



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA

**ANALISI DEL COMPORTAMENTO MECCANICO DI ALCOOL
POLIVINILICO PER LA RIGENERAZIONE NERVOSA**

Relatore: Prof. Silvia Todros

Laureanda: Caterina d'Aloja

Correlatore: Prof. Piero Pavan

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 11 Luglio 2022

Indice

Abstract	6
Introduzione	7
Capitolo 1: anatomia e fisiologia dei nervi	8
1.1 Cellule del sistema nervoso	8
1.2 Sistema nervoso centrale	12
1.2.1 Malattie neurologiche	13
1.3 Sistema nervoso periferico	14
1.3.1 Nervi periferici	14
1.3.2 Struttura dei nervi periferici	15
1.3.3 Lesioni dei nervi periferici	17
Capitolo 2: medicina rigenerativa ed ingegneria tissutale	22
2.1 Principi fondamentali	22
2.2 Cellule	25
2.2.1 Cellule staminali embrionali	25
2.2.2 Cellule staminali adulte	25
2.2.3 Cellule già differenziate	26
2.3 Scaffold	26
2.4 Biomolecole – fattori di crescita o fattori biochimici	27
2.5 Biocompatibilità	28
2.6 Applicazioni dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa ai nervi	30
2.6.1 Sviluppo storico del trattamento delle lesioni nervose	30
2.6.2 L'approccio dell'ingegneria dei tessuti	31
2.7 Sviluppi futuri dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa	33
Capitolo 3: neuroguide per la riparazione del sistema nervoso periferico	38
3.1 Introduzione	38
3.2 Tecniche di riparazione dei nervi periferici	39
3.2.1 Neuroraffia	40
3.2.2 Neurotizzazione	42
3.2.3 Innesti autologhi	42
3.2.4 Allograft di nervi o alloinnesto	44
3.2.5 Tubulizzazione mediante neuroguide	47
3.3 Design delle neuroguide	51

3.3.1 Design cavo	52
3.3.2 Design multicanale	52
3.3.3 Design poroso	54
3.3.4 Design con riempitivi in fibra o hydrogel	57
3.3.5 Design scanalato	59
3.4 Materiali per la realizzazione di neuroguide	60
3.4.1 Polimeri naturali	60
3.4.2 Polimeri sintetici	65
3.4.3 Materiali compositi a matrice polimerica	66
3.4.4 Polimeri conduttivi	67
3.5 Tecniche di fabbricazione delle neuroguide	68
3.4.1 Micro-patterning	70
3.4.2 Stampa ad iniezione	71
3.4.3 Congelamento unidirezionale	71
3.4.4 Elettrofilatura	71
3.4.5 Stampa 3D a getto elettrodinamico (EHD-jet)	73
3.4.6 Stampa 3D basata sull'elaborazione della luce digitale	73
3.5 Neuroguide in commercio: lo stato dell'arte	74
3.5.1 Neurobox	75
3.5.2 Integra LifeSciences	75
3.5.2.1 Guida per nervi NeuraGen	76
3.5.2.2 Protettore per nervi NeuraWrap	78
3.5.3 KeriMedical Reaxon	79
3.5.4 Medovent GmbH	80
3.5.5 Polyganics BV	81
Capitolo 4: materiali e metodi	83
4.1 Materiali	83
4.1.1 PVA	83
4.1.2 PVA parzialmente ossidato	84
4.1.3 Preparazione degli hydrogel e delle neuroguide	86
4.1.4 Preparazione di neuroguide caricate con nanotubi di carbonio	86
4.2 Metodi	87
4.2.1 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	87
4.2.2 Studio in vivo su modello animale	87

4.2.3 Microscopia digitale ed analisi d'immagine	88
4.2.4 Strumentazione per prove meccaniche	90
4.2.5 Protocollo di carico	91
Capitolo 5: risultati	95
5.1 Analisi morfologica delle neuroguide	95
5.1.2 Analisi in vivo – Analisi istologica	97
5.2 Prove meccaniche	100
5.2.1 Comportamento meccanico a trazione	100
5.2.2 Comportamento viscoelastico: rilassamento delle tensioni	103
Conclusioni	105
Acronimi	106
Bibliografia e Sitologia	108

Abstract

Il presente studio ha lo scopo di esaminare il comportamento meccanico di neuroguide costituite da hydrogel a base di alcool polivinilico (PVA) in forma nativa e in forma ossidata (OxPVA) con permanganato di potassio (KMnO_4), anche in forma composita con nanotubi di carbonio (CNT).

Partendo da uno studio anatomico dei nervi, è stato analizzato lo stato dell'arte nel campo della rigenerazione dei nervi periferici e dell'ideazione di metodologie come l'impiego di autoinnesti, di neuroguide e di esempi di applicazioni in ambito di ingegneria tessutale e rigenerativa.

Nel dettaglio, i campioni analizzati nel presente studio hanno la forma di neuroguide: sono dei piccoli tubi/canali artificiali per la rigenerazione del nervo periferico. Le neuroguide, o condotti di guida nervosi (NGC), possono essere costituite da materiali sintetici o naturali, funzionano come strutture di raccordo suture o comunque fissate ai due monconi del nervo danneggiato allo scopo di fornire un ambiente adeguato per la rigenerazione del nervo, fungendo al contempo sia da guida per la rigenerazione degli assoni sia da barriera contro la crescita cicatriziale.

È stato dimostrato che l'ossidazione del PVA permette di ottenere caratteristiche meccaniche modulabili, migliora l'assorbimento d'acqua da parte del materiale e infine consente un efficace controllo del meccanismo di biodegradazione in vivo. Pertanto, l'ossidazione permette di migliorare le proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità del materiale rispetto alla forma nativa, in modo da renderlo più adatto per possibili applicazioni in ambito biomedico.

Nel presente lavoro di tesi, sono state caratterizzate delle neuroguide a base di PVA, OxPVA e OXPVA composite con CNT, preparate presso la Sezione di Anatomia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova. La caratterizzazione morfologica e meccanica delle neuroguide, svolta presso il Laboratorio di Meccanica dei Materiali Biologici del Dipartimento di Ingegneria Industriale, costituisce un'analisi preliminare per la valutazione della funzionalità in vivo di tali costrutti, in vista di applicazioni nella riparazione delle lesioni dei nervi periferici, mediante un approccio di ingegneria dei tessuti.

Introduzione

La lesione del nervo periferico è un problema clinico comune globale che colpisce in modo significativo la qualità della vita dei pazienti. Nel dettaglio, la riparazione di una lesione nervosa periferica può verificarsi solo se le fibre a monte della sede danneggiata possono rigenerarsi lungo il moncone distale raggiungendo il loro target. Nella pratica clinica ciò si realizza attraverso una sutura microchirurgica. Tuttavia, nel caso in cui vi sia una perdita di sostanza nervosa e la neurorrafia termino-terminale non sia possibile, risulta necessario ricorrere a strategie alternative.

Ad oggi la tecnica gold-standard nel trattamento delle grosse perdite di sostanza nervosa rimane l'innesto nervoso autologo. Alternativamente, sono state studiate altre tecniche come l'impiego di tubi (o guide o neuroguide), biologici o sintetici, capaci di supportare e far crescere gli assoni rigeneranti per brevi distanze. Per sviluppare delle guide neurali più efficienti negli anni sono stati effettuati un ampio spettro di studi nel campo della biochimica e bioingegneria, allo scopo di studiare la risposta delle cellule agli stimoli fisici e chimici provenienti dall'ambiente extracellulare. Ambiti come l'ingegneria tessutale e l'ingegneria rigenerativa si sono rivolti verso la rigenerazione nervosa periferica producendo scaffold (supporti bi/tridimensionali) con strutturazione superficiale di dimensioni subcellulari (nell'ordine dei micrometri e dei nanometri), in grado di produrre artificialmente la struttura e le caratteristiche della matrice extra-cellulare.

Partendo prima di tutto da uno studio anatomico dei nervi, è stato analizzato lo stato dell'arte nel campo della rigenerazione dei nervi periferici e dell'ideazione di metodologie come l'impiego di autoinnesti e di neuroguide.

Nel dettaglio, i campioni analizzati in seguito nel presente studio hanno la forma di neuroguide: sono dei piccoli tubi/canali artificiali per la rigenerazione del nervo periferico, noti come 'condotti di guida nervosi o condotti nervosi'. Le neuroguide possono essere considerate come condotti per la guida nervosa costituiti da materiali sintetici o naturali, funzionano come strutture tunnel suturate o comunque fissate ai due monconi del nervo danneggiato allo scopo di fornire un ambiente adeguato per la rigenerazione del nervo fungendo al contempo sia da guida per la rigenerazione degli assoni sia da barriera contro la crescita cicatriziale.

Capitolo 1. Anatomia e fisiologia dei nervi

Il sistema nervoso umano si suddivide in due strutture principali: il sistema nervoso cerebro-spinale e il sistema nervoso autonomo. A sua volta, il sistema nervoso cerebro-spinale si suddivide in sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP). Il sistema nervoso autonomo, invece, si suddivide in sistema nervoso simpatico e sistema nervoso parasimpatico.

Le caratteristiche più particolari del sistema nervoso sono definite come irritabilità e conducibilità: l'irritabilità è la capacità di trasformare gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno in impulsi nervosi, mentre la conducibilità è la capacità di trasmettere i segnali nervosi sia ad altre parti della stessa cellula, sia ad altri neuroni e alle cellule effettrici. Con il termine effettore in anatomia s'intende qualsiasi organo capace di reagire a un impulso nervoso, quindi le cellule effettrici rappresentano un gruppo di cellule che rispondono attivamente ad uno stimolo.

Quando questo sistema di segnali nervosi subisce delle interruzioni, è necessario applicare interventi di riparazione del sistema nervoso ed è in questo ambito che si colloca lo studio oggetto del presente elaborato. Questa attività prevede lo studio preliminare dell'anatomia dei nervi e delle fibre nervose del sistema nervoso periferico e delle loro possibili lesioni.

1.1 Cellule del sistema nervoso

Il tessuto nervoso è formato da cellule aventi una morfologia caratteristica, dette cellule nervose o neuroni, tra le quali si instaurano dei rapporti finalizzati alla trasmissione di impulsi: esse sono le unità strutturali e funzionali del sistema nervoso.

Il neurone, che rappresenta la struttura fondamentale di tutta l'architettura nervosa, è un'unità morfologica, funzionale, trofica e patologica. Nello specifico, ogni neurone è indipendente dagli altri neuroni, ma è con essi in rapporto di contiguità: il corpo cellulare del neurone e i suoi prolungamenti sono dunque in contatto solo con gli altri neuroni adiacenti.

I prolungamenti neuronali degenerano quando viene interrotta la loro continuità con il corpo cellulare, per cui hanno proprietà rigenerative solo i prolungamenti che restano in continuità con il corpo centrale. La morte di un neurone interessa solo la singola unità neuronica e non quelle adiacenti. I neuroni hanno la funzione specifica di condurre l'impulso nervoso, ma trasmettono anche segnali di irritabilità e funzione trofica [1].

Ciascun neurone (Figura 1.1) è costituito principalmente da:

- un corpo cellulare (detto anche pirenoforo), contenente il nucleo e il citoplasma;
- lunghi e caratteristici prolungamenti che si distinguono, in base alla forma e alla funzione, in dendriti (o prolungamenti protoplasmatici) e assone (o cilindrassa o neurite o prolungamento nervoso).

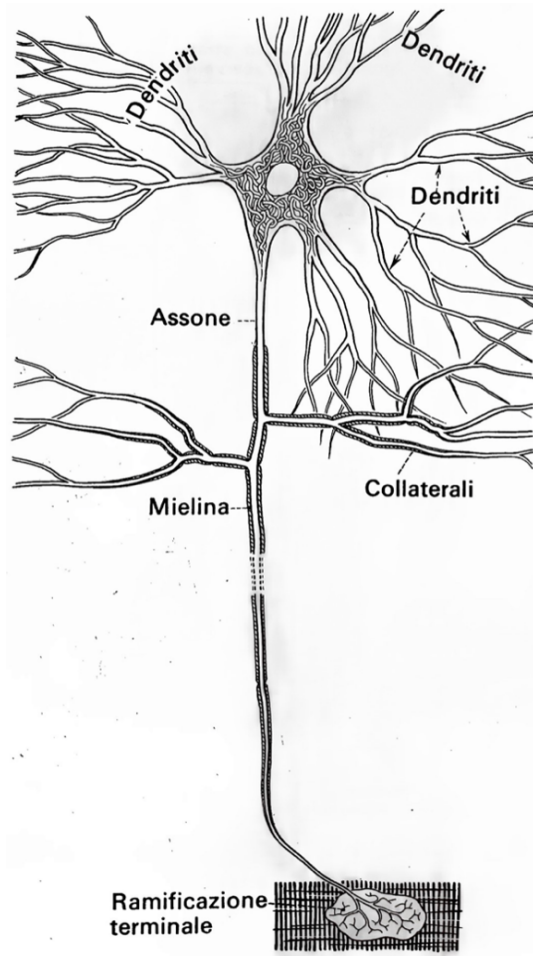


Figura 1.1: Il neurone [1].

Generalmente, dendriti e neurite si originano dai due poli opposti del corpo cellulare che ogni neurone presenta: uno recettore corrispondente all'estremità del (o dei) prolungamenti protoplasmatici, e l'altro effettore corrispondente alla estremità del cilindrasse e dei suoi rami collaterali.

Il neurone è percorso, per tutta la sua estensione, da sottili filamenti o neurofibrille che ricoprono un ruolo fondamentale nella conduzione dell'impulso nervoso.

A seconda della regione in cui si trova e della funzione che deve svolgere, il neurone può presentare caratteristiche morfologiche diverse. Il corpo cellulare può essere triangolare, rotondeggiante o stellato. I dendriti si presentano a forma di pennacchio, di rami o di raggi. Gli assoni e i dendriti sono rivestiti da una guaina nevrogliosa o guaina di grassi fosfati chiamata guaina di mielina (Figura 1.2).

Oltre ai neuroni, il sistema nervoso è composto anche da vasi sanguigni, tessuto connettivo di sostegno (nel caso del sistema nervoso periferico) e cellule di nevrogliosi.

Le cellule della nevrogliosi, o cellule della glia, forniscono supporto e protezione ai neuroni ai quali veicolano anche le sostanze nutritive. Ad esempio, alcune cellule della nevrogliosi, gli astrociti, sembrano essere coinvolte nel meccanismo di regolazione del rilascio dei neurotrasmettitori, che sono molecole aventi un ruolo nel passaggio dell'impulso da una cellula nervosa all'altra.

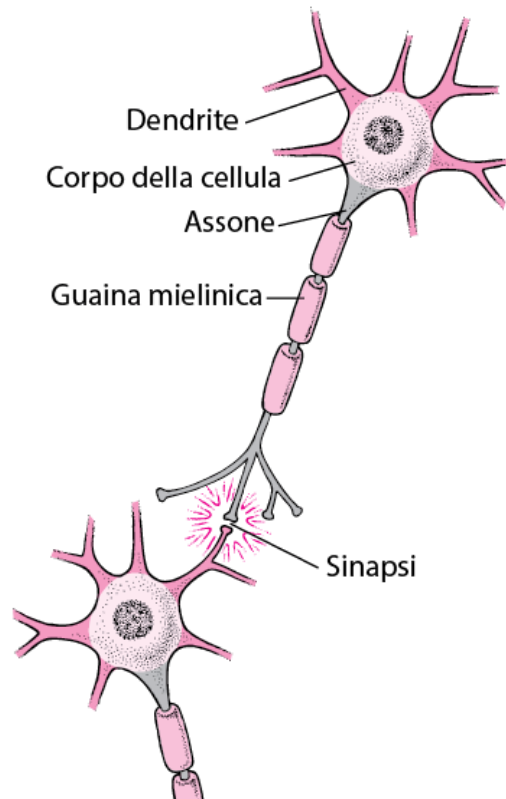


Figura 1.2: Struttura di un neurone schematizzata.

Più nel dettaglio si può schematizzare la composizione della cellula nervosa o neurone come composta dai seguenti elementi:

- Dendriti: hanno la funzione di ricevere gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno o da altri neuroni, di condurli verso il corpo cellulare e di trasformarli in impulsi nervosi (conduzione centripeta o cellulipeta). Sono più corti dell'assone e sono generalmente multipli; hanno molte ramificazioni ed emergono da punti diversi del corpo cellulare. Dal punto di vista morfologico e funzionale sono delle espansioni del corpo cellulare finalizzate a rendere più ampia possibile la superficie disponibile per i contatti sinaptici;
- Corpo cellulare (pirenoforo): contiene il nucleo e il citoplasma;
- Assone: è formato da cellule di nevroglia e da una guaina mielinica, è presente in tutti i neuroni solitamente come un unico prolungamento molto lungo e sottile, ha la funzione di trasmettere gli impulsi in zone distanti dal corpo cellulare;
- Terminali dell'assone.

Le sinapsi sono le zone di contatto fra le cellule nervose e sono strutture specializzate nella trasmissione degli impulsi. Le sinapsi (Figura 1.3) collegano funzionalmente i neuroni tra loro e con le cellule degli organi effettori, quali: cellule epiteliali, cellule connettivali, cellule muscolari, etc.

Ogni neurone diviene così un centro di regolazione e integrazione degli impulsi provenienti da moltissime altre cellule nervose.

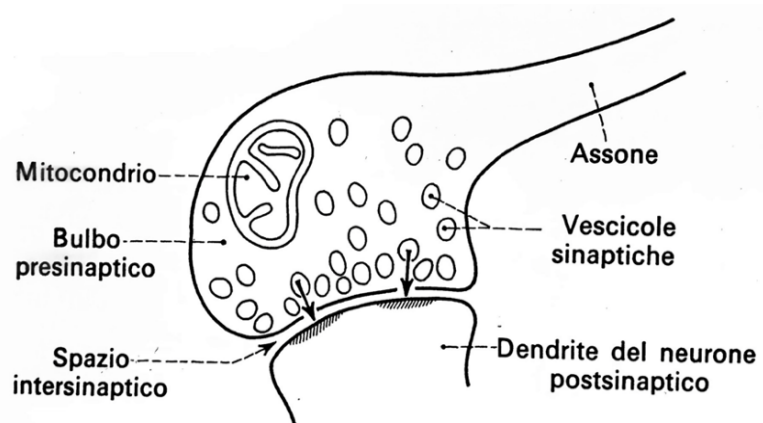


Figura 1.3: Schema di sinapsi tra assone e dendrite [1].

Riassumendo possiamo identificare le cellule del sistema nervoso come: neuroni e neuroglia. La neuroglia del SNC si divide in ectoglia (astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali) e mesoglia (o microglia), mentre quella del sistema nervoso periferico SNP in cellule satelliti, cellule di Schwann e teoglia.

Le fibre nervose possono essere efferenti, ossia motorie, oppure afferenti, ovvero sensitive (Figura 1.4). Le cellule motorie trasmettono impulsi dal sistema nervoso centrale alla periferia, mentre le cellule sensitive trasmettono gli stimoli sensoriali dagli organi periferici al sistema nervoso centrale.

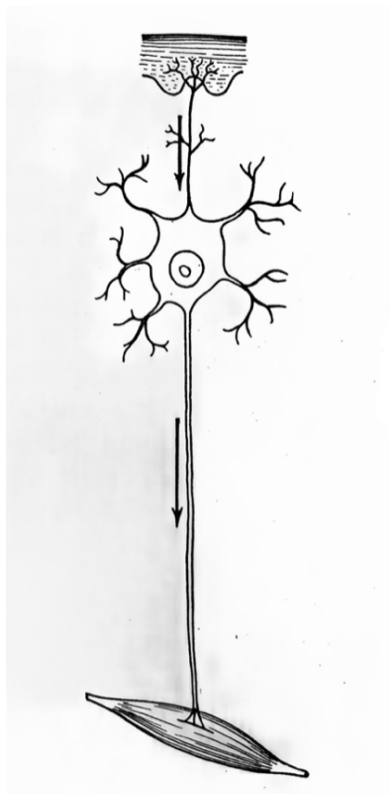


Figura 1.4: Direzione dell'impulso nervoso lungo i vari elementi del neurone, esempio di fibre nervose efferenti [1].

1.2 Sistema nervoso centrale

Il sistema nervoso centrale è costituito da cervello, midollo spinale, cervelletto e tronco encefalico. Il cervello contiene i corpi dei neuroni e le fibre nervose che trasmettono o ricevono le informazioni. Il midollo spinale può essere immaginato come la 'strada' da cui partono i nervi che conducono le informazioni alle varie parti del corpo, e permette di interconnettere le informazioni dirette al cervello e quelle che partono dal cervello.

Il cervelletto controlla il movimento e l'equilibrio dell'individuo, contribuisce alla formazione della memoria ed influenza le capacità matematiche e musicali.

Il tronco encefalico rappresenta il punto di transito delle informazioni che provengono dal cervello o che sono dirette verso lo stesso.

Il SNC ha quindi il compito di rielaborare le informazioni che giungono dal sistema nervoso periferico fornendo le risposte che verranno ridistribuite nell'organismo sempre attraverso il sistema nervoso periferico. In particolare, il cervello elabora le informazioni raccolte dal midollo spinale così da regolare le principali funzioni dell'organismo, come la memoria, i pensieri, le sensazioni e i movimenti. Il midollo spinale, invece, contribuisce a realizzare alcuni movimenti riflessi senza che siano coinvolte le strutture del cervello.

La nevroglia del sistema nervoso centrale invece si divide in ectoglia e mesoglia. L'ectoglia si divide a sua volta in astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali.

Gli astrociti sono forniti di molte estroflessioni che servono ad ancorare i neuroni al loro rifornimento di sangue. Gli stessi si dividono in protoplasmatici, fibrosi e radiali. Nello specifico, gli astrociti regolano l'ambiente chimico esterno dei neuroni rimuovendo gli ioni (ad es. del potassio) e recuperando i neurotrasmettitori rilasciati durante la trasmissione sinaptica. Secondo le teorie oggi maggiormente accreditate, gli astrociti rappresentano i 'blocchi da costruzione' della barriera emato-encefalica. Inoltre, sono in grado di regolare la vasocostrizione e la vasodilatazione.

Gli oligodendrociti si dividono in due classi: la prima classe situata nella sostanza grigia del sistema nervoso centrale, addossata ai pirenofori (oligodendrociti satelliti perineuronali), con funzioni coadiuvanti metaboliche; la seconda classe si trova nella sostanza bianca del sistema nervoso centrale (oligodendrociti interfascicolari), intercalata tra gli assoni.

Il compito degli oligodendrociti interfascicolari è quello di rivestire gli assoni del SNC con una sostanza lipidica chiamata mielinae quindi produrre la guaina mielinica. Detta guaina isola l'assone permettendo una migliore propagazione dei segnali elettrici (conduzione saltatoria).

Gli oligodendrociti possono rivestire anche più di un assone in quanto forniti di numerosi prolungamenti.

Le cellule ependimali o ependimociti delimitano le cavità del sistema nervoso centrale e, col battito delle loro ciglia, favoriscono la circolazione del liquido cerebrospinale. Possiamo immaginare che esse costituiscano i 'muri' che delimitano le varie sezioni. Sono prive di una membrana basale e si estendono in prolungamenti e connessioni in continuità con gli astrociti.

Le cellule della mesoglia o microglia invece sono un tipo di cellule della glia che si occupano della prima e principale difesa immunitaria attiva nel sistema nervoso centrale. Le singole cellule della microglia sono distribuite, nel cervello e nel midollo spinale, in larghe regioni che non si sovrappongono tra di loro e si muovono costantemente alla ricerca di neuroni danneggiati, placche e agenti infettivi.

1.2.1 Malattie neurologiche

Le malattie neurologiche (che coinvolgono il SNC) sono molteplici: malattie genetiche, malformazioni congenite, malattie neurodegenerative, tumori, malattie autoimmuni, infezioni, malattie di origine traumatica, malattie da compressione dei nervi (o sindromi da compressione nervosa), malattie vascolari, malattie psichiatriche e malattie idiopatiche (cioè senza una causa riconoscibile).

Le più frequenti sono:

- Lesioni del midollo spinale complete o incomplete (12000 nuovi casi all'anno nel mondo), nelle quali in base al sito della lesione si ha una diversa compromissione delle funzioni motorie;
- Lesioni traumatiche del cervello (1,4 milioni di persone all'anno nel mondo), sono lesioni non degenerative causate da una forza meccanica esterna che provoca una compressione e/o deformazione del cervello, seguita da un danno secondario a carico dei mediatori neurochimici. Comporta la perdita delle funzioni cognitive, del controllo motorio ed alterazioni del comportamento;
- Malattie neurodegenerative: morbo di Parkinson (1,5 milioni di persone affette nel mondo) causato dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici, morbo di Alzheimer (5 milioni di persone affette nel mondo) causa la perdita generalizzata di neuroni nel cervello, malattia di Huntington (colpisce una persona su 10000 nel mondo) e causa difetti multipli a carico del sistema nervoso, epilessia (3 milioni di persone affette nel mondo) causa la perdita dei neuroni della corteccia cerebrale, sclerosi multipla (300000 casi in USA) causata dalla degenerazione degli oligodendrociti;
- Ictus (seconda causa di morte nel mondo, 6 milioni solo nel 2020), caratterizzato da morte del tessuto cerebrale causata da un alterato apporto di sangue.

1.3 Sistema nervoso periferico

Con il termine sistema nervoso periferico si intende l'insieme dei gangli nervosi e dei nervi che si possono individuare all'esterno dell'encefalo e del midollo spinale. La sua funzione è quella di assicurare il collegamento con le altre parti del corpo.

Il sistema nervoso periferico si suddivide in due parti: il sistema sensoriale e il sistema motorio.

Il sistema sensoriale è composto da due tipi di neuroni, dei quali uno riceve le informazioni provenienti dall'ambiente esterno ed è quindi legato agli organi di senso come le orecchie o gli occhi, mentre l'altro ha la funzione di trasportare fino al cervello le informazioni provenienti dal corpo della persona.

Questo sistema è inoltre composto da una serie di nervi chiamati rispettivamente polistici e antipolistici, i quali facilitano le azioni come il movimento dei muscoli e lo scorrimento fluido del sangue.

Il sistema motorio invece può a sua volta essere suddiviso in 'somatico (o volontario)' ed 'autonomo'.

Il sistema somatico o volontario trasmette i segnali ai muscoli scheletrici, in particolare questo avviene nel caso di un riflesso, ossia quando c'è da attuare una risposta veloce ad uno stimolo di pericolo come una scossa o una scottatura. Occorre precisare che gran parte degli stimoli del sistema somatico sono volontari.

Il sistema autonomo invece gode di una vasta gamma di reazioni non volontarie che muovono in due direzioni, in base alla parte in cui sono state generate, rispettivamente dal sistema simpatico o dal sistema parasimpatico.

1.3.1 Nervi periferici

I nervi nel sistema periferico si suddividono in nervi cranici (presenti in 12 paia) e nervi spinali (presenti in 31 paia), aventi origine rispettivamente nell'encefalo e nel midollo spinale. I gangli sono, invece, dei particolari raggruppamenti di neuroni, addetti alla ricezione delle informazioni dai recettori.

I nervi periferici si classificano per tipo:

- **Sensitivo:** è un nervo che trasporta un'informazione sensoriale, captata in periferia (esempi di informazione sensoriale possono essere il dolore, la percezione tattile e la sensibilità propriocettiva);
- **Motorio:** è un nervo che controlla i muscoli scheletrici, viene messo in azione da un segnale che ha origine nel sistema nervoso centrale;
- **Autonomo:** è un nervo che regola le funzioni automatiche del corpo, come ad esempio la pressione sanguigna, la digestione o il processo di riempimento/svuotamento della vescica.

1.3.2 Struttura dei nervi periferici

Per la maggior parte i nervi periferici sono nervi misti che portano informazioni sensitive in ingresso (fibre afferenti) ed impulsi motori ed autonomici in uscita (fibre efferenti). Inoltre le fibre nervose sono classicamente distinte in due tipi fondamentali: fibre mieliniche (suddivise in fibre di moto e fibre di senso) e fibre amieliniche (o vegetative).

In questo tipo di sistema, il corpo cellulare dei neuroni, i dendriti e l'assone sono avvolti da particolari cellule di nevroglia (cellule di Schwann) e da numerosi strati di membrane cellulari, in prevalenza composte dal fosfolipide mielina (guaina mielinica), sono inoltre presenti anche cellule satelliti.

Nella letteratura specifica si evidenzia come le fibre mieliniche presentino un assone circondato da una guaina costituita dalle cellule di Schwann che lo avvolgono formando vari strati contrapposti e sovrapposti di membrana cellulare, in modo da costituire un isolante elettrico lungo tutto l'assone (Figura 1.5).

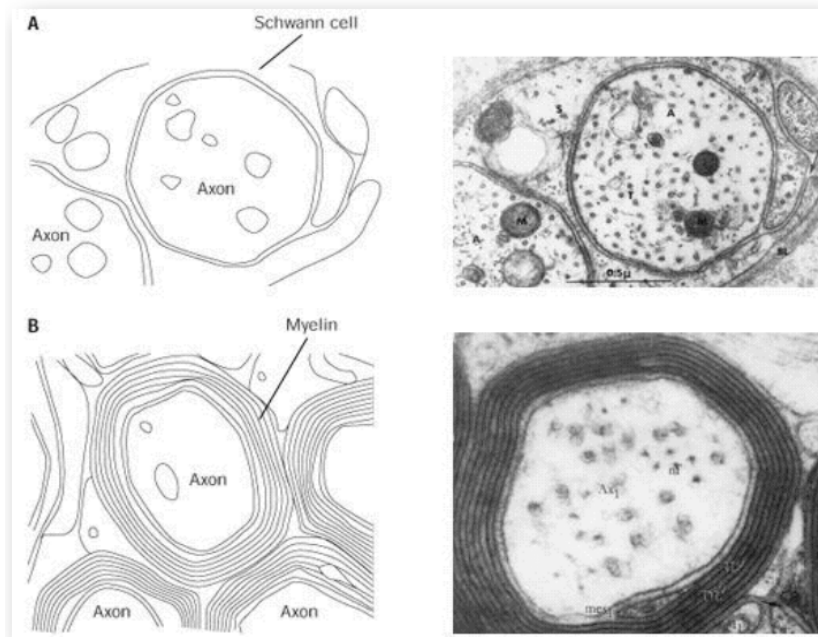


Figura 1.5: Nervi periferici.

Le cellule di Schwann hanno quindi la funzione di formare la guaina mielinica degli assoni del SNP. A differenza degli oligodendrociti, ogni cellula di Schwann riveste un solo tratto di assone di una lunghezza di circa 1 mm per volta, questo avvolgimento porta alla formazione della guaina mielinica e del neurilemma. Le medesime cellule svolgono ancora un'attività fagocitaria e ripuliscono l'ambiente loro circostante dai residui cellulari permettendo la ricrescita dei neuroni del sistema nervoso periferico.

L'avvolgimento della fibra mielinica da parte delle cellule di Schwann inizia con la formazione del "mesassone" o sito di fusione della membrana cellulare, e procede con l'avvolgimento di quest'ultimo attorno all'assone.

Il segmento di mielina prodotto da ogni singola cellula di Schwann è detto 'internodale' in quanto avvolge l'assone tra due nodi di Ranvier.

Le cellule satelliti, invece, sono piccole cellule che delimitano la superficie esterna dei pirenofori dei neuroni nel sistema nervoso periferico. Queste cellule hanno la funzione di regolare gli scambi di sostanze nutritive tra i pirenofori e il liquido extracellulare e cooperano nell'isolare il neurone da stimoli diversi da quelli prodotti a livello delle sinapsi.

Le fibre amieliniche sono, invece, avvolte da un semplice strato di citoplasma delle cellule di Schwann ed a differenza delle fibre mieliniche, una singola cellula di Schwann può avvolgere più assoni.

Per una corretta funzionalità le cellule nervose hanno bisogno del trasporto assonale cioè di un continuo apporto di metaboliti, il che risulta possibile grazie alla presenza di un delicato sistema microvascolare intraneurale.

La correlazione tra le dimensioni e la velocità di conduzione delle fibre nervose ha evidenziato come una maggiore dimensione del diametro della fibra comporti una maggiore velocità di conduzione. Inoltre, la velocità di conduzione delle fibre mieliniche viene aumentata dalla presenza dei nodi di Ranvier, che danno luogo alla conduzione dell'impulso nervoso in modo saltatorio (perché l'impulso 'salta' da un nodo di Ranvier all'altro).

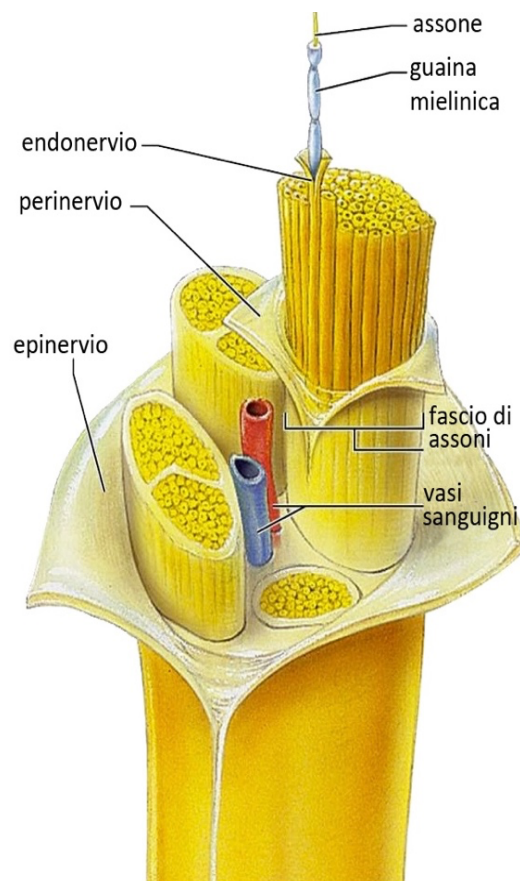


Figura 1.6: Struttura di base dei nervi periferici.

I nervi (Figura 1.6) sono costituiti da un insieme di fibre nervose parallele avvolte esternamente da una guaina di tessuto connettivo (epinervio). L'epinervio è formato da tessuto connettivo sia denso che lasso, si presenta ricco di fibre elastiche, fibroblasti, nocche cellulari adipose e fibre di collagene e ha come funzione principale quella di protezione del nervo.

In continuità con l'epinervio, altri strati di tessuto connettivo (perinervio) avvolgono i fasci di fibre nervose che compongono il nervo. Il perinervio si comporta come una barriera anatomo-funzionale per proteggere il nervo dall'ambiente circostante e le lesioni a suo carico comportano una grave limitazione della conduzione nervosa.

Gli spazi tra le singole fibre nervose sono occupati da un tessuto connettivo che si stacca dal perinervio (endonervio). Con il termine endonervio, quindi, ci si riferisce ad un sottile strato di tessuto che racchiude una fibra nervosa (formata da guaina mielinica ed assone del neurone), la cui matrice fibrosa è formata da fibre di collagene tipo I poste parallelamente all'assone lungo le fibre nervose, esternamente alla mielina. La componente cellulare dell'endonervio è costituita dalle cellule di Schwann, da cellule endoteliali, fibroblasti, mastociti e macrofagi. All'interno dell'endonervio, inoltre, sono presenti capillari sanguigni.

1.3.3 Lesioni dei nervi periferici

Le lesioni dei nervi periferici (*Peripheral nerve injuries* PNI) rappresentano un problema clinico molto diffuso, con un'incidenza stimata di 13,9-23 casi per 100.000 persone all'anno in tutto il mondo [3]. Secondo il National Center for Health Statistics, elaborando dati basati sulla classificazione delle malattie, nell'anno 1995 sono state eseguite più di 50.000 procedure di riparazione dei nervi periferici, mentre nel 2019 più di 200.000 pazienti hanno ricevuto le medesime procedure [3].

Le lesioni nervose periferiche possono interessare tutte le componenti del nervo, nello specifico le fibre nervose, le cellule di Schwann, il tessuto connettivo ed i vasi.

L'effetto principale delle lesioni è l'interruzione della conduzione degli impulsi nervosi. Con il termine "neuropatia periferica" s'intende la condizione che risulta da un deterioramento e/o da un cattivo funzionamento dei nervi periferici.

La rigenerazione nervosa conseguente ad un avvenuto deterioramento dipende da numerosi fattori sia intrinseci che estrinseci al nervo.

A differenza del SNC, nel quale la rigenerazione dell'assone può essere inibita da fattori presenti nell'ambiente circostante, nel SNP gli assoni lesionati mantengono la capacità di rigenerarsi anche nell'adulto e sono quindi dotati di capacità rigenerative spontanee a seguito di lesioni nervose, quindi la gravità e le conseguenze delle neuropatie indotte da lesioni dei nervi periferici sono generalmente flessibili e variano dal tipo di lesione.

I pazienti con lievi lesioni dei nervi periferici presentano una favorevole probabilità di autonoma guarigione, mentre i pazienti con gravi lesioni e difetti del nervo lungo soffrono spesso di disfunzioni nervose motorie, sensoriali e autonome e necessitano di complessi interventi chirurgici di riparazione dei nervi periferici.

Nel corso degli anni sono state introdotte molteplici distinzioni tra le varie lesioni dei nervi periferici, le cui classificazioni principali sono state date da Herbert Seddon nel 1943 e Sydney Sunderland nel 1968 [2,3,4].

Seddon classification	Sunderland classification	Pathology	Prognosis
Neurapraxia	First degree	Myelin injury or ischemia	Excellent recovery in weeks to months
Axonotmesis	Second degree	Axon loss	Good to poor, depending upon integrity of supporting structures and distance to muscle
		Variable stromal disruption	
		Axon loss	
Neurotmesis	Third degree	Endoneurial tubes intact Perineurium intact Epineurium intact	Poor Axonal misdirection Surgery may be required
	Fourth degree	Axon loss Endoneurial tubes disrupted Perineurium intact Epineurium intact	Poor Axonal misdirection Surgery usually required
	Fifth degree	Axon loss Endoneurial tubes severed Perineurium severed Epineurium severed	No spontaneous recovery Surgery required Prognosis after surgery guarded

Figura 1.7: Schema riassuntivo della classificazione e patologie delle lesioni dei nervi periferici [4].

Seddon considera tre diversi tipi di lesioni nervose (Figura 1.7), in base alla gravità della lesione tissutale, alla prognosi e al tempo di recupero [2,3]:

- Neuroaprassia: è un danno segmentale a carico della mielina dove sia l'assone che il perinevrio rimangono intatti, solitamente causato da una compressione (detta anche lesione compressiva), con una disfunzione temporanea del nervo. La conduzione degli impulsi nervosi è bloccata nell'area lesa, la connessione motoria e sensoriale è persa ma tutte le strutture morfologiche del moncone nervoso (inclusi l'endoneurio, il perinevrio e l'epinevrio) rimangono intatte. Poiché l'assone non è separato dal soma nella neuroaprassia la degenerazione walleriana non si verifica. La degenerazione walleriana o degenerazione secondaria è il fenomeno caratterizzato dalla degenerazione e dal riassorbimento del segmento distale di un nervo, nel caso in cui sia stato sezionato in tutto il suo spessore o danneggiato (per esempio in seguito ad un'infezione virale). Non essendoci degenerazione assonale, il nervo periferico danneggiato raggiunge il completo recupero della conduzione e della funzione nervosa in settimane o al massimo in mesi, e questo tipo di lesione non necessita di terapia chirurgica.

- **Assonotmesi:** è una lesione assonale in cui la continuità del tessuto connettivo e del nervo rimane intatta, con interruzione della fibra nervosa e con conservazione delle strutture connettivali di sostegno (come gli elementi fascicolari del tessuto connettivo). È comunemente visibile nelle lesioni causate da schiacciamento, stiramento o percussione. L'assone e la sua guaina mielinica sono danneggiati, tuttavia la struttura del tessuto connettivo circostante rimane parzialmente o completamente intatta. Si verifica una degenerazione Walleriana nel moncone assonale distale nel sito della lesione con possibilità di recupero di rigenerazione assonale. Il recupero funzionale può essere previsto se il moncone nervoso danneggiato mantiene un certo livello di integrità della struttura e dell'organizzazione fisiologica. La prognosi di questo tipo di lesione dipende in gran parte dalla distanza del sito della lesione dall'organo bersaglio, tuttavia nella maggior parte dei casi l'autorigenerazione è estremamente limitata ed è quindi necessario un intervento chirurgico appropriato.
- **Neurotmesi:** è una recisione completa sia dell'assone che del tessuto connettivo, un sezionamento completo del nervo (l'intero moncone nervoso compreso l'endoneurio, il perinevrio e l'epinevrio) con grave interruzione dei componenti del tessuto connettivo del tronco nervoso e compromissione sensoriale e funzionale. Questo tipo di lesione porta alla rottura dell'assone, della guaina mielinica e dei tessuti connettivi, di conseguenza rappresenta il grado più grave di lesione dei nervi periferici. Il recupero autonomo non è totale, infatti si può avere la formazione di un neuroma ma non avviene nessuna rigenerazione senza un intervento chirurgico. Esempi di neurotmesi sono le lesioni acute e le lesioni da trazione.

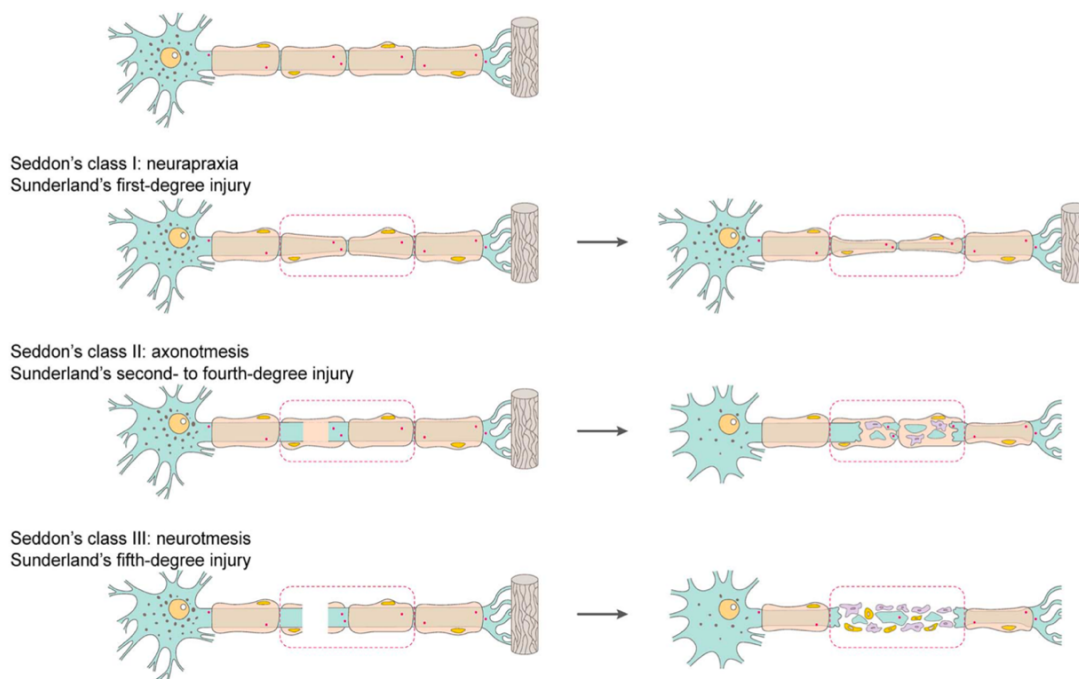


Figura 1.8: Classificazione delle lesioni nervi periferici, secondo Seddon e Sunderland [3].

Sunderland estende la classificazione di Seddon e distingue cinque gradi di danno, in base alle diverse alterazioni strutturali del tronco nervoso e quindi in base alla gravità della lesione (Figura 1.8).

La lesione di primo grado di Sunderland è equivalente alla neuroaprassia di Seddon. Le lesioni di secondo, terzo e quarto grado di Sunderland sono equivalenti all'assonotmesi di Seddon, la differenza è nel grado di danno mesenchimale al nervo. La lesione di quinto grado di Sunderland corrisponde alla definizione di neurotmesi nella classificazione di Seddon [2,3]. A livello di recupero, invece, le lesioni di Sunderland di gradi I e II guariscono completamente, le lesioni di grado III parzialmente, le lesioni di gradi IV e V richiedono un intervento chirurgico (Figura 1.9).

- Lesione di I grado: è una interruzione locale della conduzione nervosa con preservazione della continuità assonale e delle altre strutture del nervo.
- Lesione di II grado: è una interruzione dell'assone senza perdita di continuità dell'endonervio. I tubi endoneuriali, il perinervio e l'epinervio rimangono intatti, mentre l'assoplasma risulta interrotto e si ha conseguentemente la degenerazione Walleriana distale e retrograda del moncone prossimale. La causa più comune è un modesto schiacciamento del nervo. Il recupero, per lo più completo, avviene progressivamente man mano che le fibre rigeneranti raggiungono l'organo bersaglio. Non necessita di terapia chirurgica.
- Lesione di III grado: si tratta di una interruzione della fibra nervosa senza interruzione del perinervio. Oltre alla rottura dell'assone nel sito ferito, si perdono anche le continuità dell'endonervio e del perinervio. Il recupero funzionale completo è impossibile per la dispersione di fibre all'interno del connettivo e la presenza di fibrosi che impedisce meccanicamente la crescita o la maturazione di nuove fibre. In alcuni casi, un intervento chirurgico di decompressione (neurolisi) può migliorare il risultato.
- Lesione di IV grado: in questo caso, si conserva integra solo la continuità dell'epinervio, ma il tronco nervoso diviene un ammasso disordinato di tessuto fibroso, cellule di Schwann e fibre rigeneranti, detto neuroma in continuità. Il recupero spontaneo di queste lesioni non è mai sufficiente a garantire una funzionalità accettabile, rendendo necessario un intervento di escissione del tessuto cicatriziale e riparazione del nervo.
- Lesione di V grado: comporta la perdita di continuità del tronco nervoso. È caratterizzata da una distruzione dell'assone, della mielina e delle componenti circostanti del nervo. Si può osservare la formazione di un neuroma all'estremità del moncone prossimale. Queste lesioni richiedono una riparazione chirurgica del tronco nervoso, spesso con interposizione di trapianti di tessuto nervoso.

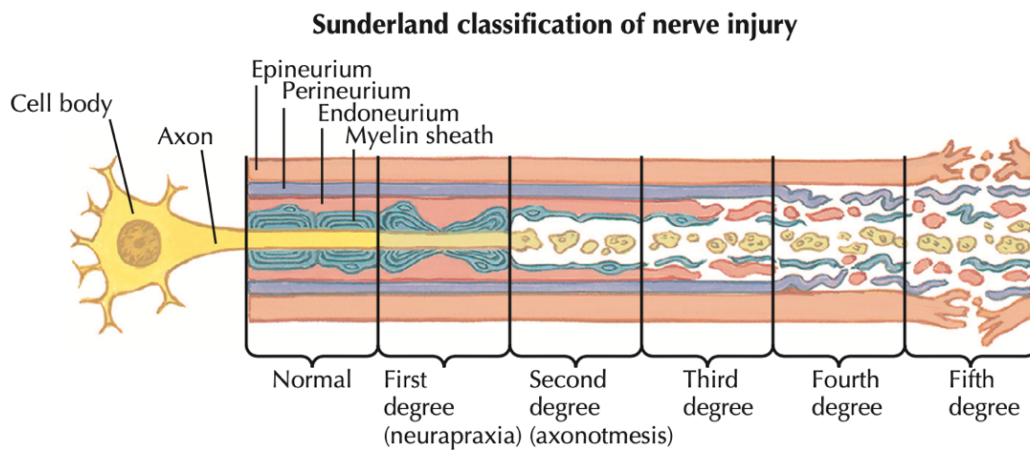


Figura 1.9: Classificazione lesioni dei nervi periferici di Sunderland [5].

Successivamente Mackinnon e Dellon, nel 1988, hanno modificato la classificazione di Sunderland aggiungendo una lesione di VI grado, che si ha nell'ipotesi di una lesione mista dove coesistono diversi tipi di lesione dello stesso tronco nervoso [4].

Le neuropatie periferiche si possono inoltre dividere in mononeuropatie, multineuropatie e polineuropatie. Per mononeuropatia si intende il danno focalizzato ad un singolo tronco nervoso (intrappolamento, ferite, agenti tossici, compressione, ecc.). Con multineuropatia si intende l'interessamento multifocale, simultaneo o in tempi successivi di più nervi periferici non contigui; dovuto a malattie infettive, infiammatorie sistemiche, metaboliche (diabete). Con polineuropatia, invece, si intende il deficit bilaterale e simmetrico di nervi periferici.

Capitolo 2. Medicina rigenerativa ed ingegneria tissutale

2.1 Principi fondamentali

L'ingegneria tissutale o ingegneria dei tessuti (*Tissue Engineering TE*) è stata definita come “una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche al fine di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione sia nei tessuti sani che malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici (tessuti od organi) in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni” [6]. L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa sono quindi un campo estremamente interdisciplinare e complesso che richiede una profonda conoscenza dell'effetto di numerosi di fattori relativi allo sviluppo e alla sostenibilità di tessuti ed organi [7].

Attualmente con il termine ‘ingegneria tissutale’ si intende l'utilizzo combinato di cellule viventi, metodi di ingegneria e di scienza dei materiali (materiali biocompatibili), fattori biochimici e fisici (fattori di crescita), per ottenere strutture simili ai tessuti biologici al fine di migliorarli o sostituirli nelle loro funzioni [7,8]. L'obiettivo finale è infatti l'impianto di questi costrutti per sostituzione, riparazione, mantenimento e/o potenziamento di porzioni di organi o di organi interi.

Il termine ‘medicina rigenerativa’ (*Regenerative Medicine RM*) è spesso utilizzato come sinonimo di ingegneria dei tessuti, sebbene l'approccio della medicina rigenerativa sia a carattere prevalentemente terapeutico e preveda interventi specifici di rigenerazione e non di sostituzione, esso implica l'uso di cellule staminali come fonte cellulare e l'impiego delle tecniche di ingegneria tissutale per raggiungere il risultato voluto.

La TE e l'RM condividono quindi il medesimo obiettivo finale, che si identifica con la realizzazione di tessuti funzionali e/o di interi organi da utilizzare come sostituti di tessuti e organi affetti da specifiche patologie.

L'approccio comune è dato dalla formazione di un ambiente in grado di mimare in modo accurato, dal punto di vista chimico e strutturale, l'ambiente di un organo originario. Quello che si richiede è la riproduzione delle caratteristiche strutturali ed ambientali degli organi da sviluppare *in vitro* al fine di supportare le cellule durante il processo di rigenerazione.

Le problematiche maggiori sono di carattere strutturale (ad es. ossa, cartilagini), legate alla barriera e al trasporto (ad es. pelle, vasi sanguigni) o biochimiche e secretorie (ad es. fegato e pancreas).

L'ingegneria dei tessuti si applica anche allo sviluppo di sistemi specializzati di supporto vitale extracorporeo contenenti cellule (ad es. fegato e reni bioartificiali), nonché di unità di tessuto che possono essere utilizzate per lo screening diagnostico.

Oltre alle applicazioni cliniche, altri utilizzi comprendono la possibilità di effettuare test su farmaci per verificarne l'efficacia e la tossicità, nonché studi di base sullo sviluppo dei tessuti e sulla morfogenesi.

Facendo riferimento alla letteratura scientifica si possono classificare gli impianti come [6]:

- “autograft o autologo”: innesto di qualsiasi tessuto, organo o cellule ottenuti dallo stesso individuo, il paziente è sia donatore che ricevente;
- “homograft”: innesto di qualsiasi tessuto, organo o cellule ottenuti da individui della stessa specie;
- “allografts o allotrapianto”: innesto di qualsiasi tessuto, organo o cellule ottenuti da individui della medesima specie ma non geneticamente identici al ricevente;
- “eterografts / xenografts o xenotrapianto”: innesto di qualsiasi tessuto, organo o cellule da una specie differente rispetto a quella del recipiente quindi trasferimenti fra individui di specie differenti come uomo-maiale, capra-uomo;
- “chimeric o chimerismo”: si riferisce a persone, organi o tessuti che contengono cellule che hanno geni diversi da quelli di tutto il resto della persona, organo o tessuto. I chimerismi riflettono la capacità di due tipi di cellule geneticamente distinte di poter coesistere in un singolo organismo.

Le ricerche ed i progressi scientifici riguardanti biomateriali, cellule staminali, fattori di crescita, di differenziamento e degli ambienti biomimetici hanno creato opportunità uniche per la fabbricazione di tessuti ed organi in laboratorio combinando scaffold, cellule e molecole biologicamente attive.

La capacità di ricostituire la funzione tissutale con prodotti terapeutici su scala clinicamente significativa ha un ampio spettro di applicazioni.

Le tecniche del tissue engineering si dividono in due grandi categorie:

- la costruzione *in vitro* di tessuti (organi) ingegnerizzati partendo da cellule isolate dal paziente, come ad esempio tessuti ed organi che sono composti da sostanze in parte sintetiche ed in parte naturali, in alternativa al trapianto di organo.
- la capacità di far crescere cellule *in vivo*, con l'idea di utilizzare il corpo umano come bioreattore.

Alcune problematiche di notevole interesse a cui queste tecniche stanno cercando di dare soluzione si riscontrano sia nelle necessità di disporre di un quantitativo di cellule proliferate tale da consentire il ripopolamento di un organo o di una porzione di tessuto danneggiato, sia nella decellularizzazione e successiva perfusione con cellule autologhe direzionate a collocarsi nelle porzioni richieste.

Il ciclo tipico dell'ingegneria tissutale risulta essere costituito dalle seguenti fasi (Figura 2.1):

- biopsia: attraverso questa tecnica, si preleva una piccola porzione di tessuto del paziente;
- isolamento delle cellule: nel tessuto prelevato vengono separate le cellule dalla matrice extracellulare (ECM), che viene eliminata, mentre si conservano le cellule;
- coltura cellulare: le cellule del paziente vengono coltivate *in vitro*;

- espansione cellulare: le cellule coltivate vengono fatte proliferare;
- deposizione su substrato (scaffold): le cellule vengono applicate sulla superficie di un substrato a base di ECM o di altri biomateriali;
- sviluppo del tessuto ingegnerizzato: la matrice viene arricchita di fattori di crescita e viene sollecitata con stimoli meccanici, al fine di arrivare ad un costrutto ingegnerizzato funzionale ottenuto combinando le cellule autologhe del paziente con uno scaffold;
- produzione di un costrutto ingegnerizzato che viene impiantato nel paziente in sostituzione del tessuto o dell'organo danneggiato.

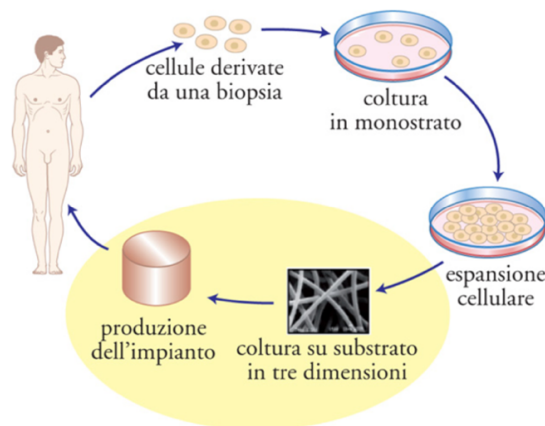


Figura 2.1: Ciclo tipico di un processo di ingegneria dei tessuti. Il costrutto ingegnerizzato (tessuto o organo) viene ottenuto prelevando le cellule dal paziente mediante biopsia, espandendole in vitro, seminandole sulla matrice tridimensionale in condizioni prima statiche e poi dinamiche all'interno del bioreattore. Il costrutto viene poi innestato chirurgicamente [6].

Gli elementi fondamentali dell'ingegneria tissutale risultano quindi tre: cellule, biomateriali e biomolecole (Figura 2.2). L'ingegneria tissutale utilizza cellule viventi, quindi reperire inizialmente un numero adeguato di cellule risulta essere il problema base di tutta la procedura, ma anche lo sviluppo di scaffold adeguati dal punto di vista biochimico e meccanico costituisce un aspetto fondamentale.

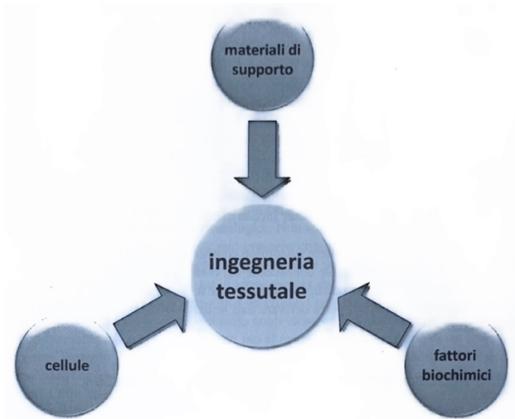


Figura 2.2: Componenti che richiede l'approccio dell'ingegneria tissutale [6].

2.2 Cellule

Le cellule di cui è possibile l'impiego sono le seguenti: autologhe, allogene, xenogene, staminali, nonché quelle geneticamente modificate che vengono manipolate dal punto di vista immunitario (sono cellule che devono venire tollerate dal ricevente). Solitamente nel campo dell'ingegneria tissutale si utilizzano cellule derivate da tessuto donatore o cellule staminali o progenitrici, quindi si parla sia di cellule staminali (embrionali o adulte) sia di cellule già differenziate e quindi somatiche.

Le cellule staminali sono cellule che vengono individuate in tutti gli organismi pluricellulari; embrionali (nelle blastocisti) ed adulte (in tutti i tessuti umani).

Queste cellule godono di due principali proprietà che le rendono importanti nella formazione di grandi quantità di cellule derivate:

- capacità proliferativa e di capacità di auto replicarsi nelle loro caratteristiche di staminalità, cioè di mantenersi in uno stato indifferenziato;
- pluripotenza o capacità di differenziarsi in cellule di più linee e quindi in tipi cellulari ben specifici, che non si modificano e non sono in grado di evolvere in altro senso.

2.2.1 Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali non si utilizzano nella TE per ragioni di tipo etico e normativo, tanto che in Italia ne è vietato il prelievo. Esse derivano dalle cellule ICM (*Inner Cell Mass*, ossia massa cellulare interna o embrioblasto) tipiche dei blastocisti che si sviluppano durante la gravidanza. Dalle staminali embrionali derivano tre foglietti germinali: ectoderma, endoderma e mesoderma. In assenza di condizioni di cultura ottimali o di interventi di manipolazione delle condizioni genetiche, le embrionali staminali si differenziano velocemente in un senso incontrollato con perdita della capacità di auto replicarsi. I principali vantaggi delle cellule embrionali sono costituiti dalla loro pluripotenza e alta proliferazione, tuttavia non sono cellule autologhe, sono soggette a problemi di tipo etico e normativo, e possono portare allo sviluppo di tumori [3,6,7].

2.2.2 Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte (somatiche o germinali) e le progenitrici possono invece fornire cellule specializzate e mantenere il naturale turnover rigenerativo di organi come sangue, cute o intestino. Le caratteristiche più favorevoli delle cellule adulte sono l'abbondante disponibilità, la plasticità sia *in vivo* che *in vitro* (sono capaci di differenziarsi nei tipi cellulari desiderati di volta in volta), e il basso potenziale immunogenico. Il principale svantaggio, invece, è costituito da possibili proliferazione incontrollata e differenziamento incontrollato: se non vengono garantite condizioni

ottimali *in vitro* e nella coltura, si corre il rischio di una proliferazione incontrollata e quindi di un differenziamento indesiderato [3,6].

2.2.3 Cellule già differenziate

Le cellule già differenziate o somatiche, invece, sono cellule che hanno raggiunto un differenziamento completo, cioè cellule specializzate indirizzate a svolgere determinate funzioni. Conservano la capacità di generare soltanto cellule del medesimo tipo, per questo sono definite specializzate. Nel caso di utilizzo *in vivo*, è necessario controllare la risposta immunitaria. I principali vantaggi delle cellule differenziate sono costituiti dalla capacità di controllare la proliferazione ed il differenziamento *in vitro*, dalla non immunogenicità e dall'assenza di implicazioni di ordine etico-normativo. Gli svantaggi, invece, sono relativi alla limitata capacità di replicazione, la specializzazione di ogni cellula in un unico tipo cellulare e la difficoltà nel prelievo [3,6].

2.3 Scaffold

Gli scaffold hanno il ruolo di supportare l'organizzazione, la crescita e il differenziamento delle cellule, fornendo degli stimoli di tipo chimico e fisico.

In fase di coltura, le cellule non sono capaci di assemblarsi spontaneamente in una struttura tridimensionale, ma possono solo generare monostrati: è quindi necessario che sia presente un substrato che consenta loro di organizzarsi in una struttura tridimensionale.

Gli scaffold, quindi, servono ad uno o più dei seguenti scopi: attaccamento e migrazione cellulare, ritenzione e presentazione di fattori biochimici, adeguata diffusione di nutrienti e rifiuti, adeguata rigidità meccanica in base alla specifica regione anatomica di utilizzo [7].

Le caratteristiche generali che uno scaffold deve possedere sono le seguenti:

- porosità interconnessa controllata;
- biodegradabilità e biorisorbibilità controllata: ci si aspetta che lo scaffold non rimanga inalterato nel tempo, ma che sia un supporto temporaneo. Lo scaffold deve essere presente per il tempo necessario alla rigenerazione del tessuto ed essere successivamente riassorbito;
- superficie con caratteristiche adeguate a favorire l'adesione cellulare;
- proprietà meccaniche adeguate;
- biocompatibilità;
- possibilità di fabbricazione in diverse forme e dimensioni;
- capacità di garantire adeguata diffusione di nutrienti e fornire segnali adeguati alle cellule.

Gli scaffold risultano essere tipicamente di tre tipi:

1. sintetici: hanno il vantaggio di poter essere prodotti con proprietà specifiche, essere stabili e riproducibili dal punto di vista chimico e privi di ogni agente patogeno;
2. naturali: sono composti da proteine, zuccheri o altri componenti di tipo naturale derivati da animali o piante. Sono biocompatibili e liberi da agenti patogeni, possono essere modellabili nelle loro caratteristiche, ad esempio modificandone la concentrazione o mediante funzionalizzazione;
3. decellularizzati: sono tessuti trattati con sostanze chimiche che permettono la rimozione della porzione cellulare dal tessuto, lasciando integra la componente extra-cellulare. Sono biocompatibili, preservano la struttura tridimensionale del tessuto, con tutti i componenti della ECM.

In origine, molti dei biomateriali sintetici utilizzati erano materiali a base di collagene e della famiglia dei polimeri polilattici, poliglicolici e policaprolattone che venivano impiegati perché già conosciuti come base delle suture biorassorbibili. Per contro questi materiali si sono dimostrati tutt'altro che ottimali in molte applicazioni dell'ingegneria dei tessuti, in particolare perché il loro processo di biodegradazione idrolitica rilascia acido che può essere tossico per le cellule. Per evitare questi problemi, sono stati studiati altri materiali sintetici, con ulteriori proprietà quali iniettabilità, trasparenza, porosità e cinetica di riassorbimento ottimali [7].

Attualmente, gli scaffold naturali a base di ECM sono ampiamente utilizzati; in particolare, le componenti della ECM che vengono impiegate sono collagene, proteoglicani, elastina, GAGs, ed enzimi. Rientrano in questa categoria anche i materiali a base di proteine come collagene e fibrina, i materiali a base di polisaccaridi come alginato, glicosaminoglicani ed acido ialuronico. Per rallentare la cinetica di degradazione in vivo, possono essere utilizzati agenti reticolanti come glutaraldeide e carbodiimmide.

2.4 Biomolecole - fattori di crescita o fattori biochimici

La funzionalità dei tessuti complessi dipende dalle corrette interazioni cellula-cellula omotipica ed eterotipica che richiedono il controllo spaziale dei vari componenti (cioè cellule parenchimali, vasi sanguigni e cellule non parenchimali) su scala micrometrica.

I fattori chimici e fisici sono rappresentati da fattori di angiogenesi (fattori che promuovono nuove fasi), fattori di crescita, fattori di differenziamento e dalle proteine che stimolano l'attività delle cellule. Ad esempio, le proteine di segnalazione sono proteine che in natura vengono prodotte dall'organismo e che in genere sono conservate all'interno della matrice allo scopo di fornire alle cellule informazioni specifiche.

Queste proteine possono essere rilasciate sulla superficie dello scaffold e possono quindi interagire con i recettori cellulari quando le cellule cominciano ad entrare a contatto con lo scaffold. A questo punto, lo scaffold diviene biomimetico, essendo arricchito con proteine segnale in grado di informare le cellule sulle funzioni da svolgere.

2.5 Biocompatibilità

I biomateriali si possono classificare in base agli effetti prodotti dall'ambiente biologico sugli stessi materiali (biostabili, biodegradabili), in base agli effetti prodotti sull'organismo (bioinerti, biotossici, bioattivi, biorisorbibili) ed in base alla natura chimica (polimerici, metallici, ceramici, compositi e di derivazione biologica).

Con il termine biocompatibilità si descrivono le interazioni tra il sistema vivente e il materiale, in particolare questo termine descrive la compatibilità fra un materiale e l'ambiente biologico circostante. Fra le differenti definizioni di biocompatibilità esistenti, la più completa riteniamo sia la seguente: "capacità di un materiale di funzionare in modo adeguato producendo un'appropriata risposta (non avversa ma favorevole) da parte dell'ospite in una specifica applicazione" [6].

Un materiale bioinerte è invece un materiale che ha un'interfaccia stabile con l'ambiente biologico, cioè i costituenti del tessuto e quelli del materiale non reagiscono chimicamente tra di loro; questi materiali sono in grado di convivere con l'ambiente biologico senza causare particolari reazioni avverse.

Quando l'interfaccia non è in condizioni di equilibrio diventa instabile e si manifestano reazioni diverse di irritazione, infiammazione, danno generico, immunogenità, patogenità, tossicità, mutagenicità e carcinogenicità: quando una di queste reazioni si manifesta, si parla di bioincompatibilità.

I materiali biotossici provocano una reazione indesiderata da parte del tessuto biologico, soprattutto a seguito di processi di tipo chimico e/o galvanico.

I materiali biotolleranti sono biomateriali che non vengono eliminati dall'organismo ed in genere danno luogo ad una capsula fibrosa.

Diversamente, i materiali bioattivi provocano una reazione da parte dell'ospite, ovvero il loro impianto induce nell'organismo una specifica attività biologica. Tali materiali permettono la formazione di interazioni dirette con il tessuto biologico al quale è consentita la crescita sulla superficie del materiale.

I materiali biorisorbibili, all'interno di un sistema biologico, subiscono una progressiva degradazione senza che questa provochi reazioni indesiderate o effetti tossici.

L'inserimento chirurgico o l'applicazione di un materiale o dispositivo altera la continuità di un tessuto o di un organo provocando in ogni caso una reazione da parte del sistema immunitario del paziente. Quando si inserisce un materiale estraneo nell'organismo, si produce una cascata di eventi basati sull'interfaccia tra il materiale, il dispositivo e l'ambiente biologico che riconosce il materiale come un corpo estraneo provocando la cosiddetta reazione da corpo estraneo, in particolare si produce una rottura, un danno volontario a carico dei tessuti, cui inevitabilmente segue una reazione di coagulazione ed infiammazione.

Le fasi di guarigione a seguito di una lesione o di una ferita chirurgica sono:

- emostasi o coagulazione: recupero della continuità vascolare per impedire la fuoriuscita di sangue dalla ferita; in questa fase si forma il coagulo di sangue, è la fase con la durata minore;
- infiammazione: il letto della ferita diviene un ambiente molto dinamico dove intervengono macrofagi e fibroblasti. I macrofagi compiono la funzione di fagocitosi e degradano eventuali scorie allo scopo di liberare il letto della ferita e preservarlo da possibili patogeni (invasori). I fibroblasti hanno il compito di produrre la matrice cutanea che si è perduta a causa della ferita e recuperare l'integrità della cute;
- proliferazione: il numero di cellule aumenta mentre lentamente il coagulo si dissolve, i fibroblasti continuano a proliferare per poter recuperare l'integrità tissutale;
- rimodellamento: l'organismo si attiva rapidamente per recuperare l'integrità del tessuto. Durante questa fase, la ECM viene in parte riassorbita ed in parte riformata: è la fase con la durata più lunga.

Il livello della risposta fisiologica dipende inoltre da diversi altri fattori, quali la localizzazione dell'impianto, la sua composizione e le proprietà meccaniche del materiale.

Per valutare e ridurre il rischio di eventi inattesi ed indesiderati, occorre conoscere la biocompatibilità sia dei componenti del materiale, che del dispositivo stesso nel suo complesso.

La valutazione della biocompatibilità di un materiale deve tener conto anche delle funzioni che il materiale stesso dovrà svolgere in vivo.

La biocompatibilità, in linea di principio, include due concetti principali che devono essere entrambi verificati:

- assenza di effetti citotossici: non deve nuocere alle cellule dell'organismo;
- adeguata funzionalità: sia del materiale che del dispositivo; il dispositivo deve avere caratteristiche meccaniche, fisiche e chimiche adeguate a svolgere una determinata funzione.

2.6 Applicazioni dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa ai nervi

2.6.1 Sviluppo storico del trattamento delle lesioni nervose

La maggior parte delle lesioni nervose non è stata trattata sino alla metà del XIX secolo a causa degli scarsi risultati delle procedure chirurgiche disponibili, mentre il processo di crescita degli assoni dal corpo cellulare nella rigenerazione dei nervi è stato investigato attraverso diversi studi nello stesso periodo.

La sutura *end-to-end* o sutura termino-terminale (metodologia di sutura in cui la parte terminale dei due monconi viene unita direttamente) dei monconi nervosi e dei trapianti o innesti nervosi spesso porta a danni sotto forma di reazioni da corpo estraneo e cicatrizzazione della linea di sutura, in quanto gli assoni vengono disorganizzati, bloccati o impigliati nei neuromi [9]. La ricerca di un metodo di anastomosi nervosa senza sutura, la tubulazione nervosa, è nota in Europa fin dagli ultimi decenni del XIX secolo; infatti i tubuli nervosi (neuroguide) sono stati impiegati a partire dai primi anni del 1880 [9].

Le tecniche di tubulazione nervosa hanno portato alla possibilità di ridurre l'invasività e la cicatrizzazione del nervo e di guidare la crescita delle fibre in lungo percorsi appropriati mediante orientamento e confinamento meccanico, evitando la formazione di neuromi o altri disturbi funzionali causati da una crescita assonale mal indirizzata.

Storicamente si attribuisce a Themistocles Gluck (1853-1942) [9] il primo esperimento animale di tubulazione nervosa (o su condotti nervosi) nel 1880. Il condotto inizialmente utilizzato era derivato da tubi ossei decalcificati, ricavati da ossa di cavallo e di bovino con un diametro variabile da 0.5 a 6 mm, usati per il drenaggio delle ferite e sviluppati da Gustav Adolf Neuber (1850-1932) nel 1879. Tuttavia, l'uso di tale condotto ebbe un limitato successo a causa della formazione di cicatrici molto estese e di successivo tessuto necrotico. Constant Vanlair (1839-1914) [9] ha invece documentato la prima applicazione con successo della tubulazione nervosa utilizzando un tubo osseo per colmare un difetto del nervo sciatico di 3 cm in un cane, nel 1882.

La teoria della tubulazione nervosa di un secolo fa sembra essere simile a quella odierna, come riportato da Foramitti nel 1904: "Fornire una struttura guida per i nervi divisi, su cui la sostanza nervosa appena emergente può crescere nel modo più breve dal moncone centrale a quello periferico senza molta resistenza, per proteggere la giunzione contro l'inclusione nel callo e dei tessuti cicatriziali e per mantenere il gap nervoso aperto per la rigenerazione dal moncone centrale a quello periferico" [9].

Negli ultimi anni, materiali artificiali sono stati utilizzati sempre più frequentemente per interventi sul corpo umano, ma questi materiali non riassorbibili rimangono in situ come corpi estranei, per

ovviare a questo inconveniente si è notevolmente diffuso nella chirurgia dei nervi l'uso di biomateriali riassorbibili.

La tubulazione nervosa è oggi un metodo consolidato per colmare le lacune nervose periferiche. La capacità di adattamento dei biomateriali e della parete della guida nervosa, affiancata dalla possibilità di apportare modifiche (ad es. incorporazione di fattori stimolanti per la rigenerazione nervosa) all'interno e all'intorno della guida stessa (minore reazione tissutale) sono aspetti che migliorano continuamente le prestazioni della tubulazione nervosa.

2.6.2 L'approccio dell'ingegneria dei tessuti

L'approccio della TE per la rigenerazione dei nervi si focalizza sull'utilizzo di cellule staminali neurali e di materiali di forma tubolare per la guida e la rigenerazione assonale, elementi talvolta utilizzati in combinazione con strategie antinfiammatorie. I risultati da raggiungere, nella specifica applicazione, sono la riconnessione degli assoni in modo corretto, il controllo dell'ambiente pro-infiammatorio e la prevenzione della formazione di tessuto cicatriziale [7].

L'ambito della rigenerazione del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico si divide sostanzialmente in quattro aree: guida assonale, sostituzione delle cellule danneggiate, trasporto di farmaci e stimolazione elettrica [7,10,11].

Focalizzeremo la nostra attenzione principalmente sulla ricostruzione del nervo mediante neuroguide, ovvero sulla rigenerazione dell'assone mediante l'utilizzo di scaffold.

Con il termine guida assonale si intende una metodologia che prevede la creazione di vie fisiche o chimiche che favoriscano la rigenerazione degli assoni in una determinata direzione. Questa tecnica viene utilizzata per favorire la ricrescita dei nervi del SNP, la riparazione di midollo spinale e di tratti nervosi del cervello.

Il campo nel quale sinora si è ottenuto il maggiore successo è quello della riparazione del sistema nervoso periferico, ovvero la riparazione di tratti di nervi danneggiati. Si è giunti a questo risultato grazie alla formazione di ponti/canali/guide che vanno a connettere le due estremità dei nervi lesionati. Tali guide possono essere costituite da materiali sintetici o biologici e fungono da collegamento tra i due tratti recisi del nervo e da barriera per la cicatrice gliale, favorendo la rigenerazione e l'estensione degli assoni. Inoltre, le guide possono essere caricate con cellule, rivestite con proteine della ECM o con fattori di crescita.

Nel caso del sistema nervoso centrale, gli assoni hanno la capacità innata di ricrescere, ma non riescono a rigenerare funzionalmente il nervo a causa dell'ambiente inibitorio e non permissivo riguardo alla rigenerazione della lesione.

È quindi necessario l'utilizzo di particolari categorie di scaffold basati su biomateriali e strutture specifici, che possono essere: nanofibre (o spugne), hydrogel oppure bioscaffold costituiti da ECM, collagene ed acido ialuronico.

Con il termine *hydrogel* (o idrogel) si intende costrutti costituiti da un polimero idrofilo reticolato formato da catene polimeriche di molecole disperse in acqua.

Gli scaffold a base di hydrogel, in particolare, godono di diverse proprietà importanti per la rigenerazione:

- biocompatibilità: non risultano tossici per le cellule e favoriscono la crescita cellulare;
- biodegradabilità: fungono da supporto, ma lasciano spazio al tessuto stesso e/o alle cellule trapiantate che dovranno riempire la zona occupata da questo hydrogel;
- devono possedere proprietà meccaniche compatibili con il tessuto interessato;
- possono essere funzionalizzati come molecole bioattive;
- godono di caratteristiche biomimetiche, cioè sono strutturalmente simili al tessuto.

Gli hydrogel costituiscono un gruppo di materiali polimerici la cui struttura idrofila li rende capaci di trattenere grandi quantità di acqua. In diverse applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, gli hydrogel naturali sono stati gradualmente sostituiti da hydrogel sintetici, che presentano una maggiore capacità di assorbimento dell'acqua ed una cinetica di riassorbimento maggiormente controllabile. I gruppi idrofili non solo facilitano un ampio assorbimento d'acqua ma aiutano anche nell'interazione con i tessuti biologici [12].

I polimeri naturali che formano hydrogel includono proteine, come collagene e gelatina, e polisaccaridi, come amido, alginato e agarosio. Gli hydrogel sintetici sono tradizionalmente preparati utilizzando i metodi di polimerizzazione chimica. La produzione di hydrogel polimerici viene realizzata sia mediante polimerizzazione di monomeri idrofili sia mediante modifica o funzionalizzazione di polimeri esistenti (naturali o artificiali).

Le caratteristiche funzionali di un hydrogel ideale sono le seguenti:

- biocompatibilità, biodegradabilità, viscoelasticità e biomimeticità;
- capacità di rilascio controllato di fattori di crescita;
- porosità e densità di reticolazione che favoriscano la proliferazione cellulare;
- proprietà meccaniche comparabili a quelle dei tessuti molli;
- alta capacità di assorbimento in soluzione salina;
- velocità di assorbimento desiderata in supporto alle esigenze applicative;
- alta capacità di assorbimento anche sotto carico;
- durabilità e stabilità in ambiente acquoso;
- biodegradabilità senza formazione di sostanze tossiche;

- pH neutro dopo il rigonfiamento in acqua;
- capacità di riuniformazione (l'hydrogel deve essere in grado di restituire la soluzione imbevuta o di mantenerla).

Gli hydrogel si possono classificare in base alla fonte, alla composizione polimerica, alla configurazione, all'aspetto fisico, alla carica elettrica o al tipo di reticolazione (cross-linking). Gli hydrogel basati sul tipo di forze di reticolazione tra catene polimeriche possono essere classificati in chimici, fisici o in una combinazione di entrambi mediante reticolazione simultanea (ibrido) [12].

2.7 Sviluppi futuri dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa

L'uso di derivati della ECM è sempre più frequente nella RM e nella TE che prevedono l'impiego sia di tessuti che di interi organi, partendo da una varietà di fonti tessutali allorigeniche e xenogeniche, tra cui cute, vescica, intestino, mesotermo, pericardio e valvole cardiache.

Altre soluzioni interessanti si sono ottenute con l'avvento di tecnologie come la litografia (*soft-lithography*), la stampa 3D, la micro-fabbricazione e i sistemi micro-elettromeccanici (MEMS).

La biostampa 3D (*bioprinting*) è un sistema di stampa tridimensionale di materiali biologici. Viene utilizzato un bioinchiostro (*bio-ink*), cioè un biomateriale in sospensione a bassa viscosità, miscelato a cellule vitali, che può essere depositato su un substrato di hydrogel, un piatto di coltura o un costrutto polimerico. I vantaggi del bioprinting sono rappresentati dalla precisione di deposizione, l'accuratezza elevata, la semplicità di fabbricazione, la distribuzione controllata delle cellule e il costo relativamente contenuto.

Tale tecnica risulta vantaggiosa rispetto all'autotrapianto o all'innesto in quanto non causa stress al paziente e sopperisce alla grave carenza di donatori di allotrapianti. Il bioprinting 3D rappresenta un'opportunità unica in quanto annulla il rischio di rigetto presente nel trapianto immunologico e potrebbe potenzialmente portare ad un trattamento personalizzato per il paziente che si tradurrebbe in migliori risultati sia clinici che estetici.

Tuttavia, nonostante tutti i progressi fatti nel campo, ci sono ancora molte problematiche per quanto riguarda la biocompatibilità, l'integrazione del costrutto stampato con il corpo ed il mantenimento della vitalità cellulare nella formulazione del bio-inchiostro.

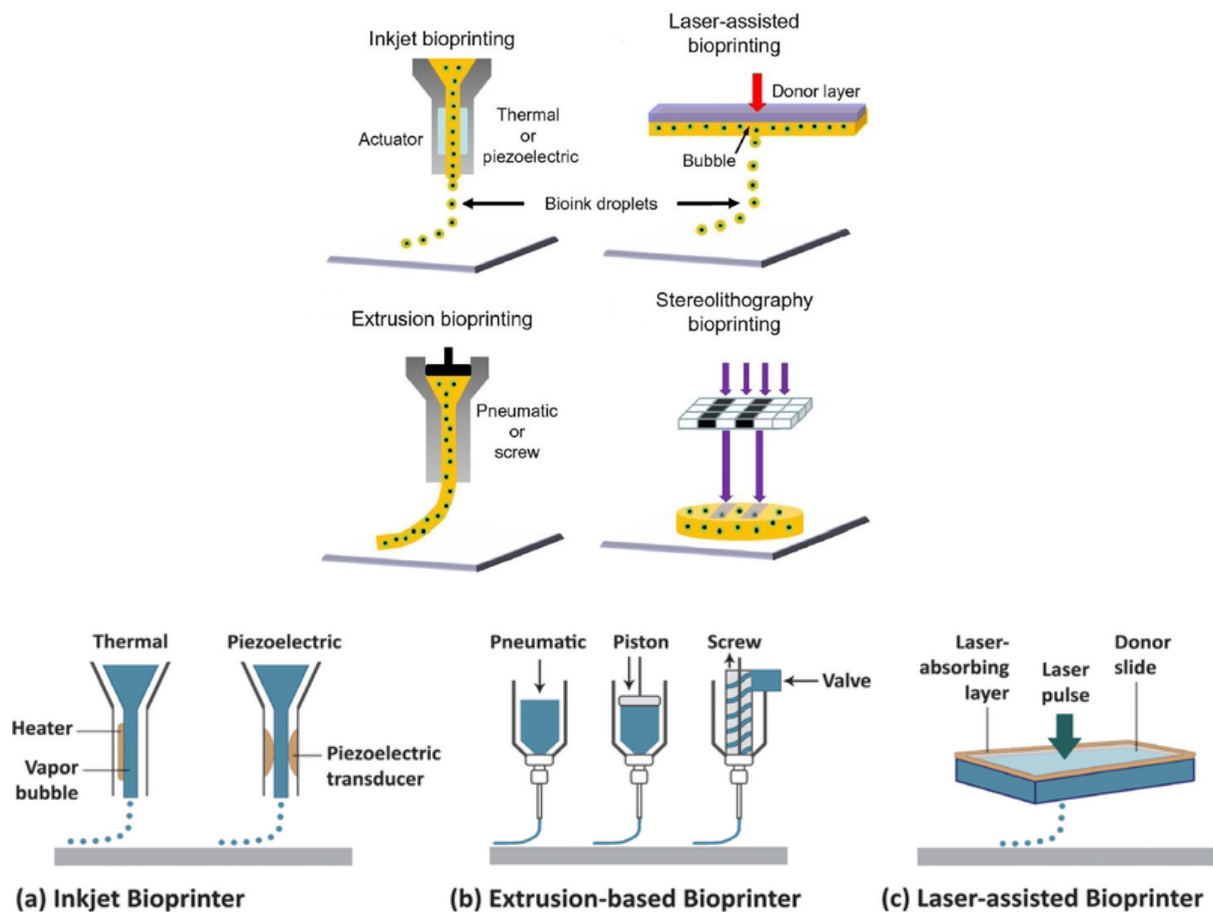


Figura 2.3: differenti tipologie di stampante 3D [13].

Le stampanti impiegate possono essere di vario tipo: ad estrusione, a getto di inchiostro, a sterolitografia, con tecnologia laser o con litografia multifotonica (Figura 2.3).

I metodi recenti di stampa 3D prevedono l'utilizzo di un meccanismo a getto ad inchiostro (*inkjet*) per stampare precisi strati di cellule su una matrice di gel termoreversibile.

La procedura di stampa 3D basata sulla stratificazione dei biomateriali si articola secondo tre fasi principali:

1. fase preparatoria: progettazione di modelli 3D anatomicamente accurati tramite software di computer grafica come CAD/CAM e rendering in una pila di strati 2D di spessore limitato che verranno inseriti nella biostampante; tale fase include anche la selezione del materiale e del bioinchiostro;
2. fase di stampa: produzione del costrutto mediante stampante, prevede la stampa vera e propria dei tessuti mediante tecniche di produzione additiva;
3. fase di post-manipolazione: il prodotto viene tenuto/coltivato in laboratorio per il tempo necessario alla sua maturazione ed alla sua caratterizzazione strutturale e funzionale;
4. applicazione in vitro o trapianto su paziente.

Altre tecniche che meritano particolare attenzione sono quelle della microfabbricazione e dei sistemi microelettromeccanici (MEMS), che possono fornire caratteristiche delle parti prodotte che si avvicinano alla scala dimensionale e alla complessità dell'ambiente in vivo.

Le tecniche MEMS e nanolitografiche possono venire utilizzate per controllare le caratteristiche su scale di lunghezza comprese tra 0.1 μm e 1 cm.

Sono state messe a punto tecniche compatibili con le cellule che vengono integrate con biomateriali per facilitare la fabbricazione di compositi di materiale cellulare da impiegare nell'ingegneria dei tessuti, inoltre le tecnologie su microscala forniscono una capacità senza precedenti nel controllo sul microambiente cellulare in coltura.

Con il termine *soft-lithography* si intende una famiglia di tecniche per fabbricare o replicare strutture utilizzando stampi e fotomaschere conformabili di materiale elastomerico. Nello specifico, questa tecnologia è composta da un insieme di tecniche di microfabbricazione che utilizza timbri elastomerici in wafer di silicio modellati per stampare o modellare materiali con risoluzioni fino ad alcune centinaia di nanometri [7].

Si usa il termine 'morbida' perché utilizza materiali elastomerici e, in particolare, polidimetilsilossano (PDMS). La *soft-lithography* può essere utilizzata per controllare la topografia e la distribuzione spaziale delle molecole su una superficie, nonché la successiva deposizione di cellule. Questi metodi vengono utilizzati per fabbricare canali microfluidici e scaffold per l'ingegneria tissutale in modo conveniente, rapido ed economico.

L'utilizzo di queste tecniche in microscala nello sviluppo degli scaffold ha portato ad un ulteriore risultato, in quanto sono state impiegate anche per posizionare le cellule su superfici e matrici con un alto grado di controllo.

Sono stati fabbricati scaffold in hydrogel multicomponente, modellati spazialmente e fotoreticolabili per localizzare i fattori di crescita al loro interno.

Tali tipologie di microfabbricazione forniscono un'alternativa interessante a causa della notevole disponibilità sul mercato e dell'accettabilità dei costi. Recentemente la capacità di modellare fluidi all'interno di microcanali si è fusa con la chimica della fotopolimerizzazione dando origine ad hydrogel spazialmente orientati, si sono quindi ottenuti gradienti di monomeri fotoreticolabili all'interno di canali microfluidici e successivamente gelificati mediante esposizione ai raggi UV.

Gli hydrogel sono stati sintetizzati con gradienti di segnalazione o molecole adesive o con densità di reticolazione variabile attraverso il materiale per dirigere il comportamento cellulare sia come migrazione che come adesione e differenziazione.

Riguardo al campo della realizzazione degli scaffold sono state adoperati diversi metodi di fabbricazione, i più comuni comprendono: la colata di solvente, la schiumatura di gas, la separazione

di fase, la liofilizzazione, l'elettrofilatura e la produzione additiva (AM) o stampa 3D (Figura 2.4) [10].

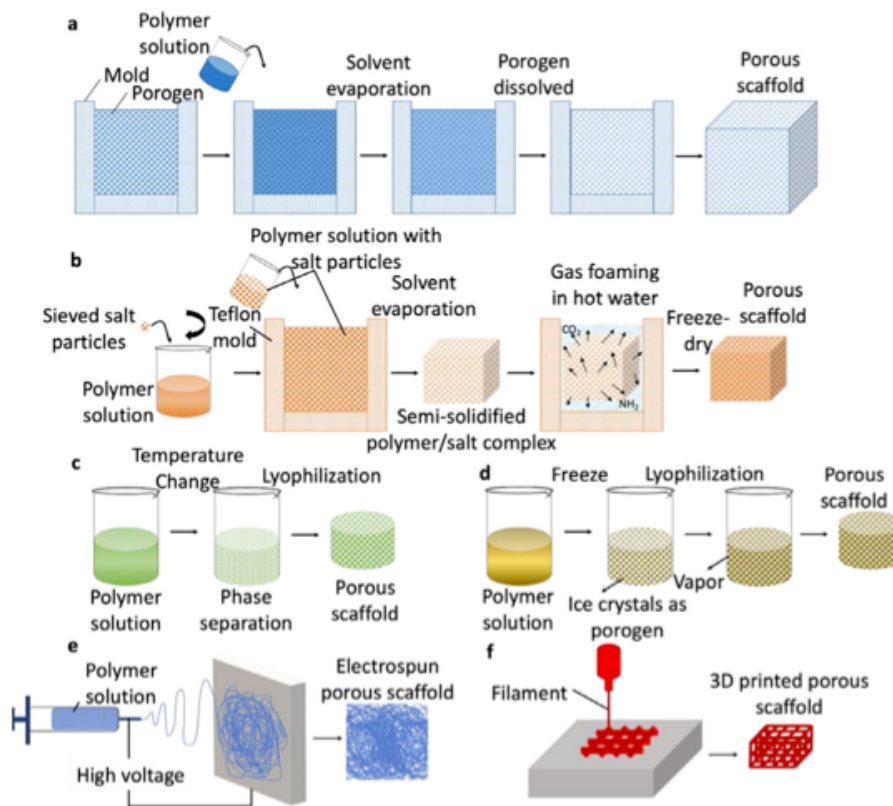


Figura 2.4: tecniche comuni utilizzate per la fabbricazione di scaffold porosi 3D: (a) colata di solvente, (b) schiumatura di gas, (c) separazione di fase, (d) liofilizzazione, (e) elettrofilatura ed (f) produzione additiva AM o stampa 3D [10].

Troviamo inoltre riassunti in Tabella 2.1 i diversi vantaggi e svantaggi dei metodi di fabbricazione dello scaffold [10].

I requisiti dei materiali in questo campo sono gli stessi sia per i tessuti che per gli organi complessi e includono [7]:

- scalabilità a una dimensione clinicamente rilevante, che può richiedere la fornitura di un sistema di trasporto/vascolare più ampio;
- rigoroso controllo dei materiali di partenza (fonte cellulare, materiale scaffold) e preciso protocollo di produzione per garantirne l'affidabilità;
- capacità di tollerare e facilitare il processo di integrazione con l'ospite (che può comportare, ad esempio, la modulazione della risposta immunitaria locale) ed uso di un regime di preconditionamento per alleviare lo shock metabolico del passaggio dal terreno di coltura al plasma.

Tabella 2.1: pro e contro dei metodi di fabbricazione degli scaffold [10].

<i>Processo</i>	<i>Pro</i>	<i>Contro</i>
<i>Colata del solvente</i>	<ul style="list-style-type: none"> + porosità e dimensione dei pori possono essere controllati utilizzando stampi appropriati + procedura relativamente più semplice 	<ul style="list-style-type: none"> - uso di solventi altamente tossici - scarsa interconnessione dei pori - pori di forma irregolare - particelle porose residue
<i>Schiumatura di gas</i>	<ul style="list-style-type: none"> + processo senza solventi organici + la porosità può essere controllata regolando la quantità di gas 	<ul style="list-style-type: none"> - scarsa interconnessione dei pori - superficie esterna non porosa
<i>Separazione di fase</i>	<ul style="list-style-type: none"> + la porosità può essere controllata regolando la temperatura di separazione di fase + buona interconnessione dei pori 	<ul style="list-style-type: none"> - nessun controllo sulla morfologia dello scaffold - scelta del materiale limitata
<i>Liofilizzazione</i>	<ul style="list-style-type: none"> + elevata porosità + alta temperatura non richiesta 	<ul style="list-style-type: none"> - tempo di lavorazione lungo - piccole dimensioni dei pori - pori di forma irregolare
<i>Elettrofilatura</i>	<ul style="list-style-type: none"> + ampia scelta di materiali + architettura nanofibrosa benefica per le cellule 	<ul style="list-style-type: none"> - bassa scalabilità - bassa riproducibilità
<i>Produzione additiva AM</i>	<ul style="list-style-type: none"> + controllo preciso sulla morfologia dello scaffold + alta riproducibilità + libertà geometrica 	<ul style="list-style-type: none"> - scelta del materiale limitata (sterolitografia SLA e sinterizzazione laser selettiva SLS) - bassa risoluzione (modellazione a deposizione fusa FDM) - rimozione della struttura di supporto

Capitolo 3. Neuroguide per la riparazione del sistema nervoso periferico

3.1 Introduzione

Nel SNP il germogliamento assonale e la rigenerazione iniziano all'estremità prossimale del nervo reciso dopo la pulizia della mielina e dei detriti assonali da parte delle cellule di supporto, comprese le cellule di Schwann e dei macrofagi. Il processo di rigenerazione assonale termina quando gli assoni appena cresciuti raggiungono il moncone distale del nervo reciso.

Abbiamo visto in precedenza come, a seconda dell'entità del danno, le lesioni dei nervi periferici (PNI) possano essere classificate in diversi gradi e quindi come i metodi di trattamento differiscano notevolmente fra loro. La PNI rimane una delle principali preoccupazioni cliniche dovute alla perdita della struttura e/o della funzione dei nervi periferici e può portare ad intorpidimento degli arti, atrofia muscolare, perdita della funzione neurologica, perdita parziale o completa delle funzioni sensoriali, motorie ed autonome ed ancora al dolore neuropatico. Si stima che le persone che ogni anno sono colpite da PNI nei paesi sviluppati siano fra 13 e 23 ogni 100.000 abitanti [10].

Ad oggi l'autotrapianto nervoso o trapianto di nervi autologo rimane il trattamento comunemente più utilizzato per colmare il vuoto tra i monconi prossimale e distale del nervo e promuoverne la rigenerazione nel trattamento della PNI [10,11,14,15]. Tuttavia, solo il 50% di tutti i pazienti è stato curato con successo utilizzando questo metodo. Benché questa tecnica rappresenti il metodo standard, i risultati sono spesso insoddisfacenti e l'intervento inoltre può provocare la formazione di cicatrici, neuromi ed una possibile perdita di sensibilità e funzionalità nel sito del donatore.

Come gli autoinnesti nervosi, anche gli alloinnesti rappresentano tecniche standard utilizzate per trattare i nervi sezionati pur presentando diversi svantaggi, tra i quali il più evidente è l'associazione ad un'elevata morbilità e quindi alla necessità di trattamenti di immunosoppressione [13].

Tenendo conto dei limiti propri degli autoinnesti, tra cui anche la limitata offerta di siti donatori disponibili nell'uomo, si stanno perseguendo metodi di trattamento alternativi attraverso l'ingegneria dei tessuti.

Gli studi fino ad ora condotti mirano allo sviluppo di nuovi approcci che utilizzano tubi di guida nervosi noti come 'condotti di guida nervosi o condotti nervosi' (*nerve guidance conduits*, NGC). Un NGC può essere definito come un tubo che viene suturato o fissato ai due monconi del nervo danneggiato e fornisce un ambiente adeguato alla rigenerazione del nervo. In dettaglio, gli NGC possono essere considerati come condotti per la guida nervosa costituiti da materiali sintetici o naturali, che funzionano come strutture tubolari atte a collegare i ceppi distali e prossimali del nervo sezionato, fungendo al contempo sia da guida per la rigenerazione degli assoni, sia da barriera contro la crescita cicatriziale [14,16].

È noto come i condotti nervosi siano responsabili della guida della migrazione degli assoni, mantenendo il nervo, con fattori di crescita, nello spazio tra moncone distale e prossimale ed impedendo che lo spazio di guarigione della ferita venga invaso da tessuto cicatriziale e da cellule che potrebbero compromettere il processo di recupero del nervo.

Nel seguito analizzeremo come si è giunti a definire le migliori metodologie da adottare e come un numero crescente di materiali per scaffold, inclusi i polimeri sia naturali che sintetici, sia stato impiegato per fabbricare NGC per la rigenerazione dei nervi periferici.

3.2 Tecniche di riparazione dei nervi periferici

Analizzeremo nel seguito le varie tecniche utilizzate nel campo della riparazione dei nervi periferici, sia con metodi chirurgici che non chirurgici. Tra i metodi chirurgici, si possono individuare tecniche come la neuroraffia e la neurotizzazione, l'utilizzo di nervi autologhi, di nervi con allotrapianto, l'allotrapianto di nervi umani acellulari e l'utilizzo di neuroguide.

Nel campo dei metodi non chirurgici individuiamo la stimolazione elettrica, la stimolazione elettrica con steroidi, la stimolazione magnetica, la fototerapia laser e le neurotrofine.

In letteratura [10,11,14,15,16,17,18] è ampiamente riconosciuto che l'innesto nervoso sia il metodo di trattamento più comunemente utilizzato per la riparazione del gap nervoso medio e grande PNI, al quale si associano i seguenti innesti nervosi: trasferimenti nervosi (neurotizzazione), autoinnesti ed alloinnesti.

A causa delle problematiche presentate sia dagli autoinnesti nervosi sia dagli alloinnesti, si è reso necessario studiare metodologie alternative, che utilizzino materiali diversi. Materiali naturali, biopolimeri e polimeri sintetici sono stati testati per produrre NGC, le cui specificità sono riassunte in Tabella 3.1.

Di seguito indicheremo con il termine 'morbilità' o 'comorbilità' alcuni particolari tipi di danni, in ambito sanitario, che comportano la coesistenza di più patologie diverse in uno stesso individuo. Più precisamente, il fenomeno per cui un paziente che è in cura per una patologia presenta anche una o più ulteriori malattie, non direttamente causate dalla prima, che condizionano la terapia, gli esiti della patologia principale, la qualità di vita del paziente, la durata di un eventuale ricovero in ospedale.

Tabella 3.1: Trattamenti attuali per la riparazione delle lesioni dei nervi periferici (PNI) [10].

<i>Metodo</i>	<i>Trattamento</i>	<i>Pro</i>	<i>Contro</i>
<i>Non chirurgico</i>	Stimolazione elettrica	Non è richiesto nessun intervento chirurgico Si ritiene che la stimolazione elettrica a bassa frequenza abbia un effetto positivo sulla rigenerazione dei nervi	Una frequenza più alta potrebbe peggiorare il recupero del nervo Effetti collaterali su altri tessuti circostanti sconosciuti

<i>Chirurgico</i>	Stimolazione elettrica con steroidi	Nessun intervento chirurgico è richiesto Rigenerazione nervosa più rapida	Effetti collaterali degli steroidi
	Stimolazione magnetica	Nessun intervento chirurgico richiesto	Pochissimi studi riportati
	Fototerapia laser a stimolazione magnetica	Nessun intervento chirurgico richiesto L'irradiazione a bassa potenza si è dimostrata benefica per la rigenerazione dei nervi	Effetti collaterali dell'irradiazione laser sui tessuti sani
	Neurotrofine	Nessun intervento chirurgico richiesto Le neurotrofine ed altri fattori di crescita accelerano la rigenerazione nervosa	Scarse prestazioni rispetto agli autoinnesti nervosi
	Neuroraffia	Intervento chirurgico relativamente semplice	Provoca tensione alle estremità nervose Adatto solo per lesioni del gap nervoso corto
	Colla di fibrina	Riparazione del nervo senza sutura Provoca meno tensione alle estremità nervose Procedura relativamente semplice	Sono riportati solo studi sugli animali e non sono ancora stati riportati studi sull'uomo Adatto solo per lesioni del gap nervoso corto
	Allotrapianti di nervi	Offerta illimitata. Evitare la morbidità del sito donatore Richiede un'immunosoppressione solo temporanea	Morbilità del sito donatore Mancata corrispondenza donatore-ospite Risposta immunitaria dell'ospite
	Trasferimenti nervosi	Procedura consolidata per le lesioni del plesso brachiale Prestazioni migliori rispetto agli alloinnesti Fornisce meno problemi immunologici	Morbilità del sito donatore Perdita sensoriale Co-contrazione
	Autoinnesti di nervi	Gold standard per il trattamento PNI Fornisce meno problemi immunologici	Morbilità del sito donatore Perdita sensoriale Fornitura limitata
	Neuroguide NGC	Fornitura illimitata Meno problemi immunologici Nessuna morbidità del sito donatore Potrebbero essere incorporati segnali meccanici, biologici e biochimici	Prestazioni contro autoinnesti ancora da dimostrare

3.2.1 Neuroraffia

L'approccio chirurgico comunemente utilizzato per la riparazione nervosa risulta essere la sutura diretta dei due monconi (prossimale e distale); infatti, se la lesione nervosa è stata causata da una

perdita di sostanza tra i due monconi, il trattamento chirurgico consiste nel suturare i due monconi sotto tensione, ma, come vedremo, questa tecnica è stata superata con l'utilizzo di un nervo autologo a formare un ponte tra i due monconi [7,8,11]. Nello specifico, interventi chirurgici come la neuroraffia sono indicati solamente per brevi lacune nervose (< 5 mm) [14].

La prima sutura termino-terminale (definita anche 'anastomosi termino-terminale' o sutura *end-to-end*) dei nervi lesionati fu attuata da Hueter nel 1873 [19], operando nell'epinervio. Questa metodica presentava il vantaggio di una minima manipolazione chirurgica lasciando la possibilità ai fattori neurotrofici di guidare la rigenerazione degli assoni verso gli organi bersaglio.

Tale tecnica originale è stata modificata da Snyder [20] e successivamente da altri, come Lubiowski [21], con l'utilizzo di un lembo a manicotto di epinervio per spostare la sede di sutura lontano dall'area interessata dalla lesione. Tuttavia il connettivo epinevrionale può essere sede di formazione di un tessuto cicatriziale in grado di interferire con la progressione assonale, inoltre si presenta il problema di non poter allineare con precisione i fascicoli in modo che non si orientino in maniera casuale all'interno del tronco nervoso.

Per ovviare a questo inconveniente è stata messa a punto una tecnica di sutura perineurale, descritta da Millesi [15], che permette la sutura dei singoli fascicoli attraverso il passaggio del filo nel perinervio, richiedendo per contro una maggiore manipolazione chirurgica del nervo. Nel 1981 infatti, Millesi dimostrò come la tensione eccessiva in sede di sutura di una riparazione termino-terminale avesse conseguenze negative sulla rigenerazione assonale, quali l'aumentata proliferazione di tessuto connettivo cicatriziale e la tendenza dello stesso ad invadere la sutura con totale o parziale interruzione dell'anastomosi limitando quindi il recupero del gap tra i due monconi suturati [15].

Esistono varie tecniche chirurgiche utilizzate per eseguire la neuroraffia [14]:

- riparazione fascicolare di gruppo convenzionale comprendente microsuture poste attraverso il tessuto epineurale interfascicolare ed esterno;
- riparazione perineurale con sutura dei corrispondenti fasci nervosi e del moncone del nervo distale per un allineamento ottimale;
- riparazione epineurale comprendente suture passate attraverso la guaina epinevrionale, di solito applicato direttamente alla lesione nervosa sezionata. Quest'ultimo è il metodo più semplice e veloce, che riduce al minimo sia l'interruzione interna del nervo sia il disturbo dell'afflusso di sangue.

Una procedura alternativa volta a mitigare gli effetti negativi della sutura ed introdotta negli anni '70 è la riparazione del nervo senza sutura, utilizzando colla di fibrina [10]. Ci sono studi al momento limitati agli animali, che indicano una minore infiammazione granulomatosa nei gruppi trattati con

colla di fibrina rispetto ai metodi di sutura convenzionali, con rigenerazione assonale comparabile e recupero della velocità di conduzione nervosa [10].

Riassumendo, ad oggi, la sutura diretta è il trattamento più semplice ed economico disponibile per la riparazione dei nervi periferici, ma è applicabile solo quando vi è una tensione minima attraverso il nervo. Ciò comporta l'approssimazione dei margini delle terminazioni nervose con suture e il tentativo di far corrispondere le posizioni del fascicolo. Dovendo trattare un gap nervoso corto (dell'ordine di 5 mm o meglio se inferiore a 10 mm), la neurorrafia è la procedura chirurgica solitamente utilizzata [10,11,15].

Quando il gap nervoso è maggiore di 5 mm, la sutura *end-to-end* diretta non viene ritenuta idonea per la riparazione del nervo e si richiede l'utilizzo di metodi alternativi.

3.2.2 *Neurotizzazione*

La neurotizzazione (ossia il trasferimento del nervo) è un intervento senza innesto che collega direttamente il moncone del nervo prossimale al ventre muscolare, utilizzabile solo in situazioni particolari. Il trasferimento nervoso riguarda la riparazione di una lesione distale con utilizzo di un nervo estraneo prossimale come donatore che presenti una funzione nervosa ridondante [10]. La selezione del nervo donatore è fondamentale per ridurre al minimo la morbilità del sito donatore. Ci sono alcune limitazioni a tale procedura, oltre alla morbilità nella regione del nervo donatore, quali la co-contrazione e la lesione preesistente al nervo donatore. Le procedure di trasferimento del nervo sono ben consolidate per le lesioni del plesso brachiale che portano a significative disfunzioni e disabilità degli arti superiori, ma per PNI in altre parti del corpo, la procedura chirurgica deve venire ancora perfezionata [10].

Le procedure di neurotizzazione forniscono comunque risultati inferiori rispetto alla neurorrafia o all'innesto di nervi.

3.2.3 *Innesti autologhi*

L'innesto nervoso autologo (detto anche autotrapianto o autoinnesto nervoso) è ad oggi considerato la tecnica migliore per la riparazione delle PNI, ossia per colmare le lacune nervose (maggiori di 30 mm) tra i monconi dei nervi prossimale e distale e promuovere la rigenerazione del nervo [11,14]. La tecnica dell'autoinnesto è stata descritta per la prima volta tra gli anni 1870 e 1900 da Philipeaux e Vulpian [22] e poi introdotta nella pratica clinica da Albert quindici anni più tardi [18]. In seguito fu Millesi [16,17,18] a lavorare a lungo sulla tecnica dell'innesto nervoso dimostrandone la superiorità rispetto alla sutura epineurale in tensione.

Per definizione gli 'autoinnesti' sono segmenti di tessuto del paziente stesso che vengono rimossi chirurgicamente da un altro sito e impiantati nel sito della lesione per colmare il divario del tessuto danneggiato [11].

Nel dettaglio, questa tecnica consiste nel prelevare un nervo da un altro sito anatomico e utilizzarlo per collegare i due monconi nervosi e allineare le fibre per consentire il recupero funzionale del nervo danneggiato. Gli innesti nervosi posseggono sia cellule di Schwann, che ricercano attivamente l'assone in rigenerazione, sia una lamina basale che garantisce un microambiente adiuvante per la ricrescita nervosa. Infatti, gli autoinnesti nervosi forniscono la sostituzione tissutale ideale poiché riflettono il tessuto nativo chimicamente, biologicamente e strutturalmente.

Il nervo più comunemente utilizzato in questa metodica è il nervo surale prelevato dalla caviglia esterna posteriore. Altri nervi che possono venire utilizzati come autoinnesti nervosi sono i nervi intercostali, i nervi peroneali superficiali e profondi, i nervi cutanei posteriori e laterali della coscia, i nervi cutanei superficiali, il ramo cutaneo dorsale del nervo ulnare e i nervi cutanei mediali e laterali dell'avambraccio (anterobracchiali) [10,11,17]. Al fine di identificarli meglio, indichiamo i nervi più utilizzati come il nervo surale, il nervo safeno, il nervo cutaneo-mediale e laterale dell'avambraccio, il nervo radiale superficiale e l'interosseo posteriore.

I fattori che influenzano la scelta del nervo più adatto da prelevare sono legati alla posizione del nervo da riparare, alla dimensione e diametro del gap nervoso ed alla morbilità associata al sito donatore [11,16].

L'innesto del nervo autologo ha finora prodotto i migliori risultati rispetto a tutti gli altri metodi di trattamento. L'impiego di autoinnesti nervosi porta vantaggi certi perché questi agiscono come scaffold immunogenicamente inerti che hanno la capacità di fornire i fattori neurotrofici appropriati e le cellule di Schwann. Più precisamente questo metodo dà buoni risultati in quanto è ricco di cellule di Schwann, ovvero dei fattori neurotrofici e neurotropici da esse prodotti; inoltre, la membrana basale delle cellule di Schwann contiene fattori quali la laminina e la fibronectina, in grado di promuovere la progressione assonale.

Il trapianto di nervi autologhi offre risultati migliori rispetto ad altri metodi di trattamento pur presentando un certo numero di limitazioni e complicanze [10,14,15,16,17,18]:

1. l'uso di autoinnesti nervosi è limitato a lacune nervose con una lunghezza massima di circa 50 mm;
2. la percentuale di successo del recupero dopo la chirurgia risulta indicativamente del 50%;
3. può causare danni al sito donatore;

4. il nervo donatore è solitamente un nervo sensoriale funzionante che viene utilizzato per riparare un nervo motorio danneggiato, comportando il sacrificio di un nervo sensitivo con conseguente perdita sensoriale;
5. potenziale formazione di un neuroma e cicatrici nel sito donatore;
6. il prelievo da un sito donatore può essere causa di morbidità del sito donatore con perdita funzionale;
7. i siti donatori disponibili nell'uomo sono in numero limitato, con conseguente carenza di materiale da innesto;
8. la necessità di una seconda incisione (per raccogliere il tessuto dell'innesto) può portare all'aumento dei tempi di recupero per il paziente;
9. mancata corrispondenza del sito del donatore, cioè possibile discrepanza tra la dimensione del nervo donatore ed il sito ricevente;
10. disadattamento del fascicolo;
11. possibile perdita di funzione, specialmente nelle lesioni dei nervi motori;
12. aumento dei costi di intervento per l'operatore sanitario;
13. le due suture (una prossimale ed una distale) che fissano l'innesto potrebbero essere sede di una sfavorevole proliferazione fibroblastica che ostacolerà la progressione dei sottili assoni rigeneranti. Inoltre, i punti di sutura portano a cicatrici e quindi alla proliferazione fibroblastica e miofibroblastica che, nel peggiore dei casi, può portare ad una sezione infiammatoria ed infine ad una fibrosi che ostacola la rigenerazione nervosa.

3.2.4 Allotrapianto di nervi o alloinnesto

L'uso di alloinnesti nervosi o allotrapianto nella rigenerazione dei nervi è stato segnalato per la prima volta nel 1885 da Albert Einige [13] e consiste nel prelievo del materiale nervoso mancante da cadaveri umani, con successivo impianto e sutura al nervo ferito.

Ad oggi gli allotrapianti vengono usati principalmente nelle lesioni dei nervi segmentali e rappresentano una valida alternativa all'autotrapianto. In particolare, per le discontinuità in cui la ricostruzione richiede una lunghezza dell'innesto superiore a quella disponibile con l'autotrapianto, l'uso di materiale da allotrapianto da cadavere appare come una valida alternativa. Il nervo allotrapiantato fornisce una guida e cellule di Schwann donatrici vitali che consentono agli assoni dell'ospite di passare dal moncone prossimale a quello distale e reinnervare gli organi bersaglio. Infatti, gli allotrapianti, contengono le microstrutture endoneurali necessarie per facilitare la rigenerazione dei nervi e sono una potenziale fonte di cellule di Schwann [11].

L'uso di allotrapianti nervosi (Figura 3.1) può dunque consentire un recupero funzionale paragonabile a quello degli autoinnesti, ma richiede che i pazienti ricevano un'immunosoppressione sistemica per circa 18 mesi. L'immunosoppressione sistemica viene attenuata per consentire agli assoni dell'ospite ed alle cellule di Schwann di rigenerarsi attraverso lo scaffold dell'allotrapianto, tuttavia può causare infezioni opportunistiche o addirittura giungere alla formazione di tumori [17].

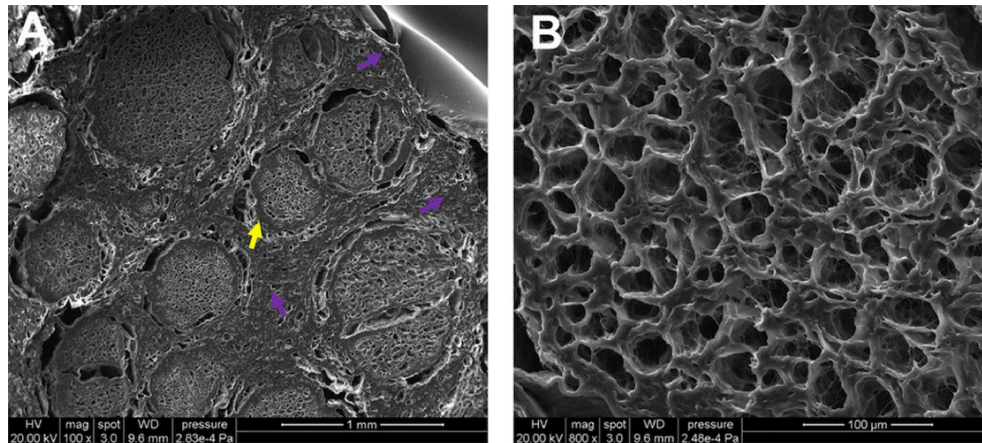


Figura 3.1: immagini SEM di allotrapianto di nervo acellulare umano liofilizzato che evidenzia la struttura gerarchica dei neuroni periferici con un ingrandimento di (A) 100X e (B) 1500X, modificato da Zhu et al. [25]. Nella figura A ci sono esempi di epineurio (viola), perineurio (giallo) e fascicoli che possono essere osservati nelle sezioni trasversali del nervo liofilizzato. La figura B mostra un'immagine ingrandita dei singoli tubi endoneurici all'interno di un singolo fascicolo [11].

Possono essere utilizzati nervi freschi o pretrattati con tecniche quali congelamento, liofilizzazione, pre-degenerazione ed ancora trattamenti chimici con o senza immunosoppressori. Recentemente si è cercato di migliorare i limiti dell'allotrapianto elaborando metodi in grado di mantenere l'impalcatura del tessuto nervoso reso non immunogenico, attraverso l'applicazione di trattamenti come: cicli ripetuti di gelo-disgelo, esposizione alle radiazioni, la conservazione prolungata in una soluzione fredda e la decellularizzazione con detergenti [16,17].

I principali vantaggi degli alloinnesti sono [10,11,16,17]:

1. forniscono un substrato biologico per la rigenerazione dei nervi senza il requisito dell'immunosoppressione, a differenza del trapianto di organi, richiedono solitamente solo un'immunosoppressione temporanea;
2. presentano un'offerta praticamente illimitata grazie all'abbondante presenza di nervi donatori;
3. presentano una lunghezza virtualmente illimitata di tessuto nervoso disponibile per il trapianto e quindi di dimensione del nervo;
4. il nervo danneggiato nel ricevente può essere sostituito con lo stesso tipo di nervo del donatore, rappresentando un vantaggio per la specificità del tipo di neurone.

Un ulteriore vantaggio degli alloinnesti rispetto agli autoinnesti è la mancanza di morbidità del sito donatore.

Benché dotata di molti vantaggi, questa tecnica presenta anche alcuni aspetti negativi quali [10,11,13]:

- possibilità di una risposta immunitaria indesiderata;
- necessità di un'immunosoppressione sistemica per prevenire il rigetto;
- gli agenti immunosoppressori comportano un rischio intrinseco di infezione, con rallentamento della guarigione delle ferite ed altri effetti sistemici;
- potenziale immunogenicità;
- possibilità di morbilità associata alla terapia immunomodulante.

Il paziente è comunque soggetto a possibili infezioni, rischio di trasmissione di malattie e, nei casi più gravi, anche alla formazione di tumori. L'immunosoppressione può essere evitata quando gli allotrapianti nervosi vengono decellularizzati. La limitazione chiave di questa tecnica consiste nella tendenza dell'immunogenicità dell'allograft nervoso a diminuire nel tempo man mano che procede il processo di scambio delle cellule di Schwann dal donatore all'ospite, rendendo quindi necessario un successivo trattamento di immunosoppressione.

AxoGen Inc. (Alachua, FL, USA) è l'unica azienda di dispositivi medici che produce alloinnesti di nervi umani acellulari in lunghezze comprese tra 15 e 70 mm e diametri tra 1 e 5 mm. Un prodotto decellularizzato viene commercializzato con il nome di AxoGen® (Axogen Corporation, USA): questo dispositivo agisce come un'impalcatura la cui struttura è fornita dalla matrice extracellulare.

La FDA, inoltre, ha approvato un prodotto commerciale, chiamato Avance® (Axogen Corporation, USA), formato da tessuto cadaverico decellularizzato e sterilizzato che non necessita di immunosoppressione [11,13]. Questo materiale presenta tutti i vantaggi associati agli alloinnesti nervosi e consente la scelta del tipo di nervo necessario. Non è certo però che l'immunosoppressione non sia richiesta in tempi successivi all'intervento. Avance® è una matrice ECM decellularizzata e purificata derivata da tessuto nervoso periferico umano donato e viene elaborata e distribuita in conformità con i requisiti FDA per i prodotti a base di cellule e tessuti umani secondo le normative statali e le linee guida dell'American Association of Tissue Banks [17,23]. Il processo di pulizia di questo materiale ne preserva le caratteristiche strutturali intrinseche del tessuto, l'innesto è prodotto elaborando il tessuto nervoso umano con una combinazione di decellularizzazione detergente, condroitinasi (composti da un nucleo proteico e un numero variabile di covalenti catene laterali di condroitin solfato attaccati da glicosaminoglicani noti per influenzare l'attività neurale e considerati inibitori della crescita degli assoni), degradazione e sterilizzazione con irradiazione gamma. Questa tecnica di lavorazione è considerata idonea a rendere il tessuto non immunogeno.

Nello studio di Neubauer et al. [24] hanno mostrato che alloinnesti nervosi decellularizzati congelati e scongelati di 40 mm potrebbero supportare la rigenerazione per tutta la loro lunghezza quando

pretrattati con condroitinasi, mentre una rigenerazione significativa non è progredita oltre i 20 mm in quelli non trattati. I recenti progressi nel ritrattamento dei tessuti e le consolidate reti di banche dei tessuti hanno portato alla disponibilità di autoinnesti di alta qualità. Mentre lo studio di Leckenby et al. [23] eseguito su 156 pazienti, supporta l'applicazione più ampia degli alloinnesti nella gestione dei problemi nervosi, seppur bisogna prestare attenzione all'uso di innesti lunghi con diametri maggiori.

3.2.5 Tubulizzazione mediante neuroguide

Un'alternativa all'impiego degli innesti autologhi che negli ultimi anni si è affermata, grazie al perfezionamento di specifiche tecniche di ingegneria tissutale, è quella dei condotti di guida nervosi. Con il termine generico di tubulizzazione s'intende l'impiego di strutture di varia natura con forma tubolare, come alternativa agli innesti nervosi autologhi. Si tratta di strutture tubolari specificamente progettate per collegare i monconi distali e prossimali di un nervo sezionato agendo sia come guida per la rigenerazione degli assoni lungo l'asse prossimale-distale, sia come barriera contro la crescita interna del tessuto cicatriziale [14].

In dettaglio, si tratta di condotti cilindrici biocompatibili all'interno dei quali il moncone nervoso in rigenerazione può trovare protezione ed orientamento. Questi condotti (Figura 3.2) rappresentano un ponte fra le terminazioni nervose danneggiate e forniscono un supporto strutturale e trofico ad entrambe le estremità, evitando l'invasione dei tessuti circostanti e favorendo la ricrescita degli assoni lungo il condotto, sono noti come condotti nervosi artificiali o innesti nervosi artificiali e vengono fabbricati con materiali sia naturali che sintetici.

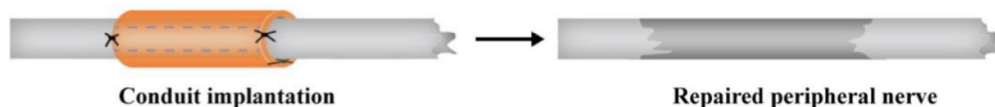


Figura 3.2: Schema di tubulizzazione mediante una neuroguida [15].

Gli NGC sono utilizzati per supportare meccanicamente e dirigere il germogliamento assonale tra i monconi nervosi feriti, prevenendo al contempo la crescita interna del tessuto fibroso nel sito della lesione e conservando i fattori neutrofici e neurotrofici secreti dalle estremità nervose danneggiate [14]. Queste guide (Figura 3.3) funzionano trattenendo la diffusione dei fattori di crescita e dei chemioattrattivi, che aiutano a dirigere la rigenerazione del nervo attraverso gradienti di diffusione verso il segmento distale, forniscono protezione al nervo e impediscono l'infiltrazione del tessuto fibroso della cicatrice durante il recupero [11].

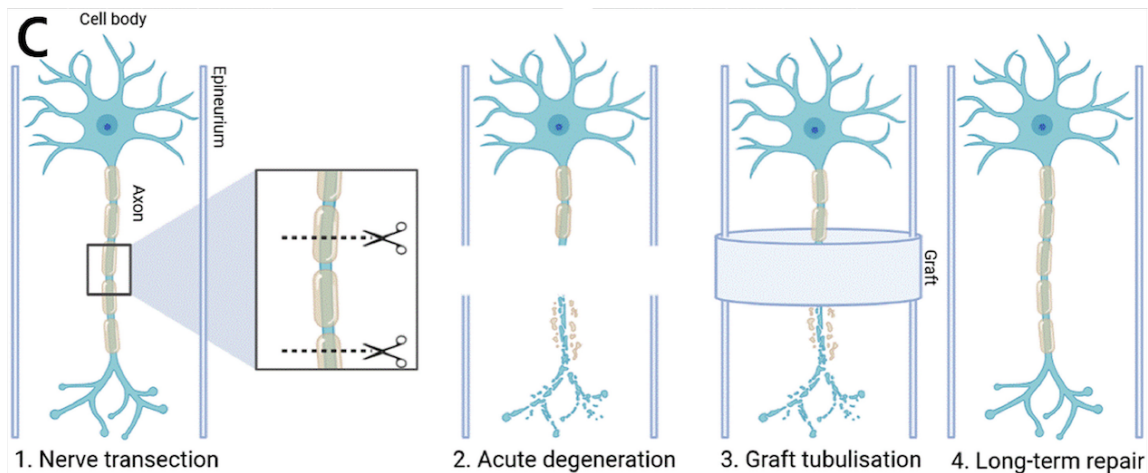


Figura 3.3: riparazione del condotto di guida nervosa delle lesioni da transezione del nervo periferico tramite la tubulazione dell'innesto. La riparazione chirurgica del divario tramite la tubulizzazione dell'innesto aiuta la rigenerazione direzionale dall'estremità del nervo prossimale ottenendo la riparazione e il degrado a lungo termine o il rimodellamento dell'innesto [11].

Nell'entubazione nervosa (chiusura di monconi nervosi) si ricerca un aumento di quantità, velocità e la lunghezza degli assoni in rigenerazione. In alcuni casi, dopo che i monconi nervosi sono stati inseriti e suturati alle estremità del tubo, un fluido ricco di proteine (assoplasmatico) essudato dai monconi nervosi viene rilasciato nella guida portando alla formazione, entro pochi giorni, di una neomatrice di fibrina che fornirà un adeguato supporto per la migrazione delle cellule di Schwann, dei fibroblasti e dei macrofagi (Figura 3.4).

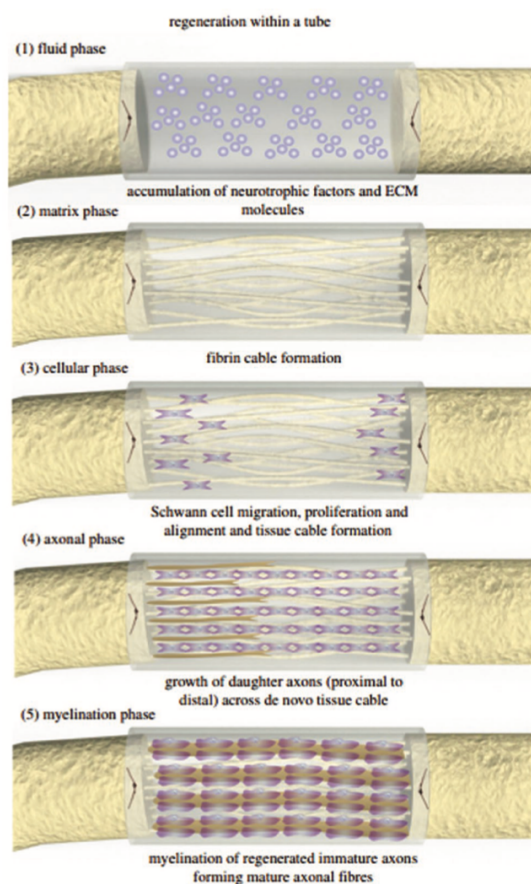


Figura 3.4: Rigenerazione dei nervi all'interno di un NGC cavo [13].

I primi modelli di NGC erano costituiti da tubi in silicone non riassorbibile utilizzati per riparare un gap nervoso di 6 mm, in grado di assistere la rigenerazione nervosa ma con il rischio di provocare stenosi del rigenerato e di renderne necessaria la rimozione [10,18]. Da allora sono stati apportati miglioramenti sia alla progettazione che ai materiali ed ai processi di fabbricazione. I nuovi dispositivi realizzati con biopolimeri naturali o sintetici hanno l'obiettivo di fornire segnali meccanici, biologici e biochimici (Figura 3.5).

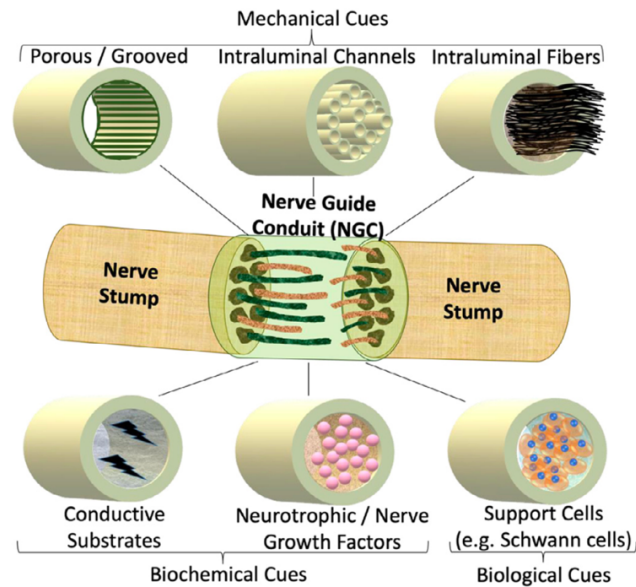


Figura 3.5: Condotto nervosi di NGC con segnali meccanici, biochimici e biologici [10].

Lo studio dei risultati clinici presenti in letteratura ha evidenziato come nelle lesioni di nervi periferici, soprattutto dei nervi sensitivi, e con perdite di sostanza non superiori ai 20-30 mm, le neuroguide siano comparabili con gli innesti, apportando il significativo vantaggio di evitare il sacrificio di un altro nervo dal sito donatore [10,11,18].

La riparazione con neuroguide presenta anche altri vantaggi, fra i quali:

- la creazione di una camera biologica non aggredibile dai fibroblasti, all'interno della quale il nervo può rigenerarsi, mantenendo in situ fattori trofici e di crescita endogeni;
- la capacità di funzionare da guida direzionale durante l'allungamento degli assoni rigenerati.

Per contro la morbilità del sito donatore, la fornitura limitata e la seconda incisione per la rimozione dell'innesto di tessuto sono alcuni dei limiti degli autoinnesti che potrebbero essere evitati con l'uso di NGC [10].

Oltre alla lunghezza, anche il diametro interno del condotto cilindrico è correlato in modo inversamente proporzionale al successo nella rigenerazione, effetto che sembra essere dovuto all'insorgere di una insufficiente vascolarizzazione nelle aree centrali per le guide di calibro maggiore [10,11].

Sarà quindi necessario sviluppare un NGC ideale che possieda ottime biocompatibilità, biodegradabilità, proprietà meccaniche e conducibilità elettrica. Si parla anche di conducibilità elettrica poiché la funzione dei neuroni è quella di condurre segnali elettrici, i rivestimenti o i materiali conduttivi sono una considerazione popolare per la rigenerazione dei nervi [11]. I materiali conduttivi influenzano la trasduzione del segnale elettrico su un nervo reciso e sono in grado di fornire uno stimolo elettrico locale all'area rigenerante. È stato dimostrato [26] che la stimolazione delle cellule neuronali su materiale rivestito con un campo elettrico di 10 mV/cm, che era una depolarizzazione sufficiente per innescare un potenziale d'azione, migliora la formazione e l'estensione dei neuriti sulle nanofibre. È stato anche dimostrato [27] che la stimolazione elettrica modula la produzione del fattore di crescita.

Nello specifico, i requisiti di un NGC ideale includono: un'architettura biomimetica, caratteristiche strutturali idonee ed allineare longitudinalmente gli assoni rigeneranti, proprietà meccaniche tali da fornire un valido supporto strutturale, sufficiente permeabilità per fornire supporto trofico, conduttività, flessibilità e biodegradabilità [10,11].

Le caratteristiche ideali delle neuroguide possono essere così riassunte [11,14]:

1. essere costruiti in materiale duttile, flessibile e morbido, in modo da prevenire la compressione degli assoni rigeneranti e limitare l'infiammazione dei tessuti;
2. fornire un segnale di guida (tramite la struttura tubolare 3D) per la crescita dell'assone in estensione;
3. essere suturabili facilmente con fili 8/9-0;
4. essere sterilizzabili con le comuni metodiche;
5. essere porosi rispetto alle sostanze in grado di facilitare la crescita assonale ed al contempo impermeabili a quelle che possono rallentarla;
6. presentare una bassa antigenicità per limitare i fenomeni di rigetto;
7. essere biodegradabili una volta che il tessuto rigenerato abbia raggiunto il moncone distale per limitare fenomeni di stenosi;
8. essere sufficientemente resistenti alla compressione;
9. funzionare come dispenser per fattori trofici in modo da supportare anche biochimicamente il tessuto rigenerato;
10. prevenire la crescita interna di tessuto fibroso nel sito della lesione e trattenere i fattori neurotrofici secreti dalle estremità nervose danneggiate;
11. essere facilmente reperibili e di costo adeguato;
12. soddisfare i requisiti tecnici necessari per la produzione, conservazione a lungo termine e manipolazione chirurgica;

13. avere dimensioni longitudinali appropriate per facilitare il superamento del gap nervoso senza tensione;
14. avere diametro interno e spessore della parete tali da non influenzare la velocità di rigenerazione del nervo, quindi essere sufficientemente ampi da accogliere qualsiasi rigonfiamento del nervo senza provocarne la compressione durante la degradazione della struttura tubolare;
15. avere diametro tale da alloggiare in modo sicuro i due monconi delle estremità nervose senza compressione;
16. essere composti da materiale biocompatibile che non provochi risposte infiammatorie;
17. essere biodegradabili pur mantenendo un'architettura meccanicamente stabile durante il processo di rigenerazione e resistenti allo strappo delle suture e all'infiammazione dei tessuti;
18. essere semipermeabili per consentire la diffusione di ossigeno e sostanze nutritive dal liquido interstiziale al tessuto nervoso sopravvissuto attraverso i pori nella parete del condotto.

La porosità della parete del condotto risulta comunque limitata dall'opposta necessità di prevenire l'infiltrazione di cellule infiammatorie nel condotto stesso e di minimizzare la diffusione di fattori di crescita al di fuori del medesimo. Le dimensioni ottimali dei pori rientrano nell'intervallo 5-30 μm , meglio se 10-20 μm . In letteratura viene evidenziato come una dimensione dei pori inferiore a circa 5 μm inibisca la proliferazione di cellule e tessuti, mentre con una dimensione superiore di circa 30 μm l'ingresso di cellule infiammatorie diventi eccessivo e come la variazione di permeabilità possa influenzare la formazione della matrice di fibrina nella fase iniziale della rigenerazione [14].

Le guide biodegradabili si sono dimostrate un valido supporto alla rigenerazione nervosa per gap inferiori ai 30 mm con risultati funzionali paragonabili agli autoinnesti, comunemente impiegate quando il gap del nervo sezionato è inferiore a 10 mm [11].

Per i casi che presentano ingenti perdite di sostanza nervosa (> 50 mm) si sta operando per arrivare alla produzione di neuroguide artificiali, migliorando quelle attuali nel disegno dell'interfaccia nervo-scaffold, nella flessibilità, biocompatibilità, permeabilità e riducendo contestualmente l'immunogenicità dei materiali.

3.3 Design delle neuroguide

Il design delle neuroguide [15,28] può essere classificato secondo cinque gruppi principali: design cavo/non poroso, design multicanale (*multi-channel*), design poroso, con riempitivi in fibra o hydrogel e design scanalato (*grooved*) (Figura 3.6).

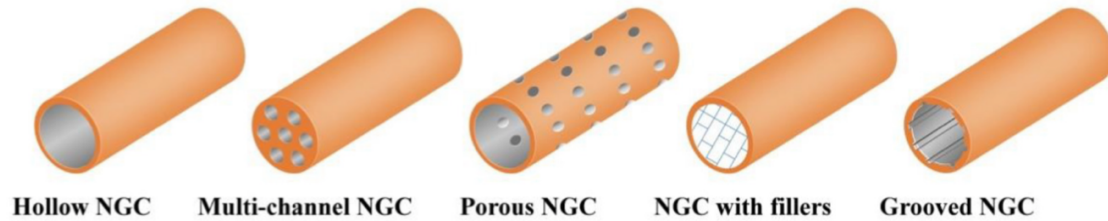


Figura 3.6: Design delle neuroguide: NGC cavo, multicanale, poroso, con riempitivi e scanalato [15].

Un esempio di un nuovo design che incorpora tutte le modifiche fisiche all'NGC è il modello del bioreattore a spirale (Figura 3.7): sulla superficie viene aggiunto uno strato elettrofilato, che viene utilizzato anche come materiale sigillante per fissare la struttura e fungere da deterrente per l'infiltrazione di tessuto cicatriziale e migliorare la rigidità dell'NGC [11].

Sfruttando questa tecnica Chang et al. [44] hanno osservato come, in un modello di roditore con difetto del nervo sciatico di 10 mm, ci fosse un miglioramento del potenziale d'azione muscolare per il condotto a spirale e un aumento degli assoni mielinizzati totali dopo 6 settimane di impianto rispetto a un tubo cavo.

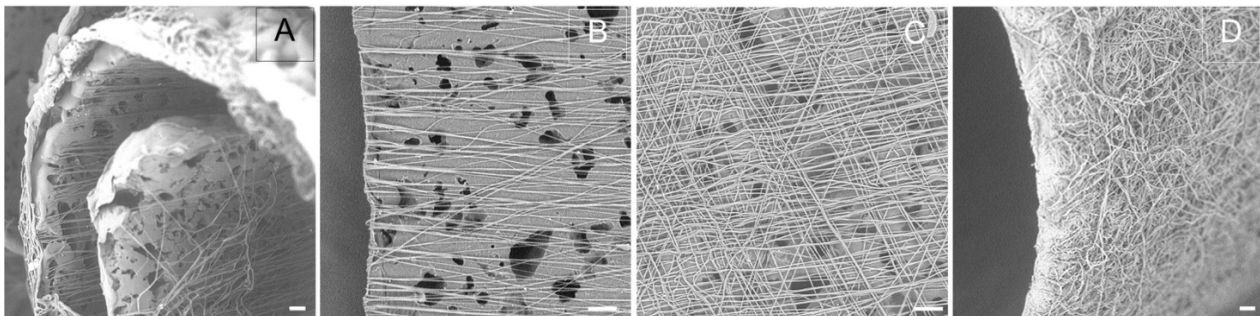


Figura 3.7: immagini di microscopia elettronica a scansione di design a spirale PCL Nerve Guidance Conduits. (A) riempitivo del condotto a spirale, (B) struttura della parete del lume allineato, (C) topografia di allineamento casuale delle nanofibre, (D) topografia casuale delle nanofibre esterne [44].

3.3.1 Design cavo

Il design cavo o non poroso è il più semplice di tutti i design e consiste in un tubo cavo in polimeri naturali o sintetici, che risulta relativamente semplice da fabbricare. I vantaggi di questo design sono la facilità di fabbricazione e la ripetibilità. I suoi limiti (poiché non è poroso) includono la scarsa permeabilità ai nutrienti e ai fattori di crescita, che ostacola in parte la rigenerazione del nervo. Un'altra limitazione è l'assenza di segnali topografici per l'allineamento direzionale dei neuroni dal moncone prossimale al moncone distale.

3.3.2 Design multicanale

Il design multicanale con canali intraluminali rappresenta un design più diffuso. Uno dei primi NGC multicanale è riportato da Moore et al. [29] che hanno utilizzato la stampa ad iniezione con

evaporazione rapida del solvente per fabbricare NGC con canali intraluminali. Studi *in vivo* sul midollo spinale di ratto adulto hanno confermato la presenza di assoni rigeneranti un mese dopo l'operazione. Zeng et al. [30] hanno utilizzato la stampa ad iniezione a bassa pressione, combinata con una separazione di fase indotta dal calore per fabbricare NGC multicanali differenti: con una microstruttura simile a una scala (LNC), con pori microsferici e pareti porose non fibrose (MNC) e con un microstruttura nanofibrosa (NNC) (Figura 3.8).

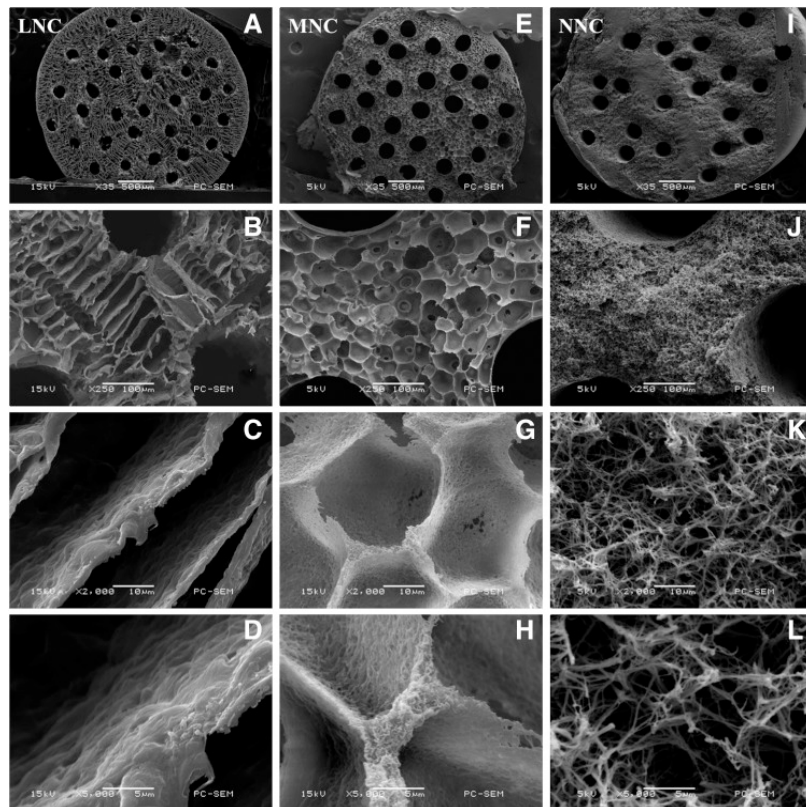


Figura 3.8: Immagini SEM della sezione trasversale dei condotti utilizzando diversi ingrandimenti. (Da sinistra a destra: LNC, MNC e NNC; barra della scala: 500 μm per A, E, I; 100 μm per B, F, J; 10 μm per C, G, K; e 5 μm per D, H, L) [30].

Jeffries e Wang [31] hanno utilizzato l'elettrofilatura per fabbricare rivestimenti fibrosi allineati e li hanno avvolti su NGC multicanale (Figura 3.9). Il vantaggio di questo processo rispetto alla stampa ad iniezione è dato dalla riduzione dello spessore delle pareti, lasciando, a parità di diametro esterno, una maggiore area per la crescita dei tessuti. Studi *in vitro* ne hanno dimostrato l'efficacia sia nell'infiltrazione cellulare che nell'allungamento assonale.

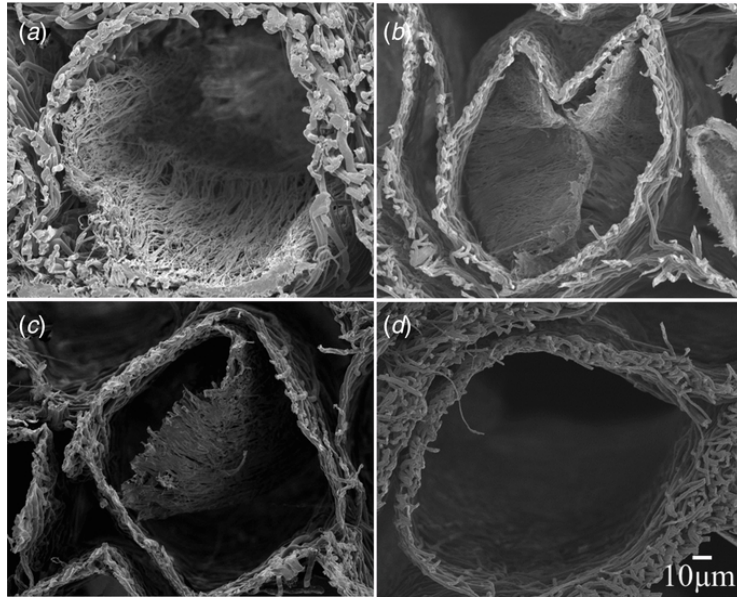


Figura 3.9: SEM di canali (ingrandimento 500 ×) che mostrano i microcanali rivestiti con fibre parallele come (a) rivestimento lume, (b) rivestimento collassato, (c) rivestimento delaminato o (d) nessun rivestimento [31].

Per contro questo metodo di fabbricazione è complesso e scarsamente produttivo. Dini et al. [32] e Jenkins et al. [33] hanno testato scaffold elettrofilati arrotolati in un NGC multicanale e lo hanno funzionalizzato con elementi bioattivi e fattori di crescita come il fattore di crescita nervoso (NGF), il fattore neurotrofico ciliare (CNTF) e i peptidi RGD (Figura 3.10).

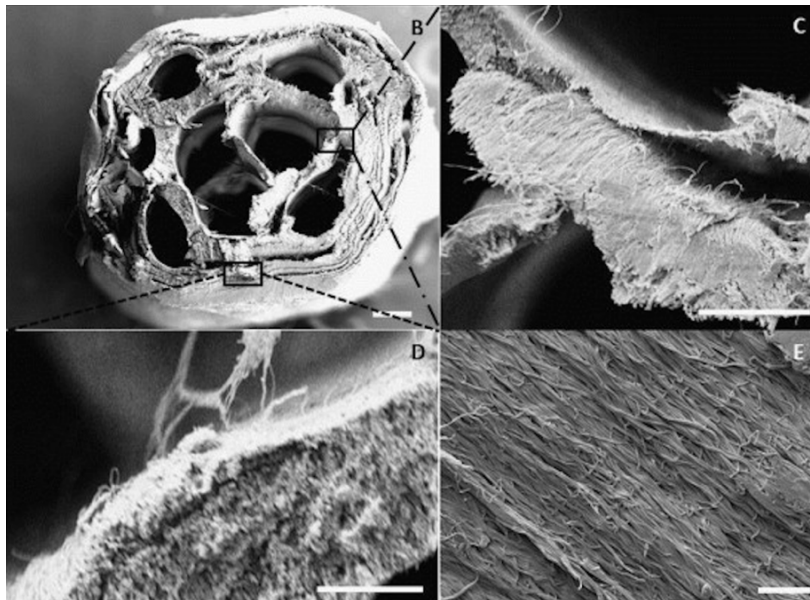


Figura 3.10: immagini SEM di microcanali (B: barra della scala 200 μm) e nanofibre nelle guide nervose (C: barra della scala 100 μm e D: barra della scala 50 μm). Sezione trasversale della guida nervosa con nanofibre allineate (E: barra della scala 10 μm) [32].

3.3.3 Design poroso

Il design poroso è stato sviluppato con l'obiettivo di migliorare la permeabilità della guida. Studi *in vivo* [34] condotti con tubi micro- e nano-fibrosi elettrofilati hanno portato alla rigenerazione di un gap nervoso di 8-10 mm in un nervo sciatico di ratto (Figura 3.11).

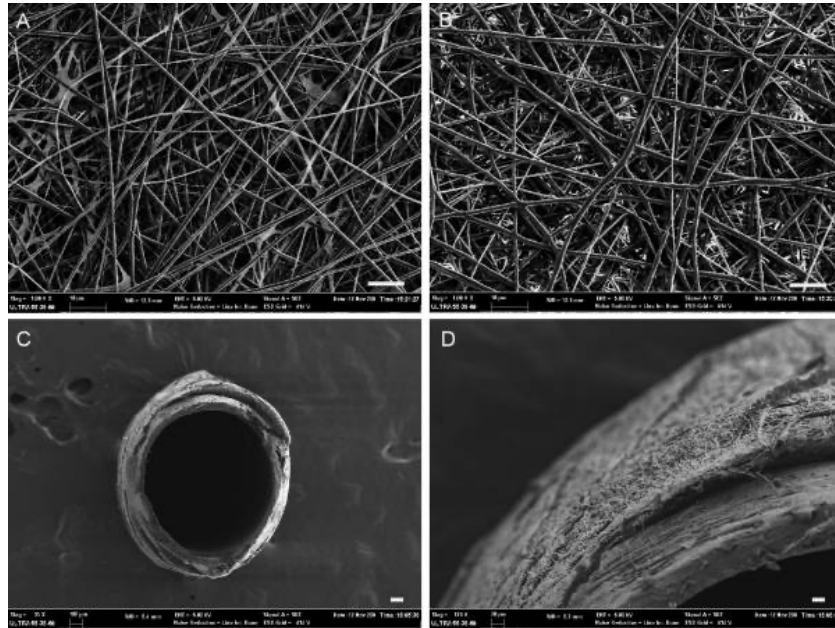


Figura 3.11: Osservazioni SEM di reti fibrose elettrofilate e neuroguide. (A) rete fibrosa collagene/PCL; (B) rete fibrosa PCL; (C) condotto nervoso collagene/PCL elettrofilato; (D) dettagliata morfologia della parete esterna del condotto nervoso collagene/PCL. Barra in A,B = 10 μm ; barra in C = 100 μm ; barra in D = 20 μm , [34].

Le fibre elettrofilate risultano generalmente orientate in modo casuale; ulteriori studi hanno consentito di realizzare fibre disposte lungo una direzione preferenziale, in modo da ottenere un migliore allineamento assonale durante la rigenerazione. A seconda del metodo di fabbricazione, gli NGC porosi possono essere di tipo fibroso o non fibroso. Il design poroso fibroso affronta sia i limiti dei segnali topografici per l'allineamento direzione (lunga la lunghezza della fibra) sia la superficie porosa per il trasporto di massa. Mentre il design poroso non fibroso manca del vantaggio di una superficie porosa.

Kim et al. [35] hanno ottenuto scaffold elettrofilati con fibre sia allineate che disposte in maniera casuale rilevando come gli scaffold con fibre allineate forniscano segnali topografici per la rigenerazione assonale.

Gli scaffold elettrofilati a doppio strato con una combinazione di fibre orientate allineate casualmente sono stati progettati in modo tale che le fibre allineate sullo strato interno forniscano le indicazioni topografiche per l'allineamento neurale mentre la superficie esterna orientata in modo casuale fornisce la resistenza meccanica necessaria. Yao et al. [36] hanno fabbricato neuroguide elettrofilate a doppio strato (Figura 3.12, Figura 3.13) e le sperimentazioni *in vitro* hanno rivelato che la lunghezza dei neuriti sulle fibre allineate sulla superficie interna risulta significativamente più lunga di quella sulla superficie della fibra orientata casualmente.

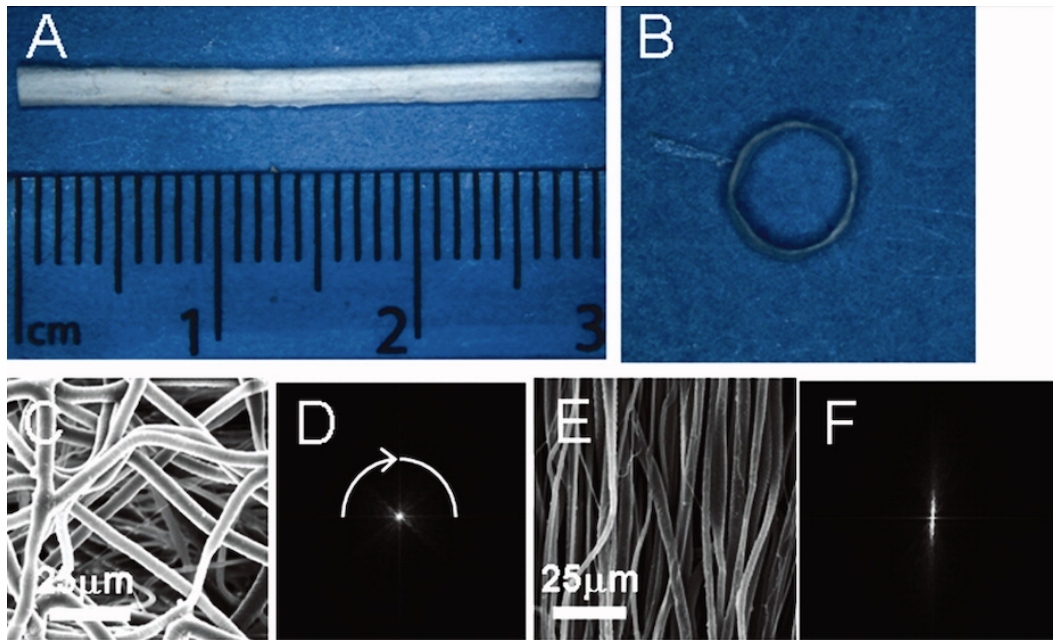


Figura 3.12: Analisi dell'allineamento delle fibre sia sulla superficie interna che su quella esterna del condotto nervoso PCL. (A) Campione di PCL elettrofilato. (B) Immagine della sezione trasversale del condotto. (C) Immagini SEM rappresentative di fibre orientate casualmente sulla superficie esterna del condotto e (E) fibre allineate sulla superficie interna del condotto. (D e F) Immagini in uscita FFT e proiezione radiale delle fibre [36].

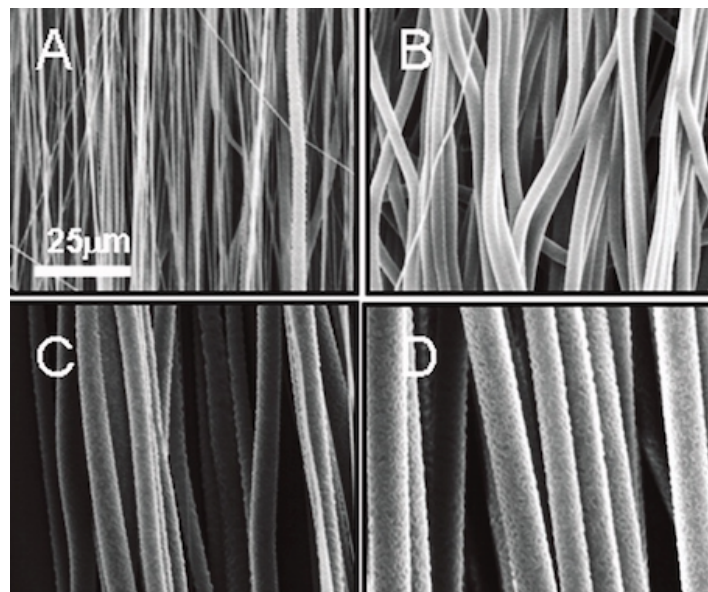


Figura 3.13: Un'analisi dell'orientamento delle fibre. (A–D) Fibre allineate con diametri di fibra variabili. L'intensità dei pixel viene tracciata rispetto al pixel di acquisizione per le fibre allineate [36].

Zhu et al. [37] e Xie et al. [38] hanno fabbricato scaffold a doppio strato con uno strato fibroso interno allineato e nanofibre esterne organizzate in modo casuale: gli studi in vitro e in vivo hanno evidenziato risultati superiori rispetto ai condotti nanofibrosi casuali (Figura 3.14).

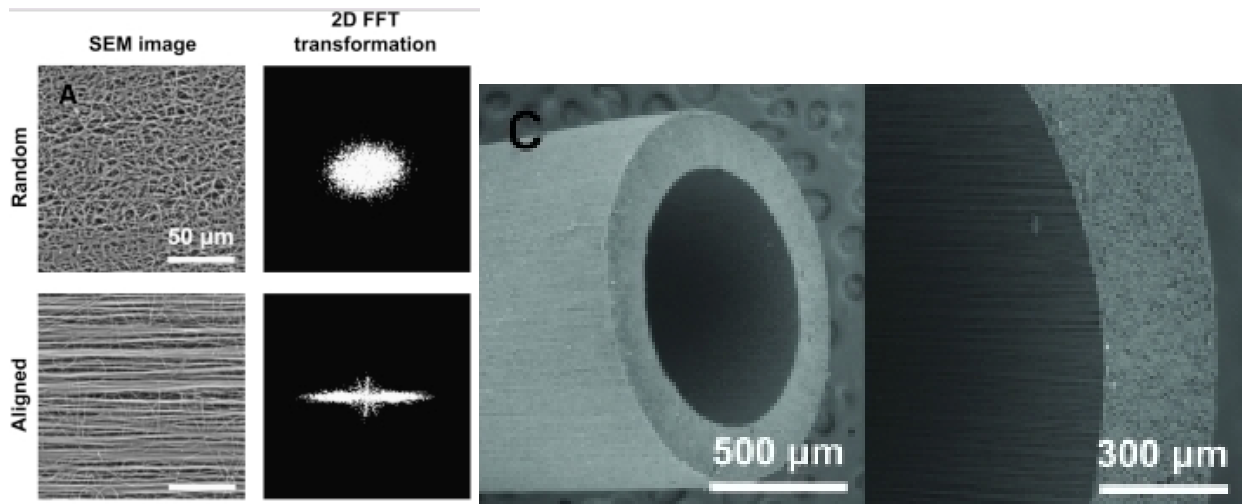


Figura 3.14: (A) Analisi di allineamento delle fibre sulla superficie del condotto nervoso (casuale e allineata). FFT 2D: immagini vengono visualizzate in nero e bianco per chiarezza. (C) Scansione SEM di un nervo che mostra fibre allineate nello strato del lume e fibre casuali nello strato esterno [37].

Successivamente Kim et al. [39] hanno apportato una leggera modifica al design dell'impalcatura a doppio strato: la superficie interna è stata ricoperta da nanofibre elettrofilate fittamente allineate per migliorare la proliferazione delle cellule neurali, mentre la parte centrale dello spessore del tubo è formata da nanofibre orientate casualmente sulle nanofibre allineate, per aumentarne la resistenza meccanica.

3.3.4 Design con riempitivi in fibra o hydrogel

Gli NGC con riempitivi contengono fibre elettrofilate o hydrogel nel lume invece che nei canali intraluminali. Poiché gli NGC multicanale fabbricati utilizzando l'elettrofilatura risultano costosi, di scarsa ripetibilità e riproducibilità, si è proposto l'inserimento dei riempitivi all'interno del lume, ad imitazione del fascicolo nervoso. Clementi et al. [39] hanno introdotto film sottili allineati a base di nanofibre all'interno del lume, confrontando le strutture con uno e tre film, con risultati in vivo su un ratto con gap nervoso tibiale da 14 mm che hanno rivelato come il design a film singolo comporti una rigenerazione migliorata.

Ko et al. [40] hanno realizzato un tubo con nanofibre elettrofilate orientate casualmente e hanno riempito il lume con fasci di nanofibre elettrofilate allineate (Figura 3.14). Biomolecole come la laminina e il fattore di crescita del nervo sono state incorporate nei riempitivi di nanofibre. I risultati *in vivo* hanno rivelato che gli NGC con riempitivi di fibre si sono comportati meglio degli autoinnesti in termini di reinnervazione muscolare e di test di latenza riflessa da astinenza (Figura 3.15).

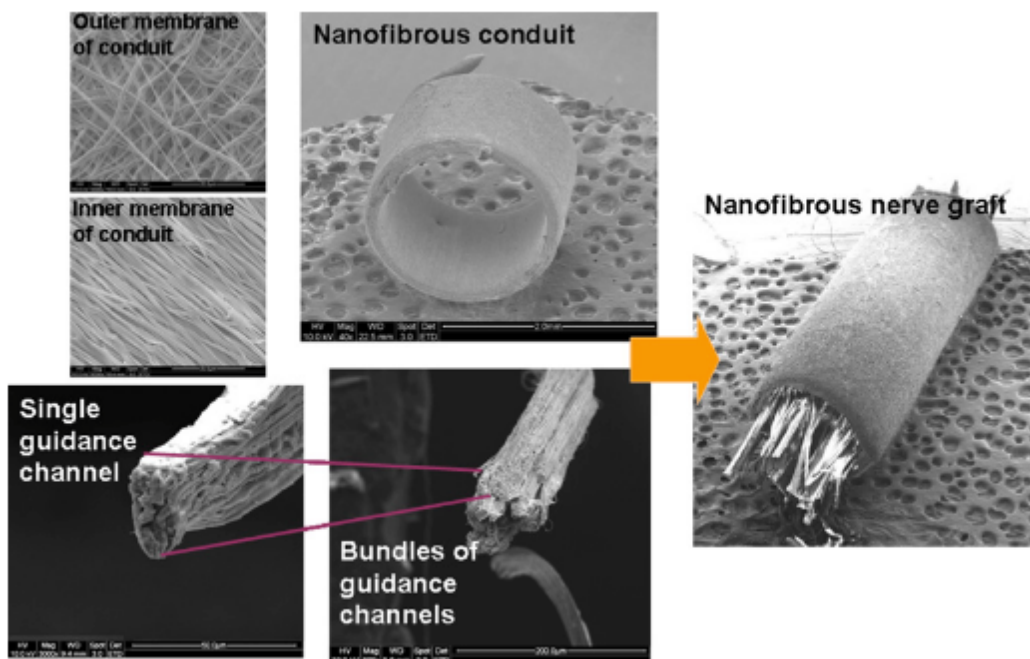


Figura 3.14: Immagini SEM di impianto nanofibroso costituito da un condotto in nanofibra a doppio strato e allineato longitudinalmente secondo i canali di guida delle nanofibre [40].

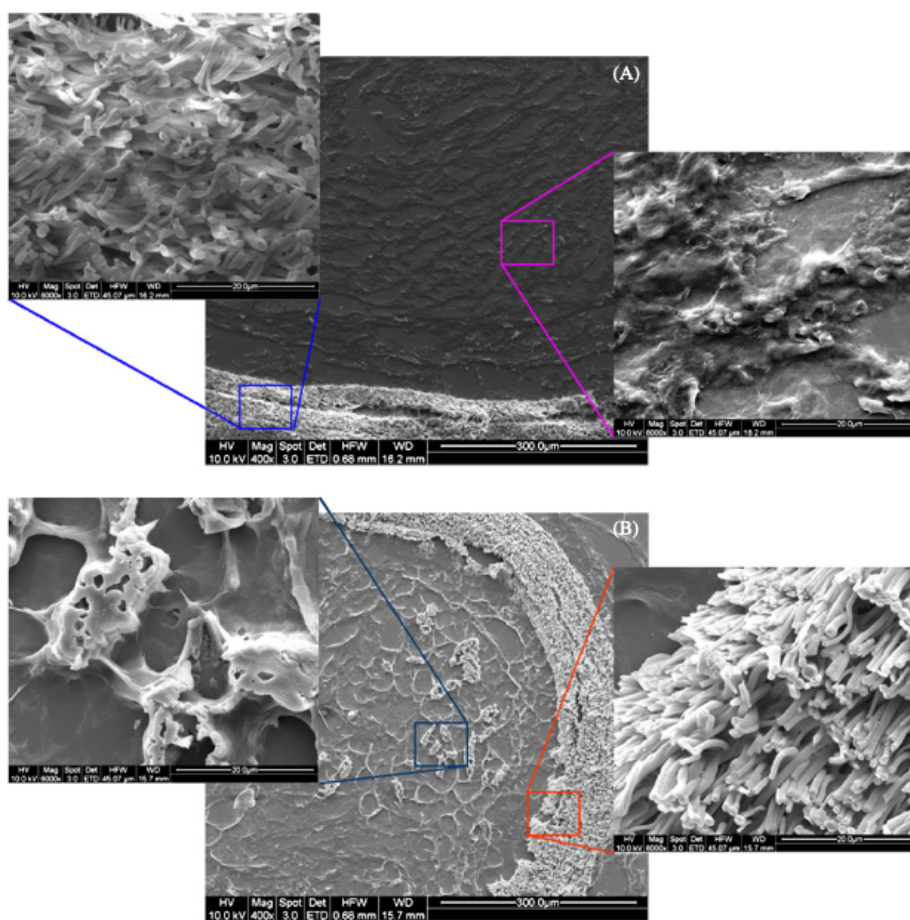


Figura 3.15: Immagini SEM della sezione mediana dell'innesto del nervo nanofibroso: (A) solo condotto nervoso a doppio strato (freccia che punta al cellulare formazione di tessuto che si trova nel lume dell'impianto), (B) condotto nervoso a doppio strato con fili di guida intraluminali (freccie che indicano i fili di guida intraluminali che si trovano nel lume dell'impianto) [40].

Quigley et al. [41] hanno utilizzato una guaina in PLA rivestita con nanofibre PLA elettrofilate come tubo esterno e fibre PLGA incapsulate in un hydrogel di alginato arricchito con neurotrofine come riempitivo.

3.3.5 Design scanalato

Queste neuroguide presentano scanalature sulla superficie interna della struttura tubolare, in quanto si ritiene che le scanalature possano allineare meglio gli assoni durante la fase di rigenerazione. Tuttavia, data la geometria complessa e i problemi di fabbricazione, questo tipo di design non ha avuto grande sviluppo. Rutkowski et al. [42] hanno studiato un progetto con il lume interno micromodellato (Figura 3.16), tuttavia senza rilevare alcuna differenza significativa tra i disegni scanalati e non scanalati esaminati in questo lavoro.

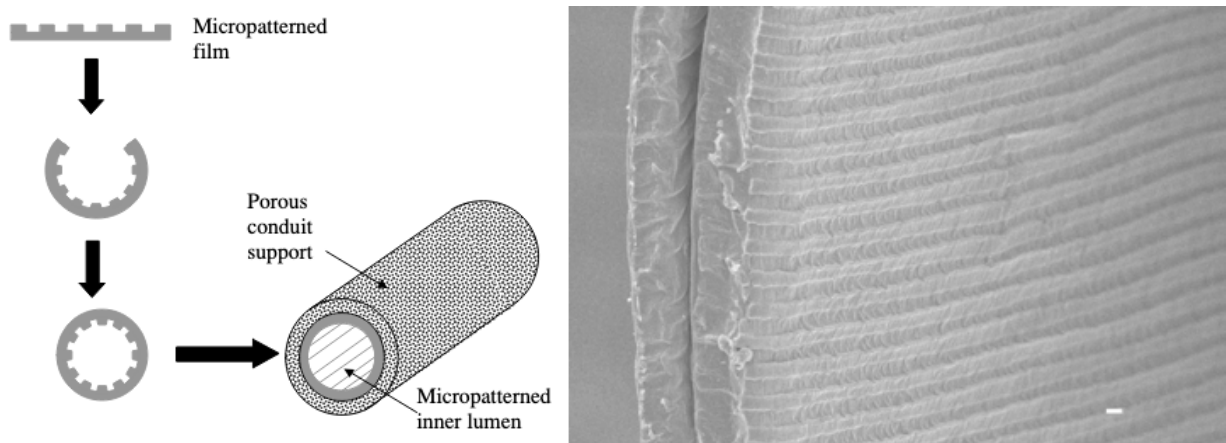


Figura 3.16: (Sinistra) i condotti sono stati generati avvolgendo un substrato piatto attorno ad una bacchetta di vetro e inserendola in un supporto cilindrico poroso. (Destra) si trova invece un'immagine al microscopio elettronico a scansione di un micropatternato, barra della scala di 10 µm [42].

Anche Ni et al. [43] hanno progettato un diverso design scanalato, senza peraltro poter affermare in modo univoco il vantaggio di questo tipo di design (Figura 3.17), ma ottenendo l'incorporazione di fattori di crescita bioattivi (fattore di crescita dei fibroblasti I) nel lume con una migliore rigenerazione del nervo.

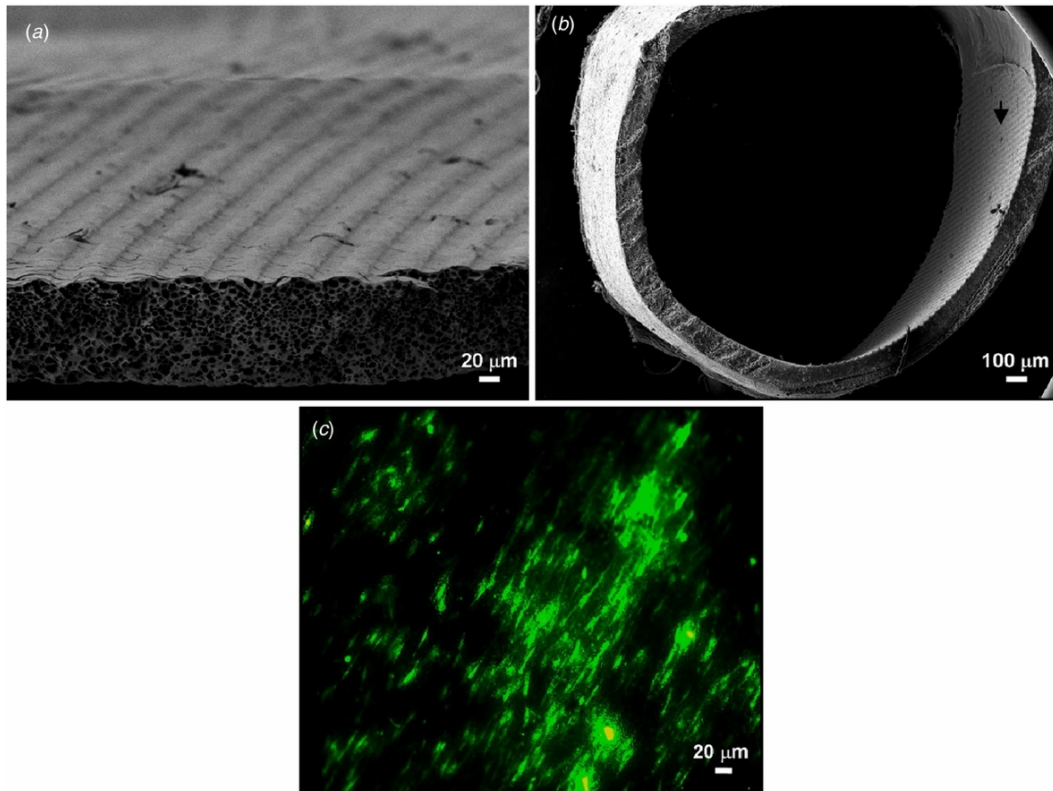


Figura 3.17: Immagini SEM che mostrano (a) microscanalature su PLA; (b) il condotto PLA microporoso, la freccia nera indica il micropattern sulla superficie del lume del condotto; (c) L'allineamento delle NSC sul condotto [43].

3.4 Materiali per la realizzazione di neuroguide

I requisiti generali dei materiali per neuroguide sono biocompatibilità, biodegradabilità, proprietà meccaniche compatibili con quelle dei nervi e conduttività elettrica. Uno dei primi materiali impiegati nella fabbricazione di neuroguide è stato il silicone, grazie alle sue proprietà meccaniche ed alla sua inerzia chimica e biologica; tuttavia questo è un materiale non biodegradabile né permeabile alle grandi molecole e questo ne ha limitato fortemente l'utilizzo per la realizzazione di neuroguide [10]. Attualmente, i materiali utilizzati per la realizzazione di neuroguide possono essere di natura biologica o sintetica. Si riportano nel seguito alcune caratteristiche delle specifiche tipologie di materiali utilizzati.

3.4.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali sono quelli che maggiormente promuovono la rigenerazione assonale grazie al rilascio di NGF e farmaci e alla facilità con cui permettono la proliferazione delle cellule nervose. Pur fornendo un ambiente biomimetico favorevole alle cellule, hanno proprietà meccaniche non sempre adeguate, stabili e riproducibili: questo aspetto è la principale limitazione al loro utilizzo per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti e, in particolare, per la fabbricazione di scaffold 3D.

Collagene

Il collagene è una proteina dei tessuti connettivi dell'uomo e degli animali e rappresenta il componente principale della matrice extracellulare. È costituito da 3 catene polipeptidiche strettamente intrecciate tra loro in modo da formare una tripla elica compatta. Fra 1400 amminoacidi, la struttura primaria è caratterizzata dalla ripetizione di triplette di sequenze glicina-prolina-idrossiprolina: la glicina si colloca all'interno della tripla elica mentre prolina e idrossiprolina favoriscono l'avvolgimento a spirale delle catene (Figura 3.18). Ogni filamento assume una struttura terziaria (caratterizzata da un particolare tipo di elica sinistrorsa); tre singoli filamenti elicodiali si organizzano in una super elica destrorsa che costituisce la superstruttura quaternaria del 'tropocollagene'. I fattori di stabilizzazione delle molecole di collagene sono legati alle interazioni tra le 3 eliche costituenti la super elica, e dovuti a legami ad idrogeno, a legami ionici e a reticolazioni intercatena.

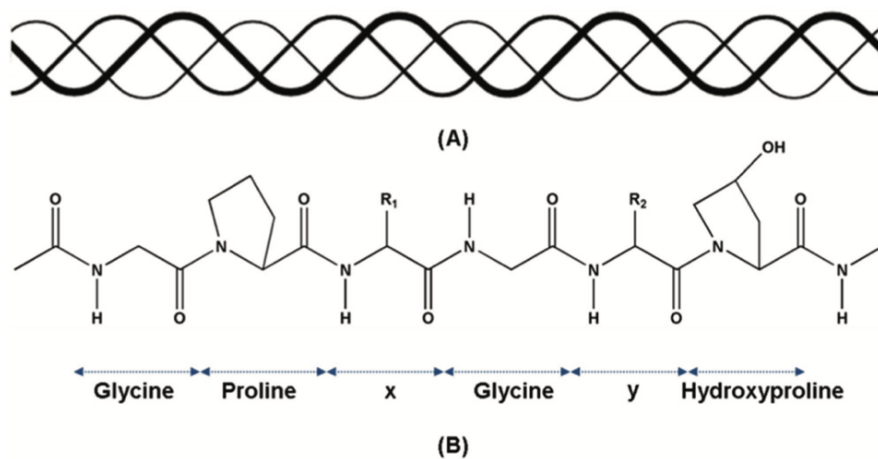


Figura 3.18: Struttura chimica del collagene di tipo I [16].

Le fibre di collagene presentano un'organizzazione strutturale caratteristica sia a livello submicroscopico che microscopico, organizzata in fasci: la singola fibra di collagene è composta da una matassa di molte macrofibrille, ciascuna macrofibrilla è costituita da molte microfibrille, ciascuna delle quali è composta da molte eliche di tropocollagene. Esistono 25 tipi di collagene, tutti caratterizzati dalla presenza di elementi di tropocollagene ma collegati tra loro in modo diverso. Il collagene di tipo I è quello maggiormente impiegato per applicazioni industriali ed è predominante nel nervo periferico intatto. Per questo motivo, il collagene è spesso impiegato per fabbricare neuroguide per la rigenerazione dei nervi periferici. È un materiale naturale biodegradabile con elevata biocompatibilità, bassa antigenicità, noto per promuovere la crescita dei neuriti, la rigenerazione dei nervi ed in quanto aiuta a mantenere le funzioni biologiche delle cellule. Tuttavia, presenta una scarsa resistenza meccanica, un elevato assorbimento all'acqua e una rapida degradazione, che sono caratteristiche non indicate nella rigenerazione dei nervi. Questo materiale è

stato utilizzato come NGC dagli anni '90 e l'FDA ha approvato alcuni dispositivi di guida nervosa che utilizzano collagene di tipo I [10,11]; questi includono fibre inserite all'interno del lume del condotto per fungere da riempitivi e formulazioni di hydrogel per fornire cellule, farmaci o fattori di crescita. Alcuni studi hanno dimostrato che i filamenti di collagene incorporati in NGC realizzati con materiali biodegradabili, aiutano a guidare le nuove fibre nervose poiché migliorano la permeabilità e la superficie esposta al tessuto circostante [16].

Chitosano

Il chitosano (Figura 3.19) è un polisaccaride cationico di origine naturale ottenuto per deacetilazione alcalina della chitina. Nel dettaglio il chitosano è un biopolimero cationico ottenuto per acetilazione alcalina della chitina, cioè per acetilazione di unità monomeriche N-acetilglucosammina unite tra loro da legami glicosidici [15, 46]. La struttura della chitina è simile alla cellulosa con sostituenti amminici e idrossilici su unità monomeriche, dove il gruppo ossidrilico è sostituito da un gruppo metilammide. Il chitosano rappresenta il più grande polisaccaride strutturale a base di azoto costituito da subunità ripetute di glucosio modificato ed è considerato un biomateriale funzionale con un potenziale di applicazione maggiore rispetto alla cellulosa.

Il chitosano gode di 4 proprietà fondamentali:

- è bioattivo: supporta la rigenerazione del nervo in modo equivalente all'autotrapianto;
- è antiadesivo: inibisce il tessuto cicatriziale e la formazione di neuroni;
- è biocompatibile: non induce alcuna risposta immunitaria;
- è antibatterico: limita i rischi di infezione.

Tra le sue proprietà, si possono inoltre citare biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità, non immunogenicità, basso costo e grande disponibilità.

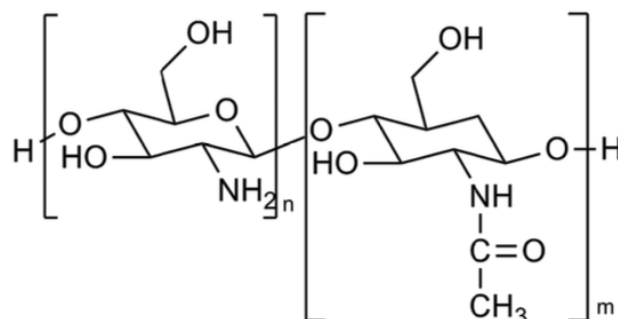


Figura 3.19: Struttura del chitosano [13].

Grazie alla capacità di facilitare l'attaccamento e la proliferazione delle cellule di Schwann, l'adesione e la differenziazione, il chitosano ha un grande potenziale per la rigenerazione dei nervi periferici. Per contro, le caratteristiche strutturali di questo biopolimero non sono adatte per la costruzione di

neuroguide poiché presenta una resistenza meccanica relativamente bassa e quindi, in condizioni fisiologiche, una incapacità a mantenere un determinato assetto strutturale necessario per guidare le nuove fibre. Insieme alla resistenza meccanica, anche la porosità è una proprietà del chitosano che deve essere ottimizzata per ottenere un valore adeguato agli utilizzi previsti [16].

Poliidrossibutirrato e poliidrossivalerato

Il poliidrossibutirrato (Poly-3-HydroxyButyrate, PHB) è un materiale polimerico bioassorbibile che viene sintetizzato da microrganismi mediante l'utilizzo di determinati substrati come fonti di carbonio, in condizioni di nutrienti limitanti. Può essere prodotto mediante fermentazione seguita dall'estrazione con solvente da colture batteriche con substrati di carbonio. Il PHB (Figura 3.20 a) è altamente biodegradabile, non tossico e biocompatibile. Tra le sue caratteristiche più importanti vi sono l'alto grado di cristallinità, la sua insolubilità in acqua e la relativa resistenza alla degradazione idrolitica.

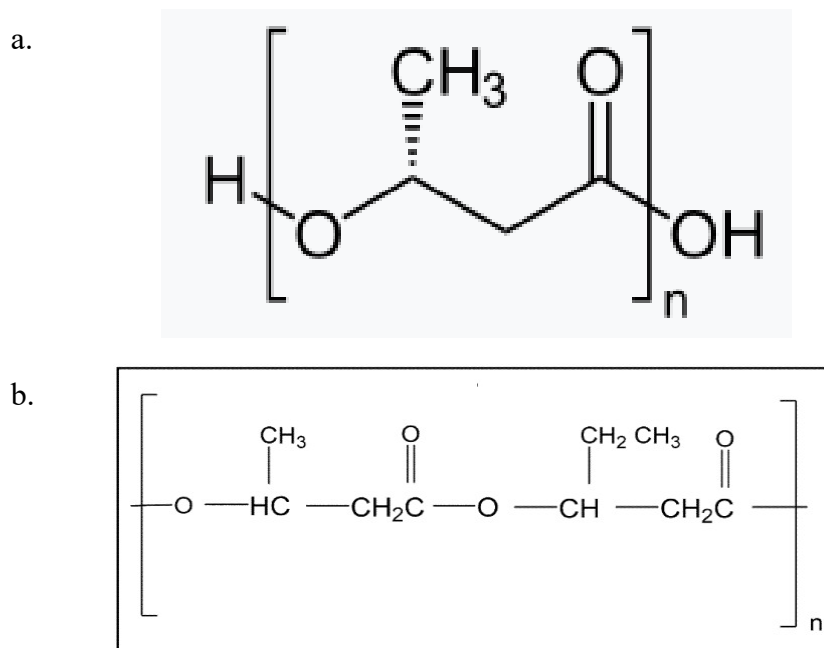


Figura 3.20: (a) Struttura chimica del PVA; (b) struttura chimica del PHBV [45].

Il copolimero del PHB (Figura 3.20 b) con poliidrossivalerato (Poly-3-HydroxyButyrate-co-hydroxyValerate, PHBV) gode di eccellenti proprietà come capacità di assorbimento, origine biologica, bassa citotossicità, piezoelettricità, termoplasticità, biocompatibilità e la biodegradabilità che lo rendono un materiale promettente per molte applicazioni in un'ampia varietà di settori [45]. Nel campo dell'ingegneria dei tessuti, le applicazioni includono l'elaborazione di patch di tessuto, impianti biodegradabili, biosensori e la fabbricazione di scaffold porosi. Tuttavia il suo utilizzo rimane limitato a causa del suo alto costo di produzione.

Alginato

L'alginato è un copolimero polisaccaride anionico di acido β -D-mannuronico (M) legato (1-4) e acido α -L-guluronico (G), estratto da alghe brune [16,46,47]. È un materiale che gode di molte proprietà favorevoli all'utilizzo *in vivo*: è biocompatibile, biodegradabile, sterilizzabile senza degradazione, idrofilo e le sue proprietà fisiche possono essere facilmente modificate variando il rapporto dei monomeri (G e M) e il peso molecolare della catena polimerica.

L'alginato (Figura 3.21) può reticolare con ioni metallici bivalenti, in particolare Ca^{2+} , per formare hydrogel e, nel caso della rigenerazione dei nervi periferici viene utilizzato come gel inserito nel lume del condotto per guidare le nuove fibre nervose. Tuttavia, è riportato in letteratura che la rigenerazione del tessuto nervoso richiede anche il degrado di una certa quantità di gel, per poter aprire spazio nel lume [16]. Questo gel di solito deriva dalla reticolazione di alginato con ioni calcio e la degradazione del gel inizia con la diffusione degli ioni Ca^{2+} , consentendo il graduale scioglimento delle reticolazioni.

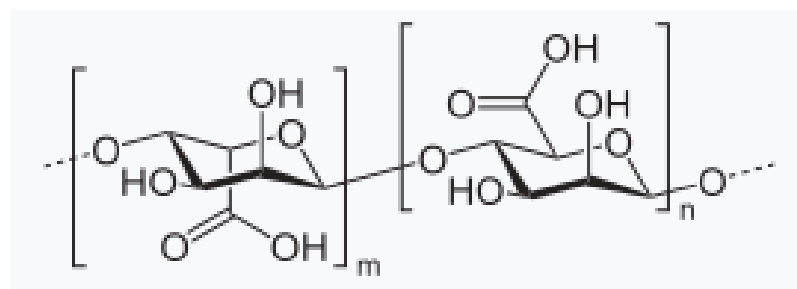


Figura 3.21: Struttura chimica dell'alginato [46].

Fibroina della seta

La fibroina della seta (*Silk Fibroin*, SF) è una proteina naturale, un biopolimero, estratta dai bozzoli di *Bombyx Mori L.* (Silkworm). Gode di molte proprietà tra cui la biodegradabilità, la biocompatibilità e la robusta resistenza meccanica con un'elevata resistenza alla trazione. SF (Figura 3.22) viene solitamente sciolto in solventi a base d'acqua e può essere facilmente ricostruito in una varietà di formati di materiale, tra cui pellicole, stuoie, hydrogel e spugne, mediante varie tecniche di fabbricazione (rivestimento di spin, elettrospinning, liofilizzazione e reticolazione fisica o chimica) [48].

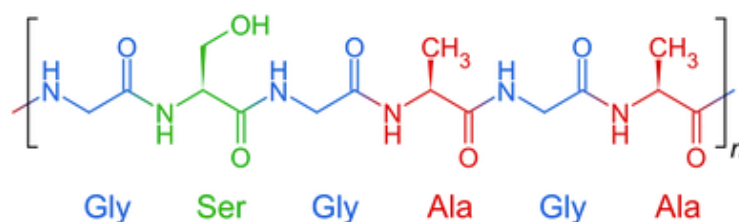


Figura 3.22: Struttura chimica della fibroina [48].

3.4.2 Polimeri sintetici

Nella fabbricazione di neuroguide si sta affermando l'utilizzo di polimeri sintetici biorisorbibili, cioè di materiali che hanno la capacità di degradarsi completamente in vivo entro la fine della rigenerazione, in modo da ridurre la risposta immunitaria dall'organismo e il rischio di effetti avversi. I polimeri sintetici possiedono buone proprietà meccaniche, ma sono meno adatti a favorire la proliferazione cellulare rispetto a quelli di origine biologica. Tali materiali vengono ampiamente utilizzati per fabbricare neuroguide per la rigenerazione dei nervi periferici per la possibilità di modificarne le proprietà meccaniche e di fabbricare strutture 3D con geometria precisa e stabile.

Acido poliglicolico

L'acido poliglicolico (PGA) è un poliesteri alifatico biodegradabile, ricavato dalla polimerizzazione dell'acido glicolico, ed è noto in campo biomedico come materiale per la produzione di fili da sutura. Il PGA (Figura 3.23) essendo un polimero biodegradabile, può essere degradato all'anidride carbonica e all'acqua con un tasso di degradazione relativamente veloce ed i suoi prodotti di degradazione possono essere assorbiti dal corpo umano. Inoltre, ha anche una resistenza meccanica superiore ad altri polimeri biodegradabili.

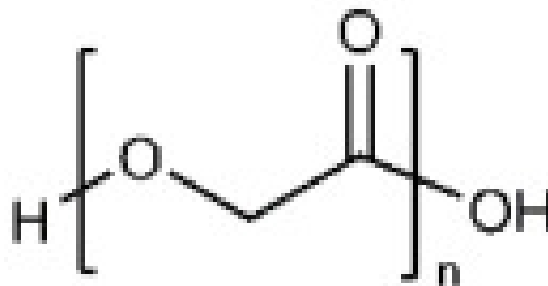


Figura 3.23: Struttura chimica del PGA [49].

Viene assorbito dal corpo umano entro 90 giorni dall'impianto attraverso un meccanismo di idrolisi; tuttavia, in alcuni studi il solo PGA è ritenuto avere un tasso di degradazione troppo rapido, che può essere negativo per le lacune nervose più grandi. Inoltre, in fase di degradazione, i prodotti rilasciati hanno natura acida e portano alla diminuzione del pH nel sito di impianto, il che può innescare una risposta immunitaria. È stato quindi proposto un nuovo approccio che prevede l'uso del PGA non come materiale centrale del condotto nervoso, ma come semplice riempitivo. Buoni risultati sono emersi da questi lavori, portando a concludere che il PGA è un materiale idoneo alla rigenerazione dei nervi, specialmente in combinazione con il chitosano e il collagene [16].

Nel 1999 è stato approvato dalla FDA il primo prodotto commerciale a base di PGA con il nome commerciale di NeuroTube® (Synovis Micro Companies Alliance, Birmingham, AL, USA), indicato

per colmare spazi tra 2 e 4 cm di lunghezza, con un diametro di 2.3–8 mm e tempo di degradazione di circa 3 mesi [11].

Policaprolattone

Il policaprolattone (*PolyCaproLactone*, PCL) è uno dei polimeri sintetici più comunemente utilizzati nella fabbricazione di neuroguide, possiede ottime proprietà meccaniche, facile lavorabilità e compatibilità con altre sostanze. Le neuroguide in PCL, inoltre, offrono segnali topografici agli assoni per la rigenerazione dei nervi periferici. Tuttavia, la scarsa biodegradabilità è la loro principale carenza che ne limita una più ampia applicazione [50].

Acido poli(lattico-co-glicolico)

L'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) è un polimero sintetico ottenuto con una combinazione di acido glicolico e lattico, la cui degradazione può venire controllata regolando il rapporto dei due monomeri PLLA/PGA: maggiore è il contenuto di PGA, più veloce sarà la degradazione [10, 15]. La capacità di variare la tempistica di degradazione consente di ben adattare il materiale ai diversi tipi e dimensioni degli spazi nervosi. Il PLGA è biodegradabile e biocompatibile.

Copolimeri di PLA e PCL

IL PLA-PLC è un copolimero poliesteri a base di poli(acido DL-lattico) e poli(ϵ -caprolattone). Rispetto ad altri materiali biodegradabili è maggiormente idrofobo e può portare a tempi di degradazione più elevati; ma i problemi derivanti dalla sua degradazione in vivo arrecano un minor danno al tessuto circostante perché i prodotti di degradazione sono meno acidi rispetto al PGA o al PLGA. La FDA ha dato l'approvazione a un prodotto commerciale realizzato da questo copoliesteri noto come Neurolac[®] (Next Medical SRL, Como, Italia) che presenta un diametro variabile da 1.5 a 10 mm, una lunghezza di 30 mm e si degrada completamente solo dopo 16 mesi [11].

3.4.3 Materiali compositi a matrice polimerica

Per superare i limiti dei singoli materiali naturali e sintetici, sono stati realizzati anche scaffold compositi naturali-sintetici che possiedono sia buone proprietà meccaniche, sia affinità cellulare. Questi scaffold compositi hanno grandi prospettive di sviluppo nell'ingegneria dei tessuti e nella produzione di neuroguide [10, 15].

Spesso si utilizza una miscela di polimeri naturali e sintetici in cui i polimeri naturali forniscono un ambiente biomimetico per le cellule e i polimeri sintetici forniscono un adeguato supporto strutturale/meccanico. Esempi di polimeri sintetici miscelati tra di loro sono la miscela di PCL e PLGA, quella di PCL e poliurea, quella di PLGA e poliuretano (PU), quella di PLLA e PLGA o

quella PLCL e glicole polipropilenico (PPG) che sono state utilizzate per la fabbricazione di neuroguide.

Sono state realizzate anche miscele polimeriche a tre componenti, più complesse, come poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBV)/P(L-D,L)LA/PLGA e PLA/PLGA/alginato, dimostrando la fattibilità dell'uso di miscele polimeriche che combinano le proprietà uniche di ciascuno dei polimeri costituenti nella fabbricazione di neuroguide biocompatibili, biodegradabili, bioattive e che possiedono proprietà meccaniche appropriate, migliorando la rigenerazione dei nervi periferici [49].

Il composito di collagene e hydrogel a base di acido ialuronico è stato utilizzato con poli-L-lattide-co-caprolattone (PLCL) allineato e studi in vivo in un modello di ratto con lesioni del nervo sciatico hanno dimostrato un miglioramento nella funzione sensoriale rispetto agli autoinnesti nervosi [10]. La fibroina della seta possiede proprietà meccaniche e biocompatibilità relativamente buone per cui gli scaffold elettrofilati di fibroina di seta mescolata con ossido di polietilene (PEO) sono stati proposti come NGC biocompatibile per la rigenerazione dei nervi periferici.

Si sono ancora miscelati collagene e PCL per fabbricare scaffold composti, le SC sono state utilizzate per studi in vitro e lesioni del nervo sciatico lunghe 8 mm dimostrando che gli scaffold di collagene/PCL hanno un effetto migliore rispetto agli scaffold PCL puri sulla rigenerazione dei nervi [15].

3.4.4 Polimeri conduttivi

Numerose sperimentazioni hanno dimostrato che la proliferazione e la crescita delle cellule nervose e l'estensione assonale potrebbero essere migliorate attraverso un'appropriata stimolazione elettrica; in riferimento a questo, la conduttività elettrica dei materiali dello scaffold può essere considerata una proprietà favorevole alla rigenerazione del tessuto neurale [11,15,26,27].

I polimeri conduttori (CP) sono dei materiali plastici in grado di condurre la corrente elettrica, che possiedono buona capacità di adesione cellulare, eccellenti proprietà meccaniche ed idrofilia superficiale regolabile. Possono condizionare direttamente lo stato e la migrazione delle cellule, trasmettere segnali elettrici e produrre una stimolazione elettrica. I polimeri conduttori comuni includono polipirrolo (PPy), politiofene (PTh), polianilina (PANI), poli(3,4-etilendiossiofene) (PEDOT) e poli(p-fenilene-vinilene) (PPV) e possono essere miscelati con altri polimeri per rendere conduttivi gli scaffold. Mentre i rivestimenti conduttivi più diffusi includono: polipirrolo, polianilina, un copolimero multiblocco di PLA e un pentamero di anilina ricoperto di carbossile, nanotubi di carbonio o compositi di ossido di grafene [11].

Il PPy è uno dei polimeri conduttori più importanti impiegati nella realizzazione di neuroguide per la rigenerazione dei nervi periferici. È un polimero riassorbibile che, per la sua capacità di condurre la corrente elettrica, viene impiegato come substrato per la ricrescita di tessuto nervoso. È stato dimostrato che con l'applicazione di una piccola differenza di potenziale si raddoppia l'attività di formazione di tessuto nervoso su supporti costruiti con questo materiale [6]. I numerosi vantaggi del suo utilizzo sono il fatto che può supportare l'adesione cellulare, che ha una buona biocompatibilità e nessuna evidenza di tossicità. Sono presenti però alcuni svantaggi legati al suo lento tasso di degradazione ed alla scarsa solubilità, per questo viene solitamente incorporato in materiali compositi. Ad esempio, utilizzando la polimerizzazione in emulsione, Xu et al. [51] hanno preparato compositi conduttivi Ppy/PDLLA riscontrando che il materiale risultante era in grado di supportare la ricrescita dei neuriti in modo simile a quello dell'innesto autologo.

Yang et al. [52] hanno esaminato un gran numero di polimeri per giungere alla rigenerazione dei nervi periferici con condotti nervosi piezoelettrici; tra questi il fluoruro di polivinilidene (PVDF) è stato individuato come un polimero promettente per fabbricare neuroguide. Il PVDF è un materiale piezoelettrico che possiede proprietà particolari, tra cui la grande resistenza chimica, la stabilità termica, la grande biocompatibilità e la capacità di autorigenerazione. È stato dimostrato che il PVDF migliora la rigenerazione assonale per le lesioni del nervo centrale e PNI, per contro una seconda procedura chirurgica di asportazione potrebbe essere inevitabile a causa della modesta biodegradabilità del materiale.

Il grafene (Gr) e i suoi derivati possiedono proprietà meccaniche e conduttività elettrica superiori. Il grafene può venire combinato con altri polimeri per migliorarne le proprietà meccaniche ed elettriche, ad esempio l'ossido di grafene (GO), che è un materiale non conduttivo ma che possiede una maggiore compatibilità con i biomateriali polimerici ed è più facile da maneggiare con una dispersione in soluzione superiore rispetto al Gr. Lo studio di Qian et al. [53] descrive lo sviluppo di un nanoscaffold GO/PCL prodotto utilizzando il metodo dello stampaggio di integrazione.

I gruppi carbossilici dell'ossido di grafene carbossilico (cGO) possono essere facilmente manovrati chimicamente e hanno una elevata dispersione nelle soluzioni rispetto al grafene mentre i nanotubi di carbonio possiedono una migliore idrofilia superficiale rispetto a GO, ma l'applicazione nella rigenerazione dei nervi periferici è limitata a causa dell'agglomerazione e della debole compatibilità dei nanotubi di carbonio.

3.5 Tecniche di fabbricazione delle neuroguide

Le caratteristiche specifiche richieste per le neuroguide (Figura 3.24), quali le indicazioni topografiche per l'allineamento assonale ed i vincoli dimensionali impongono specifiche metodologie

produttive diverse da quelle utilizzate per i classici scaffold, come lo stampaggio ad iniezione che non è una tecnica comune nella fabbricazione degli scaffold di ingegneria tissutale, ma che è invece ampiamente utilizzato per la produzione di NGC multicanale.

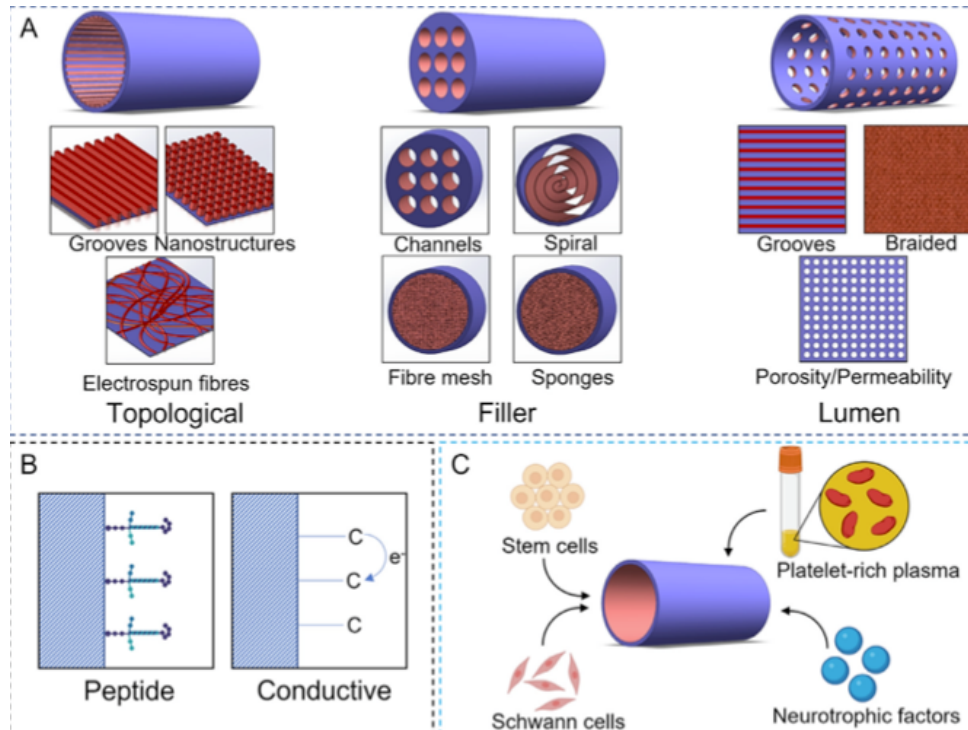


Figura 3.24: Approcci al design del condotto nervoso [11].

In Figura 3.24 le modifiche al condotto della neuroguida vuota sono raggruppate in disegni topologici, riempitivi e pareti di lume. Le modifiche includono il pattern di superficie (scanalature, pilastri, fibre di superficie), materiali di riempimento (spugne, fibre, canali) e parete luminale (porosità, permeabilità, treccia, caratteristiche anisotropiche). Tutti questi possono essere combinati con funzionalizzazione della superficie (peptidi, rivestimenti conduttivi) per migliorare l'attaccamento e la migrazione dei neuroni in superficie oltre a fattori biologici e fattori neurotrofici (come il fattore di crescita nervosa) per formare la neuroguida.

Allo stesso tempo, sono state apportate modifiche al processo di elettrofilatura, al fine di ottenere fibre allineate che fungano anche da segnali topografici negli NGC per l'allineamento diretto dei neuroni [10,28].

Analizzeremo quindi nel dettaglio i metodi di produzione delle neuroguide (Figura 3.25): micro-patterning, stampaggio a iniezione, congelamento unidirezionale, elettrofilatura, stampa 3D a getto elettroidrodinamico (EHD-jet) e stampa 3D basata sull'elaborazione della luce digitale (DLP).

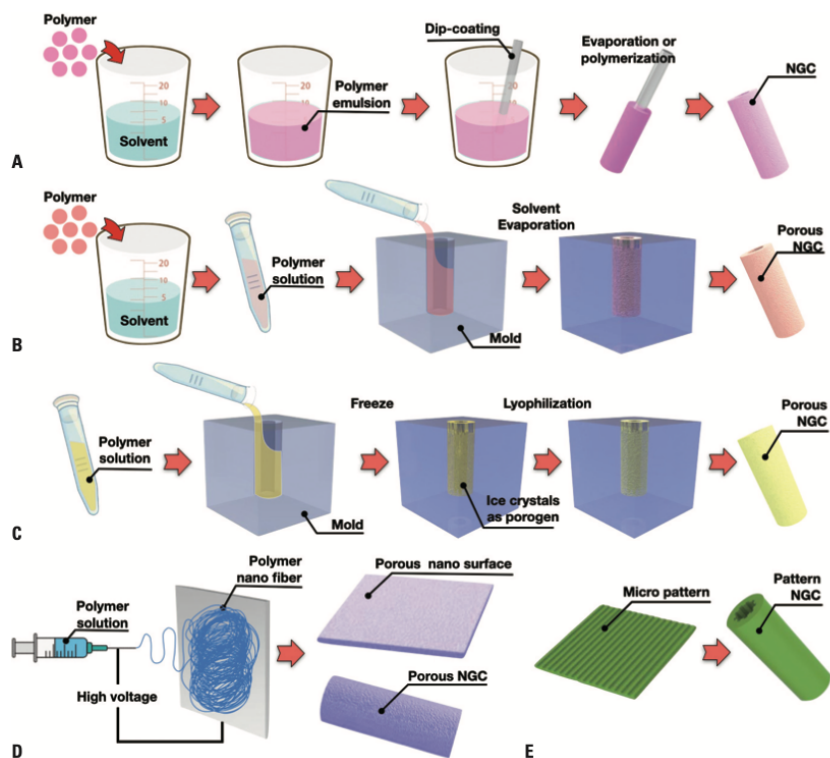


Figura 3.25: Tecniche comuni utilizzate per la fabbricazione di NGC: (A) coating dip, (B) casting solvente, (C) freeze drying, (D) elettrospinning, (E) micro-patterning [54].

3.4.1 Micro-patterning

La tecnica di micro-patterning viene utilizzata per fabbricare neuroguide con disegni scanalati (o vari design interni) per l'allineamento assonale. Il primo processo della tecnica di micropatterning è la fabbricazione di una membrana micropattata. Dopo la fabbricazione della membrana a micropattern, la membrana a micropattern viene arrotolata per fabbricare la neuroguida. Rutkowski et al. [42] hanno realizzato una neuroguida multistrato attraverso tecniche di trasferimento e il metodo di perdita di sale: la soluzione di PVA viene dapprima rivestita per rotazione con una base di silicio micro modellato che funge da strato sacrificale, una volta che il PVA si è rappreso, il PDLLA viene filato sul dado. Il micropattern consisteva in una larghezza di 10 μm , profondità di 4,3 μm , spaziatura di 10 μm e lunghezza di 4 cm ed è stato fabbricato usando PDLLA. Immerso in acqua, lo strato di PVA si dissolve per lasciando una pellicola PDLLA micro-disegnata, che viene quindi arrotolata e inserita nel condotto del lume interno micro-disegnato. L'esecuzione della stampa in silicio e quarzo mediante incisione con ioni reattivi rappresenta la fase critica di questo processo.

Ni et al. [43] hanno utilizzato tecniche fotolitografiche (metodi di stampaggio e separazione di fase) per preparare uno stampo in vetro micromodellato che funge da stampo principale, ottenendo da questo uno stampo sub-master in PDMS. Dallo stampo sub-master PDMS, il modello viene poi trasferito al PLA. I problemi di fabbricazione di stampi master ed il processo multifase sono i punti critici di questa tecnica.

3.4.2 Stampa ad iniezione

La tecnica di stampa ad iniezione (*injection molding*) viene utilizzata per fabbricare neuroguide con canali intraluminari, mediante un processo di formatura che utilizza degli stampi nei quali vengono versati materiali come le resine sintetiche (plastiche) dopo essere state fuse, poi gli stampi vengono raffreddati provocando l'indurimento del materiale che assume la forma progettata, quindi vengono estratti e rifiniti i prodotti stampati

Zeng et al. [30] hanno utilizzato un sistema di stampaggio a iniezione ibrido che combina lo stampaggio a iniezione a bassa pressione con la separazione di fase indotta termicamente per fabbricare un NGC multicanale. Il vantaggio di questo sistema è l'elevata porosità del condotto (> 90%) risultante dall'incorporazione del processo di separazione di fase, sono però presenti alcune limitazioni all'utilizzo di questo processo, fra cui la procedura divisa in più fasi e la possibile citotossicità dovuta a particelle residue di muffe o lubrificanti.

3.4.3 Congelamento unidirezionale

La tecnica di congelamento unidirezionale (*unidirectional freezing*) viene utilizzata unicamente per la fabbricazione di neuroguide con canali intraluminari allineati longitudinalmente.

La descrizione dettagliata di questo processo è riportata da Bozkurt et al. [55]: la soluzione polimerica (in questo caso collagene) viene raffreddata e congelata utilizzando un gradiente di temperatura ben definita ed una velocità di raffreddamento costante con due dissipatori di calore posti rispettivamente sopra e sotto il campione che inducono il gradiente di temperatura. È stato attivato quindi un flusso di calore unidirezionale avente la stessa direzione del gradiente di temperatura e stabilendo temperature omogenee nei rispettivi dissipatori di calore. Impostando parametri di congelamento appropriati, il fronte di ghiaccio destabilizzato può essere scomposto in una morfologia di cristalli di ghiaccio dendritico senza ramificazioni laterali (morfologia a forma di dito) che funge da stampo per il collagene. Il congelamento unidirezionale è seguito quindi dal tradizionale processo di liofilizzazione per ottenere NGC polimerici multicanale; l'intero processo però è molto laborioso, dispendioso in termini di tempo, ed a bassa produttività.

3.4.4 Elettrofilatura

La tecnica di elettrofilatura (*electrospinning*) rappresenta uno dei metodi più comunemente utilizzati per la fabbricazione di neuroguide e consiste in un processo produttivo elettrodinamico di produzione di fibre con diametri estremamente ridotti, solitamente inferiori al micron, ma anche di pochi nanometri. Si estraggono nanofibre applicando un campo elettrico (alta tensione) a una soluzione

polimerica (Figura 3.26). Nel dettaglio il processo prevede un'elevata tensione elettrica tra la punta dell'ugello e il substrato, con aspirazione delle fibre polimeriche continue all'ugello [10].

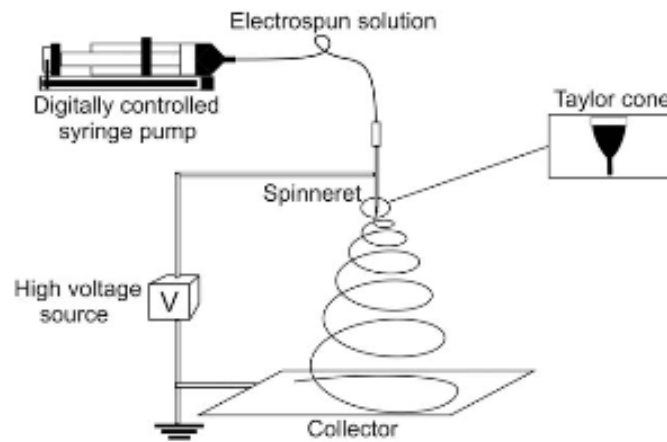


Figura 3.26: Schema di formazione delle fibre tramite processo di elettrofilatura [65].

Il getto polimerico che si genera in questo modo viene accelerato ed allungato da un campo elettrostatico esterno e durante il percorso in aria verso il collettore si stira ed assottiglia. Nel frattempo il solvente evapora, provocando la solidificazione e la deposizione di nanofibre solide su un substrato disposto sul collettore. Grazie alla riduzione delle dimensioni in scala nanometrica, le fibre ottenute hanno elevati area superficiale specifica, porosità e modulo elastico.

Questa particolare tecnica è ampiamente utilizzata per la fabbricazione di NGC in quanto l'architettura nanofibrosa degli scaffold ottenuti presenta un rapporto superficie/volume maggiore per le cellule e la gamma di materiali che possono essere lavorati è notevolmente ampia. Non mancano però alcuni limiti, come il fatto che le fibre prodotte da questo processo siano orientate in maniera casuale e altamente disordinate, mentre sarebbero preferibili fibre allineate.

Yucel et al. [56] hanno modificato il collettore, che rappresenta il substrato su cui si depositano le fibre con due aste metalliche parallele distanziate di 40 mm l'una dall'altra: le fibre si depositano tra le due aste e risultano parallele alle stesse. Jenkins et al. [33] hanno utilizzato una configurazione simile con il collettore costituito da due elettrodi di filo di rame distanziati di 35 mm l'uno dall'altro. Dini et al. [32] hanno utilizzato un mandrino rotante di 6 cm di diametro come collettore per ottenere fibre allineate il cui allineamento viene controllato dalla velocità di rotazione del mandrino mantenuta costante durante il processo di elettrofilatura.

Kim et al. [38] hanno ideato una configurazione di elettrofilatura in grado di fabbricare fibre sia allineate che casuali sullo stesso cuscinetto elettrofilato in un unico passaggio. Il collettore risulta costituito da un mandrino rotante conduttivo con fili di rame fissati orizzontalmente su di esso e nastri di cellophan fissati orizzontalmente e verticalmente sui fili di rame. Le fibre allineate si formano nella regione del collettore del mandrino dove sono presenti i fili di rame mentre nelle altre regioni si

formano le fibre orientate casualmente. Controllando il posizionamento dei fili di rame sul mandrino, è possibile modellare diversi tipi di regioni fibrose, allineate e casuali su un singolo campione elettrofilato.

3.4.5 Stampa 3D a getto elettrodrodinamico (EHD-jet)

La tecnica di stampa 3D a getto elettrodrodinamico EHD-jet (*electrohydrodynamic jet 3D printing*) è uno dei metodi adottati per superare gli inconvenienti dell'elettrofilatura (Figura 3.27).

Il principale vantaggio di questa tecnica è che tutte le proprietà dello scaffold, ovvero il diametro della fibra, la dimensione dei pori, la porosità e l'allineamento delle fibre, possono essere controllate regolando i parametri di processo.

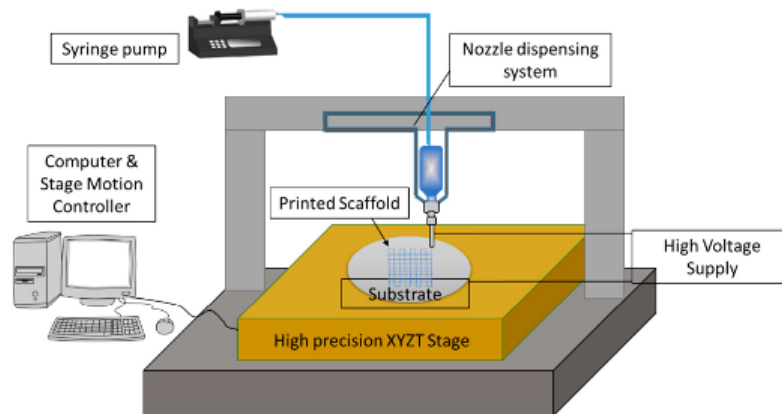


Figura 3.27: Diagramma schematico di una tecnica di stampa EHD-3D [28].

Vijayavenkataraman et al. [28] hanno fabbricato e testato scaffold stampati in 3D EHD-jet con cinque diverse dimensioni dei pori ($125\ \mu\text{m}$ – $550\ \mu\text{m}$) e porosità (65%–88%) osservando che gli NGC con una dimensione dei pori di $125\ \mu\text{m}$ soddisfano i requisiti di una struttura NGC ottimale con una porosità maggiore del 60%, proprietà meccaniche più vicine a quelle dei nervi periferici nativi e un tasso di degradazione ottimale corrispondente al tasso di rigenerazione del nervo post-lesione. Ciò è stato confermato anche dagli studi di colture cellulari in vitro. Sono state fabbricate anche neuroguide conduttive e biodegradabili utilizzando questa tecnica di stampa, ad esempio con PCL/Poly (acido acrilico) stampati in 3D con EHD-jet, PCL/ossido di grafene ridotto e PCL/PPy [10].

3.4.6 Stampa 3D basata sull'elaborazione della luce digitale

La tecnica di stampa 3D basata sull'elaborazione della luce digitale (DLP) (*Digital light processing-based 3D printing*) rappresenta un metodo di fabbricazione rapida e continua di neuroguide. È una tecnologia di stampa 3D in cui la luce viene utilizzata per la polimerizzazione dei fotopolimeri. Questa tecnica è molto simile alla stereolitografia (SLA) con un'unica differenza significativa: le macchine

SLA utilizzano un laser che traccia lo strato, mentre la macchina DLP utilizza una sorgente di luce proiettata per polimerizzare l'intero strato in una volta sola. Zhu et al. [57] hanno utilizzato la stampa 3D basata su DLP per fabbricare una varietà di design di neuroguide, inclusa una guida facciale ramificata a grandezza naturale.

3.5 Neuroguide in commercio: stato dell'arte

Sono riassunte nella tabella sottostante (Tabella 3.2) i nomi certificati FDA di neuroguide sotto il codice del prodotto "JXI", modificato dal database FDA 510 (k) in ordine di data di approvazione.

Product name	Material	510(k) Number	Sterilization Method	Structure	Intended repair length	Company
VersaWrap Nerve Protector	Calcium alginate and hyaluronic acid hydrogel	K201631	Electron Beam	Resorbable, flexible, thin sheet	"no substantial loss of nerve tissue"	Alafair Biosciences, Austin, TX, USA
NeuroShield™	Chitosan	K190246	Ethylene Oxide	Porous, transparent membrane	"no gap" or "gap closure achieved by flexion of the extremity"	Monarch Biomaterials GmbH, Switzerland
Reaxon Plus	Chitosan	K180222 K143711	Ethylene Oxide	Transparent hollow tube	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Medovent GmbH, Mainz, Germany
NeuroFlex™ (Flexible Collagen Nerve Cuff)	Bovine-derived Collagen Type I	K131541	Gamma Irradiation	Flexible, semi-permeable, corrugated, tubular collagen matrix	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA
Reinforced Flexible Collagen Nerve Cuff	Bovine-derived Collagen Type I/unspecified biodegradable polymer	K170656	Ethylene Oxide	Tubular collagen matrix, circumferentially supported with polymer filament	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA
NeuraGen: 3D and 3D Nerve Guide Matrix	Bovine-derived Collagen Type I + porous inner matrix collagen/glycosaminoglycan (chondroitin-6-sulfate)	K163457 K130557	Unspecified	Semipermeable, fibrillar structure of the collagen	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ, USA
AxoGuard™ Nerve Connector	Porcine small intestine	K162741	Ethylene Oxide	Resorbable, permeable wrap	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Cook Biotech Products, West Lafayette, IN, USA
Nerbridge™	Porcine-derived collagen/Polyglycolic acid	K152967	Ethylene Oxide	Resorbable, semipermeable, tubular membrane with porous collagen filler	"no gap" or "gap closure achieved by flexion of the extremity"	Toyoba Co., Ltd. Osaka, Japan
Cova Ortho-nerve Resorbable Collagen Membrane Neurolac™	Porcine-derived Collagen	K103081	Gamma Irradiation	Resorbable, membrane	"no gap" or "gap closure achieved by flexion of the extremity"	Biom'Up Advance Biomaterials, Saint-Priest, France
Salutunnel™	Poly(D,L-lactide-co-ε-caprolactone)	K112267 K050573 K032115 K100382	Ethylene Oxide	Synthetic and transparent PLCL tubular structure	"no substantial loss of nerve tissue"	Polyganics BV, Groningen, Netherlands
NeuroMend™ (Collagen Nerve wrap)	Polyvinyl alcohol hydrogel	K100382	Gamma Irradiation	Non-biodegradable PVA tubular structure, with a longitudinal slit	"no substantial loss of nerve tissue"	SaluMedica LCC, Atlanta, GA, USA
NeuroMend™ (Collagen Nerve wrap)	Bovine-derived Collagen Type I	K060952	Unspecified	Semipermeable collagen wrap designed to unroll and self-curl	"no substantial loss of nerve tissue" and "gap closure achieved by flexion of the extremity"	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA
NeuraWrap™	Bovine-derived Collagen Type I	K041620	Unspecified	Longitudinal slit in the tubular wall structure	"no substantial loss of nerve tissue"	Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ, USA
NeuroMatrix™ (Collagen Nerve Cuff)	Bovine-derived Collagen Type I	K012814	Gamma Irradiation	Semipermeable tubular collagen matrix	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA
Neurogen Nerve Guide	Collagen (type/species unspecified)	K011168	Unspecified	Porous, absorbable, collagen tube	"gap closure achieved by flexion of the extremity"	Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ, USA
SaluMedica Nerve Cuff	Polyvinyl alcohol hydrogel	K002098	Electron Beam	Flexible tubular sheath	"no substantial loss of nerve tissue" and "gap closure achieved by flexion of the extremity"	SaluMedica LCC, Atlanta, GA, USA
Neurotube®	Polyglycolic acid, PGA	K983007	Unspecified	Absorbable woven PGA Mesh Tube	≥ 8 mm and ≤ 30 mm	Synovis Micro Companies Alliance, Birmingham, AL, USA
Fastube Nerve Regeneration Device	Not specified	K850785	Unspecified	Unspecified	Not available	Research Medical, Inc., West Midvale, UT, USA
Non-510(k) clearance Avance Nerve Graft	Human decellularized nerve allograft	N/A	Gamma Irradiation	Human decellularized nerve allograft	≤ 70 mm	Axogen Corporation, FL, USA

Tabella 3.2: Elenco neuroguide approvate FDA [11].

3.5.1 NeuroBox

Sviluppato nel 2006 e sperimentato in vivo, questo dispositivo rappresenta un nuovo concetto di neuro-guida a “doppia valva”, non degradabile e rigido, che non richiede l’uso di alcun punto di sutura e rende possibile l’impiego di colla cianoacrilica, infatti nel NeuroBox[®] la tradizionale guida nervosa cilindrica è costituita da una doppia valva pluricamera all’interno della quale sono riconoscibili tre compartimenti principali (Figura 3.28):

- un alloggiamento per i monconi nervosi (uno prossimale ed uno distale);
- un compartimento per la colla acrilica (uno prossimale ed uno distale);
- una camera di rigenerazione assonale.

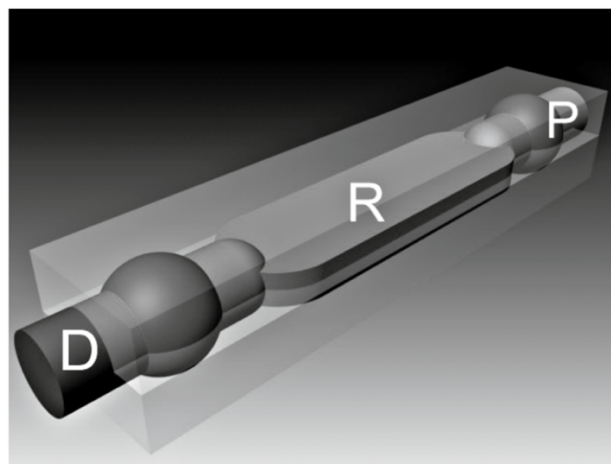


Figura 3.28: Schema della guida NeuroBox che mostra gli alloggiamenti per il moncone prossimale (P) e distale (D) e la camera di rigenerazione assonale (R) [18].

L’impiego della colla acrilica permette la polimerizzazione di un quantitativo minimo dopo che i monconi nervosi siano stati accomodati all’interno dei rispettivi alloggiamenti. Nella camera di rigenerazione il contingente di fibre in rigenerazione dal moncone prossimale è distribuito su una vasta superficie piana e protetto dalla rigidità della struttura, all’interno di una camera sono possibili vari trattamenti di micro e nano-tecnologie volti a costituire una superficie ingegnerizzata.

3.5.2 Integra LifeSciences

L’Integra - LifeSciences Corp, produce elementi di tecnologia rigenerativa di base (strumenti chirurgici, prodotti neurochirurgici e prodotti avanzati per la cura delle ferite) e risulta leader in neurochirurgia offrendo un’ampia varietà di prodotti e soluzioni per l’accesso e la riparazione durale, la gestione del liquido cerebrospinale e l’assistenza neuro-critica. La tecnologia di base della guida per nervi NeuroGen[®] e della protezione per nervi NeuraWrap[®] si fonda sull’impianto Ultra-Pure Collagen che è stato progettato specificatamente per isolare e fornire un ambiente ideale per la crescita delle cellule di Schwann e favorire l’estensione degli assoni, gli elementi responsabili del recupero

funzionale dopo una lesione nervosa (Figura 3.29). Questa tecnologia riduce al minimo le preoccupazioni legate ai patogeni e all'immuno-rigetto, consentendo un esito positivo della riparazione del nervo.

La guida è costituita da tre elementi fondamentali:

- strato interno poroso: garantisce la crescita cellulare verso l'interno e la corretta diffusione dei nutrienti, consente il riassorbimento controllato ed offre una adeguata resistenza meccanica alla compressione mediante il tessuto circostante;
- membrana interna semipermeabile: consente il passaggio di piccole molecole (acqua, ioni, metaboliti, nutrienti) per favorire la rigenerazione del nervo impedendo la fuoriuscita di fattori di crescita endogeni (come ad es. fattore di crescita dei nervi);
- membrana interna uniforme: offre un ambiente idoneo all'organizzazione della crescita assonale e consente un agevole inserimento del moncone del nervo all'interno del tubo.

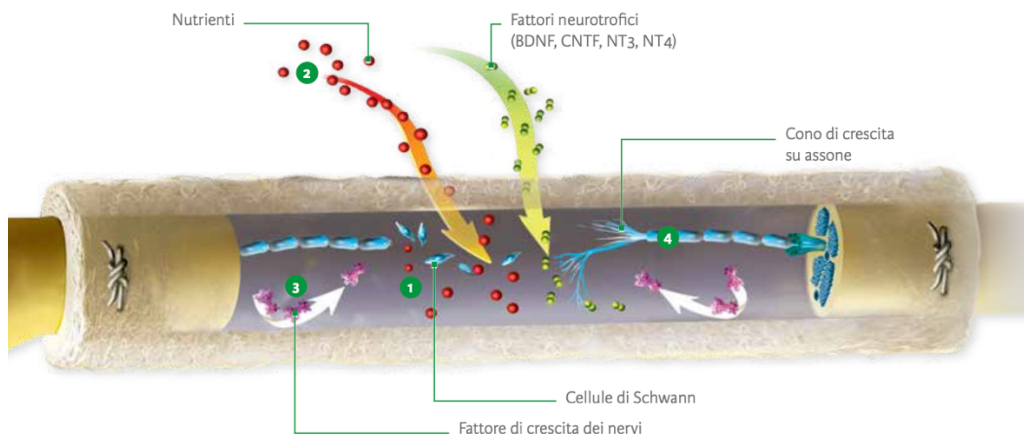


Figura 3.29: Principio di rigenerazione nel nervo [58].

La guida per nervi NeuroGen[®] e la protezione per nervi NeuraWrap[®] sono formati da collagene di tipo I semipermeabile, poroso, altamente purificato, biocompatibile, completamente assorbibile tramite le normali vie metaboliche, flessibile, duttile e resistente alla compressione con una struttura aperta per facilitare la collocazione della sutura.

3.5.2.1 Guida per nervi NeuraGen

La guida per nervi NeuraGen[®] ('Neurogen Nerve Guide' [59, 60]) è un impianto riassorbibile per la rigenerazione delle discontinuità nervose periferiche, è costituito da un tubo in collagene progettato per fungere da interfaccia tra il nervo e il tessuto circostante. Fornisce un ambiente protettivo per la rigenerazione dei nervi e costituisce un canale per la crescita assonale attraverso la porzione mancante del nervo, quindi per la crescita assonale attraverso uno spazio nervoso. La membrana semipermeabile in collagene di tipo 1 consente un riassorbimento controllato, un'adeguata diffusione

dei nutrienti e la ritenzione del fattore di crescita nervoso rappresentativo. La guida per nervi NeuraGen[®] (Figura 3.30) rappresenta una valida soluzione per ricongiungere nervi periferici separati ed elimina la necessità di un innesto di nervo corto sulla parte mancante e la procedura di prelievo di nervo con le potenziali complicazioni inerenti al sito donatore.

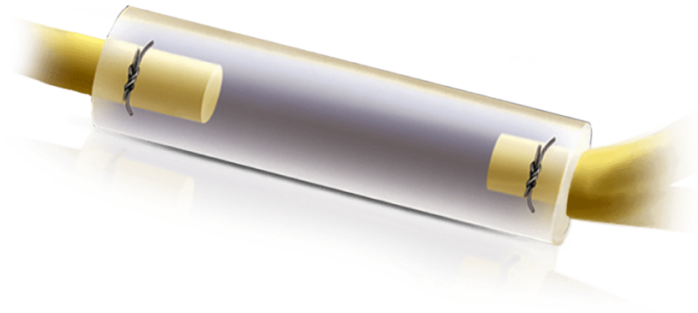


Figura 3.30: Guida per nervi NeuroGen [60].

La guida NeuroGen[®] è applicabile per la riparazione di discontinuità del nervo periferico quando è possibile chiudere lo spazio mediante la flessione dell'estremità, questo particolare tipo di guida risulta invece controindicato per pazienti con un'anamnesi nota di ipersensibilità a materiali di origine bovina. Le caratteristiche specifiche delle guide NeuraGen dell'Integra sono riassunte nella tabella seguente (Figura 3.31).

Codice	Dimensione		Dimensioni effettive (1 unità/confezione)
	Diametro interno	Lunghezza	
PNG130	1,5 mm	3 cm	○
PNG220	2 mm	2 cm	○
PNG230	2 mm	3 cm	
PNG320	3 mm	2 cm	○
PNG330	3 mm	3 cm	
PNG420	4 mm	2 cm	○
PNG430	4 mm	3 cm	
PNG520	5 mm	2 cm	○
PNG530	5 mm	3 cm	
PNG620	6 mm	2 cm	○
PNG630	6 mm	3 cm	
PNG720	7 mm	2 cm	○
PNG730	7 mm	3 cm	

Prodotti disponibili nelle lunghezze seguenti:

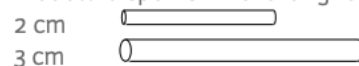


Figura 3.31: Caratteristiche della NeuraGen di Integra [E].

Relativamente a questo tipo di impianto, l'azienda Integra ha eseguito studi sia su animali che su uomo.

3.5.2.2 Protettore per nervi NeuraWrap

La protezione per nervi NeuraWrap[®] ('Neura Wrap Nerve Protector' [59, 61]) è un impianto in collagene riassorbibile che fornisce un rivestimento non costringitivo per nervi periferici lesionati, progettato per la protezione dell'ambiente neurale e per fungere da interfaccia tra il nervo e il tessuto circostante (Figura 3.32).

La parete del canale presenta un'incisione longitudinale che consente di divaricare la protezione per un facile collocamento sul nervo lesionato. Questo particolare tipo di protezione è progettato per resistere alla compressione da parte dei tessuti circostanti e per escludere la crescita di tessuto cicatriziale, in modo da ridurre al minimo le potenzialità di formazione di neuroma e il conseguente intrappolamento del nervo. Ricopre e mantiene la chiusura dopo il posizionamento intorno al nervo e rimane in sede durante la fase attiva della guarigione del tessuto.



Figura 3.32: Protezione per nervi NeuraWrap di Integra [61].

NeuroWrap[®] è adottabile per la gestione delle lesioni di nervi periferici in cui non si sia verificata una perdita di tessuto nervoso sostanziale ed è invece controindicato per pazienti con un'anamnesi nota di ipersensibilità a materiali di origine bovina.

Informazioni specifiche della protezione per nervi NeuraWrap[®] dell'Integra sono riassunte nella tabella sottostante (Figura 3.33).

Codice	Dimensione		Dimensioni effettive (1 unità / confezione)
	Diametro interno	Lunghezza	
NW320	3 mm	2 cm	
NW340	3 mm	4 cm	
NW520	5 mm	2 cm	
NW540	5 mm	4 cm	
NW720	7 mm	2 cm	
NW740	7 mm	4 cm	
NW1020	10 mm	2 cm	
NW1040	10 mm	4 cm	

Prodotti disponibili nelle lunghezze seguenti:



Figura 3.33: Caratteristiche della NeuraWrap di Integra [61].

3.5.3 KeriMedical Reaxon

L'azienda KeriMedical è nota nell'ambiente della rigenerazione nervosa per i suoi tubi di crescita nervosa e di protezione in chitosano, dispositivi che sono destinati alla riparazione delle discontinuità dei nervi periferici e che si dividono in due tipologie: per protezione e per crescita nervosa. Il chitosano che viene utilizzata nella produzione dei tubi Reaxon® è chitina di origine naturale.

I tubi di protezione chiamati “Reaxon® direct – ultra flexible protection use tube” sono altamente flessibili, presentano pareti sottili e sono destinati alla riparazione delle discontinuità dei nervi periferici in pazienti con nervi completamente separati trattati mediante sutura end-to-end. I tubi di crescita nervosa chiamati “Reaxon® nerve guide – nerve regrowth tube” sono flessibili, stabili per più di 18 mesi e non si deformano. Sono destinati alla riparazione delle discontinuità dei nervi periferici in pazienti con nervi completamente separati per una lunghezza del difetto nervoso di ≤ 26 mm. Nelle tabelle seguenti (Figura 3.34, Figura 3.35) sono indicate le caratteristiche dei vari dispositivi, si osserva che il diametro indicato è allo stato secco, una volta imbevuto Reaxon® Direct ha un incremento di diametro che può arrivare fino a 0.5 mm.

Reference	Inner diameter	Length
RD121	2.1 mm	14 mm
RD130	3.0 mm	14 mm
RD140	4.0 mm	14 mm
RD150	5.0 mm	14 mm
RD160	6.0 mm	14 mm

Figura 3.34: Reaxon® direct – ultra flexible protection use tube [62].

Reference	Inner diameter	Length
RG321	2.1 mm	30 mm
RG330	3.0 mm	30 mm
RG340	4.0 mm	30 mm
RG350	5.0 mm	30 mm
RG360	6.0 mm	30 mm

Figura 3.35: Reaxon® nerve guide – nerve regrowth tube [62].

3.5.4 Medovent GmbH

Il prodotto ‘Reaxon® Plus’ di Medovent GmbH è indicato per la riparazione delle discontinuità nervose periferiche in cui la chiusura del gap può essere ottenuta mediante la flessione dell’estremità. Questa guida è a base di chitosano, biocompatibile e biodegradabile, adatto per costituire guide nervose tubulari sterili. Le principali caratteristiche delle guide Reaxon® Plus sono riportate in Figura 3.36.







Item number	RP321	RP330	RP340	RP350	RP360
Inner diameter (mm)	2.1	3.0	4.0	5.0	6.0
Length (mm)	30	30	30	30	30
Item number	RP121	RP130	RP140	RP150	RP160
Inner diameter (mm)	2.1	3.0	4.0	5.0	6.0
Length (mm)	14	14	14	14	14
Schematics of the ID (mm) of each size					
Real picture of each model of Reaxon® Plus.					

Figura 3.36: Caratteristiche prodotto prodotto Reaxon® Plus [63].

Il prodotto è flessibile e gode di una resistenza sufficiente per resistere all'estrazione della sutura sotto carichi superiori a quelli previsti nell'ambiente di utilizzo previsto.

Studi di biocompatibilità hanno dimostrato che Reaxon® Plus è non citotossico, non sensibilizzante, non pirogeno e non genotossico. I risultati clinici hanno dimostrato che Reaxon® Plus può essere utilizzato anche per lacune nervose superiori a 10 mm, sulla base dei risultati di studi sugli animali,

di studi di caratterizzazione del prodotto in vitro, di studi di biocompatibilità in vivo e dei risultati clinici ottenuti, si conclude che Reaxon® Plus ha un profilo di sicurezza ed efficacia simile al prodotto NeuraGen® Nerve Guide [63].

3.5.5 Polyganics BV

La Polyganics BV è una innovativa società di tecnologia medica privata che offre sul mercato dispositivi biorassorbibili per facilitare la riparazione e la rigenerazione dei tessuti dopo l'intervento chirurgico. Questa azienda ha sviluppato e commercializzato tre prodotti nell'ambito della riparazione del nervo periferico per migliorare i risultati chirurgici e il recupero dei pazienti: Neurolac®, Vivosorb® e Neurocap®.

Le guide nervose “Neurolac®” sono indicate per la ricostruzione di discontinuità nervose periferiche fino a 20 mm. Il “Vivosorb®” è una pellicola polimerica flessibile biorassorbibile progettata per separare i tessuti opposti durante il processo critico di guarigione, mentre il “Neurocap®” ha lo scopo di proteggere le estremità nervose periferiche per la gestione chirurgica dei neuromi terminali sintomatici.

Nel dettaglio, l'azienda offre due tipi differenti di guide nervose: la guida “Neurolac®” e la guida “Neurolac® Thin Wall (TW)”, con la funzione di guidare e proteggere i nervi mentre si rigenerano dal moncone prossimale verso il distale, prevenendo la formazione di neuroma e la crescita interna di tessuto fibroso al gap nervoso [64].

La guida Neurolac® (TW) presenta uno spessore della parete ridotto del 40 % per facilitare la manipolazione e la penetrazione dell'ago, e rappresenta la versione a parete sottile del tubo nervoso trasparente. Le guide nervose Neurolac® sono realizzate al 100% con materiali sintetici, biologicamente sicuri e non immunogenici. Sono flessibili, consentono una sutura facile e confortevole, migliorano il comfort del paziente ed hanno una resistenza meccanica sufficiente per resistere all'attorcigliamento e al collasso, consentendo la flessione precoce delle articolazioni. Sono inoltre completamente trasparenti per consentire un posizionamento efficiente del moncone nervoso e l'osservazione precoce dei coaguli di sangue.

La degradazione delle guide nervose Neurolac® avviene attraverso l'idrolisi che porta alla graduale riduzione del peso molecolare. Le guide nervose Neurolac® mantengono le loro proprietà meccaniche iniziali fino a 10 settimane fornendo supporto meccanico e protezione al nervo di guarigione. Dopo questo periodo si verifica una rapida perdita di resistenza meccanica e una graduale riduzione della massa. Circa 16 mesi dopo l'impianto, le guide nervose vengono completamente riassorbite: i prodotti finali degradati, vengono metabolizzati ed escreti in modo sicuro dall'organismo [64].

Neurolac® TW è disponibile in 4 diversi diametri interni (1.5 – 3.0 mm), che sono i diametri più piccoli per nervi che necessitano di una sutura precisa in un'area limitata e ben definita, mentre la guida Neurolac® è disponibile in 6 formati (diametro nell'intervallo 4.0 - 10.0 mm) (Figura 3.37), facilitando l'intubazione dove non è richiesta una parete sottile.

NEUROLAC® TW Product Description

Article number	Internal diameter	Length
NG02-015/03	1.5 mm	3 cm
NG02-020/03	2.0 mm	3 cm
NG02-025/03	2.5 mm	3 cm
NG02-030/03	3.0 mm	3 cm

NEUROLAC® Product Description

Article number	Internal diameter	Length
NG01-040/03	4.0 mm	3 cm
NG01-050/03	5.0 mm	3 cm
NG01-060/03	6.0 mm	3 cm
NG01-070/03	7.0 mm	3 cm
NG01-080/03	8.0 mm	3 cm
NG01-100/03	10.0 mm	3 cm

Figura 3.37: Grandezze dei prodotti Neurolac® e Neurolac® TW [64].

Capitolo 4. Materiali e metodi

4.1 Materiali

I materiali caratterizzati in questo lavoro di tesi sono stati preparati dal gruppo di Anatomia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova, nell'ambito di una collaborazione di ricerca con il Dipartimento di Ingegneria Industriale.

4.1.1 PVA

Il PVA (Figura 4.1) è un polimero sintetico termoplastico solubile in acqua, biodegradabile e semicristallino, prodotto industrialmente per idrolisi di esteri polivinilici. Presenta eccellenti proprietà fisiche, è inodore, è atossico, altamente solubile in acqua, mostra un'elevata cristallinità e presenta buona resistenza alla trazione. Queste proprietà dipendono dalla percentuale in peso di acqua, dall'idratazione, dal grado di idrolisi e dal peso molecolare. L'acqua assorbita a livelli più elevati funge da plastificante, riduce la resistenza alla trazione del polimero ma ne aumenta la deformazione a rottura [46, 47, 65].

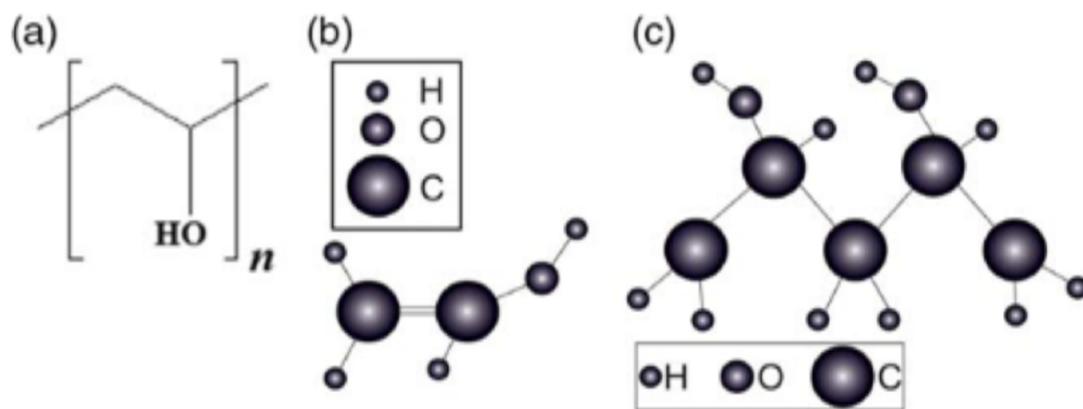


Figura 4.1: (a) Struttura del monomero del PVA completamente idrolizzata, (b) struttura di alcool vinilico, (c) struttura polimerica del PVA [65].

Il metodo più diffuso di preparazione del PVA (Figura 4.2) è rappresentato dalla polimerizzazione radicalica dell'acetato di vinile (VAc), che forma come prodotto intermedio il polivinilacetato (PVAc), seguita dall'idrolisi del gruppo acetato a base forte in presenza di alcool metilico. Questa idrolisi comporta la sostituzione parziale (o totale) del gruppo estere del VAc con gruppi ossidrilici in condizioni alcaline, chiamata idrolisi parziale (o completa) dei PVAc, mediante sostituzione dei gruppi acetati con gruppi ossidrilici, al fine di rimuovere i gruppi acetati stessi.

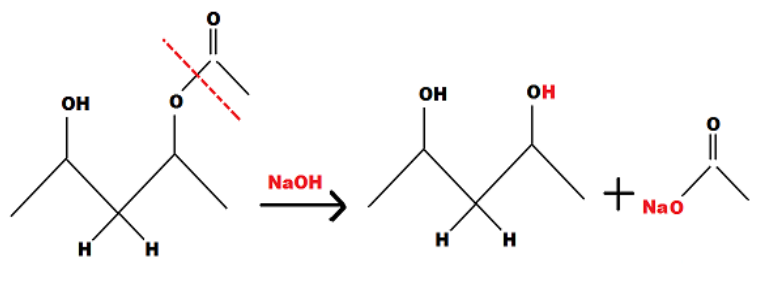


Figura 4.2: Sintesi del PVA [46].

Le proprietà chimico-fisiche del PVA (Tabella 4.1) sono influenzate sia dalle condizioni di reazione che dal grado di idrolisi del PVAc. La struttura chimica del PVA è principalmente composta da legami 1,3-dioli $[-CH_2 - CH(OH) - CH_2 - CH(OH) -]$ ma è presente una piccola percentuale di 1,2-dioli $[-CH_2 - CH(OH) - CH(OH) - CH_2 -]$ a seconda delle condizioni di polimerizzazione del precursore dell'estere vinilico.

Proprietà	Range
Densità	1,19 g/cm ³
T _g	400 K
Punto di fusione	400 K
Indice di rifrazione	1.47 a 630 nm
Punto d'infiammabilità	352.59 K

Tabella 4.1: Proprietà del PVA [46].

Grazie alle proprie specifiche caratteristiche e in considerazione della sua biocompatibilità, non tossicità, non cancerogenicità e facilità di lavorazione, il PVA è stato classificato come biomateriale polimerico ad uso clinico dalla FDA e ha ottenuto la Conformità Europea (CE). Attualmente, trova impiego in numerose applicazioni biomediche e farmaceutiche, tra cui la fabbricazione di lenti a contatto morbide, il rivestimento di cuori artificiali e di vasi sanguigni, la medicazione delle ferite e la sostituzione della cartilagine articolare [65]. Stocco et al. [69] hanno introdotto per la prima volta l'uso di PVA parzialmente ossidato come materiale innovativo per preparare protesi sintetiche biocompatibili per l'ingegneria tissutale. Successivamente sempre Stocco et al. [68] hanno sfruttato le caratteristiche biologiche implementate del PVA ossidato, riportando la fabbricazione di scaffold tubolari in hydrogel bioassorbibili, che si sono rivelati candidati potenzialmente efficaci per guidare la rigenerazione dei nervi. Il PVA viene inoltre impiegato come agente veicolante di farmaci complessi, come ad esempio riportato nello studio di Alvarado et al. [47] che hanno impiegato il PVA per la preparazione di nanoparticelle per il rilascio controllato di farmaci.

4.1.2 PVA parzialmente ossidato

Seppur il PVA sia dotato di notevoli vantaggi che lo rendono un materiale ideale per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti, il principale limite all'utilizzo di tale materiale è legato alla

capacità di degradazione in ambiente biologico: infatti, il PVA, sotto forma di hydrogel reticolato, presenta una scarsa capacità di biodegradazione.

Kawai et al. [70] hanno analizzato nel dettaglio gli step e i metodi di degradazione del PVA, dimostrando come l'ossidazione parziale del PVA con permanganato di potassio (KMnO₄) sia un metodo efficiente per fabbricare scaffold con una miglior cinetica di biodegradazione. Stocco et al. [69] hanno proposto l'ossidazione chimica del PVA mediante KMnO₄ in acido perclorico come un nuovo approccio per ottenere scaffold a base di PVA con proprietà biologiche migliorate per scopi di ingegneria tissutale. È interessante notare che, sostituendo l'1% o il 2% di gruppi ossidrilici con gruppi carbonilici nel polimero, la cinetica di rigonfiamento e la capacità di assorbimento delle proteine dell'hydrogel di PVA hanno mostrato di aumentare insieme al grado di ossidazione [69].

Alternativamente all'utilizzo di KMnO₄, Barbon et al. [71] hanno considerato per la prima volta l'uso di alogeni (come bromo, cloro e iodio) come agenti meno aggressivi del KMnO₄ per eseguire l'ossidazione controllata del PVA (Tabella 4.2). L'ossidazione dei gruppi ossidrilici a gruppi carbonilici ha inoltre consentito di introdurre nella catena polimerica funzionalità chimiche più reattive, che possono essere utilizzate per legare farmaci o fattori di crescita bioattivi [14,69].

Oxidizing Agent	Chemical Reaction
KMnO ₄	$2\text{KMnO}_4 + 5 \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} \right)_n + 6\text{HClO}_4 \longrightarrow 5 \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \right)_n + 2\text{KClO}_4 + 2\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 + 8\text{H}_2\text{O}$
Br ₂	$\text{Br}_2 + \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaHCO}_3 \longrightarrow \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaBr} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$
Cl ₂	$\text{Cl}_2 + \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaHCO}_3 \longrightarrow \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaCl} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$
I ₂	$\text{I}_2 + \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaHCO}_3 \longrightarrow \left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \right)_n + 2\text{NaI} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$

Tabella 4.2: Ossidazione parziale del PVA, schemi chimici che rappresentano le reazioni di ossidazione del PVA con diversi agenti [71].

Come possiamo notare dallo studio di Barbon et al. [71], la preparazione di scaffold a base di PVA mediante ossidazione parziale tramite Br₂, Cl₂ e I₂ è stata eseguita con successo. In particolare, Br₂ e I₂ sembrano rispondere meglio all'esigenza di trovare agenti ossidanti efficaci che consentano una minore alterazione del peso molecolare del polimero rispetto a KMnO₄, con Br₂ che assicura i risultati più soddisfacenti. Tutti gli hydrogel a base di PVA ossidati hanno dimostrato di preservare le elevate proprietà di biocompatibilità e atossicità del polimero di partenza, esibendo un comportamento meccanico che suggerisce la possibilità di realizzare scaffold ingegnerizzati con rigidità regolabile per soddisfare le esigenze di diversi tessuti danneggiati.

4.1.3 Preparazione degli hydrogel e delle neuroguide

Per la preparazione degli hydrogel di PVA ci riferiamo agli articoli di Porzionato et al. [14] e di Stocco et al. [68, 69].

Il PVA è stato preparato sospendendo la polvere di PVA in acqua milliQ (acqua purificata e deionizzata) e riscaldando per 48 ore a 100°C con continua agitazione, sino alla completa dissoluzione della polvere del polimero [69].

L'ossidazione parziale del PVA è stata eseguita utilizzando come agente ossidante KMnO_4 in acido perclorico diluito (HClO_4), trattando la soluzione del polimero allo stato nativo con una quantità stechiometrica dell'agente ossidante sufficiente ad ossidare l'1% di gruppi alcolici secondari a gruppi carbonilici. Nel dettaglio l'OxPVA_ KMnO_4 (1% PVA ossidato con KMnO_4) è stato preparato secondo la procedura descritta da Stocco et al. [69]. In breve sono stati disciolti, tramite riscaldamento in acqua bollente per 60 minuti, 10 g di polvere di PVA in 200 g di acqua milliQ. Successivamente, la soluzione polimerica è stata raffreddata a 37°C e trattata con 156 mg di KMnO_4 e 1.60 g di acido perclorico al 70% (p/p) in 10 mL di acqua milliQ per 60 minuti fino a completo scolorimento. Per rimuovere qualsiasi residuo del processo ossidativo, la soluzione risultante è stata ampiamente dializzata contro acqua utilizzando una membrana con cut-off di 8000 Da e infine liofilizzata per la conservazione a lungo termine.

Le neuroguide sono state preparate mediante la tecnica dello stampaggio ad iniezione [68], partendo da soluzioni acquose contenenti il 16% (p/p) di ciascun polimero ottenuto riscaldando in una fiala sigillata i componenti a 110°C e miscelando per 2 h per diverse inversioni. Nel dettaglio, le soluzioni polimeriche di OxPVA e PVA sono state colate in uno stampo tubolare (diametro interno: 2.1 mm) dotato di un mandrino coassiale centrale (diametro: 1.2 mm).

4.1.4 Preparazione di neuroguide caricate con nanotubi di carbonio

La preparazione dell'hydrogel nano-composito di OxPVA con CNT è leggermente diversa rispetto a quella descritta nel paragrafo 4.1.3 e le neuroguide create con questo supporto sono state preparate tramite la tecnica del injection molding.

Una soluzione acquosa contenente il 16 % (w/w) di PVA ossidato all'1% (OxPVA) è stata ottenuta riscaldando il polimero nella forma di liofilizzato in acqua deionizzata all'interno di una fialetta in vetro pyrex a chiusura ermetica. Dopo un tempo di circa 8 ore, durante le quali il sistema è stato esposto ad una temperatura di 110°C, è stata ottenuta una soluzione trasparente e viscosa. Quindi, per permettere l'incorporazione dei nanotubi di carbonio multi-walled (MWCNT) in OxPVA, questi sono stati funzionalizzati con gruppi solfonati al fine di consentirne la dispersione in medium acquoso;

brevemente, essi sono stati sospesi in acqua, sonicando 1.6 mg di MWCNT-PhSO₃-Na⁺ in 10.0 mL di acqua milliQ per 1 minuto.

Una volta predisposte le due componenti (soluzione polimerica di OxPVA e sospensione di MWCNT) si è proceduto alla preparazione dell'hydrogel composito. La soluzione di OxPVA è stata scaldata a 90°C e una quantità pari a 3 g è stata colata in una piastra Petri di vetro. Si è quindi aggiunta goccia a goccia la soluzione di MWCNT fino a raggiungere lo 0.1 wt% nell'OxPVA. La distribuzione omogenea dei MWCNT in sospensione nel polimero è stata ottenuta mediante incorporazione meccanica utilizzando una spatola da laboratorio in acciaio inossidabile.

Il nano-composito ancora caldo, subito dopo l'incorporazione, è stato aspirato all'interno di uno stampo di forma cilindrica (diametro interno = 2.1 mm; lunghezza 5 cm). A seguito dell'aspirazione è stato inserito uno stantuffo (diametro esterno = 1 mm; lunghezza 10 cm) coassiale allo stampo, per creare il lume interno della neuroguida. La reticolazione del polimero si è ottenuta con 6 cicli di congelamento-scongelo (congelamento: 6 ore a -20°C, scongelamento: 1 ora a temperatura ambiente). Infine le neuroguide sono state estratte dallo stampo e conservate a -20°C fino all'utilizzo.

4.2 Metodi

4.2.1 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

La caratterizzazione morfologica delle guide nervose a base di PVA è stata eseguita mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM), nello specifico utilizzando un microscopio JSM-6490 (Jeol USA, Peabody, MA, USA). I campioni in questione sono stati disidratati attraverso una serie di etanoli graduati, esposti ad essiccazione e allo sputtering dell'oro ed infine osservati.

4.2.2 Studio in vivo su modello animale

Le neuroguide in PVA e OxPVA sono state impiantate in vivo su modello animale, per valutarne la biocompatibilità, la biodegradazione e la fattibilità dell'intervento chirurgico. Nel dettaglio, sono stati considerati 30 ratti su cui è stato simulato un danno al nervo sciatico, mediante un'incisione sulla coscia per creare uno spazio tra i monconi prossimale e distale. I ratti sono stati suddivisi casualmente in quattro gruppi sperimentali (n = 10/ciuno), a cui è stato impiantato rispettivamente: nervo autologo (autotrapianto inverso), neuroguida in PVA e neuroguida in OxPVA. Per quanto riguarda il gruppo con autotrapianto inverso, un segmento di nervo sciatico (lunghezza 5 mm) è stato asportato, invertito e reimpiantato mediante suture in Nylon 8-0. Per quanto riguarda le neuroguide (10 mm di lunghezza), queste sono state interposte coassialmente tra i monconi e quindi suturate all'epineurio mediante suture in Nylon 8-0. L'incisione è stata chiusa a strati utilizzando suture di seta.

Dopo l'intervento chirurgico, gli animali sono stati lasciati a riposare e trattati con terapia antiinfiammatoria e antibiotica per 5 giorni e poi lasciati a recuperare le ferite. Infine sono stati sacrificati dopo 12 settimane, l'impianto è stato asportato ed analizzato preliminarmente, per poi fare un'analisi istologica per valutare la rigenerazione assonale del tessuto.

Per quanto riguarda l'analisi istologica, i campioni sono stati fissati in formalina al 10% in PBS, tagliati a croce nella porzione centrale e tagliati retrogradamente in sezioni seriali spesse 4 μm dopo l'inclusione in paraffina. Parallelamente è stata eseguita la caratterizzazione immunologica del tessuto rigenerato all'interno delle neuroguide utilizzando anticorpi diluiti in PBS.

4.2.3 Microscopia digitale ed analisi d'immagine

Per poter valutare le differenze di spessore, diametro ed area delle guide tra di loro, per ogni campione di neuroguida è stata misurata la geometria della sezione mediante microscopia digitale ed analisi d'immagine. A tal fine, è stato impiegato un microscopio PCE-MM200 (Figura 4.3) e prima dell'analisi abbiamo sempre idratato i campioni sfruttando soluzione fisiologica.



Figura 4.3: Microscopio PCE-MM200.

Per ogni campione di guida, dalla lunghezza di 10-12 mm, sono state acquisite immagini di 3 diverse sezioni tra loro pressoché equidistanti. L'analisi d'immagine è stata effettuata mediante il software Matlab (The MathWorks, Inc.). Nell'elaborazione delle immagini, si è prestata la massima attenzione

alla differenza tra la parte superficiale e quella al contorno, in quanto le guide sono inizialmente imbevute di soluzione fisiologica che riflette con la luce, in particolare quella dall'alto.

Si è quindi operato al fine di evitare, per quanto possibile, il riflesso, nonostante questo accorgimento in alcune sezioni i bordi non sono risultati perfettamente identificabili. Dovendo individuare un unico metodo da applicare a tutte le immagini, abbiamo ritenuto opportuno disegnare in sovrapposizione all'immagine, attraverso una successione di punti interpolati automaticamente dal sistema impiegato, il contorno dei vari cilindri al fine di ottenere una figura il più possibile accurata.

La superficie disegnata è stata poi riempita con uno specifico colore (sfruttando i 'Cursori RGB' - vedi Tabella 4.3), in modo da utilizzare il calcolo dei pixel del colore nella determinazione dell'area della figura.

Per il colore ROSSO	Per il colore BLU
Rosso: 255	Rosso: 0
Verde: 0	Verde: 0
Blu: 0	Blu: 255

Tabella 4.3: Cursori RGB utilizzati per il calcolo dei pixel.

Successivamente, con l'impiego di uno script di Matlab (Figura 4.4), abbiamo calcolato i pixel dell'immagine nel modo seguente:

- impostato sull'immagine originaria l'area della guida di colore rosso;
- sovrapposto l'area del lume di colore blu;
- l'area del lume è stata posta in primo piano rispetto a quella della guida, in questo modo il calcolo dei pixel residui di rosso corrisponde all'area della guida oggetto di ricerca.

```

GuideRun.m x +
1 % Script per calcolare il numero dei pixel della sezione della
2 % neuroguida (acquisita in laboratorio)
3 % In questo caso il numero dei pixel finale, corrisponde all'area della
4 % sezione
5
6
7
8 clear all
9 close all
10 clc
11
12 I = imread('S1-1.png'); % acquisisco l'immagine
13 % imshow(I) -> quando acquisisco l'immagine, Matlab la visualizza come una
14 % matrice su 3 dimensioni
15 % per esempio: I(160,200,:)
16
17 counter = 0; % inizializzo un contatore
18
19 for i = 1:size(I,1) % scorro l'immagine
20     for j = 1:size(I,2)
21         pixel = I(i, j, :);
22         % se il pixel individuato è rosso, allora il contatore aumenta
23         if pixel(1) == 255 && pixel(2) == 0 && pixel(3) == 0
24             counter = counter + 1;
25         end
26     end
27 end
28
29 % visualizzo il numero del contatore, il quale mi rappresenta i numeri di
30 % pixel rossi trovati nell'immagine
31 counter;

```

Figura 4.4: Script di Matlab impiegato nel calcolo dei pixel.

Al fine di verificare la procedura seguita abbiamo tracciato delle linee verticali in corrispondenza del bordo esterno della superficie e successivamente calcolato l'area come approssimazione dell'area di un cerchio. In questo modo abbiamo potuto constatare come i risultati del calcolo mediante pixel siano stati attendibili. Si riporta un esempio di analisi delle immagini (Figura 4.5).

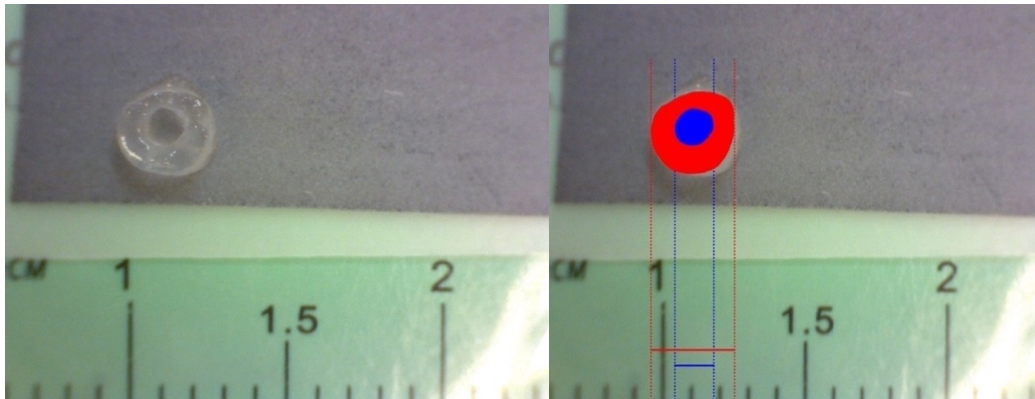


Figura 4.5: Esempi di trattamento delle immagini.

Dopo aver determinato il numero di pixel rossi presenti nell'immagine ('counter'), si effettua una proporzione per passare dai pixel ai millimetri quadrati (mm^2).

Si ripete questa operazione per tutti i campioni delle sezioni presi in esame calcolando la superficie media dell'area come rapporto tra la somma di tutte le superfici ed il numero di campioni.

4.2.4 Strumentazione per prove meccaniche

Le prove meccaniche per la caratterizzazione delle diverse tipologie di PVA sono state effettuate mediante l'attrezzatura Bose[®] ElectroForce Planar Biaxial TestBench (TA Instruments), presente nei laboratori del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova (Figura 4.6). Questo sistema è sviluppato per effettuare test meccanici con elevata accuratezza per ottenere la caratterizzazione meccanica dei materiali e di poterli comparare con i tessuti biologici.

Lo strumento offre un controllo superiore e prestazioni notevoli nella caratterizzazione dei materiali e dei tessuti molli. In particolare l'impiego di questo sistema nel caso in esame è finalizzato alla valutazione di materiali che presentano solitamente caratteristiche quali anisotropia, relazioni di tensione-deformazione non lineari, grandi deformazioni e comportamenti viscoelastici, allo scopo di sviluppare opportuni modelli costitutivi. Esso viene impiegato per l'analisi di campioni che vanno dai dispositivi ingegnerizzati, inclusi sensori indossabili e reti per la riparazione delle ferite, ai tessuti come pelle, pericardio e lembi delle valvole cardiache [66,67].

Lo strumento può essere configurato con due o quattro motori lineari montati su una piastra di base orizzontale e fino a quattro celle di carico (celle da 22 N, 200 N, 400 N).



Figura 4.6: Strumentazione Bose® per le prove meccaniche [66].

La strumentazione è costituita da una base metallica traforata su cui poggiano quattro motori elettromagnetici lineari disposti a croce con spostamento massimo di ± 6.5 mm. Tale configurazione consente di effettuare sia prove mono-assiali, utilizzando solo due dei motori, sia prove bi-assiali tramite l'utilizzo di tutti e quattro i motori. Motori e celle di carico sono interfacciati mediante un software di controllo chiamato *WinTest*, parte integrante del sistema, che permette il controllo completo dei motori durante la prova, l'acquisizione temporale delle grandezze fisiche di interesse ed il settaggio informatizzato di tutti i parametri e modalità di lavoro dei motori. Grazie all'ausilio di questo software è possibile programmare un preciso protocollo sperimentale in controllo di spostamento o in controllo di forza.

4.2.5 Protocollo di carico

Le prove meccaniche svolte nel presente studio hanno compreso dei test mono-assiali di trazione e di rilassamento che permettono lo studio dei fenomeni viscoelastici. Trattandosi di prove mono-assiali per la loro esecuzione sono stati utilizzati due motori contrapposti ed in corrispondenza di uno di questi motori è stata posta una cella di carico in grado di rilevare la forza applicata che presenta il valore massimo di 22 N. Prima di ogni prova sperimentale, i provini sono stati scongelati e mantenuti in idratazione mediante soluzione fisiologica a temperatura ambiente. Per evitare la disidratazione del materiale, i provini sono stati sottoposti a costante idratazione per mezzo di una flebo di soluzione salina per tutta la durata delle prove.

In tutte le prove effettuate sono state utilizzate come elementi di tenuta delle pinze con vite a serraggio poste a distanza di 12 mm circa ($L_0 = 12$ mm), nelle quali sono stati fissati i campioni in analisi. Il fissaggio dei campioni è stato testato in maniere differenti (Figura 4.7) con l'impiego di nessun sostegno, balsa oppure bastoni. Abbiamo impiegato diverse tipologie di sistemi di afferraggio perché volevamo evitare lo scivolamento del campione all'interno del macchinario ed anche per evitare una possibile rottura da parte del campione in prossimità delle pinze.

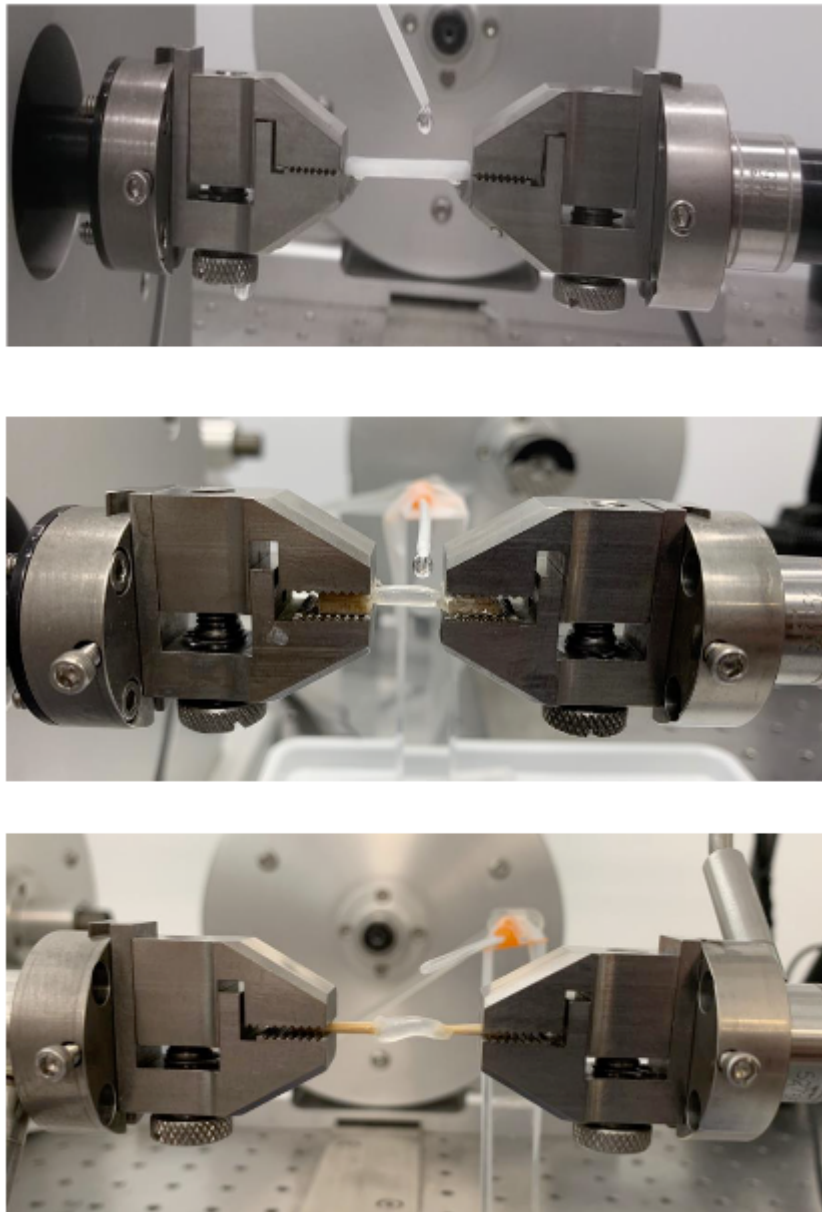


Figura 4.7: Sistemi di afferraggio delle prove eseguite in laboratorio. (alto) nessun sostegno, (metà) balsa, (basso) bastoni.

Le prove meccaniche realizzate sono state tutte a spostamento imposto e il sistema, tramite la cella di carico, ha misurato la forza sviluppata per provocare detto spostamento.

Una prova di trazione consiste nell'aumento progressivo di una deformazione sotto l'azione di un carico applicato costante. Per le prove di trazione eseguite in laboratorio, sono stati adottati i seguenti parametri:

- provini di lunghezza libera di 10 mm;
- area della sezione misurata mediante analisi d'immagine;
- deformazione massima imposta pari a $\epsilon = 50 \%$, corrispondente ad uno spostamento del motore di 5 mm;
- velocità di trazione pari a $v = 0.5 \% s^{-1} = 0.005 \text{ mm/sec}$.

Sono state eseguite prove di trazione con cinque cicli di carico/scarico (Figura 4.8): le prove cicliche consistono in una successione di trazioni e successivo rilascio della deformazione raggiunta, ripetute nel tempo a distanza di un determinato intervallo di tempo.



Figura 4.8: Prove di trazione con cinque cicli di carico/scarico.

Una prova di rilassamento delle tensioni consiste nella graduale diminuzione del carico quando una deformazione costante è applicata al materiale. Per le prove di rilassamento delle tensioni eseguite in laboratorio, sono stati adottati i seguenti parametri:

- provini di lunghezza libera di 12 mm;
- deformazione imposta pari a $e = 20 \%$, corrispondente ad uno spostamento del motore di 2.4 mm;
- velocità di trazione pari a $v = 500 \% s^{-1} = 60 \text{ mm/sec}$;
- tempo di rilassamento pari a $t = 600 \text{ sec}$.

Le prove di laboratorio sono state effettuate su un numero totale di 17 campioni ricavati da 18 elementi complessivamente forniti, di cui 21 prove di trazione e 5 prove di rilassamento.

L'apparecchiatura Bose® utilizzata in questi test sperimentali fornisce la misura delle forze, espresse in Newton, che agiscono sul materiale in risposta all'applicazione del protocollo di carico previsto. Conoscendo tali misurazioni e considerando il fatto che si lavora a spostamenti imposti, è possibile ricavare da queste grandezze i valori di deformazione e di tensione.

I dati sperimentali sono stati ottenuti mediante il software di controllo *WinTest* connesso al sistema *ElectroForce Planar Biaxial TestBench instrument* della Bose®. Tale software, oltre a consentire il controllo dei motori e l'impostazione del protocollo di carico desiderato, permette di acquisire istantaneamente alcune grandezze fisiche di particolare interesse, nei test in oggetto sono stati memorizzati i valori delle forze interne al materiale sviluppate in seguito ad una deformazione imposta.

Successivamente, è stata eseguita un'elaborazione dei dati tramite l'uso di Excel, calcolando, per ogni set di dati sperimentali, i valori di deformazione ε , tensione nominale $\sigma_{nominale}$ e tensione normalizzata $\sigma_{normalizzata}$.

Inoltre, ogni curva delle prove di rilassamento delle tensioni è stata interpretata mediante una serie di Prony secondo un modello di Maxwell di 4 rami.

$$\sigma(t) = \sigma_0 + \sum_{i=1}^N \sigma_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Figura 4.9: Espressione matematica dell'equazione di Prony [73].

L'equazione di Prony descritta in Figura 4.9 permette di descrivere l'andamento delle tensioni in funzione del tempo, con una tensione iniziale, ed è caratterizzata dal tempo di rilassamento i-esimo.

Capitolo 5. Risultati

5.1 Analisi morfologica delle neuroguide

Le neuroguide di PVA e OxPVA, preparate secondo il protocollo descritto nel paragrafo 4.1.3 e 4.1.4, ad un primo esame visivo, mostrano una geometria tubolare ben definita e omogenea, per tutta la lunghezza dei campioni in esame (Figura 5.1). Le guide costituite dai diversi materiali presentano una colorazione diversa: bianco semi-trasparente nel caso del PVA, trasparente per OxPVA con KMnO_4 e nero per OxPVA caricato con nanotubi a carbonio (CNT). Il lume dei campioni è visibile in ogni neuroguida.

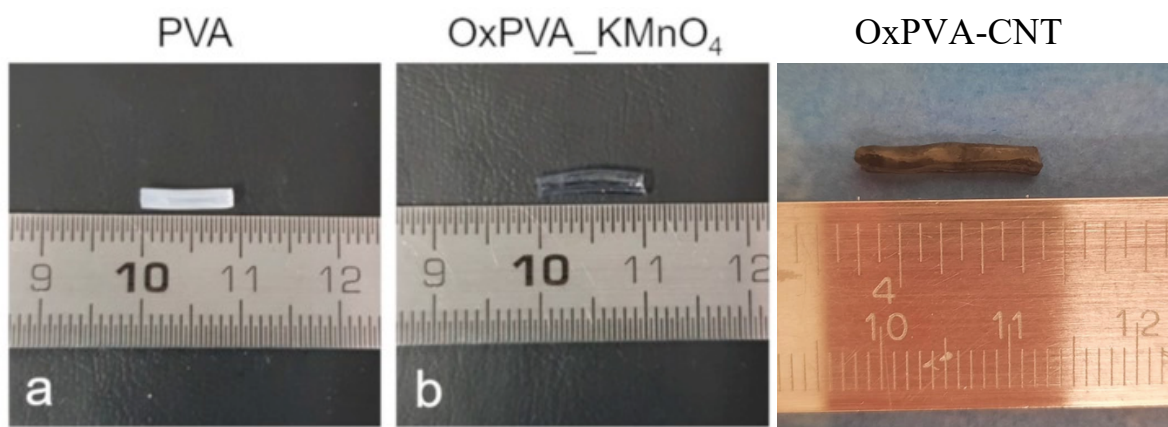


Figura 5.1: Morfologia delle neuroguide [14].

L'ultrastruttura superficiale delle neuroguide è stata analizzata mediante microscopia elettronica. I risultati (Figura 5.2) mostrano una maggior rugosità da parte delle neuroguide ossidate rispetto a quelle di PVA nativo. Infatti, le neuroguide in PVA nativo mostrano una superficie più liscia rispetto ai campioni ossidati e le sezioni trasversali degli scaffold dimostrano una certa regolarità nei condotti.

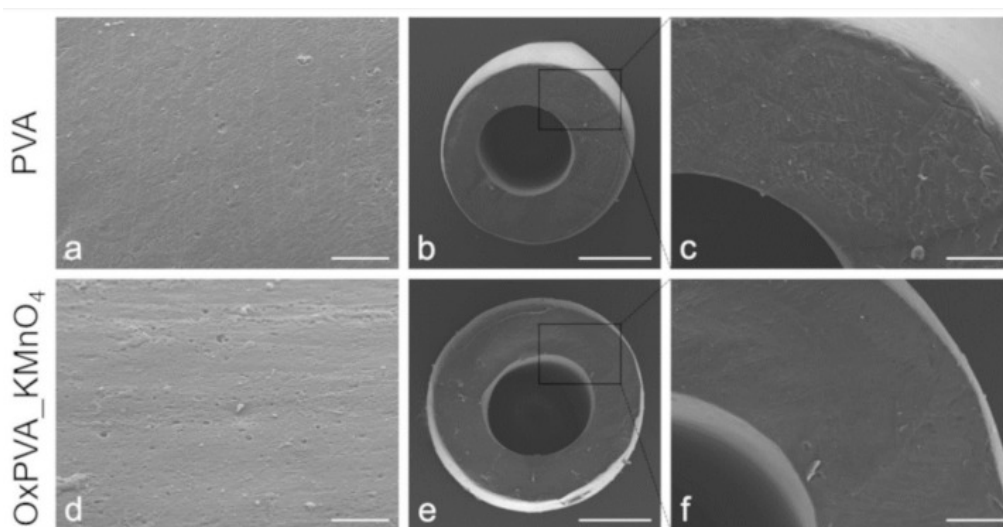


Figura 5.2: Analisi ultrastrutturale attraverso SEM di neuroguide a base di PVA reticolati. (a,d) vista laterale e (b,c,e,f) sezioni trasversali di ponteggi tubolari. Barre di scala: (a,d) 10 μm ; (b,e) 500 μm ; (c,f) 100 μm [14].

Tutti i provini di neuroguida analizzati in laboratorio sono stati sezionati in tre diversi punti, per acquisire un'immagine della sezione attraverso un microscopio digitale. Si riportano, a titolo d'esempio, alcune delle immagini ottenute per diversi provini (Figura 5.3).

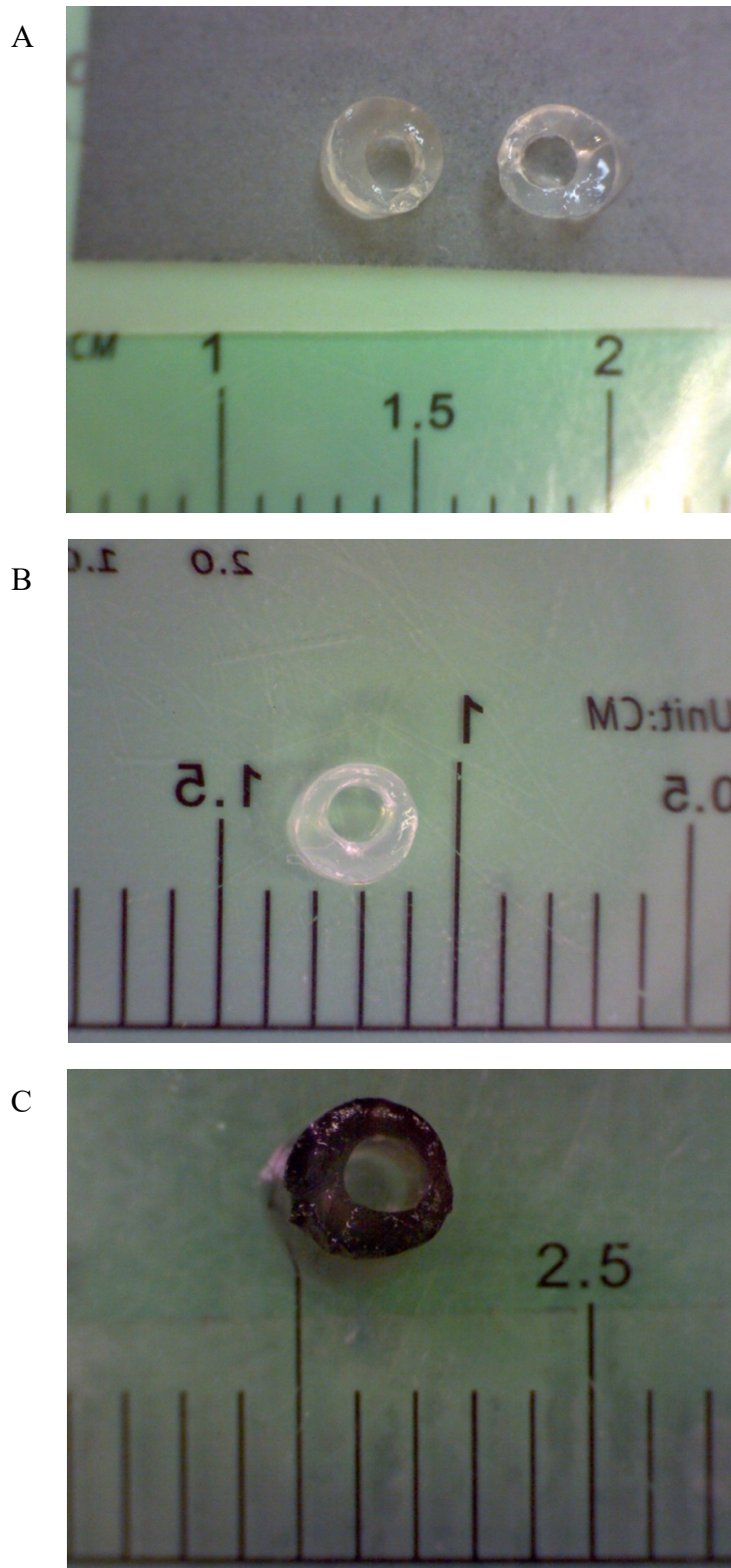


Figura 5.3: Sezioni guide ricavate in laboratorio: (A e B) neuroguide in OxPVA-KMnO₄; (C) neuroguida in OxPVA-CNT.

Come mostrano le immagini in figura, è evidente la presenza di una variabilità nella posizione del lume e nello spessore delle neuroguide. L'analisi d'immagine ha consentito di determinare l'area delle diverse sezioni, come riportato in Figura 5.4. In questa figura si riportano le varie sezioni che abbiamo ottenuto per ogni campione: sull'asse x individuamo il numero del campione, mentre sull'asse y la misura dell'area delle sezioni ricavate per quel determinato campione.

Con il colore blu si sono indicate le sezioni delle neuroguide ossidate con KMnO_4 , mentre in arancione le neuroguide ossidate con CNT.

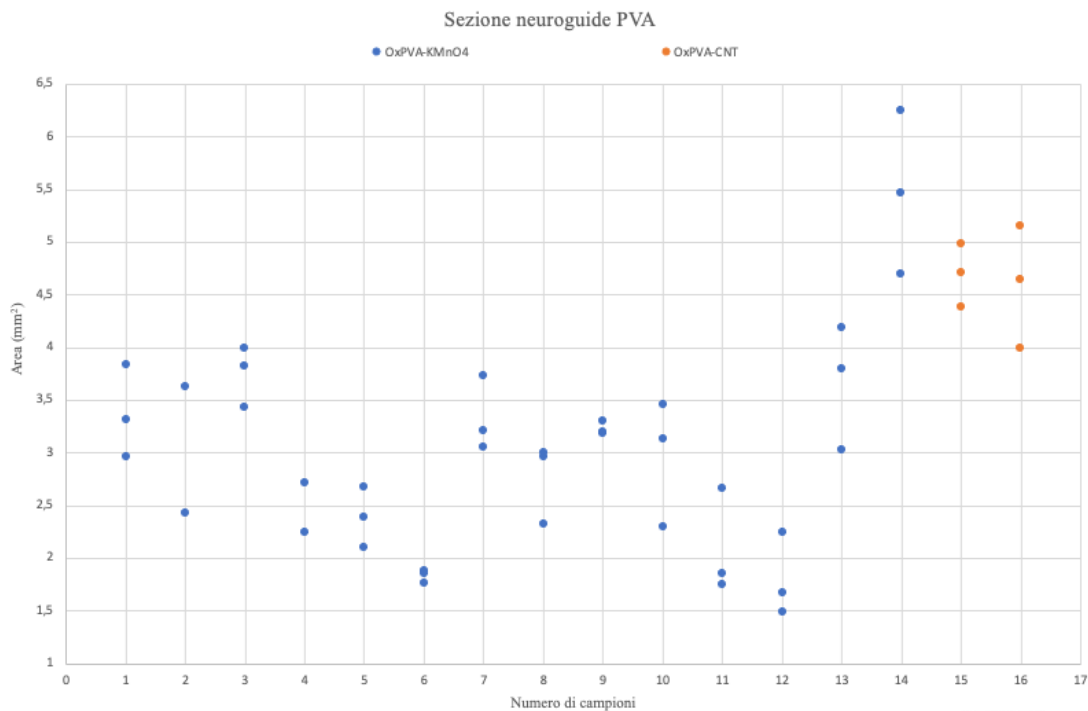


Figura 5.4: Aree delle sezioni di campioni di neuroguide in OxPVA.

Come si può osservare dai dati riportati in Figura 5.4, vi è una notevole variabilità di area, sia tra diverse guide, che tra diverse sezioni della stessa guida. Bisogna notare che, nelle immagini SEM in Figura 5.2, si potevano osservare sezioni di area minore (dell'ordine di 1 mm^2): questo è compatibile con il processo di fissazione con formaldeide per la preparazione dei campioni SEM. Infatti, tali campioni devono essere disidratati e fissati per poter essere osservati con il microscopio elettronico, e questo provoca una contrazione e quindi le dimensioni sono minori.

Nel caso dell'acquisizione di immagini con il microscopio digitale, invece, le immagini sono state ottenute idratando i campioni e pertanto evitando una contrazione da parte delle guide ed ottenendo misure delle sezioni maggiori.

5.1.2 Analisi in vivo – Analisi istologica

Dallo studio in vivo [68], sono stati estratti questi impianti che vengono mostrati in Figura 5.5. Durante la rimozione tutti i condotti nervosi erano ancora chiaramente riconoscibili: sono stati

incapsulati in un tessuto fibroso estremamente sottile, evidenziando che i tessuti ospiti tolleravano i condotti impiantati senza provocare reazioni da corpo estraneo. Inoltre, l'ispezione visiva dopo l'intervento chirurgico ha mostrato come tutte le neuroguide abbiano conservato la loro forma rotonda e un diametro uniforme lungo l'intera lunghezza dell'impianto. Al momento dell'espianto, tutte le neuroguide sembravano ben integrati nel tessuto ospite e non è stata osservata alcuna dislocazione; inoltre non si è verificata alcuna reazione infiammatoria a dimostrazione della biocompatibilità degli impianti con i tessuti nervosi periferici.

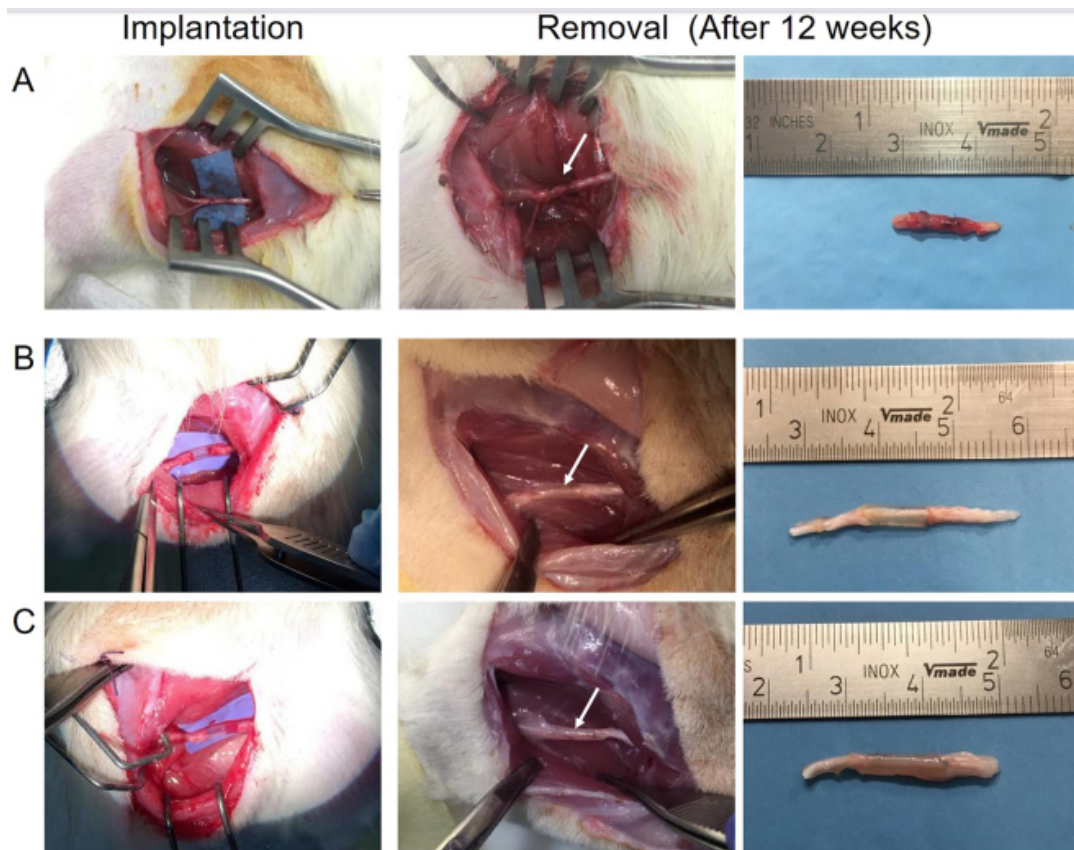


Figura 5.5: Fotografie di impianto e rimozione di neuroguide fra (A) autotrapianto; (B) OxPVA e (C) PVA in un modello di sezione del nervo sciatico di ratto. Dodici settimane dopo l'intervento chirurgico, le protesi sono state confrontate preliminarmente per il loro aspetto grossolano nel sito implantare (freccia bianca) prima dell'espianto [68].

Le immagini istologiche (Figura 5.6), realizzate sfruttando delle colorazioni con ematossilina ed eosina (HE) nella porzione centrale di ciascuna neuroguida, mostrano come il nervo rigenerato sia cresciuto con successo attraverso lo spazio che collega i monconi dei nervi prossimali e distali: il nervo rigenerato è riconoscibile all'interno delle neuroguide.

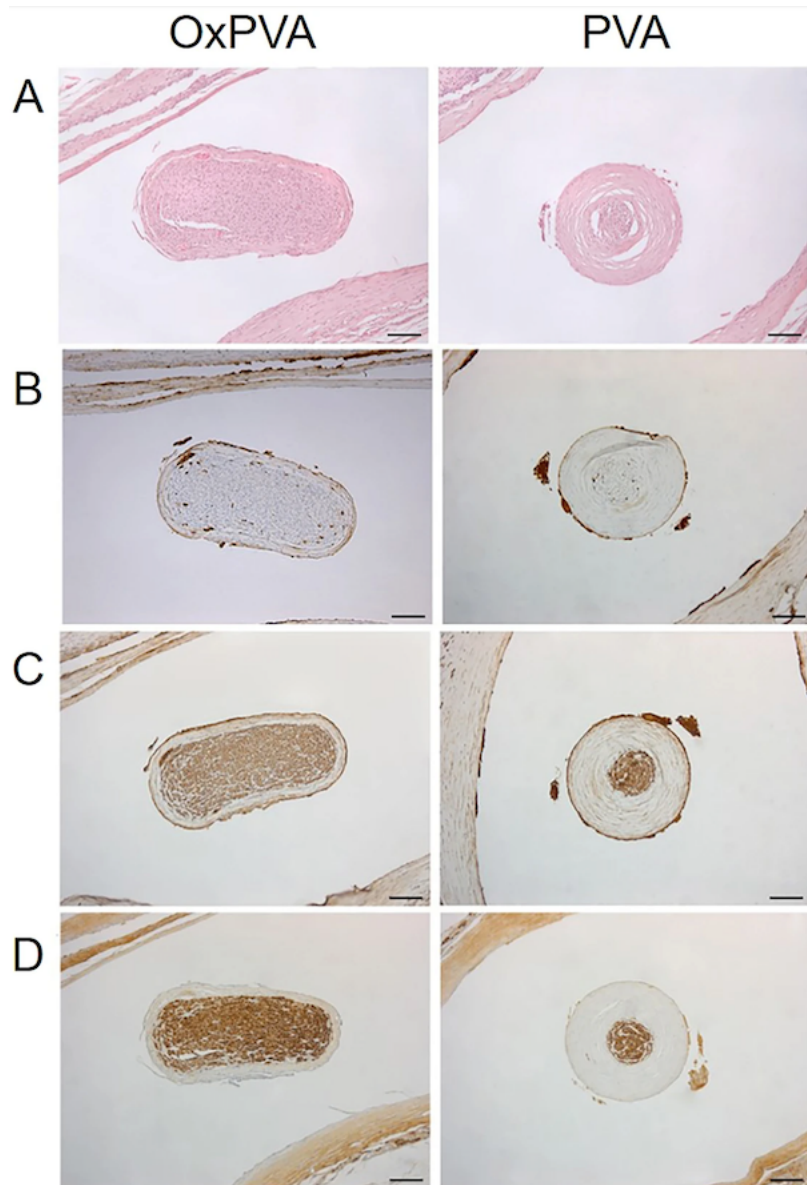


Figura 5.6: Analisi istologica e immunoistochimica. (A) caratterizzazione della porzione centrale degli innesti OxPVA e PVA espianati mediante colorazione HE; (B) reazioni immunoistochimiche anti-CD3; (C) anti- β -tubulina e (D) anti-S100. Barra = 100 μ m [68].

In tutti i gruppi è identificabile la presenza di uno strato fibroso esterno che avvolge il biomateriale. Inoltre, i condotti nervosi OxPVA hanno promosso la formazione di un nervo rigenerato caratterizzato da un perinevrio più sottile e compatto rispetto alle guide in PVA. Il tessuto neoformato di ciascuna sezione appare al centro denso e ben organizzato, paragonabile a quello del gruppo dell'autotrapianto. La colorazione HE non ha mostrato gravi infiltrati infiammatori in nessun campione.

L'analisi immunoistochimica anti-CD3 ha dimostrato che gravi reazioni infiammatorie non erano presenti in tutti i campioni, a parte una leggerissima infiltrazione del tessuto connettivo che circonda il materiale impiantato. La rigenerazione assonale nei costrutti è stata valutata mediante colorazione β -tubulina e S100 che ha evidenziato che i tre condotti nervosi consentivano la riconnessione dei

monconi prossimali e distali. Questi dati hanno ulteriormente dimostrato che il tessuto ospite tollerava i condotti impiantati.

Riassumendo, l'impianto sottocutaneo nella regione dorsale dei topi di questo modello ha permesso di dimostrare come gli scaffold di PVA ossidati non abbiano indotto alcuna reazione infiammatoria grave e una lieve infiltrazione linfo-monocitica del tessuto connettivo che circonda il materiale impiantato. Le neuroguide ossidate a base di PVA hanno così dimostrato un potenziale rigenerativo efficiente quando testati in un modello di ratto di PNI, oltre che confermare l'elevata biocompatibilità e la bassa immunogenicità degli hydrogel. Inoltre, il tasso di biodegradazione del polimero ossidato ha comportato un aumento proporzionale al grado di ossidazione [69].

5.2 Prove meccaniche

Come precedentemente descritto, sono state eseguite due tipologie di prove meccaniche: prove di trazione e prove di rilassamento delle tensioni, su campioni di neuroguide in OxPVA-KMnO₄ e neuroguide in OxPVA-KMnO₄ con nanotubi di carbonio.

Non si è osservato alcun effetto dovuto alla variazione del sistema di fissaggio tra le grip e quindi, dopo una serie di prove eseguite utilizzando diversi metodi di afferraggio, si è deciso di utilizzare per tutti i provini un fissaggio diretto tra le pinze.

5.2.1 Comportamento meccanico a trazione

Dai risultati delle prove cicliche di carico e scarico, come mostrato a titolo d'esempio per un provino in Figura 5.7, si può osservare che il comportamento meccanico si stabilizza tra il secondo e il terzo ciclo. Per questo motivo, nei grafici successivi sarà presentata esclusivamente la risposta stabilizzata, in particolare quella relativa all'ultimo ciclo.

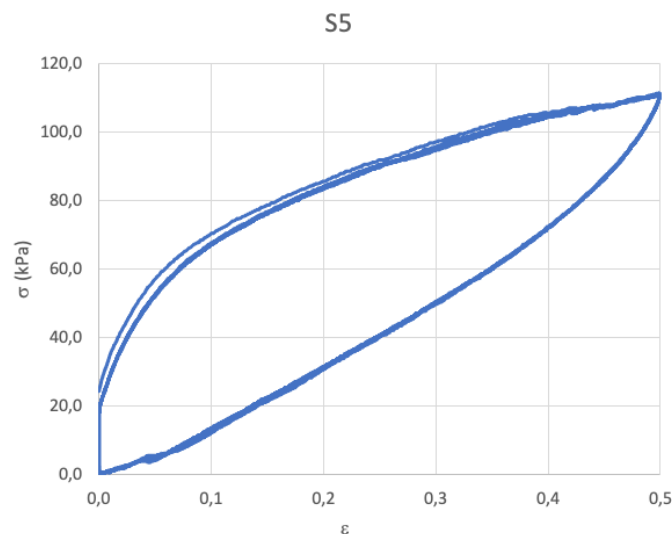


Figura 5.7: Esempio comportamento a trazione del campione S5.

In Figura 5.8 a sono riportate tutte le curve sperimentali delle prove di trazione ottenute nelle varie giornate di prova per le neuroguide OxPVA-KMnO₄. La Figura 5.8 b mostra gli stessi dati in termini di curva media ed associata deviazione standard.

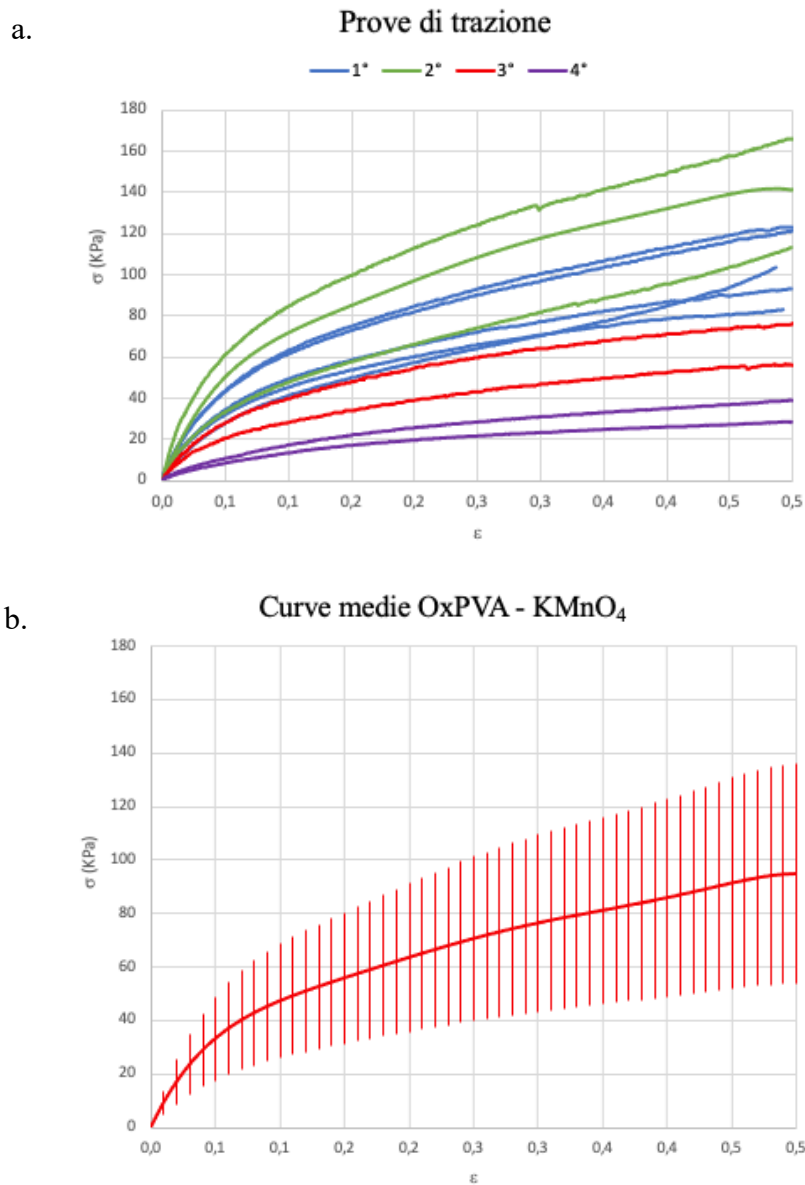


Figura 5.8: (a) confronto di tutte le curve sperimentali delle prove di trazione dei campioni divisi per giornata; (b) grafico media \pm deviazione standard.

Da questi grafici si può osservare come ci sia una certa variabilità nei risultati in termini di rigidità dei diversi provini, tenuto conto dell'omogeneità dei metodi di prova, si ritiene possa venire ricercata nella composizione dei provini stessi o nella posizione di prelievo del campione nell'ambito del provino stesso. Si è ovviamente riscontrato un rapporto diretto fra la sezione dei campioni e la resistenza dei medesimi. Le prove si sono svolte in numerose sessioni durante le quali, per quanto possibile, si sono mantenute costanti le condizioni termoidrometriche dell'ambiente.

Per quanto riguarda le neuroguide in OxPVA-KMnO₄ con nanotubi di carbonio, i risultati ottenuti sono mostrati in Figura 5.9. In Figura 5.9 a, sono confrontati i due provini con nanotubi con la media delle neuroguide senza nanotubi, mentre, in Figura 5.9 b, abbiamo confrontato le neuroguide con nanotubi con quelle senza nanotubi caratterizzate nella stessa giornata di prove e provenienti dalla stessa sessione di preparazione del materiale.

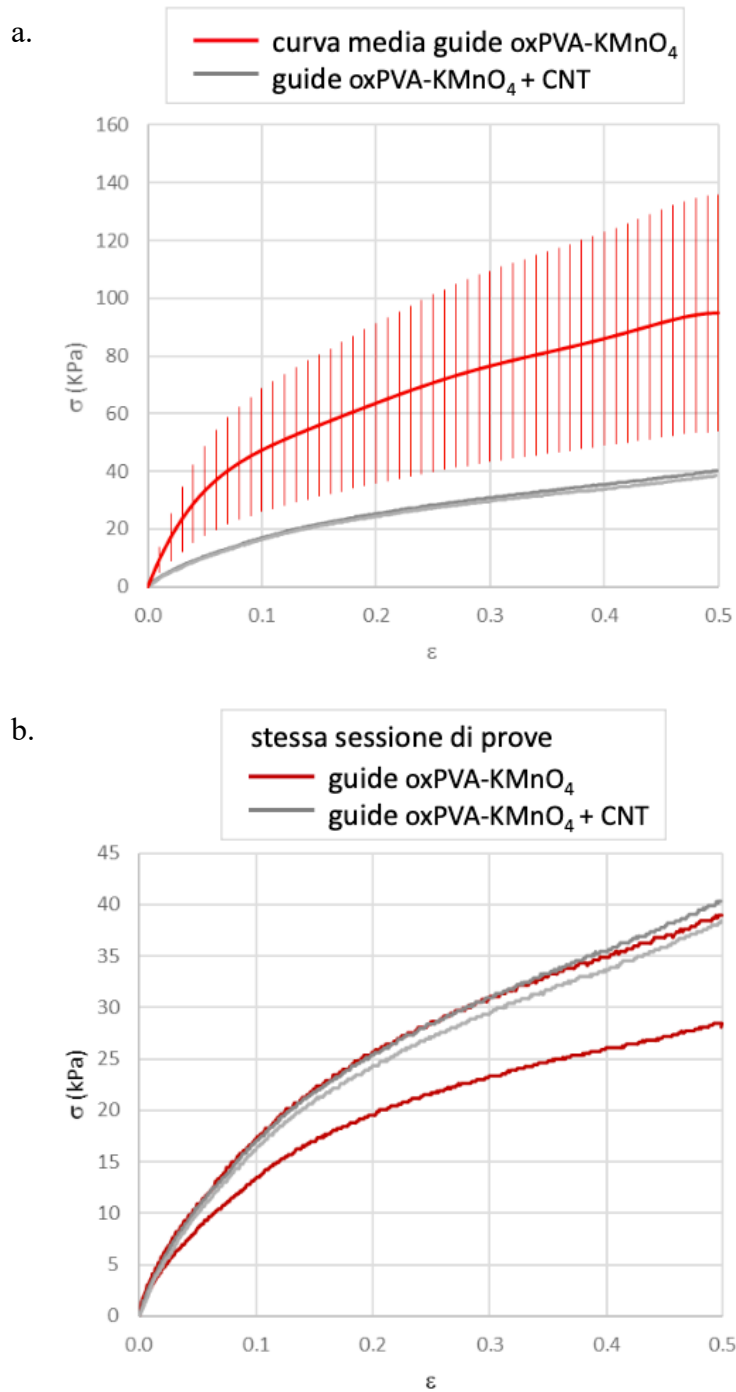


Figura 5.9: (a) confronto tra neuroguide con nanotubi e la media delle neuroguide senza nanotubi; (b) confronto tra neuroguide con nanotubi e quelle senza.

Nel primo caso, il grafico mostra una differenza tra le neuroguide con i nanotubi e la curva media delle neuroguide di OxPVA, anche se non è possibile eseguire un confronto per valutare la significatività statistica di tale differenza, dato il numero limitato di campioni con nanotubi.

Al tempo stesso, essendoci questa grande variabilità, è interessante andare a confrontare questi due campioni di neuroguide con quelli senza nanotubi che sono stati realizzati nella stessa sessione di preparazione dei campioni. Come mostrato in Figura 5.9 b, in questo caso notiamo che le neuroguide sembrano comparabili tra di loro e non paiono esserci differenze significative nel comportamento meccanico.

5.2.2 Comportamento viscoelastico: rilassamento delle tensioni

I risultati delle prove di rilassamento delle tensioni sono mostrati in Figura 5.10. Anche in questo caso, pur considerando il numero limitato di provini analizzati, sembra che si osservi una notevole variabilità dei risultati sperimentali, con valori di tensione normalizzata che variano da 0.74 a 0.54 al tempo $t = 600$ s della prova di rilassamento.

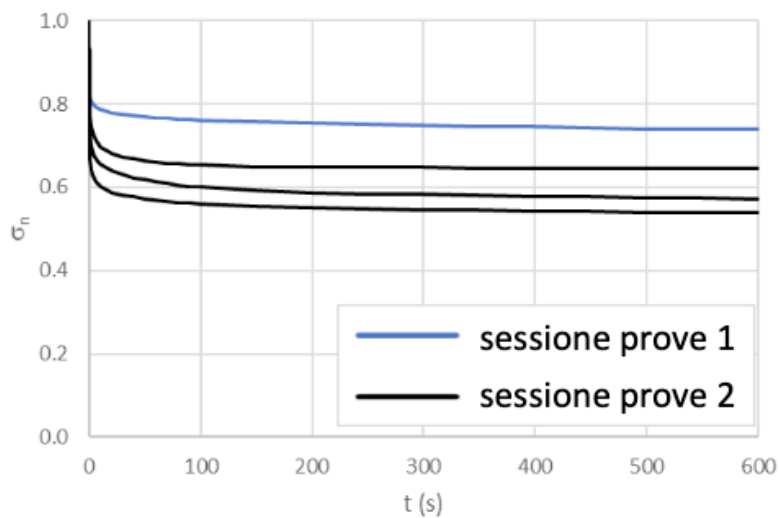


Figura 5.10: Confronti delle prove di rilassamento delle tensioni.

Ogni curva delle prove di rilassamento delle tensioni è stata interpretata mediante una serie di Prony secondo un modello di Maxwell di 4 rami, ottenendo il calcolo dei parametri riassunti in Tabella 5.1.

Parametri	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
γ_1	0.152	0.066	0.139	0.221
γ_2	0.030	0.221	0.089	0.118
γ_3	0.032	0.054	0.047	0.039
γ_4	0.020	0.062	0.047	0.039

γ_5	0.038	0.036	0.0001	0.033
τ_1	0.05	0.05	0.05	0.05
τ_2	0.5	0.5	0.5	0.5
τ_3	5	5	5	5
τ_4	50	50	50	50
τ_5	500	500	500	500

Tabella 5.1: Parametri specifici della serie di Prony per il OxPVA-KMnO₄.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi, si è provveduto alla caratterizzazione delle specifiche caratteristiche morfologiche e meccaniche di neuroguide a base di PVA parzialmente ossidato con KMnO_4 e con CNT.

I principali requisiti dei materiali da impiegarsi nella realizzazione di neuroguide sono infatti i seguenti:

- presentare una corretta stabilità dimensionale pur in presenza di porosità delle pareti in modo da permettere il transito di nutrienti e farmaci dall'esterno all'interno e viceversa;
- essere biodegradabili, biorisorbibili e presentare grandezza adeguata all'intervento da eseguire.

Gli hydrogel a base di PVA e OxPVA sono materiali biocompatibili e biorisorbibili, come evidenziato sia dalle prove in vivo che dalle analisi istologiche e come confermato da numerosi articoli in letteratura. Gli hydrogel a base di OxPVA hanno delle buone proprietà meccaniche che dovranno comunque essere confrontate con quelle dei nervi da riparare: questa procedura rappresenta una doverosa attività preliminare che sarà seguita dal confronto del comportamento meccanico del materiale con quello del tessuto nativo. Bisognerà infatti confrontare per mezzo di prove meccaniche e in vivo sui nervi il comportamento del tessuto nativo e della sua struttura, per esempio collegando un campione di neuroguida ad un nervo.

Eventuali errori di misurazione, potenzialmente introdotti durante lo svolgimento delle prove in laboratorio, possono avere avuto origine dal fenomeno del cross-linking, ovvero dalla reticolazione del materiale durante la sua conservazione in congelatore, ed ancora dalla variazione di temperatura e di umidità dell'ambiente sia durante la fase di scongelamento che durante l'esecuzione delle prove, tenuto conto comunque dell'attenzione prestata nella varie fasi delle attività, si ritiene presentino entità non significativa.

Eventuali errori di misurazione relativi al calcolo delle aree nelle analisi di immagine, si ritengono parimenti trascurabili.

Dal punto di vista dei limiti di operatività delle neuroguide, si è riscontrata una discreta variabilità dei campioni dovuta ai metodi di preparazione del materiale ed alle specifiche caratteristiche geometriche, risulterebbe quindi necessario dotarsi di un processo di preparazione più rigoroso che fornisca risultati omogenei e ripetibili dal punto di vista della geometria al fine di ridurre le possibilità di variazione dei risultati.

Quanto sopra pur nella considerazione che, tenuto conto dei risultati di tutte le prove eseguite, il materiale presenta una discreta, ma certamente migliorabile, applicabilità negli interventi a cui è destinato.

Acronimi

CNT = nanotubi di carbonio

CP = polimeri conduttori

DLP = stampa 3D a luce digitale

ECM = matrice extracellulare

EHD-jet = stampa 3D a getto elettroidrodinamico

FDA = Food and Drug Administration

FDM = modellazione a deposizione fusa

Gr = grafene

GO = ossido di grafene

KMnO₄ = permanganato di potassio

MEMS = sistemi micro-elettromeccanici

NGC = condotti di guida nervosi o neuroguide

NGF = fattore di crescita nervoso

OxPVA = alcool polivinilico ossidato

PCL = policaprolattone

PDLLA = acido poli(D,L-lattico)

PDMS = polidimetilsilossano

PGA = acido poliglicolico

PHB = poliidrossibutirrato

PHBV = poliidrossivalerato

PLCL = poli-L-lattide-co-caprolattone

PLGA = acido poli(lattico-co-glicolico)

PNI = lesione dei nervi periferici

PPy = polipirrolo

PU = poliuretano

PVA = alcool polivinilico

PVAc = polivinilacetato

PVDF = polivinilidene

RM = medicina rigenerativa

SEM = microscopia elettronica a scansione

SF = fibroina della seta

SLA = stereolitografia

SNC = sistema nervoso centrale

SNP = sistema nervoso periferico

SLS = sintetizzazione laser selettiva

TE = ingegneria tissutale o ingegneria dei tessuti

VAc = acetato di vinile

Bibliografia e Sitologia

- [1] Delmas A., *Vie e centri nervosi introduzione alla neurologia*, Utet-Masson, 1975.
- [2] Kaya Y., Sarikcioglu L., *Sir Herbert Seddon (1903-1977) and his classification scheme for peripheral nerve injury*, Childs Nerv Syst, 2015, 31(2):177-180.
- [3] Yi S., Zhang Y., Gu X., et al., *Application of stem cells in peripheral nerve regeneration*, Burns Trauma, 2020, 8:002.
- [4] Robinson LR., *Traumatic injury to peripheral nerves*, Muscle Nerve, 2000, 23(6):863-873.
- [5] Felten DL., O'Banion MK., Maida MS., *Netter's atlas of neuroscience third edition*, Elsevier, 2016.
- [6] Di Bello C., Bagno A., *Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Patron Editore, 2016.
- [7] Berthiaume F., Maguire TJ., Yarmush ML., *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*, Annu Rev Chem Biomol Eng, 2011, 2:403-430.
- [8] Mavrogenis AF., Markatos K., Saranteas T., et al., *The history of microsurgery*, Eur J Orthop Surg Traumatol, 2019, 29(2):247-254.
- [9] IJpma FF., Van De Graaf RC., Meek MF., *The early history of tubulation in nerve repair*, J Hand Surg Eur Vol, 2008, 33(5):581-586.
- [10] Vijayavenkataraman S., *Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods*, Acta Biomater, 2020, 106:54-69.
- [11] Parker BJ., Rhodes DI., O'Brien CM., Rodda AE., Cameron NR., *Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: A commercial perspective*, Acta Biomater, 2021, 135:64-86.
- [12] Bashir S., Hina M., Iqbal J., et al., *Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications*, Polymers (Basel), 2020, 12(11):2702.
- [13] Gungor-Ozkerim PS., Inci I., Zhang YS., Khademhosseini A., Dokmeci MR., *Bioinks for 3D bioprinting: an overview*, Biomater Sci, 2018, 6(5):915-946.
- [14] Porzionato A., Barbon S., Stocco E., et al., *Development of Oxidized Polyvinyl Alcohol-Based Nerve Conduits Coupled with the Ciliary Neurotrophic Factor*, Materials (Basel), 2019, 12(12):1996.
- [15] Jiang H., Qian Y., Fan C., Ouyang Y., *Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering*, Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8:582646.
- [16] Pinho AC., Fonseca AC., Serra AC., Santos JD., Coelho JF., *Peripheral Nerve Regeneration: Current Status and New Strategies Using Polymeric Materials*, Adv Healthc Mater, 2016, 5(21):2732-2744.

- [17] Kehoe S., Zhang XF., Boyd D., *FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy*, *Injury*, 2012, 43(5):553-572.
- [18] Merolli A., Masciangelo M., Morini A., Mingarelli L., De Vitis R., Militerno A., Rocchi L., Catalano F., *La rigenerazione dei nervi periferici mediante guide neurali artificiali: l'applicazione clinica e la ricerca sperimentale*, *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia - organo ufficiale della Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia*, GIOT Agosto 2011, 37:198-205. Pacini Editore SRL.
- [19] IJkema-Paassen J., Jansen K., Gramsbergen A., Meek MF., *Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation*, *Biomaterials*, 2004, 25(9):1583-1592.
- [20] Snyder CC., Webster HD., Pickens JE., Hines WA., Warden G., *Intraneural neuroorrhaphy: a preliminary clinical and histological evaluation*, *Ann Surg*, 1968, 167(5):691-696.
- [21] Lubiatuski P., Unsal FM., Nair D., Ozer K., Siemionow M., *The epineural sleeve technique for nerve graft reconstruction enhances nerve recovery*, *Microsurgery*, 2008, 28(3):160-167.
- [22] Risitano G., Battiston B., Coppolino S., Tos P., *Risultati clinici sull'utilizzo della tubulazione biologica e sintetica nella ricostruzione dei nervi digitali della mano*, *Riv Chir Mano*, 2001, 38(1).
- [23] Leckenby JJ., Furrer C., Haug L., Juon Personeni B., Vögelin E., *A Retrospective Case Series Reporting the Outcomes of Avance Nerve Allografts in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries*, *Plast Reconstr Surg*, 2020, 145(2):368-381.
- [24] Neubauer D., Graham JB., Muir D., *Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts*, *Exp Neurol*, 2007, 207(1):163-170.
- [25] Zhu S., Zhu Q., Liu X., et al., *Three-dimensional Reconstruction of the Microstructure of Human Acellular Nerve Allograft*, *Sci Rep* 6, 30694 (2016).
- [26] Lee JY., Bashur CA., Goldstein AS., Schmidt CE., *Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications*, *Biomaterials*. 2009, 30(26):4325-4335.
- [27] Huang J., Hu X., Lu L., Ye Z., Zhang Q., Luo Z., *Electrical regulation of Schwann cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers*, *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93(1):164-174.
- [28] Vijayavenkataraman S., Zhang S., Thaharah S., Sriram G., Lu WF., Fuh JYH., *Electrohydrodynamic Jet 3D Printed Nerve Guide Conduits (NGCs) for Peripheral Nerve Injury Repair*, *Polymers (Basel)*, 2018, 10(7):753.
- [29] Moore MJ., Friedman JA., Lewellyn EB., et al., *Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration*, *Biomaterials*, 2006, 27(3):419-429.
- [30] Zeng CG., Xiong Y., Xie G., Dong P., Quan D., *Fabrication and evaluation of PLLA multichannel conduits with nanofibrous microstructure for the differentiation of NSCs in vitro*, *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(5-6):1038-1048.

- [31] Jeffries EM., Wang Y., *Incorporation of parallel electrospun fibers for improved topographical guidance in 3D nerve guides*, *Biofabrication*, 2013, 5(3):035015.
- [32] Dinis TM., Elia R., Vidal G., et al., *3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration*, *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015, 41:43-55.
- [33] Jenkins PM., Laughter MR., Lee DJ., Lee YM., Freed CR., Park D., *A nerve guidance conduit with topographical and biochemical cues: potential application using human neural stem cells*, *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10(1):972.
- [34] Yu W., Zhao W., Zhu C., et al., *Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate*, *BMC Neurosci*, 2011, 12:68.
- [35] Kim YT., Haftel VK., Kumar S., Bellamkonda RV., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*, *Biomaterials*, 2008, 29(21):3117-3127.
- [36] Yao L., O'Brien N., Windebank A., Pandit A., *Orienting neurite growth in electrospun fibrous neural conduits*, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 90(2):483-491.
- [37] Zhu Y., Wang A., Patel S., et al., *Engineering bi-layer nanofibrous conduits for peripheral nerve regeneration*, *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(7):705-715.
- [38] Kim JI., Hwang TI., Aguilar LE., Park CH., Kim CS., *A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up*, *Sci Rep*, 2016, 6:23761.
- [39] Clements IP., Kim YT., English AW., Lu X., Chung A., Bellamkonda RV., *Thin-film enhanced nerve guidance channels for peripheral nerve repair*, *Biomaterials*, 2009, 30(23-24):3834-3846.
- [40] Koh HS., Yong T., Teo WE., et al., *In vivo study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration*, *J Neural Eng*, 2010, 7(4):046003.
- [41] Quigley AF., Bulluss KJ., Kyratzis IL., et al., *Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve*, *J Neural Eng*, 2013, 10(1):016008.
- [42] Rutkowski GE., Miller CA., Jeftinija S., Mallapragada SK., *Synergistic effects of micropatterned biodegradable conduits and Schwann cells on sciatic nerve regeneration*, *J Neural Eng*, 2004, 1(3):151-157.
- [43] Ni HC., Tseng TC., Chen JR., Hsu SH., Chiu IM., *Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap*, *Biofabrication*, 2013, 5(3):035010.
- [44] Chang W., Shah MB., Lee P., Yu X., *Tissue-engineered spiral nerve guidance conduit for peripheral nerve regeneration*, *Acta Biomater*, 2018, 73:302-311.

- [45] Biazar E., Khorasani MT., Montazeri N., et al., *Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction*, Int J Nanomedicine, 2010, 5:839-852.
- [46] Singh R., Gautam S., Sharma B., Jain P., Chauhan KD., *Chapter 2 - Biopolymers and their classifications*, Editor(s): Thomas S., Gopi S., Amalraj A., Biopolymers and their Industrial Applications, Elsevier, 2021, 21-44.
- [47] Rajeswari A., Jackcina Stobel Christy E., Pius A., *Chapter 5 - Biopolymer blends and composites: processing technologies and their properties for industrial applications*, Editor(s): Thomas S., Gopi S., Amalraj A., Biopolymers and their Industrial Applications, Elsevier, 2021, 105-147.
- [48] Lujerdean C., Baci GM., Cucu AA., Dezmirean DS., *The Contribution of Silk Fibroin in Biomedical Engineering*, Insects, 2022, 13(3):286.
- [49] Zhang Z., He F., Wang B., et al., *Biodegradable PGA/PBAT Blends for 3D Printing: Material Performance and Periodic Minimal Surface Structures*, Polymers (Basel), 2021, 13(21):3757.
- [50] Qiao K., Guo S., Zheng Y., et al., *Effects of graphene on the structure, properties, electro-response behaviors of GO/PAA composite hydrogels and influence of electro-mechanical coupling on BMSC differentiation*, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 93:853-863.
- [51] Xu H., Holzwarth JM., Yan Y., et al., *Conductive PPy/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration*, Biomaterials, 2014, 35(1):225-235.
- [52] Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S., *Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering*, Biomaterials, 2005, 26(15):2603-2610.
- [53] Qian Y., Song J., Zhao X., et al., *3D Fabrication with Integration Molding of a Graphene Oxide/Polycaprolactone Nanoscaffold for Neurite Regeneration and Angiogenesis*, Adv Sci (Weinh), 2018, 5(4):1700499.
- [54] Kang NU., Lee SJ., Gwak SJ., *Fabrication Techniques of Nerve Guidance Conduits for Nerve Regeneration*, Yonsei Med J, 2022, 63(2):114-123.
- [55] Bozkurt A., Brook GA., Moellers S., et al., *In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix*, Tissue Eng, 2007, 13(12):2971-2979.
- [56] Yucel D., Kose GT., Hasirci V., *Polyester based nerve guidance conduit design*, Biomaterials, 2010, 31(7):1596-1603.
- [57] Zhu W., Tringale KR., Woller SA., et al., *Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits*, Mater Today (Kidlington), 2018, 21(9):951-959.
- [58] <https://www.integranerve.com/nerve-products>

- [59] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K011168>
- [60] <https://www.integranerve.com/nerve-guide>
- [61] <https://www.integranerve.com/nerve-protector>
- [62] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPCD/classification.cfm?ID=JXI>
- [63] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K180222>
- [64] <https://polyganics.com/portfolio/peripheral-nerve-repair/neurolac/>
- [65] Aslam M., Kalyar MA., Raza ZA., *Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites*, Polym Eng Sci, 2018, 58: 2119-2132.
- [66] <http://www.cmbm.unipd.it/news/bose.html>
- [67] <https://www.tainstruments.com/planar-biaxial-2-motor/>
- [68] Stocco E., Barbon S., Lora L., Grandi F., Sartore L., Tiengo C., Petrelli L., Dalzoppo D., Parnigotto PP., Macchi V., De Caro R., Porzionato A., Grandi C., *Partially oxidized polyvinyl alcohol conduit for peripheral nerve regeneration*, Sci Rep, 2018, 8(1):604.
- [69] Stocco E., Barbon S., Grandi F., et al., *Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering*, J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(7):2060-2070.
- [70] Kawai F., Hu X., *Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation*, Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(2):227-237.
- [71] Barbon S., Stocco E., Dalzoppo D., et al., *Halogen-Mediated Partial Oxidation of Polyvinyl Alcohol for Tissue Engineering Purposes*, Int J Mol Sci, 2020, 21(3):801.
- [72] Stocco E., Barbon S., Macchi V., et al., *New bioresorbable wraps based on oxidized polyvinyl alcohol and leukocyte-fibrin-platelet membrane to support peripheral nerve neurorrhaphy: preclinical comparison versus NeuraWrap*, Sci Rep 9, 2019, 9(1):17193.
- [73] Brückner S., Allegra G., Pegoraro M., La Mantia FP., *Scienza e tecnologia dei materiali polimerici*, 2001.