campione pc. In particolare la superficie della figura

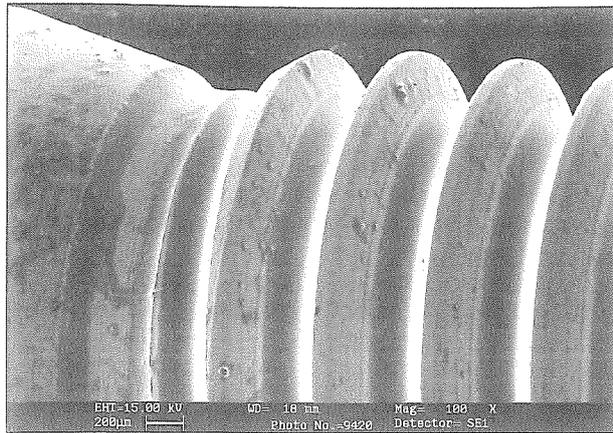
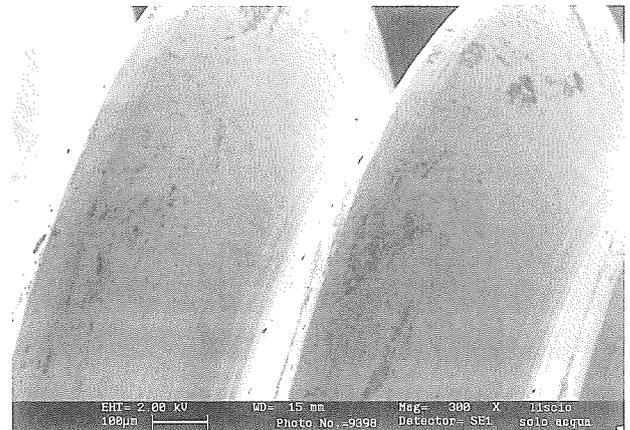
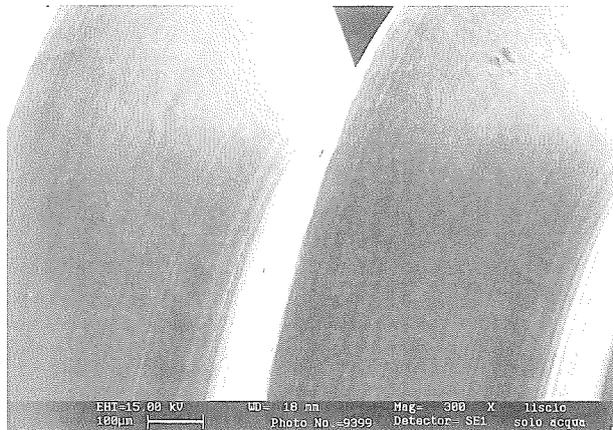


Fig 1 L'immagine al SEM (3100) mostra un impianto come prodotto dagli attrezzi di levigatura meccanica (campione non sottoposto a pulizia).



Figg. 2a, 2b Le immagini al SEM (3300) mostrano il campione sottoposto a pulizia parziale. Sinistra: immagine convenzionale (voltage di accelerazione 15 kV). Destra: stesso campo visivo ottenuto con modalità LV-SEM (a bassa tensione, voltage di accelerazione 2 kV).

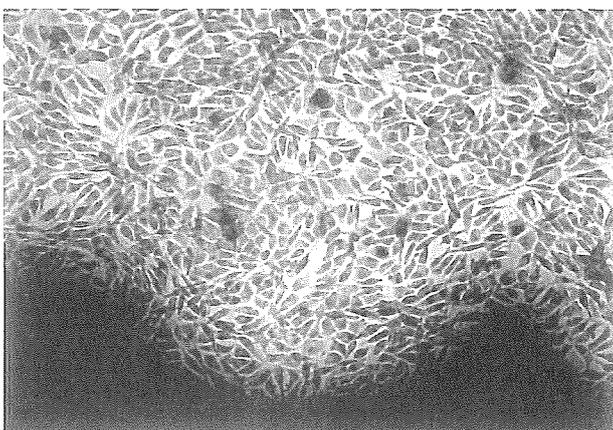
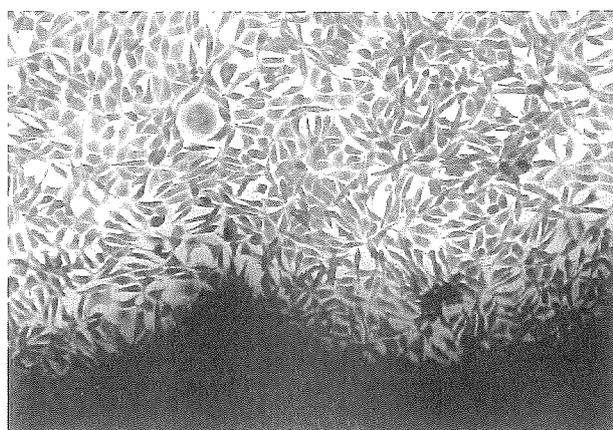
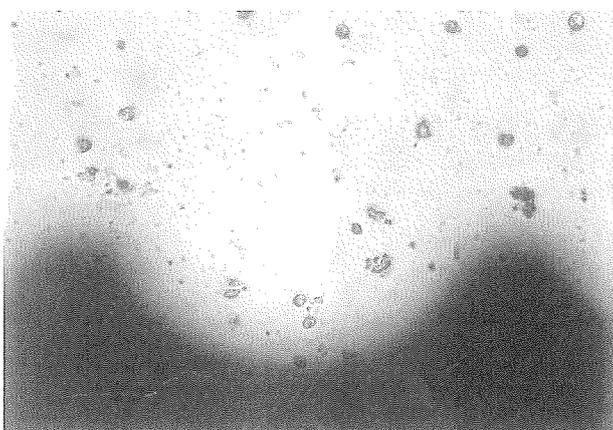
2a è stata ottenuta utilizzando un voltage di accelerazione di 15kV, secondo la prassi comune nel SEM (il voltage di accelerazione viene mantenuto di norma tra 10 e 30 kV). Il lavaggio con acqua ha eliminato la maggior parte dello strato grasso visibile nella figura 1. La figura 2b mostra il medesimo campo visivo della figura 2a, ma questa volta l'immagine è stata ottenuta utilizzando un voltage di accelerazione di soli 2 kV (SEM a bassa tensione o LV-SEM)¹⁶: una porzione rilevante della superficie risulta coperta da aree nere, che non erano state rinvenute con la mo-

dalità convenzionale ad alta tensione (Fig 2a). Il SEM a bassa tensione è come strumento diagnostico per verificare il grado di contaminazione organica degli impianti odontoiatrici¹⁶. Le aree nere della figura 2b, che non vengono rappresentate con il SEM convenzionale, sono prodotte da agenti contaminanti organici non eliminati dal trattamento di pulizia parziale. In accordo con i risultati dell'analisi XPS, sulle superfici pc è rimasta una percentuale rilevante di contaminazione organica.

Relativamente alle superfici cc, con la modalità LV-

Tabella 2 Risultati del Test di citotossicità MTT (media \pm DS).

Campione	attività SDH (% controllo negativo)
nc	34 \pm 6
pc	99 \pm 7
cc	98 \pm 6
Controllo positivo	27 \pm 8

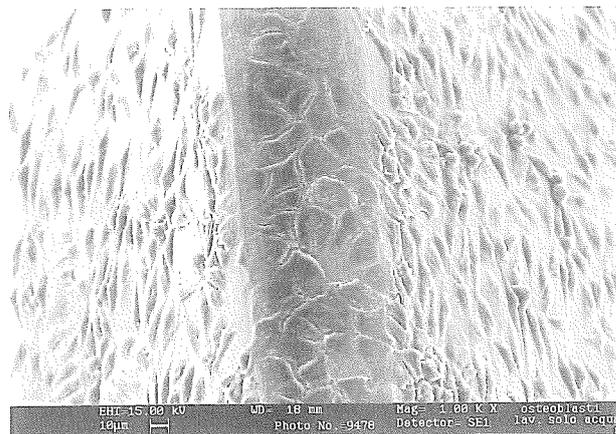


Figg. 3a-3c Le immagini al microscopio ottico (microscopio invertito) mostrano i risultati del test di tossicità a contatto diretto. In alto a sinistra: campione non soggetto a pulizia; in alto a destra: campione sottoposto a pulizia parziale; sinistra: campione sottoposto a pulizia completa.

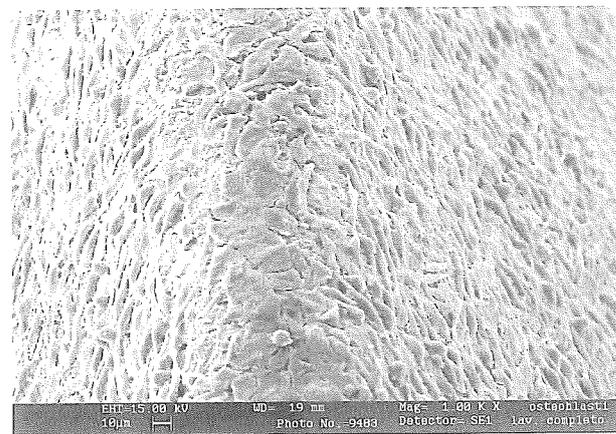
SEM sono state individuate poche macchie nere o comunque molto piccole, a conferma dei rapporti quantitativi precedentemente riportati tra analisi XPS e analisi LV-SEM¹⁶. In breve, le differenti metodiche di pulizia adottate (o la non pulizia) hanno determinato impianti simili (da un punto di vista topografico), con diverse quantità di agenti contaminanti organici.

Test di citotossicità

Per la valutazione della citotossicità è stata utilizzata la linea continua di cellule L-929, con il test di contatto diretto. Ovviamente il titanio non è tossico, ma come dimostrato delle figure 1 e 2 può non essere l'unico elemento contenuto in questo tipo di campioni. Le figure



Figg. 4a-4c Le immagini al SEM mostrano i risultati dell'adesione e della crescita cellulare (cellule SaOS-2 simili a osteoblasti). In alto a sinistra: campione non soggetto a pulizia; in alto a destra: campione sottoposto a pulizia parziale; destra: campione sottoposto a pulizia completa.



3a-3c illustrano i risultati del test di contatto diretto sui campioni nc, pc e cc visti al microscopio invertito. La porzione dell'impianto a diretto contatto con le cellule appare come un corpo opaco (cioè che non trasmette la luce) nella parte bassa delle figure. Mentre lo strato di cellule era ben sviluppato e veniva a contatto con i campioni pc e cc, un importante grado di morte cellulare veniva osservato nel caso del campione nc (Fig. 3a). Chiaramente il lubrificante che appare nella figura 1, rilasciato dalla superficie implantare al terreno di coltura, esercitava un effetto fortemente tossico. Questi risultati sono stati confermati dagli esiti del test MMT (Tabella 2): nessuna riduzione del metabolismo cellulare è stata osservata nel caso di cellule coltivate a contatto con campioni pc e cc, mentre una variazione assai significativa era determinata dai campioni nc.

Gli studi sull'adesione cellulare e la valutazione della

densità di superficie in funzione della topografia superficiale vengono riportati spesso in letteratura. Nel presente caso sono state utilizzate cellule SaOS-2 simili a osteoblasti per valutare la densità cellulare su superfici con identica topografia e chimica superficiale diversa (Tabella 1). I risultati sono riportati nelle figure 4a-4c. A conferma dei risultati precedenti non sono state rinvenute cellule sulla superficie degli impianti nc (Fig. 4a), dato che gli effetti tossici descritti non hanno permesso alle cellule di aderire e crescere sulle superfici nc; al contrario, le cellule sono aderite, si sono propagate e sono cresciute rapidamente e senza difficoltà sulle superfici pc (Fig. 4b) e cc (Fig. 4c). Tuttavia, come chiaramente visibile dalle figure, la densità delle cellule in superficie era decisamente differente e nettamente superiore sulla superficie cc. Non si è tentato per nulla di attribuire valori quantitativi delle diverse densità cellulari, poiché la geometria di questi campioni

potrebbe dare origine ad artefatti (i campioni piatti sono più adatti per gli studi quantitativi rispetto agli impianti sagomati). Dalle suddette fotografie è evidente comunque che il numero di cellule per unità di superficie è differente sulle superfici pc e cc.

Discussione

I test riguardanti la valutazione della risposta cellulare alle superfici in titanio sono importanti per sviluppare le conoscenze relative alle interazioni biologiche sulle superfici degli impianti odontoiatrici^{1,3}. Parallelamente all'aumento delle conoscenze di base sulla biochimica della formazione e guarigione dei tessuti, è possibile ricorrere ad approcci più sofisticati per individuare la risposta delle cellule alle caratteristiche superficiali degli impianti. Nel primo articolo di questa serie è stato dimostrato che la topografia superficiale e la chimica superficiale sono indissolubilmente legate, nel senso che il trattamento utilizzato per ottenere una data topografia superficiale spesso influisce sulla chimica superficiale degli impianti. Perciò, mentre si può ritenere che la topografia sia la sola variabile, spesso non è così. La questione è se le differenze a livello di chimica come quelle precedentemente evidenziate¹¹ siano sufficienti ad influenzare il comportamento delle cellule. La letteratura suggerisce una risposta affermativa, come dimostrato per esempio da Keller et al. mediante studi in vitro sull'effetto dei trattamenti di sterilizzazione sul comportamento cellulare¹⁷.

Due semplici esperimenti in vitro - test di citotossicità e di adesione cellulare - sono stati condotti in questa indagine. Il campione nc è stato intenzionalmente incluso, per sottolineare il fatto che anche se si parla di un impianto in titanio, la sua composizione superficiale non è affatto prevedibile. Quando viene prodotto un campione in titanio, la sua superficie può essere simile a quella della figura 1, la sua composizione essere quella della tabella 1 e il suo effetto sul comportamento cellulare quello illustrato nelle figure 3a e 4a. Tale condizione può essere migliorata dalle metodiche di pulizia; ma la superficie finale che verrà usata in test sofisticati sulla biochimica cellulare risulterà dalla concomitanza di fattori come accuratezza della pulizia, effetto del trattamento o dei trattamenti adottati per con-

ferire una data topografia superficiale ed infine effetti legati ai materiali di imballaggio. I risultati dei test riportati nelle figure 3 e 4 e nella tabella 2 mostrano che, mantenendo costante la topografia e modificando esclusivamente la chimica superficiale, è possibile variare all'interno dell'intera gamma, dalla massima citotossicità alla massima citocompatibilità (Figg. 3a-3c, Tabella 2), dalla morte delle cellule alla colonizzazione completa della superficie (Figg. 4a-4c). Naturalmente tutti i marcatori e le sostanze biochimiche legate al metabolismo cellulare molto probabilmente presenteranno la stessa spiccata variabilità e determineranno un comportamento non prevedibile se interpretato solo in termini di topografia superficiale. Quando sono state messe a confronto superfici con diversa rugosità, differenze a livello di densità cellulare come quelle delle figure 4b e 4c sono state spesso attribuite alla sola topografia superficiale. Viene suggerito in questa sede che gli effetti della chimica superficiale possono agire in aggiunta alla topografia superficiale rendendo impossibile, senza un'opportuna caratterizzazione¹⁸, formulare affermazioni precise sul ruolo della sola topografia. La premessa della topografia è ulteriormente rafforzata da recenti suggerimenti che si riferiscono al ruolo di precoci interazioni sangue-impianto nella guarigione dell'osso^{19,20}. La spiccata differenza nell'esito dell'interazione tra sangue e una superficie organica (contrapposta a una superficie inorganica) è nota fin dal 1885, quando è stato osservato che il tempo di coagulazione sanguigna aumenta se le provette in vetro in cui viene raccolto il sangue vengono ricoperte di vaselina, un'osservazione codificata più tardi (nel 1940) dalla regola di Lampert del tempo di coagulazione sanguigna¹⁸. La quantità variabile di presenza organica sulla superficie apparentemente inorganica del titanio (vedi Fig. 2b, per esempio) può dare origine a risultati contrastanti se viene presa in considerazione solo la topografia superficiale²⁰ o se viene ignorata la reale chimica superficiale. I problemi derivanti da artefatti prodotti dalla contaminazione organica sul preparato della superficie metallica non sono nuovi. Nel 1970 Baier et al.²¹ spiegano che la maggiore compatibilità con il sangue della Stellite (una lega cobalto-cromo allora utilizzata nella produzione di valvole cardiache) era da imputare di fatto al trattamento di lucidatura. Poiché la durezza della lega consentiva di lucidarla a specchio, si pro-

vocava l'inclusione permanente di cere nella superficie metallica, rendendola pressoché organica e più compatibile con il sangue²¹. Angoli di contatto eccessivamente alti, tipici di superfici organiche piuttosto che di quelle metalliche, vengono spesso rilevati anche nel caso di superfici in titanio²².

Conclusioni

I risultati di questa indagine limitata mostrano che la risposta cellulare può essere influenzata dalla composizione della superficie degli impianti odontoiatrici, a conferma del fatto che, almeno in vitro, gli effetti chimici agiscono in aggiunta agli effetti topografici comunemente citati. Di conseguenza un'analisi accurata della chimica superficiale degli impianti in titanio (o dei campioni in titanio utilizzati negli studi in vitro) dovrebbe costituire una parte integrante di tutti gli studi sulla risposta biologica alle superfici irruvidite degli impianti in titanio.

Gli studi in vitro che studiano i meccanismi di base delle interazioni tra cellule e materiali dovrebbero mettere in discussione il presupposto implicito secondo cui la chimica superficiale del titanio rimane costante. Via via che la caratterizzazione biochimica della risposta cellulare alle superfici in titanio diventa più sofisticata^{4, 8, 19, 20}, i rischi che tale approccio implica si fanno più grandi e la corretta caratterizzazione di tutte le variabili coinvolte è l'unica soluzione per ridurre al minimo i rischi.

Autori:

Clara Cassinelli, biologa, Ricercatrice, Nobil Bio Ricerche, Villafranca d'Asti.

Marco Morra, chimico, Ricercatrice, Nobil Bio Ricerche, Villafranca d'Asti.

Giuseppe Bruzzone, MD, Ricercatrice, Nobil Bio Ricerche, Villafranca d'Asti.

Angelo Carpi, MD, Professore, Dip. di Fisiopatologia della Riproduzione e Scienze dell'Invecchiamento, Univ. di Pisa.

Giuseppe Di Santi, MD, Studio privato, Porto Ercole.

Roberto Giardino, MD, Professore, direttore di Fisiopatologia Chirurgica, Facoltà di Medicina, Univ. di Bologna e del Dip. di Chirurgia Sperimentale, Istituto di Ricerca Codivilla Putti, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna.

Milena Fini, MD, Ricercatrice, Dip. di Chirurgia Sperimentale, Ist. di Ricerca Codivilla Putti, Ist. Ortopedico Rizzoli, Bologna.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr.ssa Clara Cassinelli, Nobil Bio Ricerche, Str. S. Rocco 36, 14018 Villafranca d'Asti, Italia. Fax: +39-0141-941956. e-mail: cclara@tin.it

Bibliografia

1. Davies JE (ed). *The Bone-Biomaterial Interface*. Toronto: University of Toronto Press, 1991.
2. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321.
3. Davies JE (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared, 2000.
4. Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkilä P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:37-47.
5. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29:389-401.
6. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG-63 osteoblastlike cells to 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$. *J Biomed Mater Res* 1998;39:77-85.
7. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, et al. Surface roughness modulate the local production of growth factors and cytokines by osteoblastlike MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996;32:55-63.
8. Boyan BD, Schwartz Z. Modulation of osteogenesis via implant surface design. In: Davies JE (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared, 2000:232-239.
9. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000;84:522-534.

10. Cochran DL. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 1999;70:1523-1539.
11. Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implants surfaces: Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:40-45.
12. Horbett TA, Klumb LA. Cell culturing: Surface aspects and considerations. In: Brash PL, Wojciechowski PW (eds). *Interfacial Phenomena and Bioproducts*. New York: Dekker, 1996:351-456.
13. Morra M (ed). *Water in Biomaterials Surface Science*. Chichester: Wiley, 2001.
14. Windeler AS, Bonewald L, Khare AG, Boyan BD, Mundy GR. The influence of sputtered bone substitutes on cell growth and phenotypic expression. In: Davies JE (ed). *The Bone-Biomaterial Interface*. Toronto: University of Toronto Press, 1991:205-213.
15. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J Prosthet Dent* 2000;83:223-234.
16. Morra M, Cassinelli C. Evaluation of surface contamination of titanium dental implants by LV-SEM: Comparison with XPS measurements. *Surf Interf Anal* 1997;25:983-988.
17. Keller JC, Draughn RA, Wightman JP, Dougherty WJ, Meletiou SD. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:360-367.
18. Garbassi F, Morra M, Occhiello E. *Polymer Surfaces, From Physics to Technology*. Chichester: Wiley, 1997:395-435.
19. Davies JE, Housseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared, 2000:1-14.
20. Gemmell CH, Park JY. Initial blood interactions with endosseous implant materials. In: Davies JE (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared, 2000:108-117.
21. Baier RE, Dutton RC, Goff VL. Surface chemical features of blood vessel walls and of synthetic materials exhibiting thromboresistance. *Adv Exp Med Biol* 1970;7:235-260.
22. Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterization of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:333-342.

Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: in vitro experiments

Clara Cassinelli, Marco Morra, Giuseppe Bruzzone, Angelo Carpi, Giuseppe Di Santi, Roberto Giardino, Milena Fini

Purpose: To determine, in vitro, cytotoxicity and cell adhesion on 3 different implant surfaces. **Materials and Methods:** All samples had machined surfaces, but they were subjected to different cleaning procedures, which produced 3 different surface chemistries. One of the samples was as-produced from the machining tools. The other samples were subjected to partial and total cleaning routines. Cytotoxicity was evaluated using mouse fibroblast cultures, and cell adhesion was evaluated with osteoblast-like SaOS-2 cells. **Results:** The as-produced sample showed a pronounced surface contamination by lubricating oils. For partially and totally cleaned samples, an increasing amount of titanium and a decreasing carbon/titanium ratio was observed as cleaning became more complete. **Discussion:** Differences in surface chemistry such as those normally found on titanium implant surfaces can lead to those same effects which, in in vitro experiments, are normally accounted for in terms of surface topography alone. **Conclusion:** Effects related to surface chemistry can operate over and above surface topography, making it impossible, without proper characterization, to make definite statements about the role of topography alone. (*Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:46-52)

Key words: Cell adhesion; Cytotoxicity; Dental implants; Surface properties; Surface topography; Titanium.