

Studio in vitro di un nuovo trattamento per il controllo dell'adesione batterica di impianti dentali in titanio e lega di titanio

Carmen Giordano*, Livia Visai**, Maria Pia Pedferri*, Paola Olivero**, Roberto Chiesa*, Alberto Cigada*, Francesco Sanfilippo***, Andrea E. Bianchi***

* Dipartimento di Chimica, Materiale e Ingegneria Chimica «G. Natta», Politecnico di Milano.

** Dipartimento di Biochimica, Sezione Medicina, Pavia

*** Dipartimento di Odontoiatria, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano. Direttore professor Enrico Gherlone

RIASSUNTO

Lo sviluppo di nuovi materiali in implantologia che consentano di controllare l'adesione e la proliferazione batterica è una tematica di grande attualità, nell'ambito della moderna odontoiatria riabilitativa. L'incorporazione di un impianto dentale osteointegrato può determinare una colonizzazione batterica sulla porzione transmucosa dell'impianto, con la conseguente progressiva perdita del contatto tra impianto e tessuti molli che incrementa la possibilità di aggressione di patogeni al tessuto mineralizzato, compromettendone l'osteointegrazione, con conseguenze che possono portare fino al fallimento del dispositivo. Nel presente lavoro sono stati studiati metodi elettrochimici di modifica superficiale degli impianti, in grado di cambiare lo spessore e la struttura del film di passività che riveste il titanio e le leghe di titanio. Con queste tecniche si possono ottenere film di ossido di titanio superficiale cristallino, potenzialmente in grado di ridurre la colonizzazione batterica degli impianti osteointegrati una volta posizionati e funzionalizzati nel cavo orale. In particolare è stata studiata l'influenza del voltaggio di trattamenti di anodizzazione, applicati a superfici di titanio commercialmente puro grado 2 e lega di titanio Ti6Al4V, sull'inibizione del processo adesivo e proliferativo, rispettivamente a 3 e 24 ore, di quattro ceppi batterici: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* 8325-4 e *Staphylococcus epidermidis* RP62A.

SUMMARY In-vitro study of a new treatment for controlling bacterial adhesion to titanium and titanium-alloy dental implants

The development of new implant dentistry materials allowing to control bacterial adhesion and proliferation is an extremely topical issue in modern rehabilitation dentistry. Placing an osseointegrated implant may lead to the bacterial colonisation of the transmucosal portion of the implant, with the resulting progressive loss of contact between implant and soft tissues. As a result, there can be pathogen aggression of mineralised tissue, and impaired osseointegration, and even failure. This paper investigated the electrochemical methods for changing the implant surface, i.e. the thickness and structure of the passivity film investing titanium and titanium alloys. These techniques may enable to obtain a crystalline surface titanium oxide film, potentially capable of reducing bacterial colonisation in osseointegrated implants once positioned and loaded in the mouth. In particular, the influence of the anodisation voltage was investigated as applied to commercially pure, grade 2 titanium and Ti6Al4V surfaces, on the inhibition of the adhesion and proliferation process at 3 and 24 hours, respectively, for 4 bacterial strains: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* 8325-4 and *Staphylococcus epidermidis* RP62A.

[Implantologia Orale 2006;5:22-33](#)

Gli impianti dentali osteointegrati sono dispositivi di largo impiego che vantano un notevole successo clinico a lungo termine. Un'efficace osteointegrazione e la presenza di tessuti molli sani, trofici e bene aderenti alla porzione transmucosa sono elementi chiave che garantiscono all'impianto adeguate prestazioni.

I tessuti perimplantari di impianti che dimostrano nel tempo conservare l'anchilosi funzionale ottenuta attraverso il fenomeno biologico dell'osteointegrazione, sono colonizzati prevalentemente da batteri Gram-positivi aerobi facoltativi. Questa condizione si mantiene invariata nel tempo con im-

pianti clinicamente stabili¹ e le caratteristiche della microflora perimplantare è sovrapponibile a quella appartenente a un parodonto sano.

È stato osservato che un notevole accumulo batterico lungo la porzione transmucosa dell'impianto può condurre a processi infiammatori della mucosa, mucositi, con perdita di attacco, creando i presupposti per l'esposizione dell'osso ai patogeni, perimplantiti, e nei casi più gravi portare al fallimento dell'impianto.

Le perimplantiti sono, infatti, processi infiammatori dei tessuti molli e duri perimplantari che, se non trattate, condu-

cono alla formazione di difetti ossei che possono divenire ingravescenti, fino alla perdita completa dell'anchilosi funzionale dell'impianto. L'accumulo di placca rappresenta il fattore eziologico principale insieme agli eventi immunopatogenetici che lo accompagnano e che aumentano la possibilità del danno tissutale localizzato²⁻⁴.

Proprio l'accumulo di placca è determinato inizialmente da una colonizzazione prevalentemente di microrganismi Gram-positivi aerobi facoltativi ma con percentuali di *Bacteroides* e *Capnocytophaga* più alte nei soggetti parzialmente edentuli rispetto ai soggetti completamente edentuli⁵.

Studi scientifici hanno, inoltre, evidenziato la colonizzazione del solco perimplantare da parte dei microrganismi periopatogeni in relazione alla microflora putativa delle tasche parodontali dell'ospite e allo stato parodontale del soggetto; è dimostrato che le tasche e i difetti parodontali agiscono come serbatoi di patogeni influenzando la colonizzazione dei tessuti perimplantari^{6,7}. Inoltre, studi retrospettivi hanno riportato che l'aumento degli indici di sondaggio perimplantare (maggiori di 4 mm) è significativo per una colonizzazione del sito da parte di microrganismi anaerobi come la *Porphyromonas gingivalis*⁸, e che segni di infiammazione delle tasche perimplantari più profonde sono associati alla presenza di *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetecomitans* di possibile migrazione dal parodonto al perimplantato^{2,4,9-14}. Episodi di parodontiti hanno quindi una grande influenza sulla flora perimplantare tanto da determinarne persino la composizione^{13,15,16}. Tali evidenze scientifiche, qualora non si sia in presenza di soggetti totalmente edentuli che determinano invece un ecosistema orale diverso¹², hanno indicato che per ottenere il successo di una terapia implantoprotesica e/o per ridurre il rischio di innesco di malattie dei tessuti perimplantari è fondamentale l'attenta valutazione dello stato parodontale del soggetto: l'accertamento di una compromissione del parodonto superficiale o profondo dovrà determinare, *in primis*, l'esecuzione di una terapia mirata a risolvere l'avanzamento delle problematiche parodontali, in un paziente anticipatamente sensibilizzato alla necessità di un mutamento della sue abitudini alimentari e dell'igiene orale e del quale si è verificata una fattiva collaborazione.

È comunque noto l'accumulo di placca sulla porzione transmucosa dell'impianto o dell'abutment è determinato non solo dalla presenza e dal trasporto dei batteri sulla superficie implantare, ma anche dalle caratteristiche di superficie del biomateriale, e dalle sue interazioni con l'ambiente biologico. La micromorfologia e le caratteristiche chimico fisiche delle superfici degli impianti in titanio determinano, nel tratto transmucoso, un momento importante per l'innesco di una mucosite e lo sviluppo della malattia in perimplantite. Ad esempio è noto che lo *Streptococcus sanguis*, l'*Actinomy-*

ces viscosus e *Porphyromonas gingivalis* prediligano per l'adesione al titanio la superficie ruvida a quella liscia¹⁶⁻¹⁸; anche gli aspetti legati alla chimica della superficie implantare sembrano avere una notevole importanza: studi *in vitro* hanno evidenziato che dischi rivestiti mediante deposizione fisica con vapore (PVD) di nitrato di titanio o in nitrato zirconio determinano una significativa riduzione dell'adesione di *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*¹⁹.

La superficie degli impianti, la sola parte che viene a contatto con l'ospite, può giocare quindi un ruolo fondamentale non solo nei rapporti con il substrato osseo durante i processi di osteointegrazione, come è stato ampiamente documentato dalla letteratura scientifica degli ultimi decenni, ma anche con i tessuti molli del tratto transmucoso, che determinano proprio la sopravvivenza nel tempo di questo fenomeno biologico.

È noto che il titanio deve la sua resistenza alla corrosione alla presenza in superficie di un sottile e aderente strato di ossido, amorfo o cristallino, che si forma spontaneamente all'aria e in presenza di ossigeno. La forma cristallina di tale ossido può assumere tre diverse strutture: rutilo, anatasio, brookite.

Dalla letteratura emerge che la presenza di anatasio o rutilo in superficie può innescare e stimolare la precipitazione di idrossiapatite da soluzioni contenenti ioni calcio e fosfato, ad esempio quando tali superfici entrano in contatto con soluzioni del tipo *Simulated Body Fluid* (SBF). Questo evento è spesso associato all'indicazione di buone proprietà osteointegrative²⁰. Le potenzialità osteointegrative di un materiale sono inoltre legate alla capacità di consentire o indurre la colonizzazione di cellule osteoblastiche. È quindi possibile migliorare l'osteointegrazione di un impianto in titanio attraverso opportuni trattamenti superficiali, finalizzati a modificare la composizione chimica e la microstruttura del suo film di ossido. In questo senso nel corso degli anni sono stati messi a punto e applicati svariati trattamenti finalizzati alla modifica della morfologia e chimica superficiale degli impianti dentali. Tra questi occupano un ruolo di rilievo le tecnologie di deposizione di idrossiapatite o calciofosfati. Se, però, da un lato tali trattamenti sono potenzialmente in grado di migliorare l'osteointegrazione degli impianti, dall'altro restano aperti problemi di adesione e coesione dei rivestimenti al substrato metallico, che possono portare a delaminazione, granulazione dei rivestimenti e originare detriti. Una valida possibilità per la modifica superficiale del titanio è oggi rappresentata dai trattamenti elettrochimici, in grado di modificare la composizione chimica, la struttura e la morfologia del film superficiale di ossido. Attraverso queste tecniche elettrochimiche il film superficiale che si ottiene è aderente e intrinsecamente legato al substrato metallico; determinando un'interfaccia con il substrato continua e stabile.

Recentemente si è anche osservato che, utilizzando opportuni trattamenti basati sull'anodizzazione del titanio, è possibile fornire alla superficie proprietà batteriostatiche/battericide modificando la struttura e cristallinità dell'ossido superficiale, mantenendo inalterato il comportamento biologico in termini di citocompatibilità²⁰.

La colonizzazione microbica e l'attività antibatterica sulle superfici metalliche è già stata discussa in diversi studi *in vivo* e *in vitro*²¹⁻³¹. La superficie di titanio da sola, invece, non possiede attività antibatterica e conseguentemente può essere essa stessa un fattore capace di promuovere l'accumulo di placca sugli impianti^{32,33}. Nonostante questa considerazione solo un numero ridotto di esperimenti sono stati compiuti utilizzando impianti di titanio con superficie modificata allo scopo di inibire la colonizzazione dei batteri^{34,37}.

Le peculiari proprietà battericide e fotocatalitiche del materiale ceramico TiO₂ in forma di polvere e con struttura di anatasio sono ben note dalla letteratura. La possibilità di modificare le superfici di titanio e lega di titanio mediante ossidazione anodica per ottenere film superficiali ricchi di anatasio, è una strategia oggi percorribile per effettuare il controllo della presenza batterica superficiale. Diversi lavori sono stati compiuti per documentare l'effetto dell'attività fotocatalitica del ceramico TiO₂ nei processi di disinfezione e di eliminazione delle cellule cancerogene^{20,38}.

In questo lavoro si è voluto verificare sperimentalmente la capacità di un trattamento elettrochimico di ossidazione anodica nel controllare e ridurre la colonizzazione batterica sulla superficie di titanio, nonché gli effetti di tale trattamento sulla citocompatibilità. A tale fine, sono stati studiati e caratterizzati diverse varianti di trattamenti di ossidazione anodica eseguiti su titanio e lega di titanio Ti6Al4V, alcuni dei quali in grado di formare un film di ossido cristallino con struttura tipo anatasio. Le superfici ottenute sono state caratterizzate con diffrattometria ai raggi X e studiate con prove *in vitro* utilizzando due modelli cellulari selettivi rispettivamente per l'analisi della risposta cellulare post contatto con tessuti duri (MG63-cellule da osteosarcoma umano)³⁹ e per i tessuti molli (L929-fibroblasti murini)³⁵. La verifica della capacità di controllare e limitare l'adesione e la proliferazione batterica è stata operata mediante test *in vitro* con diversi ceppi batterici: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* 8325-4 e *Staphylococcus epidermidis* RP62A. In particolare, l'adesione e la crescita di *Porphyromonas gingivalis*, ceppo batterico co-responsabile della formazione della placca batterica nel cavo orale, è stata studiata sulle superfici di titanio grado 2 mentre il processo adesivo e proliferativo di *Staphylococcus epidermidis* RP62A, frequente ceppo colonizzatore di biofilm naturale, è stata analizzata su superfici di lega di titanio Ti6Al4V, materiale utilizzato in ambito ortopedico oltre che dentale.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

I campioni sono stati ottenuti da una lastra di titanio grado 2 e una grado 5 (Toresin titanium, Padova). I campioni (10×10×1 mm³) sono stati tagliati usando un tagliatore meccanico, sgrassati con acetone, puliti utilizzando un bagno a ultrasuoni.

I trattamenti elettrochimici di anodizzazione sono stati eseguiti in opportune soluzioni e in condizioni di temperatura controllata, secondo un know-how riservato sviluppato al Politecnico di Milano. Fissata la corrente mediante un galvanostato (Eutron Rivoli, Italia), il voltaggio è stato aumentato fino al valore desiderato, quindi il processo è stato interrotto e i campioni lavati in ultrasuoni con acqua distillata, quindi asciugati.

I materiali considerati utilizzati per le prove cellulari sono stati rispettivamente:

- A = Ti grado 2 senza trattamento
- B = Ti grado 2 con anodizzazione a V=90V
- C = Ti grado 2 con anodizzazione a V=130V
- D = Ti6Al4V senza trattamento
- E = Ti6Al4V con anodizzazione a V=100V
- F = Ti6Al4V con anodizzazione a V=120V
- CONTR = pozzetto di controllo

Rispetto alle prove di citocompatibilità, alcuni trattamenti effettuati per le prove batteriche sono stati modificati in termini di voltaggio di anodizzazione e condizioni di prova. Per ogni materiale testato con le culture batteriche è stato, infatti, valutato anche l'effetto dell'irraggiamento con raggi ultravioletti (identificati dall'indicazione Y-UV). Conseguentemente, i materiali utilizzati per le prove con i batteri sono così identificati:

- Ctr, N-UV = Ti grado 2 senza trattamento
- Ctr, Y-UV = Ti grado 2 senza trattamento irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)
- N-AN, N-UV = Ti grado 2 con anodizzazione a V = 60V
- N-AN, Y-UV = Ti grado 2 con anodizzazione a V = 60V irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)
- Y-AN, N-UV = Ti grado 2 con anodizzazione a V = 90V
- Y-AN, Y-UV = Ti grado 2 con anodizzazione a V = 90V irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)
- Ctr, N-UV = Ti6Al4V senza trattamento
- Ctr, Y-UV = Ti6Al4V senza trattamento irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)
- N-AN, N-UV = Ti6Al4V con anodizzazione a V=65V
- N-AN, Y-UV = Ti6Al4V con anodizzazione a V=65V irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)
- Y-AN, N-UV = Ti6Al4V con anodizzazione a V=120V
- Y-AN, Y-UV = Ti6Al4V con anodizzazione a V=120V irraggiato con UV (235 nm, 6 minuti)

Caratterizzazione microstrutturale delle superfici

Diffrazione a raggi X (XRD)

I campioni sono stati caratterizzati usando la diffrazione a raggi X per film sottili (Philips PW 1710). Per ogni tipologia di materiale è stato ottenuto uno spettro di diffrazione che indica qualitativamente la presenza di ossido di titanio in forma cristallina di anatasio.

Risposta cellulare in vitro

Sterilizzazione dei campioni

I campioni sono stati immersi per 10' con etanolo (70% v/v in acqua) (Merk.) e successivamente sterilizzati per irraggiamento con UV (235 nm).

Cellule, mezzi e controlli

I saggi sono stati condotti adottando un modello cellulare basato su MG63-cellule da osteosarcoma umano (ECACC 86051601) e L929 – fibroblasti murini di linea (ECACC 85011425).

Le cellule sono state coltivate e preparate per la semina sui materiali come descritto altrove^{41,20}. Come controllo non tossico, negativo, è stato utilizzato polistirene trattato per colture cellulari (Corinig-Costar).

Adesione e morfologia cellulare

Le cellule (2×10^5 cellule/campione) sono state seminate sulla superficie dei materiali (2 campioni per materiale) e, dopo il prescelto tempo di incubazione (24 e 48 ore post semina), preparate per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) come descritto in precedenza⁴⁰.

Brevemente, ai tempi di saggio selezionati, i campioni sono stati trattati con una soluzione di glutaraldeide (Fluka) e disidratati con una scala di etanolo crescente. Dopo opportuna ricopertura con oro (Sputter coater Edwards S150B) i materiali sono stati esaminati con il microscopio elettronico a scansione-SEM (Cambridge Instruments, Stereoscan 360).

Saggio per l'attività metabolica cellulare

Le cellule sono state seminate (2×10^5 cells/sample) sui campioni (4 campioni per materiale) e il saggio eseguito come già descritto⁴⁰.

In breve, a ogni tempo di saggio (1, 3, 10 giorni per le cellule L929; 1, 3, 10, 14 per le cellule MG63), il mezzo di coltura sostituito con una soluzione di Almar Blue (Serotec, Prodotti Gianni S.p.A, Italia) e dopo quattro ore di incubazione, i surnatanti trasferiti in una diversa piastra ed esaminati a una lunghezza d'onda di 570 nm (Tecan Genius Plus). I campioni, ricoperti con mezzo fresco, sono stati riposti in coltura fino al successivo tempo di saggio.

Studio dell'adesione batterica

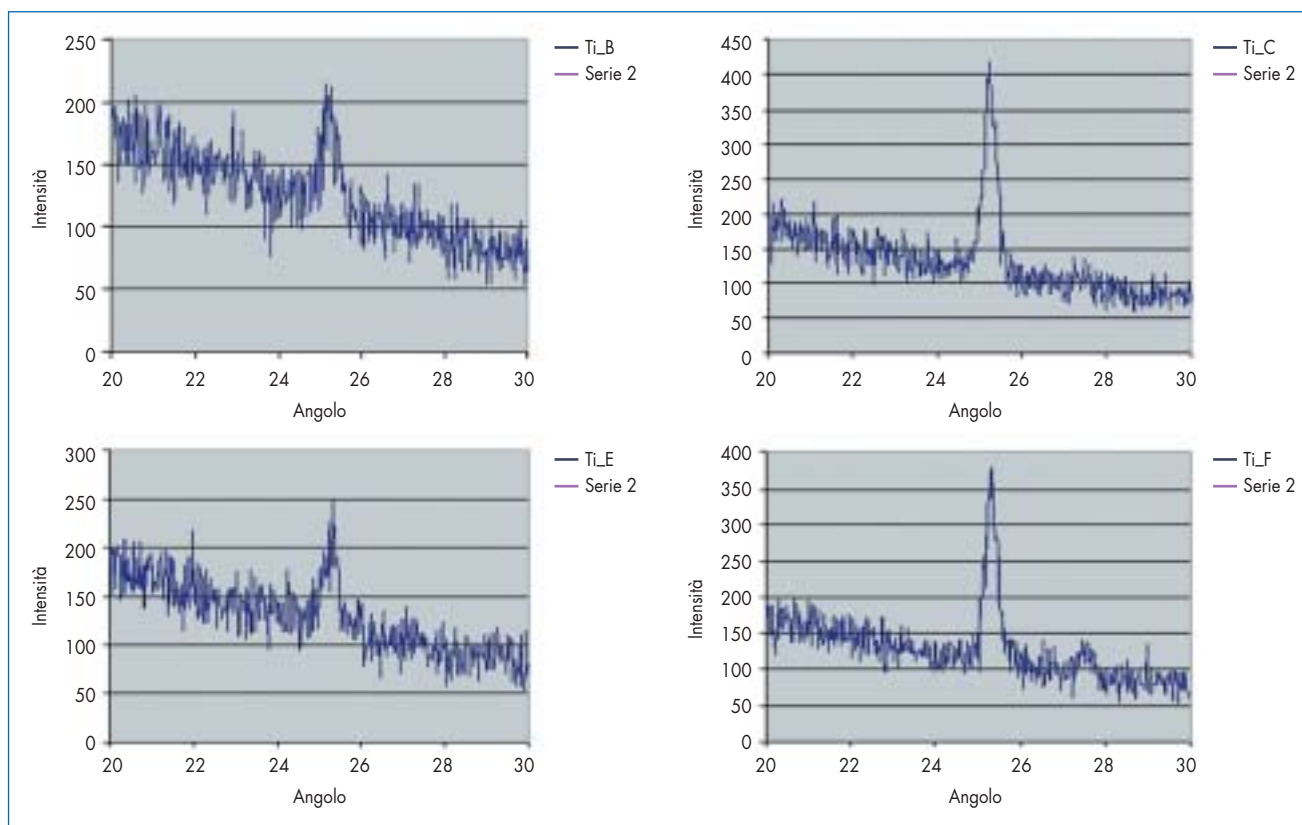
I ceppi batterici e le condizioni di crescita

Streptococcus mutans (CCUG 35176) e *Porphyromonas gingivalis* (CCUG 25211/030213) sono stati acquisiti dalla Culture Collection of University of Göteborg (CCUG); *Staphylococcus aureus* (NTCC 8325-4) e *Staphylococcus epidermidis* RP62A (ATCC 35984) provengono rispettivamente dalla National Type Culture Collection (NTCC) e dall'American Type Culture Collection (ATCC). I ceppi selezionati di *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis* sono batteri cariogenici presenti nella cavità orale. I ceppi selezionati di *Staphylococcus aureus* 8325-4 e *Staphylococcus epidermidis* RP62A sono batteri responsabili di infezioni di protesi. Tutti i ceppi sono stati fatti crescere in un terreno liquido, Brain Heart Infusion (BHI, Difco, CA), addizionato di siero di cavallo al 10% (v/v, Oxoid, Italia), preventivamente inattivato al calore, per favorirne la crescita. Le colture rispettivamente di *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* RP62A sono state incubate staticamente in condizioni aerobiche per 16 h a 37 °C mentre il ceppo di *Porphyromonas gingivalis* è stato cresciuto in condizioni statiche e strettamente anaerobiche per 16 h a 37 °C (*Anaerogen Compact*TM, Oxoid, Italy).

Queste colture, utilizzate come fonte principale per gli esperimenti, sono state quindi normalizzate a una densità finale di 1×10^{10} cellule/mL mediante lettura spettrofotometrica e successivo confronto dei valori di OD₆₀₀ dei campioni con una curva standard che correla i valori ottenuti di OD₆₀₀ al numero di cellule batteriche.

L'adesione batterica in vitro

I campioni sono stati precedentemente trattati in una soluzione acquosa di etanolo 70% (v/v) e lavati con acqua distillata sterile. I campioni sono stati, quindi, divisi in due serie: la prima serie risulta costituita da campioni che non sono stati illuminati dalla luce UV (N-UV) mentre la seconda serie è costituita da campioni che sono stati illuminati per sei minuti dalla luce UV (Y-UV). Un numero di batteri pari a 1×10^6 o 1×10^4 cellule batteriche, cresciute durante la notte come precedentemente indicato, sono state depositate su ogni campione e incubate a 37 °C, rispettivamente per 3 o 24 ore, in condizioni statiche. Al termine dei rispettivi tempi d'incubazione, i batteri debolmente adesi sono stati allontanati attraverso delicati lavaggi del campione con tampone PBS mentre i batteri fortemente adesi alle superfici sono stati preparati per l'osservazione al SEM, come indicato. Sono stati utilizzati tre campioni di prova per ogni condizione sperimentale (3 o 24 ore) per stimare le Contate Vitali Totali (TVC) come descritto precedentemente^{20,41}. I campioni con le cellule batteriche adese sono stati sospesi in 1 mL di soluzione Ringer sterile (Oxoid, Italia) utilizzando



1. Diffratogrammi ai raggi X dei materiali B, C, D ed F

il vortex per cinque minuti. Le superfici pulite sono state quindi colorate e analizzate per valutare la completa rimozione delle cellule adese. Sono state preparate delle diluizioni seriali delle sospensioni batteriche e 100 μ L di ciascuna diluizione è stato depositato su piastre di agar in terreno BHI (Bacto agar, Difco, CA). Le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 32 °C e poi sono state contate le colonie cresciute. Sono state quindi calcolati i valori di TVC per ogni campione e i risultati sono stati espressi come Unità Formanti Colonie (CFU) per cm^2 .

Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per l'analisi al SEM, i batteri adesi su ciascuna superficie dopo 24 ore d'incubazione sono stati fissati per un'ora a 4°C con una soluzione al 2,5% v/v di glutaraldeide in tampone cacodilato 0.1 M (pH=7,2). Successivamente i campioni sono stati estensivamente lavati in tampone cacodilato e infine disidratati attraverso una scala graduale in percentuale crescente di etanolo (dal 25% fino al 100%). I campioni sono stati quindi lasciati per 10 minuti in etanolo al 100% e poi essiccati al punto critico utilizzando la CO_2 . I campioni, montati su un supporto di alluminio, sono stati rivestiti di oro ed

esaminati con un microscopio StereoScan 360 Cambridge a 10 kV. I campioni con i batteri adesi sono stati osservati rispettivamente a 2000 \times e 10000 \times ingrandimenti^{20,42}.

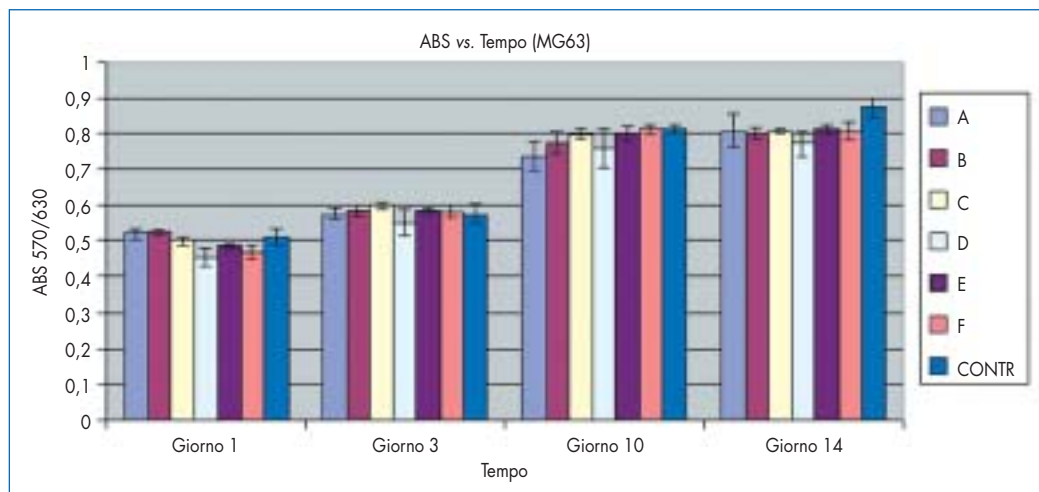
Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando i test ANOVA test e t-test per paragonare le popolazioni di dati.

RISULTATI

Caratterizzazione microstrutturale di superficie

Sia per il titanio c.p. grado 2 che per la lega Ti6Al4V le analisi di diffrazione a raggi X evidenziano la presenza di anatasio. Tale presenza, evidenziata dall'intensità dei picchi intorno a 24,6°, risulta minore sui materiali anodizzati a voltaggio più basso (materiali B ed E nei grafici di sinistra di figura 1) rispetto ai substrati anodizzati a maggior voltaggio (materiali C e F nei grafici di figura 1). Questo comportamento è stato riscontrato in tutti i materiali. Per i materiali non trattati, non è stata osservata la presenza di alcun picco indicativo della presenza di anatasio.



2. Attività metabolica di cellule MG63 e L929 coltivate sui materiali.

Risposta cellulare in vitro

Lo studio sull'adesione e morfologia cellulare mostra dopo 24 ore dalla semina, per entrambi i modelli utilizzati, cellule ben adese sulla superficie di tutti i materiali, con morfologia appiattita. I risultati ottenuti dopo 48 ore confermano tale osservazione, mostrando inoltre un'incrementata densità cellulare su tutti i substrati. I valori relativi allo studio dell'attività metabolica mostrano un andamento crescente nel tempo, per entrambe le linee cellulari (figura 2). Nel caso delle cellule osteoblastiche, i valori relativi alle superfici anodizzate risultano più elevati rispetto alle superfici non trattate, in generale fino al giorno 10 ($p < 0,05$), sia per i substrati in titanio, sia per quelli in lega.

Studio in vitro dell'adesione batterica

Adesione batterica su superfici di titanio differentemente modificate.

Studi di adesione *in vitro* sul titanio e relative superfici opportunamente modificate, condotti rispettivamente con i ceppi di *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Porphyromonas gingivalis*, hanno dimostrato una riduzione maggiore dell'adesione batterica sui campioni anodizzati, con anatasio (Y-AN) e senza anatasio superficiale (N-AN), rispetto ai substrati non trattati (CTR), già dopo tre ore di incubazione ($p < 0,05$) (figura 3, pannello A). La riduzione della capacità proliferativa dei tre ceppi batterici si è dimostrata ancora più evidente sulle superfici Y-AN e N-AN, se paragonate al numero di CFU/cm² rilevate sulla superficie di controllo dopo un'incubazione di 24 ore ($p < 0,05$) (figura 3, pannello B). In generale, l'efficienza di riduzione sul processo adesivo si è apprezzata in modo significativo per i tre ceppi batterici testati sul campione Y-AN, sia a tre ore, sia 24 ore ($p < 0,05$).

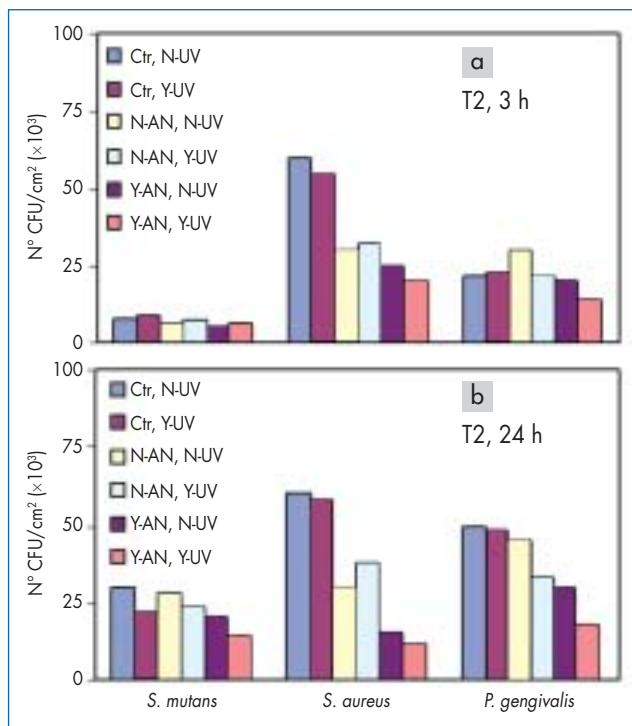
A tre ore, l'adesione del ceppo di *S. aureus* su N-AN e Y-AN è risultata significativamente ridotta rispetto all'adesio-

ne dei ceppi di *S. mutans* e *P. gingivalis* agli stessi campioni ($p < 0,05$) (figura 3a). A 24 ore, i ceppi di *S. aureus* e *P. gingivalis* hanno evidenziato una minore capacità proliferativa, sia su Y-AN, sia su N-AN rispetto al ceppo di *S. mutans*. ($p < 0,05$) (figura 3b).

In particolare, il pre-trattamento di ciascun campione per una breve esposizione ai raggi UV ha comportato una riduzione non particolarmente elevata sia della adesione batterica, sia della capacità proliferativa dei tre ceppi analizzati a 3 o 24 ore di incubazione sui campioni Y-AN e N-AN ($p < 0,05$) (figura 3).

Per quanto concerne lo studio *in vitro* di adesione e proliferazione batterica sulla lega di titanio Ti6Al4V e sulle superfici modificate correlate, si sono utilizzati i ceppi di *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* 8325-4 e *Staphylococcus epidermidis* RP62A, che sono stati incubati rispettivamente a tre e 24 ore. I risultati ottenuti hanno evidenziato, dopo tre ore, una minore capacità adesiva dei tre ceppi selezionati sulle superfici modificate Y-AN e N-AN, rispetto alla superficie di controllo ($p < 0,05$) (figura 4a). L'efficienza della riduzione sulla capacità proliferativa si è apprezzata in modo significativo sui campioni Y-AN e N-AN, rispetto a CTR ($p < 0,05$) (figura 4b). Anche in questo caso, il campione Y-AN ha mostrato il minor numero di CFU/cm² ($p < 0,05$).

In modo del tutto paragonabile a quanto già osservato per il titanio, il ceppo di *S. aureus* 8325-4, dopo tre ore, ha mostrato, sui campioni in lega N-AN e Y-AN, una minore capacità adesiva rispetto ai ceppi di *S. mutans* e *S. epidermidis* RP62A sugli stessi campioni ($p < 0,05$) (figura 4a). Lo stesso comportamento da parte del ceppo di *S. aureus* 8325-4 è osservabile dopo 24 ore ($p < 0,05$) (figura 4b). In particolare, la riduzione della capacità proliferativa del ceppo di *S. epidermidis* RP62A è stata particolarmente significativa sul campione Y-AN a 24 ore ($p < 0,05$).



3. Numero totale CFU di ciascuno dei ceppi batterici analizzati, su campioni di titanio di grado 2, rispettivamente dopo 3 ore (a) e 24 ore (b).

Anche per le superfici in lega di titanio, l'effetto dovuto a una breve pre-illuminazione con raggi UV non ha comportato una riduzione significativa, né dell'adesione, né della proliferazione batterica, dei tre ceppi selezionati a tre o 24 ore ($p > 0,05$) (figura 4).

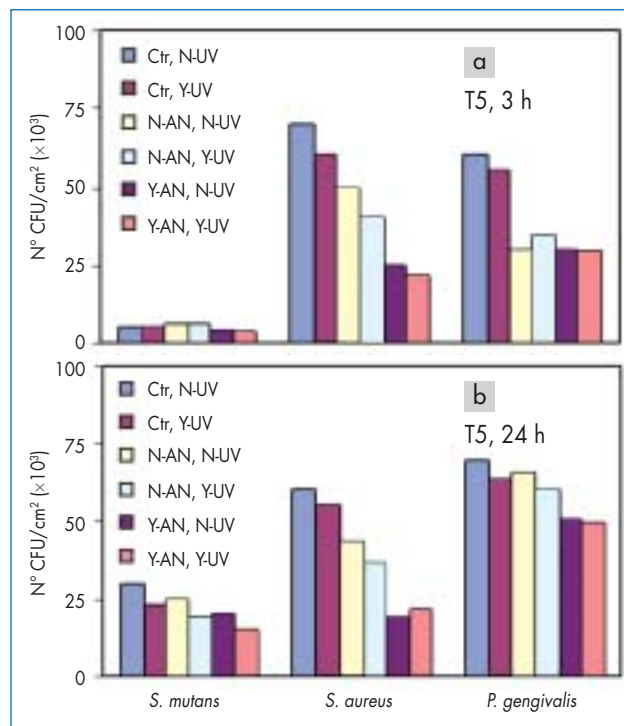
I risultati precedenti sono stati confermati qualitativamente anche dall'osservazione al SEM (dati non mostrati).

DISCUSSIONE

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto e caratterizzare trattamenti superficiali elettrochimici di ossidazione anodica su titanio e lega di titanio Ti6Al4V, al fine di migliorarne il comportamento *in vivo*, attraverso la formazione sulla superficie di ossido di titanio dalla struttura di anatasio.

Sono state analizzate diverse condizioni sperimentali, selezionate per consentire lo studio dell'effetto determinato sia della presenza, sia dell'ammontare di anatasio, sul comportamento cellulare e sulla colonizzazione batterica.

I risultati ottenuti indicano un aumento del picco relativo all'anatasio passando dal titanio, sottoposto all'anodizzazione al voltaggio crescente. Lo stesso comportamento è riscontrabile sulla lega di titanio Ti6Al4V (figura 5??? e 6???)

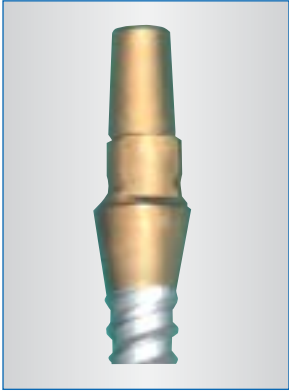


4. Numero totale CFU di ciascuno dei ceppi batterici analizzati, su campioni di lega di titanio Ti6Al4V, rispettivamente dopo 3 ore (a) e 24 ore (b).

I risultati relativi alla risposta biologica *in vitro* suggeriscono che tutte le superfici analizzate costituiscono substrati adeguati per la colonizzazione cellulare, mostrando nel caso delle analisi al microscopio cellule ben adese e distribuite sui campioni, con morfologia ottimale. I dati ottenuti dallo studio dell'attività metabolica conferma tali ipotesi fornendo valori crescenti nel tempo per entrambe le linee cellulari utilizzate. I valori più elevati dell'attività metabolica delle cellule di tipo osteoblastico, coltivate sulle superfici anodizzate rispetto a quelle non anodizzate, suggeriscono che i processi di anodizzazione possono influenzare positivamente i processi di osteointegrazione. In generale, i risultati ottenuti indicano che le modifiche superficiali applicate ai materiali non influenzano in maniera significativa la risposta cellulare: sia nel caso del titanio, sia nel caso della lega, preservando le ottime proprietà di compatibilità biologica del titanio.

I risultati sperimentali dello studio sulla vitalità batterica, condotti con quattro ceppi batterici differenti, hanno confermato in generale i precedenti dati ottenuti da altri autori^{38,43-45} che avevano illustrato l'attività battericida delle superfici di biossido di titanio in forma ceramica.

L'attività fotocatalitica (PCA) è la capacità da parte di un materiale di catalizzare reazioni di ossidazione/riduzione per effetto dell'illuminazione, ottenuta con onde luminose



5. Esempio di trattamento di anodizzazione sulla parte transmucosa di un mini-impianto.



6. Un differente voltaggio nel trattamento di anodizzazione determina un diverso effetto cromatico.

di lunghezze d'onda opportuna. Il materiale ceramico massivo TiO_2 , – come la maggior parte degli ossidi dei semiconduttori – manifesta questa proprietà. Quando questi materiali sono illuminati in modo appropriato, sono prodotti buchi di coppie elettroniche nell'ossido per il trasferimento di elettroni della banda di valenza a quelle di conduzione.

L'anatasio, che presenta un intervallo di banda più grande, tende ad aumentare i potenziali *redox* della superficie e a prolungare la vita del carrier rispetto ad altre forme di ossido di titanio. Sebbene diversi studi abbiano dimostrato l'efficacia dell'attività battericida del TiO_2 , non è ancora stato definito il meccanismo fondamentale alla base del processo fotocatalitico responsabile dell'eliminazione dei batteri. Un meccanismo abbastanza generale che cerca di spiegare l'azione battericida del biossido di titanio è stato proposto da vari autori e riportato da Blake et al.⁴⁶

Gli elettroni di valenza sono capaci di ossidare l'acqua fino a formare radicali idrossilici nell'acqua stessa. Si pensa, quindi, che questi radicali giochino un ruolo di vitale importanza per l'ossidazione delle membrane cellulari in ambiente acquoso³⁸.

L'attacco ossidativo alle membrane cellulari causa la perossidazione della componente lipidica di membrana ed è responsabile della morte della cellula. A ogni modo, devono essere condotti ulteriori studi *in vitro* sulle superfici di titanio così modificate per poter chiarire con maggiore certezza il/i meccanismo/i che è/sono dannoso/i per la sopravvivenza delle cellule batteriche.

In questo studio, l'effetto della pre-illuminazione con luce ultravioletta delle superfici opportunamente modificate di titanio e lega incubate *in vitro* con i ceppi batterici quali *S. mutans*, *S. aureus*, *P. gingivalis* e *S. epidermidis* ha influito poco sull'adesione e la crescita batterica, rispetto alle stesse superfici di titanio anodizzate ma non pre-illuminate.

I dati sperimentali ottenuti confermano comunque la potenzialità del trattamento di modificazione superficiale – soprattutto per i campioni anodizzati con un voltaggio superiore – in quanto risulta migliore la sua efficacia nella riduzione dell'adesione e della crescita batterica. Diversi autori hanno ampiamente discusso sull'influenza dello spessore dell'ossido sull'attività fotocatalitica, sostenendo che quest'ultima non aumenta all'incrementare dello spessore dell'ossido.

I nostri dati sperimentali sembrano invece andare in direzione opposta, anche se le spiegazioni di questo comportamento possono essere imputate a diversi fattori, quali ad esempio l'effettiva distanza alla quale il reagente dev'essere raggiunto per catturare gli elettroni generati nei film sottili di TiO_2 , la quantità di ioni idrossilici per unità di peso di TiO_2 , lo spessore del film e così via.

CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato che è possibile applicare dei trattamenti elettrochimici, capaci di modificare la struttura del film di ossido superficiale del titanio. È stato osservato come per voltaggi di anodizzazione crescenti, aumenti la fase cristallina di ossido con struttura anatasio. Proprio per questi materiali sono state osservate le migliori proprietà antibatteriche.

Si segnala, inoltre, che questi trattamenti di anodizzazione consentono, unitamente alla modifica della struttura dell'ossido, di cambiare l'aspetto estetico del titanio e della lega di titanio, introducendo delle colorazioni di interferenza che possono apportare al tratto transmucoso dell'impianto un trattamento con una notevole valenza estetica, laddove sia maggiore l'esigenza di apportare un controllo funzionale della proliferazione batterica.

Ringraziamenti

Questo lavoro di ricerca è stato supportato dai Progetti di Ricerca di Interesse Nazionale (PRIN 2004 al prof. A.C. e alla dott. L.V.) finanziati dal Ministero Italiano della Educazione e della Ricerca Scientifica.

Corrispondenza: Roberto Chiesa
Dipartimento di Chimica, Materiali
Ingegneria Chimica "G. Natta",
Politecnico di Milano
via Mancinelli 7, 20131 Milano
e-mail: roberto.chiesa@polimi.it



zimmer | dental

Leader in Implantologia



DiADent

Distributore esclusivo

DIADENT srl Via Matteotti, 98 31029 Vittorio Veneto - TV
Tel. 0438 555573 Fax 0438 553181 diadent@diadent.it www.diadent.it

SWISS PLUS



TAPERED SCREW-VENT



SPLINE



Impianti approvati FDA per carico immediato

BIBLIOGRAFIA

1. Mombelli A. Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* 1993;7:202-6.
2. Leonhardt A, Adolfsson B, Lekholm U, Wikstrom M, Dahlen G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 1993;4:113-20.
3. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:1-19.
4. Quirynen M, Teughels W. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol* 2000 2003;33:119-28.
5. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res* 1989;24:96-105.
6. Papaioannou W, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 1996;7:405-9.
7. Gouvoussis J, Sindhusake D, Yeung S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:666-73.
8. Rutar A, Lang NP, Buser D, Burgin W, Mombelli A. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:189-95.
9. Kohavi D, Greenberg R, Raviv E, Sela J. Subgingival and supragingival microbial flora around healthy osseointegrated implants in partially edentulous patients. *Int J Oral Maxillofacial Impl* 1994;9: 673-8.
10. Koka S, Razzoog ME, Bloem TJ, Syed S. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. *J Prosthet Dent* 1993;70:141-4.
11. Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlen G. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1992;3:112-9.
12. Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1995;22:124-30.
13. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:8-12.

14. Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:696-702.
15. Saito A, Hosaka Y, Sekiguchi K, Kigure T, Isobe S, Shibukawa Y, Sumii H, Ito T, Nakagawa T, Yamada S. Responses of peri-implant tissues to undisturbed plaque formation in dogs: clinical, radiographic, and microbiological findings. *Bull Tokyo Dent Coll* 1997;38:13-20.
16. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, Naert I, Busscher HJ, van Steenberghe D. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res* 1993;72:1304-9.
17. Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, Walters KS. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol* 1995;21:207-13.
18. Rimondini L, Fare S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Carrasi A. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol* 1997;68:556-62.
19. Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Hausteim I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel UB. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:543-51.
20. Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedeferra MP, Valtulina V, Visai L, Cigada A. Decreased bacterial adhesion to surface treated titanium. *The International Journal of Artificial Organs* 2005;28:718-30.
21. Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:321-6.
22. Wolinsky LE, De Camargo PM, Erard JC, Newman MG. A study of in vitro attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:27-31.
23. Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:226-32.
24. Leonhardt A, Olsson J, Dahlen G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo. *J Dent Res* 1995;74:1607-12.
25. Berry CW, Moore TJ, Safar JA, Henry CA, Wagner MJ. Antibacterial activity of dental implant metals. *Implant Dent*. 1992;1:59-65.
26. Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 1993;4:53-64.
27. Fujioka-Hirai Y, Akagawa Y, Minagi S, Tsuru H, Miyake Y, Suginaka H. Adherence of *Streptococcus mutans* to implant materials. *J Biomed Mater Res* 1987;21:913-20.
28. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *J Oral Rehabil* 2004;31:140-8.
29. Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Hausteim I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel UB. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:543-51.
30. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol* 2004;75:292-6.
31. Leonhardt A, Dahlen G. Effect of titanium on selected oral species in vitro. *Clin Oral Impl Res* 1995;4:3-64.
32. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000;52:388-94.
33. Bellanda M, Cassinelli C, Morra M. Reduced plaque accumulation on hydrocarbon thin film deposited on restorative acrylic polymers. *J Biomed Mater Res* 1997;36:216-22.
34. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K, Hirayama A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000;52:388-94.
35. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials* 2001;22:2043-8.
36. Ikeda S, Igarashi T. Titanium plate anodization by discharging in NaCl, NaF, KI solution acquires antibacterial activity to oral bacteria. *Jpn J Dent Mater* 2001;20:68-76.
37. Shibata Y, Kawai H, Yamamoto H, Igarashi T, Miyazaki T. Antibacterial titanium plate anodized by being discharged in NaCl solution exhibits cell compatibility. *J Dent Res* 2004;83:115-9.
38. Mills A, Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J Photochem Photobiol. A Chem* 1997;108:1-35.
39. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-32.
40. Giordano C, Sandrini E, Del Curto B, Signorelli E, Rondelli G, Di Silvio L. Titanium for osteointegration: Comparison between a novel biomimetic treatment and commercially exploited surfaces. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2004;2:35-44.
41. Gopal J, Muraleedharan P, George P, Khatak HS. Investigations of the antibacterial properties of an anodized titanium alloy. *Trends Biomater. Artif Organs* 2003;17:13-18.
42. Visai L, Rindi S, Speziale P, Petrini P, Farè S, Tanzi MC. In vitro interactions of biomedical polyurethanes with macrophages and bacterial cells. *J Biomat Appl* 2002;16:191-214.
43. Matsunaga T, Tomada T, Nakajima N, Wake H. Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol Letter* 1985;29:211-4.
44. Saito T, Iwase T, Morioka T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci. *J Photochem Photobiol B Biol* 1992;14:369-79.
45. Wei C, Lin W-Y, Zaina Z, Williams NE, Zhu K, Kruzic AP, Smith RL, Rajeshwar K. Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. *Environ Sci Technol* 1994;28:934-8.
46. Blake DM, Maness P, Huang C, Wolfrum EJ, Jacoby WA, Huang J. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Sep Purif Meth* 1999;28:1-50.