



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**UTILIZZO DELLA STAMPA 3D NELLA PIANIFICAZIONE DI  
INTERVENTI DI CARDIOCHIRURGIA**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Jessica Bruttomesso**

**Correlatore: Prof. Vladimiro Vida**

**ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022**

**Data di laurea 20/09/2022**

## Indice

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abstract                                                                                          | pagina 3  |
| Capitolo 1: Introduzione                                                                          | pagina 4  |
| Capitolo 2: La stampa 3D, nascita ed evoluzione                                                   | pagina 5  |
| 2.1 Principali tecniche di stampa 3D                                                              | pagina 7  |
| 2.1.1 <i>Classificazione delle tecniche a prototipazione rapida</i>                               | pagina 7  |
| 2.1.2 <i>La melt-electrowriting</i>                                                               | pagina 13 |
| Capitolo 3: La stampa 3D nella pianificazione chirurgica                                          | pagina 15 |
| 3.1 Progressi della stampa 3D in cardiochirurgia nell'Azienda Ospedaliera di Padova               | pagina 17 |
| 3.2. Cenni sulle cardiopatie congenite                                                            | pagina 21 |
| 3.2.1 <i>Simulazione di un intervento chirurgico: procedura correttiva di coartazione aortica</i> | pagina 21 |
| Capitolo 4: Utilizzo di biomateriali polimerici in ambito cardiochirurgico                        | pagina 24 |
| 4.1 Descrizione dei principali materiali polimerici                                               | pagina 25 |
| 4.1.1 <i>Polimeri naturali</i>                                                                    | pagina 26 |
| 4.2 Polimeri sintetici                                                                            | pagina 28 |
| 4.2.1 <i>Acido polilattico (PLA)</i>                                                              | pagina 28 |
| 4.2.2 <i>Alcool polivinilico (PVA)</i>                                                            | pagina 29 |
| 4.3 Test in vivo su modello animale                                                               | pagina 30 |
| 4.3.1 <i>Aspetti tecnici dell'intervento</i>                                                      | pagina 30 |
| 4.3.2 <i>Gestione post-operatoria dell'animale</i>                                                | pagina 34 |
| 4.3.3 <i>Analisi istologiche relative al PLA</i>                                                  | pagina 35 |
| Capitolo 5: Conclusioni                                                                           | pagina 37 |
| Bibliografia                                                                                      | pagina 38 |
| Ringraziamenti                                                                                    | pagina 42 |

## **Abstract**

La stampa 3D è una tecnologia in continua crescita e già ampiamente utilizzata in ambito medico che permette di realizzare la cosiddetta “prototipazione rapida”, cioè la veloce produzione fisica di modelli virtuali elaborati con un sistema CAD (Computer-Aided Design). La stampa 3D ha avuto una grandissima evoluzione, dalla sua nascita sino ad oggi, mettendo a disposizione moltissime tecniche di produzione di modelli tridimensionali che verranno descritti nella presente tesi.

Verrà approfondito in particolare il funzionamento della stampante 3D Form3L disponibile presso la UOC di Cardiocirurgia Pediatrica dell’Azienda Ospedale Università Padova (AOUP), il cui processo di stampa si basa sul software Meshmixer.

Questa stampante viene utilizzata con lo scopo di progettare e produrre repliche anatomiche di organi e tessuti, utilizzati dal personale medico per una più accurata fase di pianificazione preoperatoria.

In secondo luogo la stampa 3D permette la produzione di matrici tridimensionali e porose, ottenute con biomateriali polimerici, che forniscono un supporto meccanico alle cellule in crescita al fine di rigenerare un tessuto o un organo danneggiato. Si parlerà pertanto dei biomateriali polimerici utilizzati a tale scopo, ponendo particolare attenzione all’acido polilattico e all’alcol polivinilico. In particolare, si analizzeranno le proprietà di biodegradabilità di questi due materiali tramite dei test in vivo effettuati su ratti presso il laboratorio del reparto di Cardiocirurgia Pediatrica dell’Ospedale Università di Padova.

## **Capitolo 1: Introduzione**

Questa tesi nasce dal desiderio di approfondire un argomento molto interessante e sempre più importante in ambito medico e chirurgico, che è stato possibile comprendere e sperimentare nel corso dell'esperienza di tirocinio presso il reparto di Cardiochirurgia Pediatrica dell'Azienda Ospedale Università di Padova: l'utilizzo della stampa 3D.

La stampa 3D ha due obiettivi principali, che verranno approfonditi e analizzati nella presente tesi. Il suo primo importante utilizzo è la produzione di repliche anatomiche di organi di pazienti affetti da patologie, che vengono utilizzate per la fase di planning pre-operatorio e per lo studio approfondito della morfologia di un organo o un tessuto. In particolare, nel corso dell'esperienza di tirocinio presso l'Azienda Ospedaliera di Padova, è stato possibile comprendere l'importanza della stampa 3D nel settore cardochirurgico: essa permette di realizzare la cosiddetta "prototipazione rapida", cioè la veloce produzione fisica di oggetti a partire da modelli virtuali elaborati con un sistema CAD (Computer-Aided Design).

La stampante 3D disponibile presso la UOC dell'Azienda Ospedale Università di Padova permette di produrre repliche anatomiche di organi e tessuti di pazienti affetti da cardiopatie congenite o difetti cardiaci, che vengono utilizzate per la pianificazione e la simulazione di un intervento operatorio.

Nella presente tesi, perciò, verranno approfondite le varie tecniche di stampa 3D, in particolare quella della stampante Form3L utilizzata nel reparto di Cardiochirurgia Pediatrica, e verrà descritto un esempio di simulazione di un intervento chirurgico.

In secondo luogo, la stampa 3D è molto importante per la produzione di matrici tridimensionali e porose, ottenute con biomateriali polimerici, che forniscono un supporto meccanico alle cellule in crescita al fine di rigenerare un tessuto o un organo danneggiato.

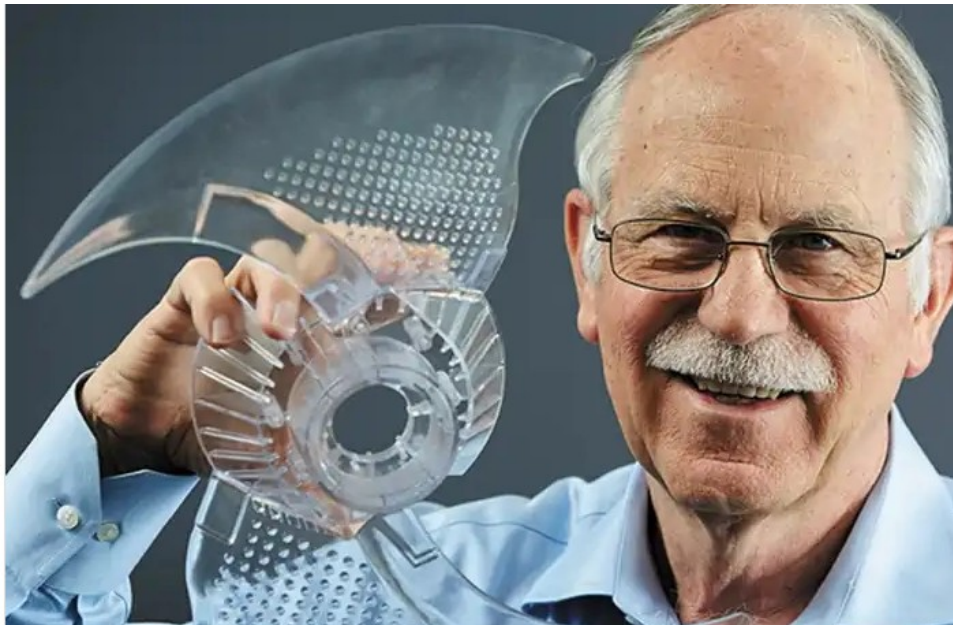
Saranno perciò approfondite le caratteristiche di due dei principali biomateriali utilizzabili, cioè l'acido polilattico (PLA) e l'alcol polivinilico (PVA), le cui proprietà di biodegradabilità sono state analizzate tramite test in vivo effettuati su modello animale nel laboratorio della Cardiochirurgia Pediatrica.

## Capitolo 2: La stampa 3D, nascita ed evoluzione

La tecnologia di stampa 3D nasce come evoluzione di quella bidimensionale e consiste in un processo additivo, ovvero in grado di trasformare i modelli virtuali creati con la progettazione assistita dal computer (CAD) in oggetti fisici 3D in modo “stratificato” [1].

La stampa 3D esplose sullo scenario statunitense circa 30 anni fa ed in seguito a tale invenzione emersero moltissime opportunità interessanti in tutti i settori dell’industria.

La prima persona a sperimentare la tecnologia di stampa 3D all’inizio degli anni ’80 fu il Dr. Hideo Kodama dal Giappone, il quale creò un sistema di stampa in cui la resina veniva esposta alla luce UV strato per strato, producendo alla fine un solido modello 3D. Egli depositò un brevetto ma non riuscì a completare tutti i requisiti per ottenerne uno, pertanto il suo metodo di stampa 3D non è mai stato commercializzato. Fu allora che intervenne l’ingegnere, inventore e imprenditore statunitense, Chuck Hull, che fu il primo a depositare ufficialmente un brevetto per la stampa 3D SLA nel 1984 e per tale motivo è stato accreditato come “uno dei pionieri della stampa 3D” (Figura 2.1). A Hull viene in particolare riconosciuto il merito di aver inventato la stereolitografia laser (SLA), il primo esempio commerciale di prototipazione rapida (la cui procedura di stampa verrà approfondita nel paragrafo successivo), creando una sua società di stampa 3D chiamata 3D Systems, ancora oggi attiva e considerata l’azienda all’apice del settore [2].

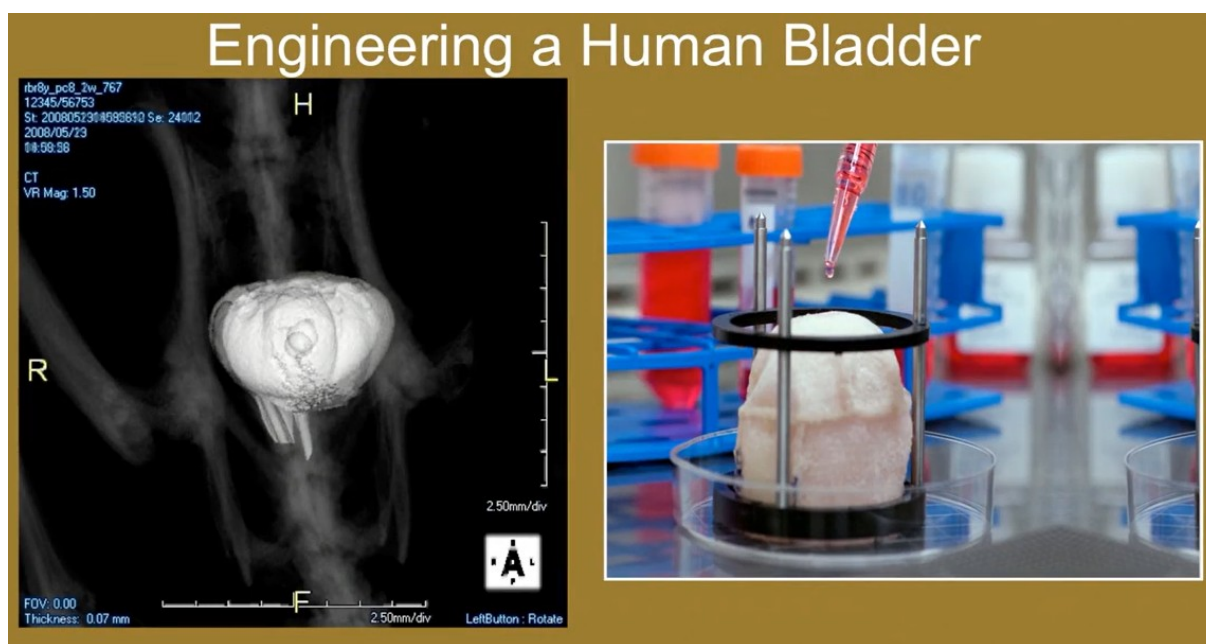


*Figura 2.1: Chuck Hull, creatore della stereolitografia laser SLA che mostra il suo primo oggetto stampato tramite stereolitografia [3].*

Il *3D printing*, sin da subito si è evoluto all'interno di moltissimi settori applicativi: domestico, automobilistico, aeronautico, industriale, edile; ma la sua invenzione ha avuto una grandissima importanza in particolar modo nel settore sanitario [4].

Una grande svolta scientifica si è verificata nel 1999, quando un'equipe di scienziati statunitensi, guidata dal chirurgo bioingegnere Anthony Atala, costruirono uno scaffold artificiale di vescica umana con una stampante 3D convenzionale. Le cellule umane, prelevate da un paziente, sono state poi seminate sullo scaffold che è stato quindi utilizzato per rigenerare la vescica trapiantata con successo nello stesso paziente (Figura 2.2).

Questo fatto ha indotto a perseguire una successiva applicazione, cioè la produzione di un rene in miniatura completamente funzionale che è stato stampato nel 2002 e applicato su modello animale. Il rene stampato in 3D è stato in grado di filtrare con successo il sangue e produrre urina per la prima volta nella storia.



*Figura 2.2: produzione di una vescica umana funzionante tramite la stampa 3D, ad opera del chirurgo bioingegnere Anthony Atala [5].*

Da allora vennero stampati in 3D molti altri organi umani come un fegato, un'impalcatura polmonare e persino un cuore; fino ad arrivare al 2008 quando fu stampata la prima gamba protesica e successivamente impiantata con successo su un paziente [2].

Grazie a questa serie di eventi, la stampa 3D iniziò ad avere un'importanza cruciale in ambito medico e chirurgico; in particolare essa ha due obiettivi principali che verranno approfonditi nei prossimi capitoli. Il primo importante utilizzo della stampa 3D è la produzione di repliche anatomiche di organi di pazienti affetti da patologie che vengono utilizzate per la fase di

planning pre-operatorio e per lo studio approfondito della morfologia di un organo o un tessuto. In secondo luogo, la stampa 3D è molto importante per la produzione di matrici tridimensionali e porose che forniscono un supporto meccanico alle cellule in crescita con il fine di rigenerare un tessuto o un organo danneggiato.

## **2.1 Principali tecniche di stampa 3D**

I metodi maggiormente utilizzati per la fabbricazione di modelli tridimensionali vengono dette a prototipazione rapida (RP), una tecnologia innovativa che consente la produzione di oggetti dotati di geometria complessa, in tempi molto ridotti, a partire dalla rappresentazione dell'oggetto realizzata su un modello CAD tridimensionale.

Le tecniche a prototipazione rapida si basano sulla considerazione che ogni oggetto può essere suddiviso in moltissime sezioni di spessore infinitesimo; perciò il prototipo viene realizzato sezione dopo sezione, assemblando piani bidimensionali in un oggetto a tre dimensioni.

Questa procedura viene effettuata con un processo di fabbricazione additiva, ovvero consente di ottenere l'oggetto 3D tramite la deposizione di strati sovrapposti e per questo motivo la tecnologia RP è anche definita “tecnica di produzione per strati o per piani” (layer manufacturing). I materiali utilizzati possono essere liquidi, solidi e polveri e permettono un significativo miglioramento della biocompatibilità del prodotto finale [6].

Le tecniche a prototipazione rapida sono nate con l'intento di superare le limitazioni dei metodi convenzionali e presentano notevoli vantaggi che si possono osservare nella Tabella 2.1. Le tecniche convenzionali, a differenza delle PR, permettono di ottenere modelli tramite una procedura di sottrazione in cui viene rimosso materiale dal prodotto di partenza fino a ottenere la conformazione desiderata [7].

### *2.1.1 Classificazione delle tecniche a prototipazione rapida*

Tra le tecniche di stampa 3D a prototipazione rapida ormai consolidate e ampiamente diffuse sul mercato si citano le seguenti:

- 1 la *fused deposition modeling* (FDM) è un metodo di stampa nel quale si utilizza un ugello mobile per rilasciare delle fibre polimeriche che si depositano tra di loro, strato dopo strato, fino alla realizzazione del prodotto finale (Tabella 2.3). La FDM è un processo complesso, caratterizzato da un gran numero di parametri che influenzano la qualità e le proprietà finali del prodotto. La porosità del materiale ottenuto può variare tra il 48 e il 77%, in dipendenza del diametro della punta dell'ugello, e permette la produzione di materiali dotati di buona resistenza meccanica. In particolare nel caso dei polimeri

semicristallini, che offrono migliori proprietà meccaniche rispetto a quelli amorfi, è necessario comprendere la cinetica di cristallizzazione al variare delle condizioni di lavorazione al fine di avere un migliore controllo sul processo e di conseguenza sulle proprietà finali del materiale. La cinetica di cristallizzazione è studiata sia in condizioni isotermitiche che di raffreddamento veloce, grazie ad un dispositivo che permette di imitare lo spegnimento sperimentato durante la deposizione del filamento. Questa tecnica presenta il vantaggio di non utilizzare solventi organici tossici, tuttavia, le elevate temperature raggiunte nel processo di produzione (anche oltre i 120°C) impediscono l'incorporazione di molecole biologiche [8].

|                                     | <b>TECNICHE CONVENZIONALI</b>                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>TECNICHE A<br/>PROTOTIPAZIONE RAPIDA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MECCANISMO DI<br/>PRODUZIONE</b> | metodo di sottrazione rimuovendo materiale dal prodotto di partenza per ottenere la conformazione desiderata                                                                                                                                                                            | processo di fabbricazione additiva per ottenere l'oggetto in 3D tramite la deposizione di strati sovrapposti                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>SVANTAGGI</b>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- limitata capacità di controllare la forma e la geometria dei prodotti</li> <li>- non consentono di ottenere prodotti con buona porosità</li> <li>- l'uso di solventi organici può compromettere la vitalità e le funzioni cellulari</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- processi più elaborati e costosi</li> <li>- le elevate temperature raggiunte nel processo impediscono l'incorporazione di molecole biologiche</li> <li>- possibile irritazione cutanea e citotossicità causata dalle resine fotosensibili</li> </ul>                                                                                                                                                        |
| <b>VANTAGGI</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- tecnica meno costosa</li> <li>- lavorazione più semplice</li> </ul>                                                                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- consentono un significativo miglioramento della biocompatibilità del materiale prodotto</li> <li>- controllo preciso della porosità e delle caratteristiche meccaniche permettono di progettare modelli composti da più materiali e ne regolano l'interfaccia</li> <li>- rapidità nello sviluppo e nella gestione delle modifiche del progetto</li> <li>- migliore qualità del manufatto finale.</li> </ul> |

*Tabella 2.1: principali differenze tra le tecniche di manifattura convenzionali e a prototipazione rapida (RP): quelle RP siano molto più convenienti per la fabbricazione di modelli tridimensionali [7].*

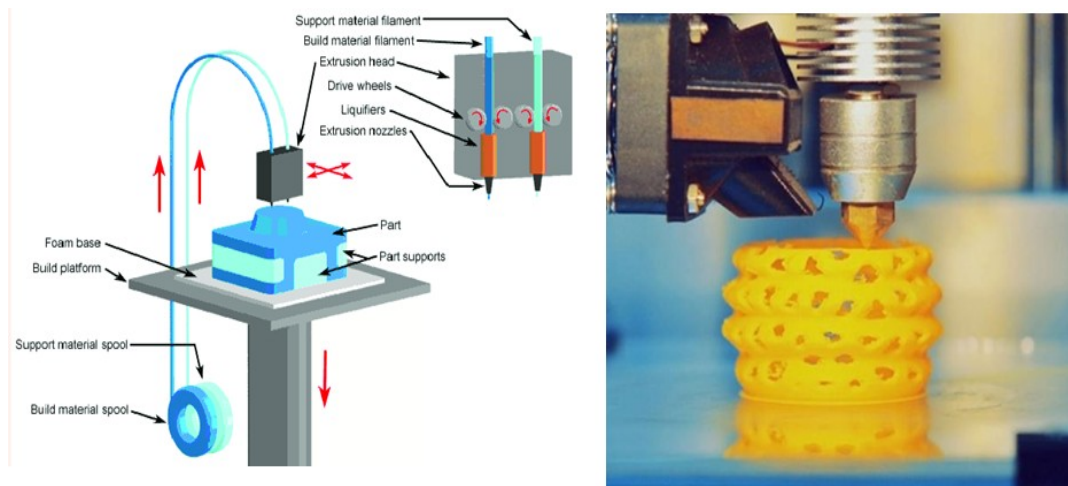


Figura 2.3: a sinistra meccanismo di funzionamento della fused deposition modeling, a destra esempio di materiale prodotto [9].

2 la *stereolitografia* (SLA) è un processo che consiste nella polimerizzazione di un monomero liquido, trasformandolo in materiale solido, per mezzo di un fascio laser di raggi UV che si muove lungo gli assi x e y sulla superficie del monomero seguendo i dati forniti da un sistema computerizzato (Figura 2.4). La stampa 3D stereolitografica (SLA) è diventata molto popolare grazie alla capacità di realizzare parti e prototipi ad alta precisione, isotropici e impermeabili in una vasta gamma di materiali con dettagli raffinati e una elevata finitura superficiale. Le stampanti SLA, infatti, utilizzano materiali termoindurenti e reattivi alla luce chiamati "resine". Quando le resine per stereolitografia vengono esposte alla luce con una determinata lunghezza d'onda, brevi catene molecolari si uniscono, polimerizzando i monomeri e gli oligomeri in geometrie solidificate rigide o flessibili [10].

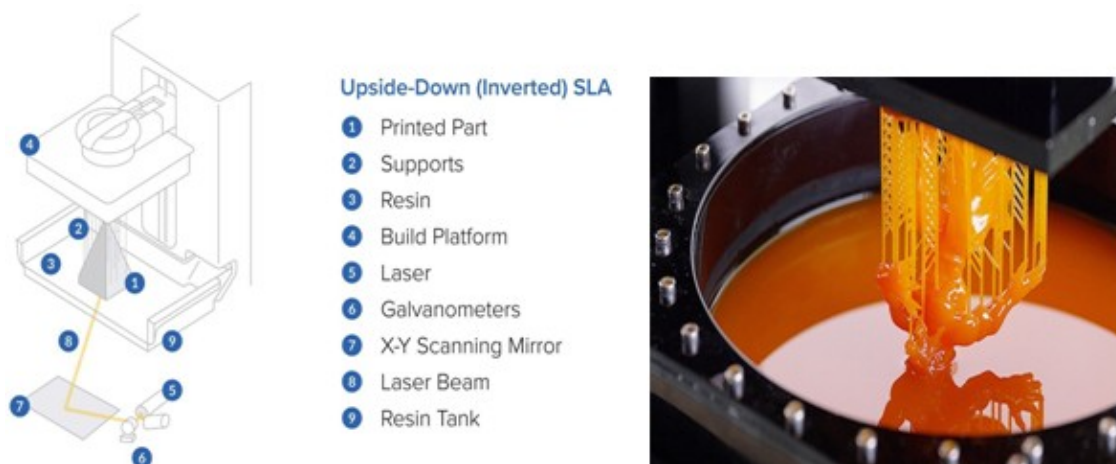


Figura 2.4: a sinistra funzionamento della stampa 3D nel processo di stereolitografia, a destra esempio di un materiale stampato [11].

Le parti stampate tramite stereolitografia, oltre al fatto presentare una migliore risoluzione e precisione rispetto a tutte le altre tecnologie di stampa 3D, hanno un vantaggio fondamentale: la versatilità. I produttori di materiali hanno infatti creato delle formulazioni innovative di resina per la stereolitografia con una vasta gamma di proprietà ottiche, meccaniche e termiche in grado di imitare quelle delle resine termoplastiche standard, ingegneristiche ed industriali [10]. Tuttavia, anche questa tecnica presenta degli svantaggi: irritazione cutanea e citotossicità causata dalle resine foto-sensibili utilizzate nel processo di produzione dei biomateriali sembrano essere un grosso problema; per questo motivo, si ricorre sempre più spesso a resine alternative a base di esteri vinilici che possiedono una migliore biocompatibilità [12]. La SLA è la tecnica di stampa maggiormente utilizzata in ambito medico per la riproduzione di modelli anatomici di organi e tessuti di pazienti affetti da patologie ed è perciò fondamentale nella fase di programmazione di interventi chirurgici e per altri importanti obiettivi in ambito medico, argomento che verrà approfondito nel Capitolo 2;

- 3 la *sinterizzazione laser selettiva* (SLS) consiste in una tecnica di stampa 3D che comporta la fusione di strati di materiale in polvere (tipicamente con spessore di  $\sim 0,1$  mm), distribuiti uniformemente sull'area di stampa utilizzando un rullo livellatore controrotante. La polvere nella base di stampa viene preriscaldata e mantenuta appena al di sotto del punto di fusione e/o della temperatura di transizione vetrosa del materiale in polvere con l'aiuto di riscaldanti a infrarossi presenti sopra il letto di stampa. Una volta terminato il preriscaldamento, un raggio laser di CO<sub>2</sub> concentrato viene puntato sul letto di in modo da fondere termicamente il materiale formando la sezione trasversale strato per strato a seconda del disegno CAD. Dopo che uno strato è stato completato, il letto di stampa viene abbassato a seconda dello spessore del layer e un nuovo strato di polvere viene depositato e livellato utilizzando il rullo controrotante. Questo processo continua ripetutamente fino a quando tutte le sezioni trasversali vengono depositate l'una sull'altra ottenendo così il modello 3D terminato. Infine le parti completate vengono rimosse dal letto separandole dalla polvere residua e, se necessario, è possibile effettuare ulteriori operazioni di finitura quali tintura, colorazione, sabbiatura, finitura alimentare (Figura 2.5). L'SLS è uno dei metodi di stampa più affidabili e precisi per la produzione di piccoli lotti e per applicazioni a livello industriale. Essa è inoltre una delle tecniche in assoluto più veloci in quanto le polveri polimeriche utilizzate in questa tecnica richiedono solo pochissima esposizione al laser per essere sinterizzate [13].

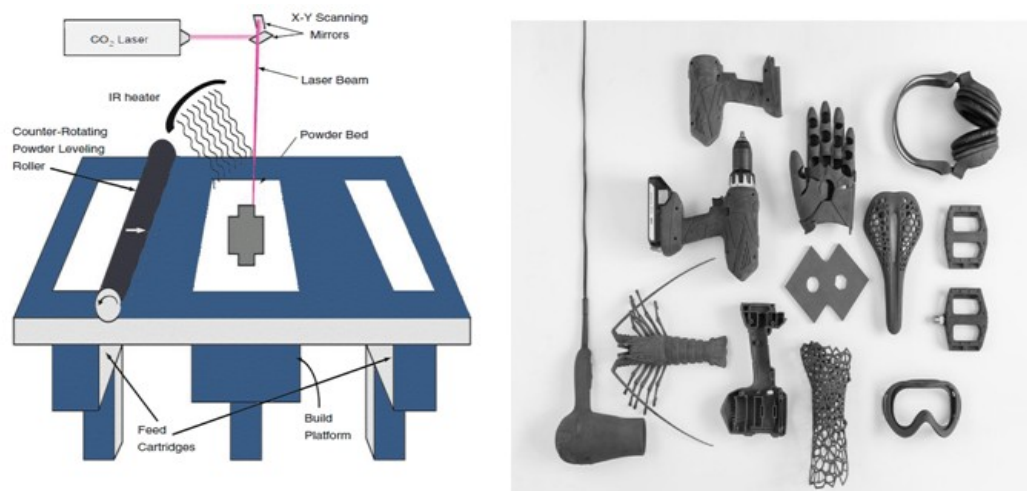


Figura 2.5: a sinistra schema del processo di SLS, a destra esempio di piccoli lotti produttivi [14].

Tra le tecniche più innovative, in particolare nel campo dell'ingegneria tissutale ossea, vi è il *bioprinting*. Tale processo si riferisce alla stampa e alla modellazione di cellule viventi, pertanto è bene fare una distinzione da tutti gli altri metodi di stampa analizzati che, al contrario, non coinvolgono entità cellulari, ma soltanto materiali inerti.

Nel bioprinting piccole unità di biomateriali e cellule vengono depositate in successione su un substrato o su un piatto di coltura tissutale, attraverso un sistema di distribuzione automatizzato molto accurato, permettendo la regolazione della distribuzione cellulare e la produzione di tessuti biologici (Figura 2.6) Il componente principale di tale processo è il bioink (bioinchiostro) costituito da cellule viventi, fattori di crescita e biomateriali che imitano l'ambiente della matrice extracellulare, favorendo le funzioni di adesione, proliferazione e differenziazione delle cellule dopo la stampa.

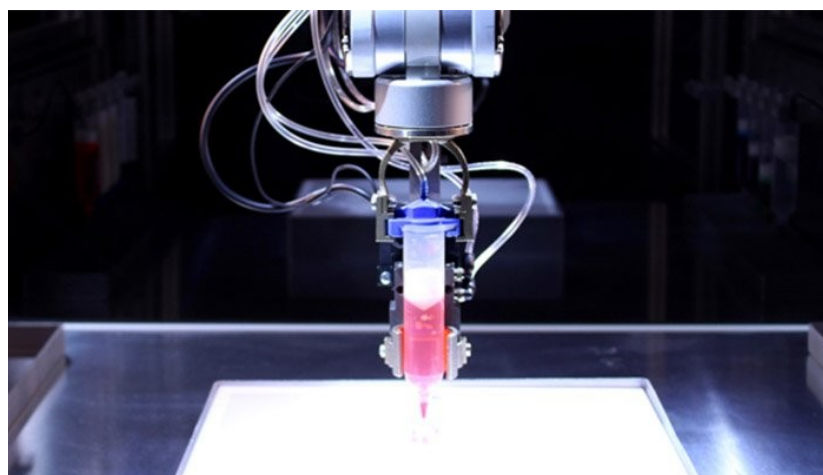


Figura 2.6: esempio di stampante bioprinting a getto di inchiostro [15].

Il Bioprinting si distingue in tre principali tecnologie di stampa che si differenziano a seconda di come si realizza la deposizione di bioink (Figura 2.7):

- *bioprinting a estrusione*: il metodo è basato sull'uso di un'estrusione per creare modelli 3D utilizzando biomateriali per la stampa che vengono inserite all'interno di siringhe o serbatoi monouso ad uso medico. La soluzione viene poi estrusa coordinando il movimento di un pistone a pressione o di un microago su un substrato stazionario;
- *bioprinting a getto d'inchiostro*: una tecnologia senza contatto che permette di depositare piccole goccioline di un bioink strato dopo strato, con risoluzione micrometrica, su un supporto di idrogel o una capsula di petri. Questa tecnologia può essere effettuata tramite due metodi: termico e piezoelettrico. Quello termico impiega un sistema riscaldante in grado di creare bolle d'aria che collassano e forniscono la pressione necessaria a espellere le gocce di inchiostro. La tecnologia piezoelettrica, invece, non impiega il calore per generare la pressione necessaria, ma utilizza una carica elettrica che si accumula in determinati materiali solidi;
- *bioprinting laser-assistito (LAB)*: prevede l'applicazione di un laser pulsato ad alta energia su un nastro donatore rivestito con il bioink da stampare per generare l'espulsione locale di piccole goccioline. La luce laser incidente è focalizzata principalmente su un substrato trasparente rivestito con uno strato sottile di metallo che assorbe l'energia della luce e ne promuove il trasferimento al bioink. In questo momento, viene generata una bolla ad alta pressione e una piccola goccia viene spinta verso una piattaforma ricevente [16].

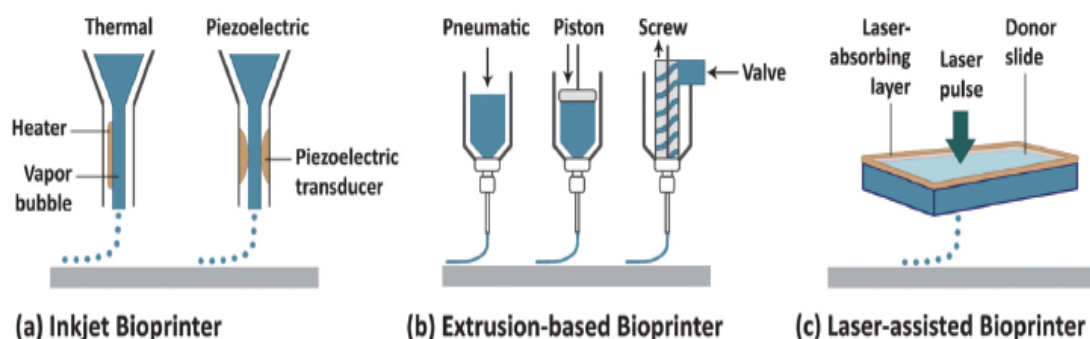


Figura 2.7: Rappresentazione schematica delle principali tecnologie di bioprinting 3D. (a) Bioprinting a getto d'inchiostro/goccioline. (b) Bioprinting a estrusione. (c) Bioprinting laser-assistito [17].

### 2.1.2. La melt-electrowriting

Tra i metodi di stampa 3D, la melt electrowriting (MEW) ha mostrato un grande potenziale grazie alla sua capacità unica di depositare fibre di dimensioni nanometriche con architetture ordinate e predefinite.

Questa tecnologia avanzata di stampa 3D combina i principi dell'elettrofilatura e della fabbricazione additiva. Il processo di stampa tramite MEW è essenzialmente basato sull'estrusione di sottilissime fibre polimeriche a partire da una soluzione di polimero sottoposta ad una differenza di potenziale applicata tra la punta dell'estrusore e la piastra (collettore) sulla quale vengono dirette. Il getto polimerico che si genera viene accelerato ed allungato grazie al campo elettrico e, durante la fase di "volo" verso il collettore, si stira ed assottiglia. Il campo elettrico svolge un ruolo fondamentale nella MEW in quanto governa la traiettoria continua e precisa del getto polimerico e consente di ottenere fibre con diametro estremamente sottile (Figura 2.8) [18].

Grazie alla riduzione delle dimensioni alla scala nanometrica, le fibre ottenute acquisiscono importanti proprietà, come un'elevata area superficiale specifica (molto elevata in rapporto al volume), porosità ed elevato modulo elastico.

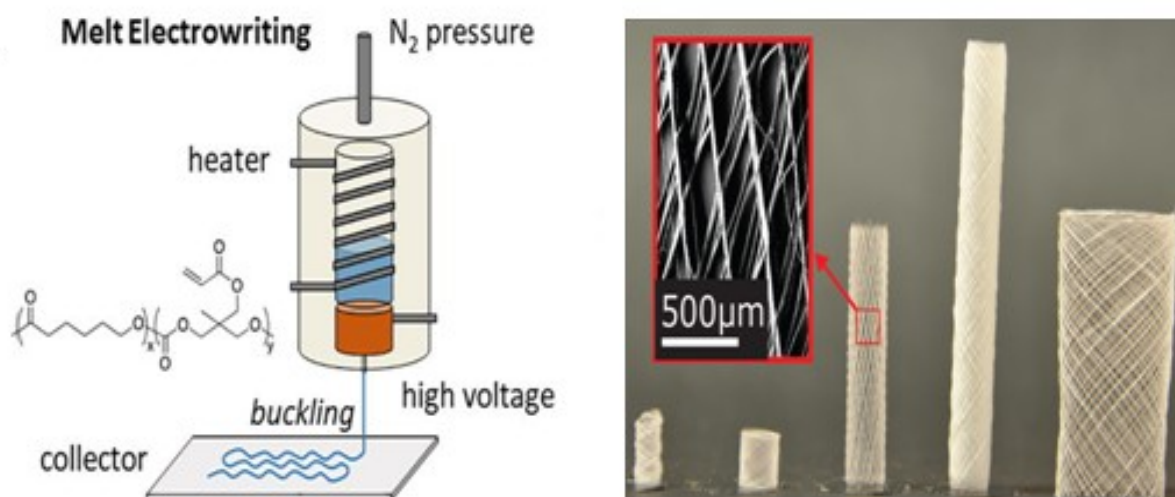


Figura 2.8: a sinistra meccanismo di stampa della melt-electrowriting, a destra esempio di un filamento stampato in policaprolattone (PCL) [18].

Questa tecnica di stampa è utile per la produzione di filamenti polimerici molto lunghi e dotati di uno spessore molto sottile. Presso il Complesso Vallisneri dell'Università di Padova è disponibile una stampante MEW di tipo Axo (Figura 2.9), tramite la quale vengono stampati numerosi filamenti di biomateriali quali acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA),

policaprolattone (PCL) e alcol polivinilico (PVA) che vengono utilizzati dagli studenti e dottorandi dell'Università per effettuare vari studi e sperimentazioni.

In particolare nel Capitolo 3 si parlerà delle caratteristiche di due materiali stampati tramite melt-electrowriting che sono stati testati in vivo su un modello animale nel laboratorio dell'Azienda Ospedaliera/Università di Padova per valutarne la biodegradabilità.

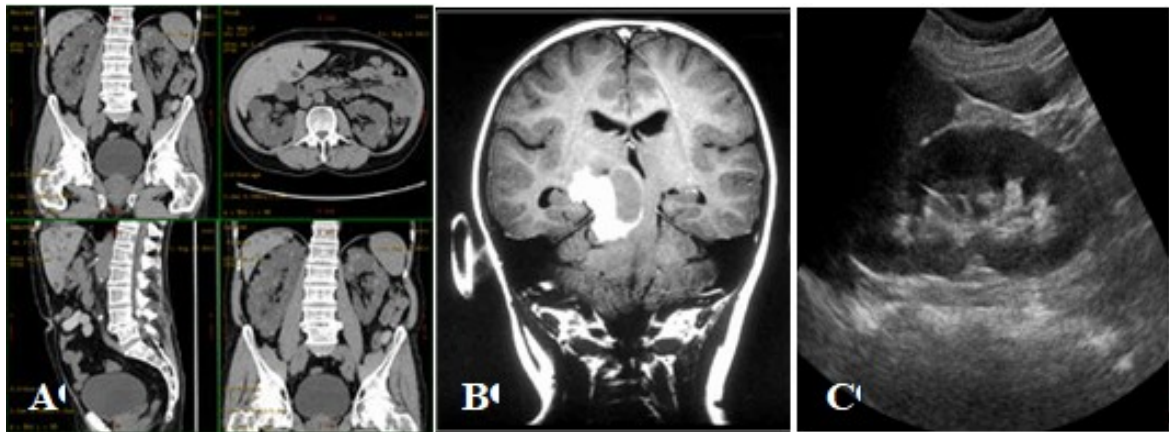


*Figura 2.9: stampante MEW Axo conservata presso il Complesso Vallisneri dell'Università di Padova.*

### Capitolo 3: La stampa 3D nella pianificazione chirurgica

La stampa 3D è una tecnologia di fabbricazione additiva che consente di realizzare un oggetto tridimensionale partendo da immagini bidimensionali e per le opportunità che offre sta assumendo una grandissima importanza in ambito medico e chirurgico.

Grazie alle stampanti 3D odierne è possibile costruire repliche anatomiche di tessuti e organi a partire da immagini radiografiche bidimensionali quali RX, tomografia computerizzata, risonanza magnetica, ecografia (Figura 3.1).

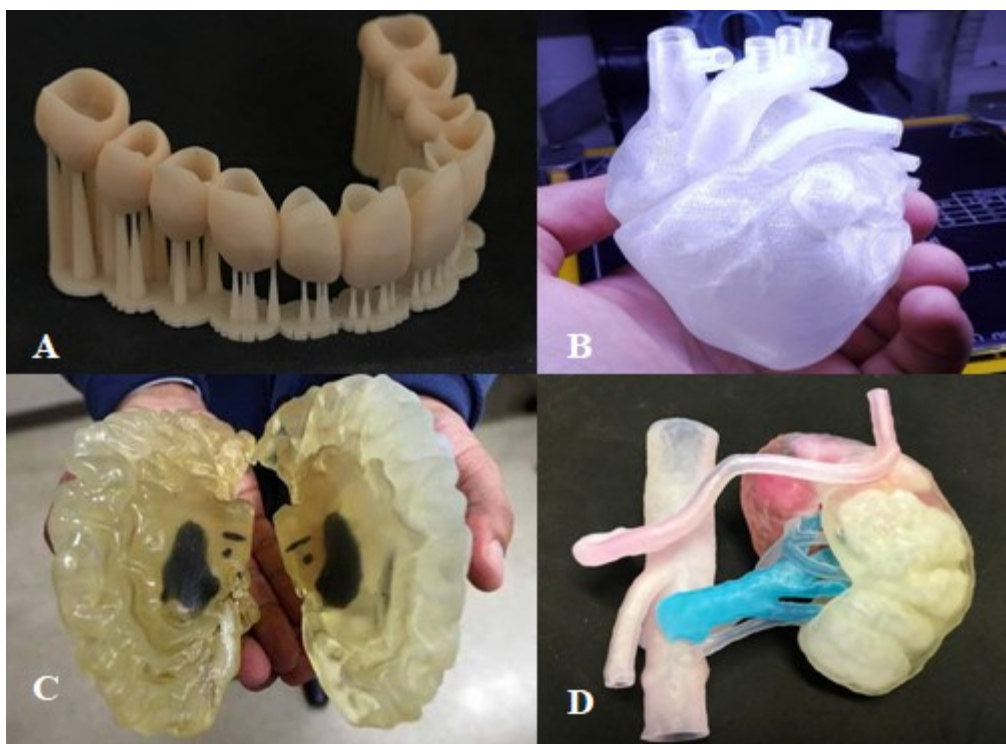


*Figura 3.1: A) tomografia computerizzata (TAC) dell'addome ricostruita nei vari piani dello spazio, B) risonanza magnetica (RM) dell'encefalo), C) immagine di un'ecografia renale bilaterale.*

Uno degli obiettivi della stampa 3D nella medicina è quello di utilizzare questa tecnologia per studiare le variabili anatomiche nella fase di planning preoperatorio, riducendo in tal modo la durata dell'intervento e le complicanze operatorie [19]. Perciò se fino a non molto tempo fa il chirurgo poteva studiare l'anatomia di un organo o di un apparato solo sulla base di immagini bidimensionali in bianco e nero, oggi può disporre di un modello fisico dell'organo o della struttura sul quale andrà ad effettuare l'operazione chirurgica [20].

Studi recenti evidenziano che i principali campi medici nei quali viene utilizzata la stampa 3D sono la chirurgia orale e maxillofacciale e la cardiocirurgia: ad esempio, vengono realizzate repliche anatomiche di strutture cardiache con patologie congenite

Nonostante ciò, la tecnica di stampa 3D è in continua sperimentazione anche in altri ambiti medici (Figura 3.2) tra cui si cita la chirurgia oncologica per la diagnosi e la programmazione chirurgica di lesioni tumorali renali e pancreatiche, la neurochirurgia per la diagnosi di vasculopatie cerebrali, l'urologia per il trattamento radioterapico e chirurgico di adenocarcinomi prostatici e infine la chirurgia dei trapianti d'organo [19].

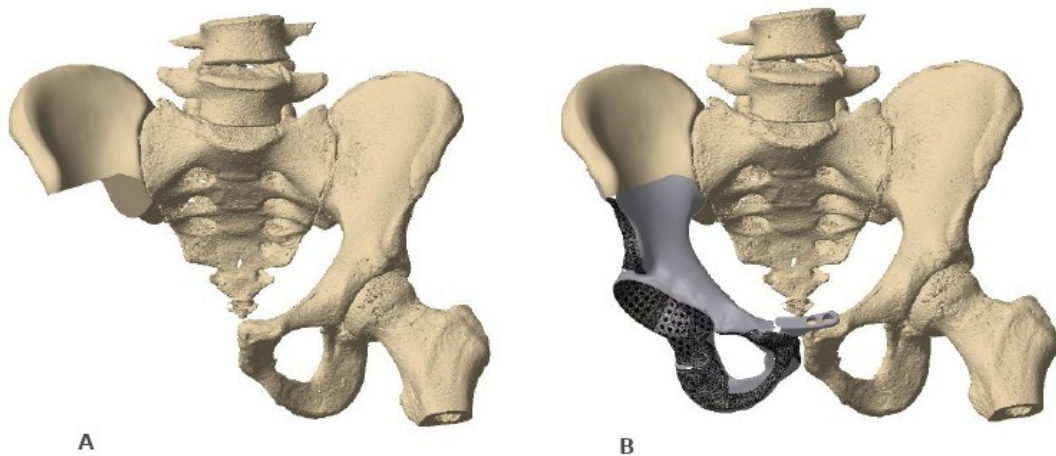


*Figura 3.2: A) modello 3D di arcata dentale per la chirurgia orale; B) modello 3D del muscolo cardiaco per la cardiocirurgia; C) modello 3D di un cervello per la neurochirurgia; D) modello 3D di un rene in urologia.*

Oltre che nel planning preoperatorio, i modelli fisici tridimensionali risultano utili anche per altri scopi. Uno di questi è quello didattico: la stampa tridimensionale di modelli anatomici è di aiuto agli studenti di medicina, agli specializzandi e agli stessi chirurghi che possono effettuare uno studio molto più approfondito dei vari organi e apparati danneggiati pianificando con maggiore efficacia gli interventi chirurgici.

Un altro scopo fondamentale è quello di migliorare la comunicazione medico-paziente; infatti il modello tridimensionale permette al chirurgo di spiegare meglio al paziente la patologia presente e di conseguenza il paziente, attraverso la visione del modello, può comprendere meglio l'entità della lesione e l'intervento al quale sarà sottoposto [20].

Infine, la stampa 3D è molto utile nella produzione delle così dette “protesi custom-made”: si tratta di protesi su misura per il singolo paziente utilizzate soprattutto nell'ambito dell'ortopedia oncologica per ricostruire segmenti anatomicamente complessi, come bacino, vertebre, scapola, ossa del tarso e del carpo (Figura 3.3). Il concetto di “customizzazione” in ambito medico si focalizza sul paziente e sulla ricerca di soluzioni personalizzate create *appositamente* per sostituire con precisione elevata i difetti ossei che altrimenti non sarebbero colmabili con le protesi modulari o gli innesti ossei [21].



*Figura 3.3: Protesi custom made 3D printed del bacino. A) difetto osseo, B) ricostruzione con protesi su misura [21].*

### **3.1. Progressi della stampa 3D in cardiochirurgia nell’Azienda Ospedaliera di Padova**

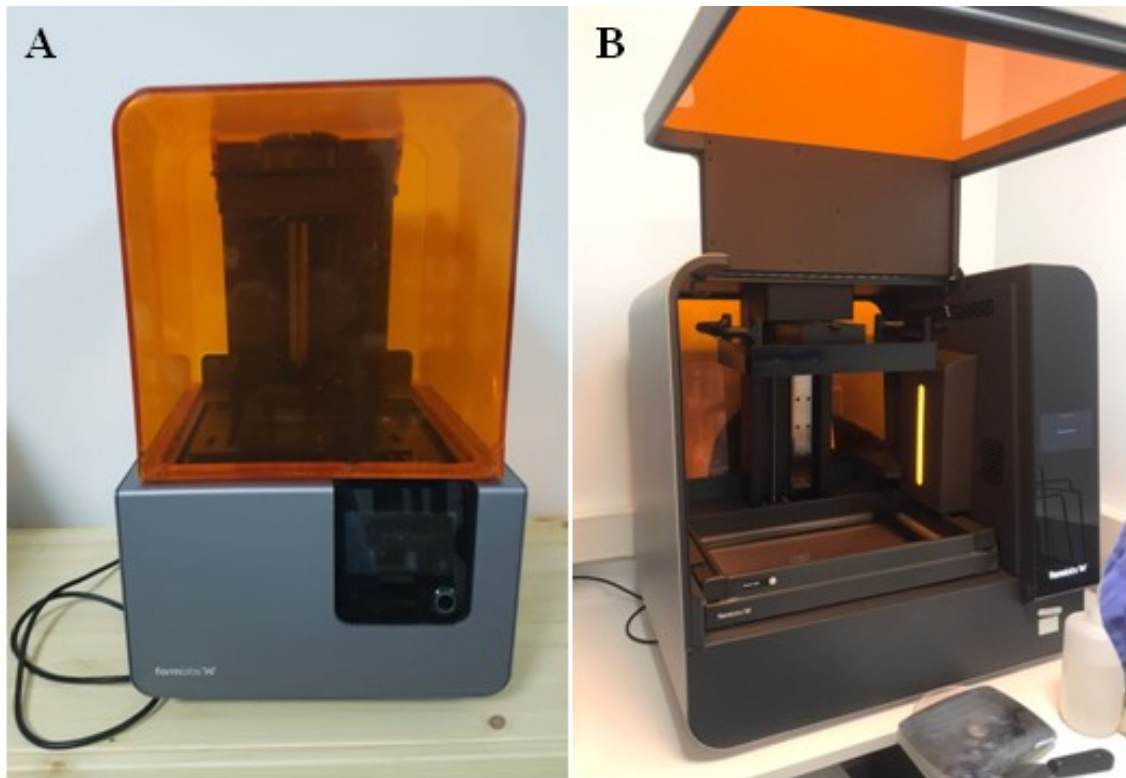
Presso l’Azienda Ospedale-Università di Padova, in particolare nel reparto di Cardiochirurgia Pediatrica, sono stati fatti grandi progressi per quanto riguarda lo studio delle patologie cardiache congenite anche grazie alla stampa 3D di modelli anatomici.

“L’integrazione di modelli 3D nella pratica di tutti i giorni sta diventando standard e contribuisce a cambiare l’approccio al trattamento delle malattie cardiache dei bambini” cita un articolo del giornale “PadovaOggi”, evidenziando come l’utilizzo della stampa 3D svolga ormai un ruolo quasi fondamentale nel settore cardochirurgico.

L’Azienda Ospedaliera di Padova ha infatti a disposizione tecnologie innovative che, partendo da diversi tipi di imaging cardiaci tradizionali, hanno la possibilità di giungere alla ricostruzione tridimensionale dell’organo cardiaco affetto da malformazioni congenite semplici o complesse (di cui si parlerà nel paragrafo successivo). Queste ricostruzioni virtuali possono essere stampate tridimensionalmente mediante l’utilizzo di una stampante 3D con l’obiettivo di ottenere una riproduzione dell’organo cardiaco fedele all’organo reale del paziente [22].

Il Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica dell’Università di Padova dispone di tre diverse stampanti 3D prodotte dalla Formlabs (Somerville, MA, USA), una Form2 e due Form3L (Figura 3.4). Queste stampanti desktop sono fra le più utilizzate e performanti sul mercato, e sono basate sulla tecnologia stereolitografica (SLA). Un vantaggio di questa metodica è la vasta gamma di resine che possono essere utilizzate nella stampa e in grado di imitare quasi ogni tipo di materiale, dalla ceramica alla gomma, selezionato a

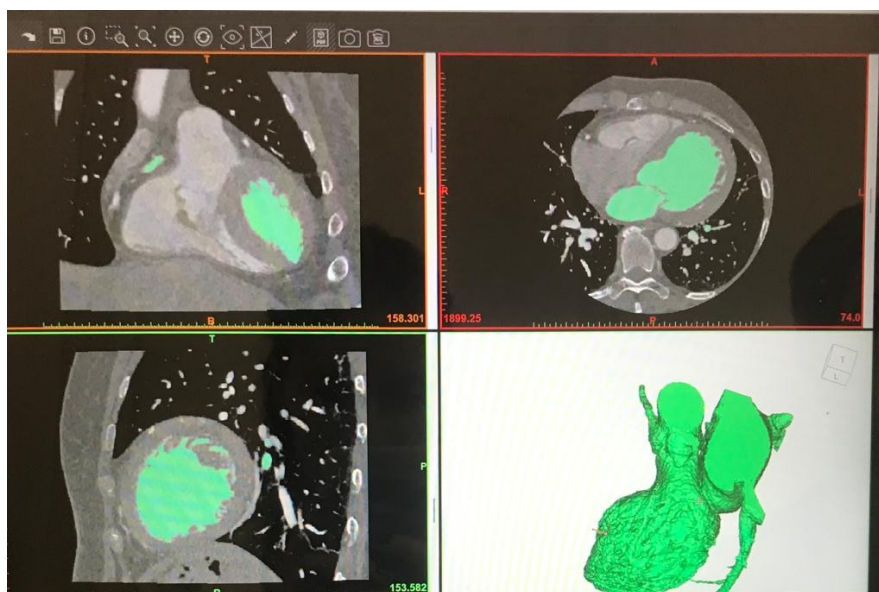
seconda dello scopo per cui verrà utilizzato il modello anatomico stampato. Inoltre la fotopolimerizzazione laser consente una'elevatissima risoluzione dimensionale (dell'ordine del micrometro) [23].



*Figura 3.4 stampanti 3D utilizzate presso l'Azienda Ospedaliera di Padova: A) stampante Form2; B) stampante Form3L.*

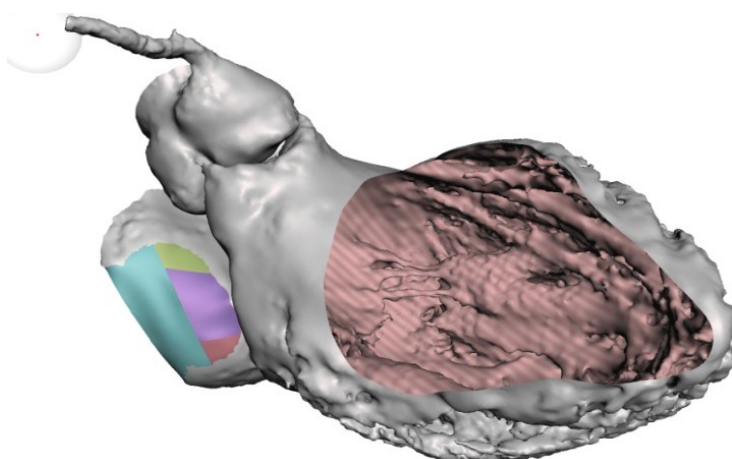
Il processo di ricostruzione parte direttamente opportunamente acquisite allo scopo di avere una mappatura tridimensionale accurata e a sufficiente risoluzione della regione di interesse. Tali immagini vengono elaborate mediante software di segmentazione, ovvero in grado di “segmentare” i pixel delle varie immagini separando tra di loro le diverse strutture anatomiche (Figura 3.5).

Si ottiene la cosiddetta mesh, ossia una superficie tridimensionale definita come un insieme di punti connessi fra loro a formare spigoli e facce. Una mesh, se chiusa, suddivide lo spazio in una regione interna e una esterna, pertanto può già essere stampata direttamente in un oggetto 3D, in cui il materiale occupa completamente la regione interna.

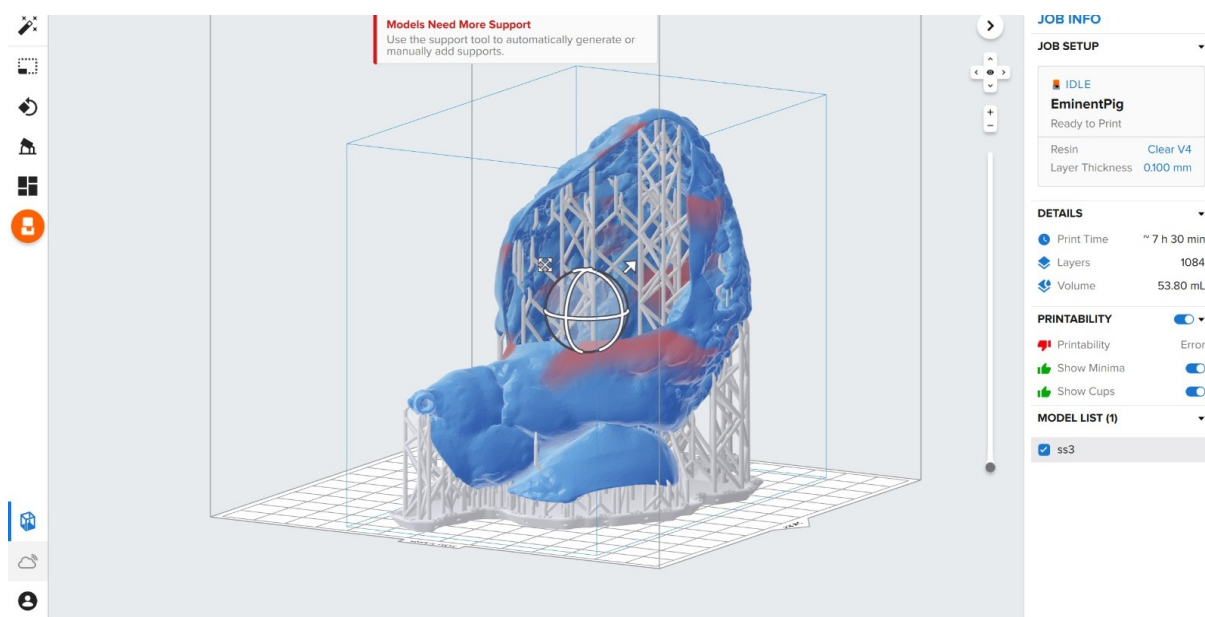


*Figura 3.5: Software di segmentazione (Mimics imPrint) di un modello di valvola mitrale nelle sue tre proiezioni: frontale, assiale e sagittale; in basso a destra, la visualizzazione tridimensionale.*

Tuttavia un certo grado di rielaborazione (post-processing) è quasi sempre necessario e viene attuato tramite software CAD (*Computer-Aided Design*), che rende possibile scalare le immagini (rimpicciolirle o ingrandirle), correggere artefatti, simulare aperture o fori, in modo da riprodurre un'immagine il più possibile fedele al modello anatomico originale (Figura 3.6). Una volta terminata la fase di rielaborazione (Figura 3.7), la mesh viene inviata alla stampante che provvede autonomamente allo slicing del modello in una serie di sezioni spesse 100 micron. Tali sezioni costituiscono i layers (strati) del modello finale che verrà stampato [23, 24].

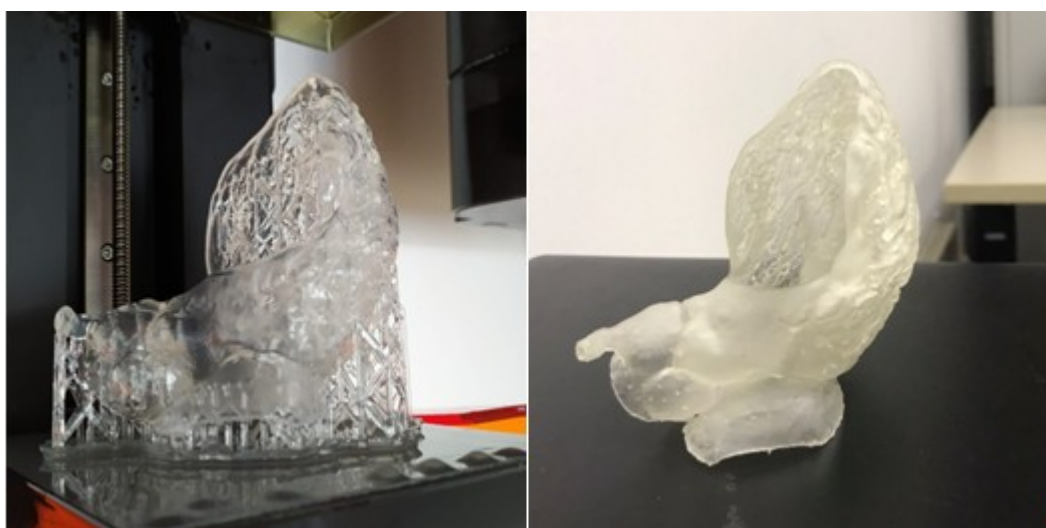


*Figura 3.6: fase di elaborazione(post-processing) della mesh tramite il programma CAD.*



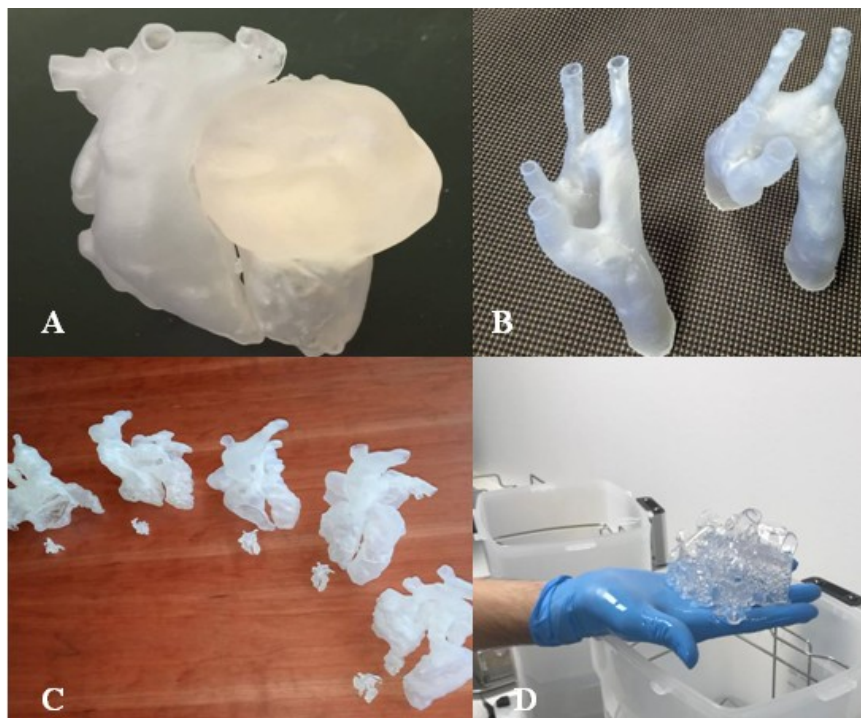
*Figura 3.7: rendering della valvola mitrale ottenuta alla fine del processo di elaborazione con l'aggiunta dei supporti necessari pronta per essere stampata.*

Una volta terminato tale processo è possibile ottenere repliche anatomiche di organi e tessuti in materiali rigidi e opachi, come la “Resina Clear” (Formlabs), o materiali più duttili, malleabili e trasparenti, come la “Resina Elastic” (Formlabs) a seconda dello scopo al quale i modelli sono destinati (Figura 3.8) [23].



*Figura 3.8: a sinistra valvola mitrale ottenuta una volta terminato il processo di stampa ricoperta di resina, a destra modello ottenuto dopo il lavaggio e la rimozione dei supporti e pronto per l'utilizzo.*

Nel reparto di Cardiocirurgia Pediatrica dell'Azienda Ospedale di Padova vengono stampate ogni giorno diversi modelli anatomici di cuori normali e patologici per lo studio della loro morfologia e la simulazione di interventi chirurgici (Figura 3.9).



*Figura 3.9: alcuni esempi di parti anatomiche cardiache stampate: A) fibroma del ventricolo sinistro in un neonato; B) doppio arco aortico prima e dopo la divisione; C) cuoricini fetali; D) coartazione aortica in elastic resin.*

### **3.2. Cenni sulle cardiopatie congenite**

Le cardiopatie congenite (Congenital Heart Disease, CHD) costituiscono un gruppo di patologie a carico del sistema cardiocircolatorio estremamente eterogeneo, sia per quanto riguarda le varie malformazioni che per i possibili quadri anatomici tra i vari pazienti. Attualmente, le CHD costituiscono il 4,2% di tutte le cause di morte neonatale, che si verificano nei primi 28 giorni di vita del bambino.

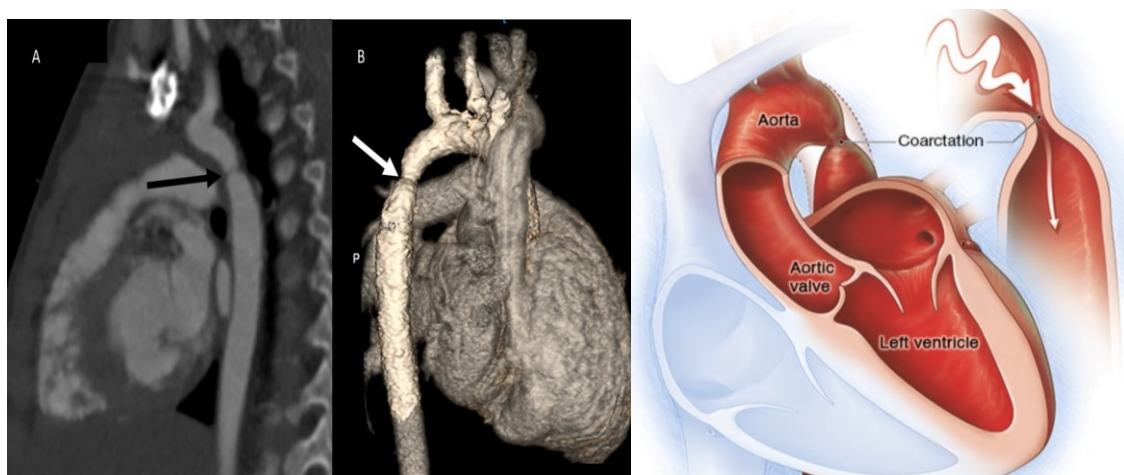
Da tempo studi clinici hanno evidenziato come fattori genetici siano importanti nell'eziologia delle CHD, sebbene la maggior parte di queste malattie non sia associata ad alterazioni del genoma; inoltre una stessa malformazione cardiaca può essere causata da diversi fattori genetici [25]. Le forme critiche di cardiopatie, che richiedono un intervento invasivo di tipo chirurgico o percutaneo entro l'anno di vita, costituiscono il 25% delle CHD; di questa popolazione di bambini, il 25% richiede un intervento immediato al fine di garantire un'adeguata circolazione sanguinea per la vitalità del paziente [26].

#### *3.2.1 Simulazione di un intervento chirurgico: procedura correttiva di coartazione aortica*

La coartazione aortica è una malattia congenita o acquisita dell'aorta che consiste in un restringimento localizzato del lume aortico, di solito nella sua porzione istmica. Questo difetto

si manifesta con una ipoperfusione (apporto inadeguato di sangue a un organo) generalizzata di tutti gli organi addominali e degli arti inferiori, e nelle forme più gravi può essere rapidamente letale dopo la nascita, mentre nelle forme più lievi può persino essere diagnosticata in età adulta [27].

Normalmente l'aorta non presenta alcun restringimento, mentre nei pazienti con coartazione vi è un restringimento, a volte anche molto marcato, immediatamente dopo il punto in cui si diramano le arterie che portano il sangue al capo e agli arti superiori (Figura 3.10).



*Figura 3.10: immagine di un cuore affetto da coartazione aortica in cui si evidenzia il restringimento (coartazione) del lume aortico.*

La diagnosi di questa patologia congenita viene di norma effettuata sulla base dei sintomi presentati dal bambino, quali difficoltà nell'alimentazione, scarso accrescimento, aumento della pressione arteriosa, cefalea, vertigini e svenimento. L'intervento chirurgico correttivo è tecnicamente semplice ma richiede sicurezza e velocità poiché, durante tutto l'intervento, l'aorta resta chiusa e gli organi addominali non ricevono sangue. Inoltre non è possibile l'utilizzo di protesi o altri mezzi di riparazione perché non in grado di crescere insieme al bambino. Per questo motivo, questa patologia è stata scelta fra quelle per cui viene offerta agli specializzandi del reparto di Cardiocirurgia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera di Padova la possibilità di esercitarsi su modelli anatomici tridimensionali, simulando l'intervento.

Per svolgere tale simulazione, i partecipanti sono stati divisi in 4 gruppi (ciascuno formato da due specializzandi) e sono stati registrati durante tutta la procedura per poi avere una valutazione del proprio lavoro da parte di un chirurgo esperto e poter quindi comprendere gli errori effettuati.

In età neonatale l'intervento consiste in una decoartectomia (Figura 3.11), ovvero la rimozione di tutto il segmento ristretto, seguita da una anastomosi diretta termino-terminale, ovvero la sutura dei due monconi (parti dell'aorta non tagliati e sani) con un filo molto sottile in polipropilene non riassorbibile in diretta continuità l'uno con l'altro [27].



*Figura 3.11: fasi della procedura correttiva di coartazione aortica: A) simulazione della sutura di un cilindro; B) immagine del modello una volta effettuata la decoartectomia e l'anastomosi diretta; C) specializzandi durante la simulazione; D) tre modelli dopo l'intervento posti a confronto.*

## Capitolo 4: Utilizzo di biomateriali polimerici in ambito cardiocirurgico

La stampa 3D, specialmente negli ultimi anni, svolge un ruolo fondamentale in ambito medico per quanto riguarda la realizzazione di scaffold polimerici, ovvero supporti tridimensionali porosi o semplici patches, utilizzati per favorire/accelerare la guarigione di lesioni e colmare lacune dovute a cause diverse tra le quali eventi traumatici o l'asportazione di tumori (Figura 4.1). Questi supporti tridimensionali vengono progettati per poter essere impiantati nel corpo del paziente, nella zona del tessuto dove è presente il danno o la lesione, e sono in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare fino alla formazione del nuovo tessuto, che sarà biologicamente e meccanicamente equivalente a quello nativo sano [28].

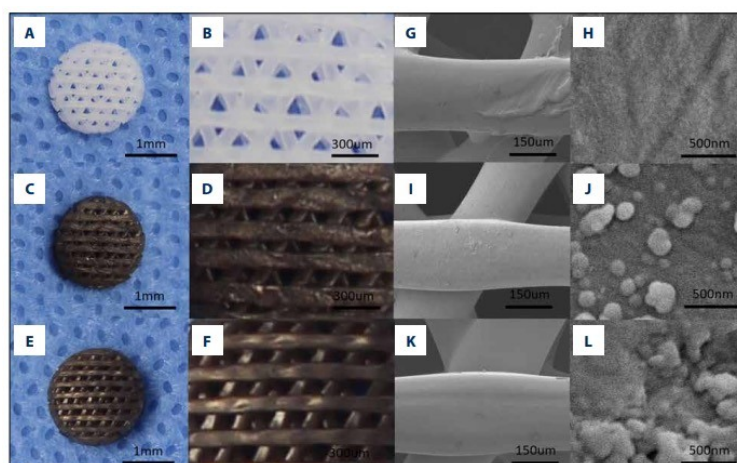


Figura 4.1: Ingrandimento sempre minore di fotografie digitali di scaffold: PCL (A, B); PCL-PDA (C, D) e PCL-PDA-Li (E, F). Le corrispondenti immagini SEM degli scaffold: PCL (G, H); PCL-PDA (I, J) e PCL-PDA-Li (K, L) [29].

Tuttavia l'utilizzo di questi materiali in ambito cardiocirurgico è ancora pionieristico in quanto non se ne conosce con esattezza il reale comportamento in vivo, perciò per il momento si utilizzano per contenere la dilatazione di vasi. Un esempio di sperimentazione dell'utilizzo di biomateriali riassorbibili in cardiocirurgia è nell'intervento di Ross. In questa procedura, la valvola e l'arteria polmonare vengono utilizzate per sostituire la valvola aortica stenotica; a cause del più elevato regime pressorio, l'arteria polmonare subisce un'importante dilatazione che provocherebbe dei danni a livello della parete. Nel laboratorio di chirurgia sperimentale dell'Ospedale/Università di Padova, viene sperimentato su modello animale l'utilizzo di materiali bioriassorbibili per contenere questa dilatazione nelle prime fasi ed evitare lesioni alla parete. La caratteristica della bioriassorbibilità è fondamentale soprattutto in ambito pediatrico poiché, una volta risolto il problema della dilatazione dell'arteria polmonare in

posizione aortica, il materiale utilizzato si degrada naturalmente nell'ambiente biologico permettendo al vaso nativo del paziente di crescere con lui; in caso contrario sarebbero necessari ulteriori interventi.

#### **4.1 Descrizione dei principali materiali polimerici**

I polimeri sono materiali organici prodotti mediante reazioni di polimerizzazione controllate (per condensazione o per via radicalica) a partire da singole molecole dette monomeri e possono essere sintetizzati in diverse forme: solidi, films, materiali viscoelastici o hydrogels a seconda del loro utilizzo. È possibile inoltre modulare le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche formando copolimeri o miscele utilizzando differenti monomeri che conferiscono al polimero finale proprietà specifiche.

Le proprietà fisiche dei polimeri dipendono da molti fattori, tra i quali: il grado di polimerizzazione, il peso molecolare, la temperatura, l'arrangiamento delle catene e la composizione chimica [30, 33].

I polimeri, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto quando entrano in contatto con i fluidi biologici, possono essere classificati in bioinerti o biodegradabili. I polimeri biodegradabili vengono utilizzati nella preparazione di matrici per l'ingegneria tissutale; tali matrici sono, in genere, costituite da:

- materiali polimerici di sintesi, ottenibili in modo riproducibile, meccanicamente resistenti, biocompatibili e, possibilmente, biorassorbibili;
- biopolimeri di origine naturale come, ad esempio, l'acido ialuronico ed alcuni suoi derivati.

I polimeri biodegradabili forniscono prestazioni ottimali per un periodo di tempo programmabile e vengono gradualmente degradati ed eliminati dall'organismo tramite reazioni chimiche e/o fisiche senza richiedere interventi chirurgici [33].

Particolare attenzione è rivolta ai polimeri biorassorbibili, i quali subiscono una progressiva degradazione all'interno del sistema biologico, senza causare reazioni di rigetto o effetti tossici e dannosi. I polimeri biorassorbibili sono utilizzati per applicazioni che richiedono una degradazione progressiva del materiale, come nei sistemi a rilascio controllato di farmaci, come mezzi di sutura oppure come substrato per le applicazioni di ingegneria tissutale. A seconda delle diverse applicazioni, i biomateriali polimerici devono garantire velocità di degradazione diversa. Il meccanismo più importante di degradazione nel corpo umano è l'idrolisi: si tratta di una reazione chimica che causa la scissione del legame tra le unità

monomeriche del polimero, che viene progressivamente decomposto in molecole via via più piccole [31, 33].

In base all'origine i polimeri si possono classificare in due categorie: naturali e sintetici.

#### 4.1.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali (chiamati anche biopolimeri) sono costituiti da materiali biologici e ciò comporta la capacità di instaurare specifiche interazioni cellulari (il cosiddetto “riconoscimento cellulare”). Tale caratteristica li rende molto utili per la rigenerazione dei tessuti. Tuttavia, essendo prelevati da tessuti umani o vegetali, possono essere portatori di agenti patogeni e presentano inoltre notevoli differenze in relazione all'organismo da cui sono prelevati. A causa di queste disomogeneità, i polimeri naturali dispongono di una versatilità limitata nella costruzione di scaffolds con proprietà specifiche e richiedono elevati costi di lavorazione.

Tra di essi si citano in particolare:

- il collagene: una proteina fibrosa costituita da catene polipeptidiche, denominate catene  $\alpha$ , strettamente intrecciate tra loro in modo da formare una super-elica compatta (Figura 4.2). Esso è considerato uno tra i biomateriali ideali per l'ingegneria dei tessuti dato che è il principale costituente della matrice extra-cellulare (ECM);

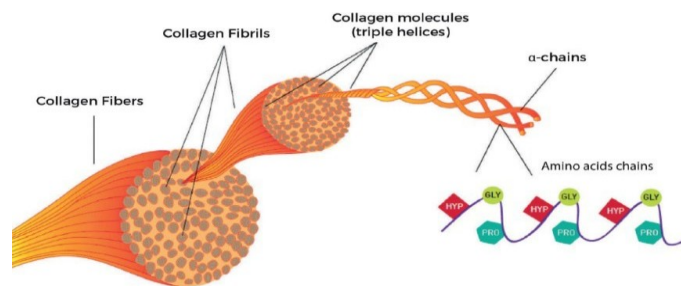


Figura 4.2: struttura delle catene di collagene organizzate in fibre, fibrille e molecole.

- la fibrina: una proteina fibrosa alla base del processo di riparazione dei tessuti, si trova nel plasma sotto forma di fibrinogeno (Figura 4.3), il quale polimerizza in presenza di ioni di calcio e di trombina. Questo biopolimero è molto sfruttato per la rigenerazione di tessuti grazie alle sue proprietà di biocompatibilità e biorassorbibilità; il collagene e la fibrina, nonostante le loro caratteristiche di biocompatibilità e biorassorbibilità, sono dotati di una bassa resistenza meccanica e non risultano adatti a produrre scaffold soggetti a sforzi meccanici elevati [32];

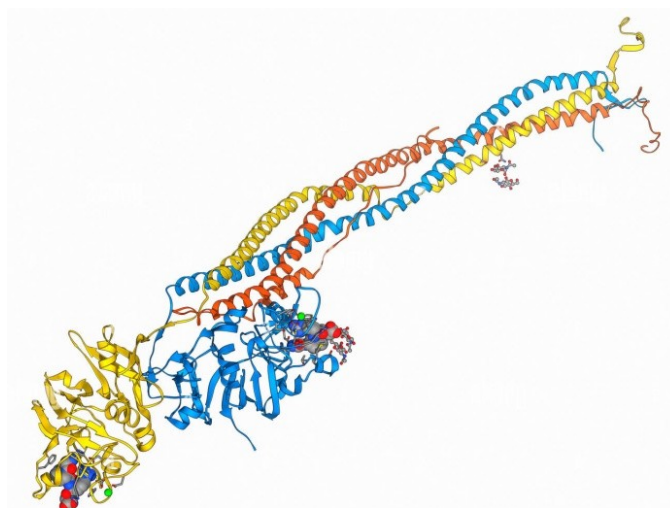


Figura 4.3: molecola di fibrinogeno (precursore solubile della fibrina presente nel plasma).

- l'acido ialuronico: è un componente naturale dei tessuti (glicosaminoglicani della ECM), soprattutto della pelle, in grado di svolgere un ruolo chiave nel processo di riparazione tissutale (Figura 4.4). Esso ha il vantaggio di essere biocompatibile (e quindi non immunogenico), regola l'adesione, la crescita e la migrazione cellulare e svolge il ruolo di lubrificante nelle articolazioni. Tuttavia l'acido ialuronico presenta anche degli svantaggi, ovvero viene riassorbito molto velocemente, è solubile in ambiente acquoso, non è processabile e possiede ridotte proprietà viscoelastiche. Per questi motivi spesso si ricorre a un derivato dell'acido ialuronico ottenuto mediante esterificazione; quest'ultimo presenta le caratteristiche di processabilità, lenta degradazione, biocompatibilità e stabilità dopo la sterilizzazione [33].

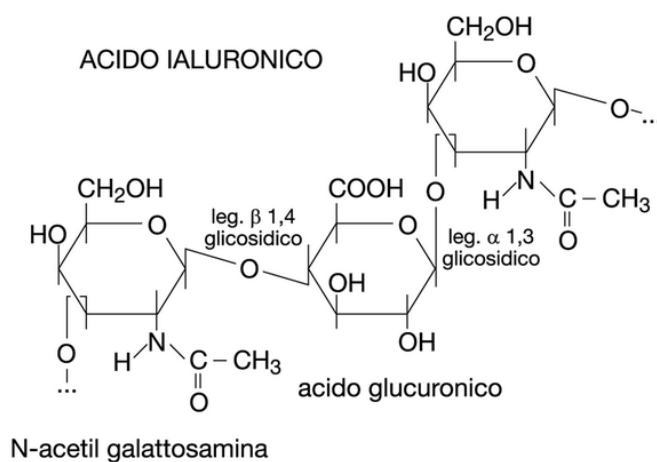


Figura 4.4: struttura chimica dell'acido ialuronico.

## 4.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono composti che vengono ottenuti tramite sintesi chimica e sono producibili industrialmente su grande scala. Essi possono essere trasformati in una matrice tridimensionale nella quale la struttura principale, le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione possono essere facilmente controllate. Un ulteriore vantaggio consiste nel poter combinare differenti polimeri sintetici al fine di ottenere specifiche proprietà.

Il principale svantaggio dei materiali sintetici consiste nella mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare. Tra di essi verranno analizzati in particolare l'acido polilattico e il polivinil alcol, entrambi utilizzati nella sperimentazione di interventi cardiocirurgici su modello animale [31].

### 4.2.1 Acido polilattico (PLA)

L'acido polilattico ((C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), indicato come PLA, è un poliestere alifatico ottenuto dalla sintesi dell'acido lattico, che può essere derivato dalla fermentazione e successiva raffinazione di carboidrati, o dalla polimerizzazione ad anello aperto della molecola di lattide con l'utilizzo di particolari catalizzatori (Figura 4.5).

L'acido lattico, da cui deriva il PLA mediante il processo di policondensazione, è un composto naturale normalmente presente nell'organismo ed è quindi un materiale ben tollerato e facilmente metabolizzato. Infatti le principali caratteristiche del PLA sono quelle di essere biodegradabile e compostabile al 100%. Questo materiale presenta inoltre un tempo di degradazione molto lungo: se paragonato con gli altri polimeri utilizzati in ambito biomedico, il PLA impiega infatti più di un anno per degradarsi nel corpo attraverso il processo di idrolisi; in questo modo può svolgere completamente la sua funzione di riparazione del tessuto danneggiato senza essere rimosso prima di aver riparato completamente il danno [34]. Grazie a queste caratteristiche, il PLA è molto utile per la produzione di fibre utilizzate come scaffold (Figura 4.6) testate su modello animale per contenere vasi sanguigni e simulare interventi cardiocirurgici [34].

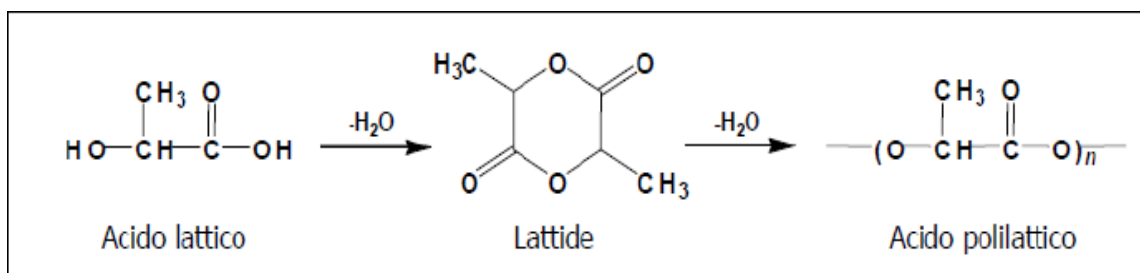


Figura 4.5: struttura chimica dell'acido polilattico (PLA) ottenuto dall'acido lattico.



### 4.3 Test in vivo su modello animale

Nel rispetto della normativa vigente DL n. 16/92, art. 5, presso il laboratorio di chirurgia sperimentale dell'Azienda/Ospedale di Padova, sono stati effettuati dei test su modello animale con l'obiettivo di analizzare il comportamento in vivo di due materiali polimerici: l'acido polilattico (PLA) e il polivinil alcol (PVA).

Nell'esperimento stati utilizzati dei ratti di tipo Sprague Dawley (Harlan Laboratories, San Pietro al Natisone, Udine, Italy), con un peso compreso tra i 350-450 g (Figura 4.8). Sono stati utilizzati in totale quattro ratti (due per PLA e due per PVA). I due materiali sono stati stampati tramite Mew dall'azienda francese Axoltle e, una volta arrivati all'Azienda Ospedale di Padova, sono stati semplicemente tagliati a forma di rettangolo di spessore 200 micrometri.



*Figura 4.8: foto di un ratto di tipo Sprague Dawley, utilizzato nell'esperimento.*

- Norme per la cura e la sicurezza degli animali:

Tale indagine è stata condotta in accordo con la Guida per la Cura e l'Uso degli Animali da Laboratorio degli Istituti Sanitari Nazionali ed è stata approvata dal Comitato per la Cura e l'Uso degli Animali dell'Università degli Studi di Padova (Protocollo 700/2018-PR, emesso il 13 settembre 2018, DL n.16/92 art.5). Tutti gli animali hanno ricevuto cure umane in conformità con la Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio.

#### 4.3.1 Aspetti tecnici dell'intervento

La procedura chirurgica è stata eseguita in sterilità, con l'animale in respirazione spontanea, in anestesia generale ottenuta mediante somministrazione di ossigeno e sevoflurano al 3%,

come induzione, e poi al 1,5-2% come mantenimento, potenziata con l'antidolorifico tramadolo (5 mg/kg sottocute), quest'ultimo somministrato 15 minuti prima dell'intervento. Dopo accurata rasatura e disinfezione della regione addominale mediale, l'animale è stato posizionato supino sul tavolo operatorio (Figura 4.9). Al fine di evitare una dispersione di calore, date le piccole dimensioni dell'animale, è stata usata una pellicola trasparente per coprire il ratto. In seguito, si è proceduto alla laparotomia mediana xifo-pubica, e l'addome è stato mantenuto aperto mediante uso di due mini-retrattori. Per esporre l'aorta addominale, si è reso necessario estrarre l'intestino dalla cavità addominale, il quale è stato avvolto in una garza imbevuta di soluzione salina a 39°C e posizionata a lato dell'animale (Figura 4.10). Durante l'intervento è stata evitata l'ipotermia, andando a inumidire l'intestino, ad intervalli regolari, con la soluzione salina sopra descritta.

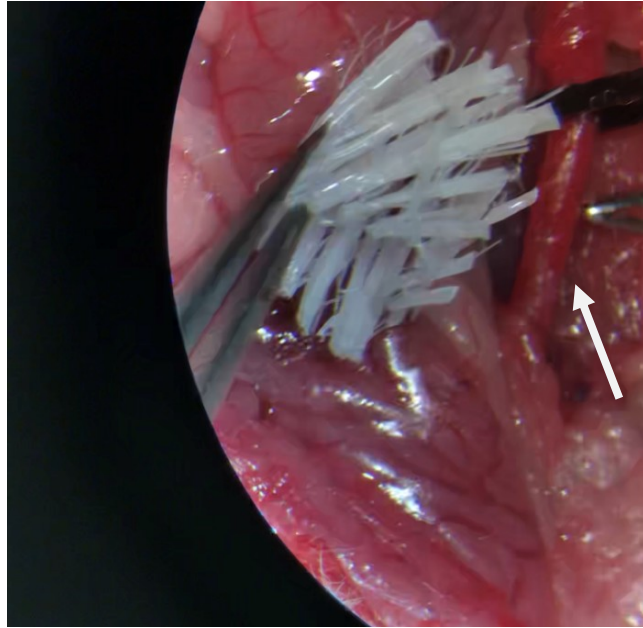


*Figura 4.9: posizionamento supino del ratto dopo essere stato sottoposto ad anestesia generale.*



*Figura 4.10: esecuzione della laparotomia mediana xifo-pubica e successiva estrazione dell'intestino avvolto in una garza imbevuta di soluzione salina necessaria per evitare l'ipotermia.*

Successivamente, si è proceduto all'isolamento dell'aorta addominale nella sua porzione sotto-renale, sono stati inoltre legati eventuali rami collaterali lombari dell'aorta stessa mediante filo di seta 6/0. In seguito, l'animale è stato ruotato in modo da disporlo orizzontalmente all'operatore e con la parte craniale diretta verso la sinistra del chirurgo. Si è quindi proceduto ad avvolgere la porzione di aorta isolata con il materiale riassorbibile (Figura 4.11). In particolare, per fare ciò, avvalendosi di un filo seta, l'aorta è stata trazionata verso l'alto al fine di esporre il letto vasale dell'aorta stessa. In tale sede è stato adagiato il pezzo di PLA/PVA e, successivamente, l'aorta adagiata sopra quest'ultimo. Infine, per avvolgere e fissare in sede il PLA/PVA, sono state utilizzate due suture Prolene 10/0 posizionate all'estremità prossimale e terminale del materiale riassorbibile.



*Figura 4.11: avvolgimento dell'aorta addominale nella porzione sottorenale isolata con acido polilattico(PLA).  
La freccia indica l'aorta addominale isolata.*

In seguito, si è passati alla procedura di emostasi avvalendosi, se necessario, di spugna emostatica Spongostan (Ferrosan Medical Devices A/S, Denmark); è stata inoltre eseguita un'emostasi meccanica mediante applicazione di una leggera pressione per pochi secondi ove necessario. L'intestino è stato successivamente ricollocato nella sua posizione originale e la parete addominale suturata in due strati, con suture continue (Figura 4.12).



*Figura 4.12: riposizionamento dell'intestino nella posizione originale e sutura continua della parete addominale.*

#### 4.3.2 Gestione post-operatoria dell'animale

Gli animali, durante tutto il periodo postoperatorio, sono stati seguiti quotidianamente da personale tecnico esperto e dai medici veterinari del Servizio Veterinario Centralizzato di Ateneo, al fine di monitorarne adeguatamente le condizioni psicofisiche nel rispetto della legge sulla sperimentazione animale. I due tecnici dello stabilimento sono laureati in biologia, formati attraverso specifici corsi di formazione, e forniti di lunga esperienza nella gestione e nell'utilizzo degli animali da laboratorio.

Durante il *follow-up*, gli animali sono stati collocati in un ambiente adatto, che garantiva una certa libertà di movimento, con disponibilità di alimentazione, acqua e cure adeguate alla loro salute e al loro benessere. Gli animali sono stati, inoltre, pesati a intervalli regolari: ogni giorno nella prima settimana e successivamente, a giorni alterni.

Per la raccolta e la registrazione dei segni clinici rilevanti è stato applicato uno specifico sistema di valutazione (*pain score system*). Tale sistema è stato utilizzato per favorire il riconoscimento precoce degli eventuali segni clinici riferibili a stati di sofferenza degli animali coinvolti in questo test. Lo *score* combina il punteggio fornito da manifestazioni cliniche (Tabella 4.1) con l'assunzione di alcuni atteggiamenti tipici della specie quali postura incurvata e cromodacriorrea, ovvero una continua emissione di porfirina da parte delle ghiandole di Harder in concomitanza al mancato *self-grooming* causato da distress, dolore e sofferenza.

| <b>MANIFESTAZIONE CLINICA</b>                                                                        | <b>SCORE</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Nessuna</i>                                                                                       | 0            |
| <i>Arruffamento del pelo</i>                                                                         | 1            |
| <i>Arruffamento del pelo, diminuzione di attività fisica</i>                                         | 2            |
| <i>Arruffamento del pelo, diminuzione di attività fisica, perdita di peso tra 10 e 15%</i>           | 3            |
| <i>Arruffamento del pelo, diminuzione di attività fisica, perdita di peso tra 15 e 20%</i>           | 4            |
| <i>Arruffamento del pelo, diminuzione di attività fisica, perdita di peso di più del 20%, cifosi</i> | 5            |

Tabella 4.1: Pain score system utilizzato per la valutazione dello stato di benessere dell'animale.

#### 4.3.3 Analisi istologiche relative al PLA

- Materiali e metodi

I campioni di tratto di aorta di ratto rivestiti di rete di PLA sono stati espantati dopo 1 mese dall'intervento, fissati in formaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1M, fotografati, successivamente disidratati in soluzioni di etanolo a concentrazione crescente ed inclusi in paraffina. Sezioni di spessore 3-4  $\mu\text{m}$  eseguite con il microtomo Microm HM450 (Thermofisher Scientific Inc, Waltham, USA), dopo sparaffinatura, sono state colorate con ematossilina-eosina per la valutazione di tutte le componenti cellulari ed extracellulari.

- Risultati

La parete di aorta avvolta dal materiale appare integra e ben organizzata; sono visibili le aree in cui era alloggiato il materiale di contenimento (PLA) circondate da pochi strati di cellule, verosimilmente fibroblasti, cellule infiammatorie e poche cellule giganti da corpo estraneo. Sono visibili, inoltre, i punti di sutura resi necessari per fissare la rete di PLA alla parete aortica (Figura 4.13).

L'aorta dopo un mese dall'intervento appare integra; il materiale termoplastico che l'ha avvolta sembra non abbia interferito se non in minima parte con il tessuto circostante, dimostrando così una buona biocompatibilità. Il PLA, nella sezione istologica, non è visibile in alcun modo, questo significa che esso si è totalmente degradato nell'ambiente biologico, mostrando perciò anche ottime proprietà di biodegradabilità.

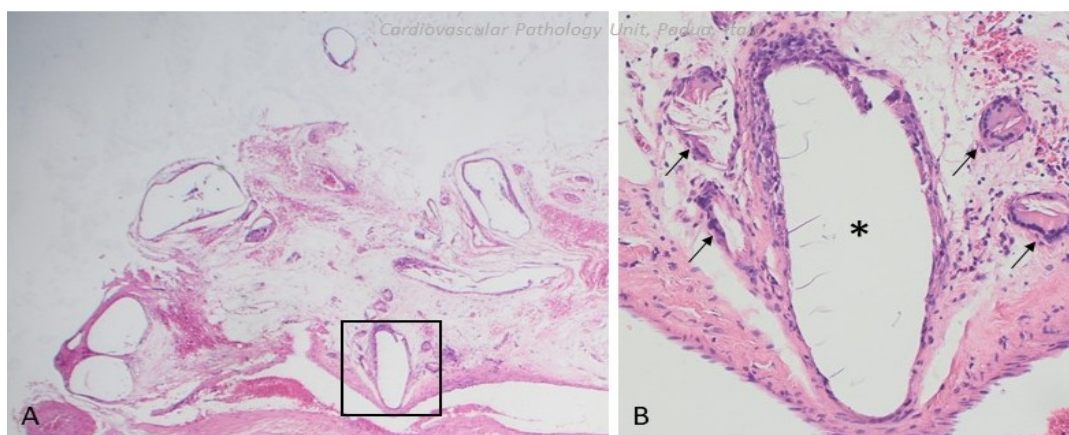


Figura 4.13: Porzione di aorta di ratto con rete di PLA. A) Panoramica. B) Particolare di A evidenziata dal riquadro. E' visibile l'area in cui era alloggiato il PLA (asterisco) circondato da fibroblasti e alcune cellule infiammatorie; accanto, sono visibili i punti di sutura (frecce).

Le prove in vivo del PVA sono state eseguite circa due settimane dopo quelle sul PLA e perciò le analisi istologiche non sono ancora disponibili alla data di consegna della presente tesina.



## Capitolo 4: Conclusioni

In questo elaborato si è fatto riferimento alla stampa 3D, descrivendone le varie tipologie e prestando particolare attenzione a quelle utilizzate in ambito medico e, nello specifico, cardiocirurgico. Si è evidenziato come essa svolga un ruolo fondamentale per la fase di planning operatorio e per lo studio approfondito dell'anatomia di organi e tessuti. In particolar modo, si è descritto dettagliatamente il metodo di stampa 3D Meshmixer della Form3L presente presso il reparto di Cardiocirurgia Pediatrica dell'Azienda Ospedale Università di Padova, con il quale vengono stampati numerosi modelli di cuori di pazienti affetti da cardiopatie congenite per consentire un'accurata simulazione dei relativi interventi chirurgici. Tale processo è in continuo sviluppo e tuttora si stanno studiando nuovi software per poter migliorare la velocità di stampa, la precisione dei modelli anatomici stampati e la qualità dei materiali utilizzati.

Inoltre si è visto come la stampa 3D sia fondamentale per la produzione di modelli polimerici tridimensionali utilizzati per produrre scaffold o patches. Tali modelli vengono ancora utilizzati pionieristicamente e sperimentati su modello animale per poter comprendere le caratteristiche e il comportamento in vivo dei materiali utilizzati.

Nella presente tesi si è analizzato il comportamento di due materiali (PLA e PVA) che sono stati testati su modello animale nel laboratorio di chirurgia sperimentale. Dalle analisi istologiche, si è potuto osservare come uno dei materiali utilizzati (il PLA) abbia un riscontro molto positivo in termini di biocompatibilità e biodegradabilità.

L'utilizzo di tali materiali in interventi cardiocirurgici è in continuo sviluppo ed è lecito attendersi che possano essere ben presto utilizzati anche in interventi sull'uomo.

## Bibliografia

- [1] Li J., Wu C., Chu P. K., & Gelinsky M. (2020). 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 140, 100543. Pagine: 76.
- [2] Thomas C. (2021) Storia della stampa 3D. [Online]. Available: <https://www.top3d.it/storia-della-stampa-3d/>.
- [3] Geekitbase.info, [Online]. Available: <https://geekitbase.info/content/50.4>.
- [4] Jemghili R., Taleb A. A., & Mansouri K. (2020, December). Additive manufacturing progress as a new industrial revolution. In *2020 IEEE 2nd International Conference on Electronics, Control, Optimization and Computer Science (ICECOCS)*. Pagine: 8.
- [5] TED [Online]. Available: [https://www.ted.com/talks/anthony\\_atala\\_growing\\_new\\_organs](https://www.ted.com/talks/anthony_atala_growing_new_organs)
- [6] Torabi K., Farjood E., & Hamedani S. (2015). Rapid prototyping technologies and their applications in prosthodontics, a review of literature. *Journal of Dentistry*, 16(1), 1. Pagine: 9.
- [7] Gatto A., and Iuliano L. Prototipazione rapida. La tecnologia per la competizione globale. *Tecniche nuove*, 1998.
- [8] Costanzo A., Croce U., Spotorno, R., Fenni S. E., & Cavallo D. (2020). Fused deposition modeling of polyamides: Crystallization and weld formation. *Polymers*, 12(12), 2980. Pagine: 16.
- [9] Haryńska A., Gubanska I., Kucinska-Lipka J., & Janik H. (2018). Fabrication and characterization of flexible medical-grade TPU filament for Fused Deposition Modeling 3DP technology. *Polymers*, 10(12), 1304. Pagine: 19.
- [10] Schubert C., Van Langeveld M. C., & Donoso L. A. (2014). Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *British Journal of Ophthalmology*, 98(2), 159-161. Pagine: 3.
- [11] Formlabs. [Online]. Available: <https://formlabs.com/it/blog/guida-definitiva-stampa-3d-stereolitografia-sla/>.
- [12] Heller C., Schwentenwein M., Russmueller G., et al (2009) Vinylesters: low cytotoxicity monomers for the fabrication of biocompatible 3D scaffolds by lithography based additive manufacturing. *J Polym Sci, Part A* 47(24):6941–6954. Pagine: 14.
- [13] Xometry. (2021). Sinterizzazione laser selettiva (SLS) Stampa 3D: Presentazione della tecnologia. [Online]. Available:

- [https://xometry.eu/it/?gclid=Cj0KCQjwguGYBhDRARIsAHgRm48nAV\\_k3Pl81eAMGmi-WjumGnnlerkOyqErtxmLAieyhtvzHlIG7YwaAkadEALw\\_wcB](https://xometry.eu/it/?gclid=Cj0KCQjwguGYBhDRARIsAHgRm48nAV_k3Pl81eAMGmi-WjumGnnlerkOyqErtxmLAieyhtvzHlIG7YwaAkadEALw_wcB).
- [14] MANUFAT. Tecnologia SLS selective laser sintering. [Online]. Available: <https://manufat.com/tecnologia-stampa-3d-sls/>.
- [15] 3Dnatives. [Online]. Available: <https://www.3dnatives.com/it/3d-bioprinting-medicina-220920219/#!>.
- [16] Geeetech. 3D Bioprinting for Medical and Enhancement purpose. [Online]. Available: <https://www.geeetech.com/blog/2020/01/3d-bioprinting-for-medical-and-enhancement-purpose/>.
- [17] Gungor-Ozkerim P. S., Inci I., Zhang Y. S., Khademhosseini A., & Dokmeci M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, 6(5), 915-946. (pp: 8-32)
- [18] Hochleitner G., Chen F., Blum C., Dalton P. D., Amsden B., & Groll J. (2018). Melt electrowriting below the critical translation speed to fabricate crimped elastomer scaffolds with non-linear extension behaviour mimicking that of ligaments and tendons. *Acta biomaterialia*, 72, 110-120. Page: 11.
- [19] Palazzo L., Fioroni A., Dodaj G., Guerra D. (2021). La stampa 3D come ausilio diagnostico nella gestione del mascellare superiore atrofico. *Exacone News*. [Online]. Available: <http://www.diagnostico-nella-gestione-del-mascellare-superiore-atrofico/.leone.it/pubblicazioni/la-stampa-3d-come-ausilio->
- [20] Arosio P. (2020). Pianificazione chirurgica con il modello fisico stampato in 3D. *01health*. [Online]. Available: <https://www.01health.it/tecnologie/stampa-3d/pianificazione-chirurgica-modello-fisico-stampato-3d/>.
- [21] De Paolis M., Sambri A., Zucchini R., Frisoni T., Spazzoli B., Taddei F. & Donati D. M. (2022). Custom-made 3D-Printed Prosthesis in Periacetabular Resections Through a Novel Ileo-adductor Approach. *Orthopedics*, 45(2), e110-e114.
- [22] Redazione Data Manager Online (DMO). (2021, febbraio). Padova Cardiochirurgia Pediatrica applica la realtà virtuale nelle cardiopatie congenite.. [Online]. Available: <https://www.padovaoggi.it/salute/cardiochirurgia-pediatria-applica-realta-virtuale-nelle-cardiopatie-congenite.html>.
- [23] Formlabs. [Online]. Available: <https://formlabs.com/it/blog/guida-definitiva-stampa-3d-stereolitografia-sla/>.

- [24] Carolo L., Mashambanhaka F., Parenti M. (2022). The Best Free CAD Software for 3D Printing. [Online]. Available: <https://all3dp.com/2/best-free-cad-software-for-3d-printing/>.
- [25] Data and Statistics on Congenital Heart Defects. (2020, dicembre). National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, Centers for Disease Control and Prevention,
- [26] Oster M. E., Lee K. A., Honein M. A., Riehle-Colarusso T., Shin M., & Correa A. (2013). Temporal trends in survival among infants with critical congenital heart defects. *Pediatrics*, 131(5), e1502-e1508. Pagine: 7.
- [27] Lee B. (2020, dicembre) Coartazione dell'aorta. Children's Hospital of Pittsburgh of the University of Pittsburgh School of Medicine, MSD. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/pediatria/disturbi-cardiovascolari-congeniti/coartazione-dell-aorta>.
- [28] Mhanna R., Hasan A. Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine. First Edition (2017) Wiley-VCH Verla. GmbH & Co. Pagine: 23.
- [29] Marginov M. (2019) Impalcature (scaffold) stampate in 3d con litio per la rigenerazione della cartilagine. [Online]. Available: <https://stamparein3d.it/impalcature-scaffold-stampate-in-3d-con-litio-per-la-rigenerazione-della-cartilagine/>.
- [30] Chen H., & Kong J. (2016). Hyperbranched polymers from A 2+ B 3 strategy: recent advances in description and control of fine topology. *Polymer Chemistry*, 7(22), 3643-3663. Pagine: 22.
- [31] Foggia M. (2008) Studio di biomateriali usati come scaffolds per tissueengineering e loro caratterizzazione con tecniche elettroscopiche vibrazionali dianalisi termica. Università di Bologna. Pagine: 15.
- [32] Stephanie M., Willerth Shelley E., Sakiyama E: (2007). Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 329. Pagine: 14.
- [33] Slide di biomateriali presentate a lezione, Bagno A.
- [34] Carrella M. R. (2012). Preparazione e caratterizzazione di compositi polimerici biodegradabili a base di acido polilattico e nanocellulosa. Pagine: 42.
- [35] Barbani N., Lazzeri L., & Lelli L. (1992). Nuovi materiali polimerici bioartificiali costituiti da collagene e alcool polivinilico. Pagine: 8.



## **RINGRAZIAMENTI:**

Desidero ringraziare innanzitutto il mio relatore, il prof. Andrea Bagno, per avermi aiutata con passione, dedizione ed estrema accuratezza nella stesura di questo elaborato.

Un ringraziamento speciale è rivolto a tutto il personale medico della UOC di Cardiochirurgia Pediatrica dell'Azienda Ospedale Università di Padova; in particolar modo al prof. Vladimiro Vida, direttore della UOC e mio correlatore, per avermi accompagnata e seguita con premura in tutta l'esperienza del tirocinio formativo appassionandomi a questo ambito. Ringrazio inoltre gli specializzandi per avermi aiutata e seguita attentamente e soprattutto per avermi insegnato quanto è importante e gratificante seguire le proprie passioni e interessi, specialmente in ambito lavorativo.

I ringraziamenti più importanti vanno alla mia famiglia: a mia madre, mio padre e mia sorella che mi hanno sempre sostenuto e supportato in questo percorso di studio triennale, specialmente nei momenti più difficili.

Infine un grazie speciale va a mio nonno, che da poco ci ha lasciato, ma che sono sicura sarebbe orgoglioso di me; a lui voglio dedicare il successo e la felicità di questo traguardo.