



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
BIOINGEGNERIA**

**Caratterizzazione meccanica di hydrogel a base di alcool polivinilico e  
nanotubi di carbonio per la rigenerazione nervosa**

**Relatrice: Prof.ssa Silvia Todros**

**Correlatrice: Dott.ssa Marta Confalonieri**

**Laureanda: Francesca Lampis**

**ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024**

**Data di laurea 9 Luglio 2024**



# Indice

|   |    |
|---|----|
| Abstract.....   | 1  |
| Capitolo 1. Il sistema nervoso .....  | 3  |
| 1.1 Sistema nervoso centrale .....  | 3  |
| 1.1.1 Cellule del sistema nervoso centrale .....                                    | 5  |
| 1.1.2 Il neurone.....   | 6  |
| 1.2 Sistema nervoso periferico.....   | 8  |
| 1.3 Anatomia dei nervi.....   | 10 |
| 1.4 Lesioni del nervo .....   | 11 |
| 1.5 Trattamento delle lesioni nervose .....   | 14 |
| 1.5.1 Tecniche di riparazione dei nervi periferici.....                             | 16 |
| 1.5.2 Trattamento delle lesioni ai nervi periferici .....                           | 17 |
| Capitolo 2. Neuroguide .....  | 20 |
| 2.1 Struttura delle neuroguide.....   | 21 |
| 2.2 Materiali per la creazione di condotti nervosi.....                             | 22 |
| 2.2.1 Polimeri sintetici biodegradabili .....                                       | 23 |
| 2.2.2 Polimeri naturali.....  | 26 |
| 2.3 Tecniche di fabbricazione delle neuroguide.....                                 | 30 |
| 2.4 Neuroguide commerciali.....   | 36 |
| Capitolo 3. Materiali e metodi.....   | 44 |
| 3.1 Materiali.....  | 44 |
| 3.1.1 PVA .....   | 44 |
| 3.1.2 PVA parzialmente ossidato (OxPVA).....  | 45 |
| 3.1.3 Nanotubi di carbonio.....   | 45 |
| 3.2 Metodi.....   | 46 |
| 3.2.1 Preparazione hydrogel a base di OxPVA .....                                   | 46 |
| 3.2.2 Preparazione hydrogel a base di OxPVA caricato con nanotubi di carbonio ..... | 47 |
| 3.2.3 Fabbricazione dei provini.....  | 48 |
| 3.2.4 Preparazione delle neuroguide .....   | 49 |
| 3.2.5 Microscopia digitale e analisi d'immagine .....                               | 50 |
| 3.2.6 Strumentazione per prove meccaniche.....                                      | 52 |
| 3.2.7 Protocollo prove di trazione .....  | 53 |
| 3.2.8 Protocollo <i>suture retention</i> .....                                      | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Capitolo 4. Risultati e discussione.....                  | 57 |
| 4.1 Analisi d'immagine.....                               | 57 |
| 4.2 Risultati prove di trazione.....                      | 58 |
| 4.3 Risultati protocollo di <i>suture retention</i> ..... | 62 |
| Conclusioni.....  | 65 |
| Bibliografia.....   | 66 |

## Abstract

Il presente studio ha lo scopo di analizzare e caratterizzare il comportamento meccanico di neuroguide (piccoli condotti per la rigenerazione nervosa) in hydrogel a base di alcool polivinilico parzialmente ossidato (OxPVA) e combinato con nanotubi di carbonio (*Carbon Nanotubes*, CNT). È stato, infatti, notato da precedenti studi come il PVA parzialmente ossidato migliori la biodegradabilità e la biocompatibilità rispetto al PVA nativo, inoltre l'aggiunta di nanotubi di carbonio a differenti percentuali, permette un miglioramento della conduttività dell'hydrogel composito, aspetto che risulterà utile per essere applicato in futuro in ambito dell'ingegneria tissutale dei nervi periferici. Nel presente lavoro di tesi, si è partiti dallo studio anatomico dei nervi e delle lesioni nervose, analizzando lo stato dell'arte in merito alla rigenerazione nervosa. In seguito, sono state studiate le diverse neuroguide presenti in commercio. Alcune di queste neuroguide commerciali sono state utilizzate in studi clinici con risultati apprezzabili, ma in questa tesi si propongono diversi materiali che oltre ad avere buone caratteristiche di biodegradabilità e biocompatibilità possono promuovere una buona rigenerazione nervosa. La preparazione e reticolazione degli hydrogel, la costruzione degli stampi e delle neuroguide sono state realizzate presso la Sezione di Anatomia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova. La miscelazione con i nanotubi di carbonio è stata realizzata in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova. Al fine di analizzare le proprietà meccaniche del materiale, sono state realizzate delle membrane con i suddetti materiali ed eseguite prove di trazione mono-assiale e prove di resistenza alla sutura (*suture retention*) presso il Laboratorio di Meccanica dei Materiali Biologici del Dipartimento di Ingegneria Industriale. Le neuroguide vengono suture alle due parti (prossimali e distali) dei nervi danneggiati per garantire un ambiente ottimale alla rigenerazione assonale. Le prove di *suture retention* hanno dato come risultato la forza massima a cui il filo della sutura può resistere. Tali ricerche costituiscono un'analisi preliminare per lo studio in vivo di questi costrutti.

Nello specifico nel primo capitolo vengono descritti gli aspetti anatomici rilevanti del sistema nervoso e dei nervi; vengono esposte inoltre, le lesioni nervose e i metodi comunemente attuati per la riparazione dei nervi periferici e per il trattamento delle lesioni nervose.

Nel secondo capitolo è stata delineata una panoramica generale sull'importanza e sullo scopo delle neuroguide: si sono analizzate le caratteristiche meccaniche che dovrebbe possedere una buona neuroguida. Si è passati, poi, alla descrizione della struttura e dei materiali con cui vengono

costruiti i condotti nervosi. Infine, si sono analizzate le neuroguide commerciali, valutando sia i pro che i contro di ciascuna di esse. Di alcuni condotti nervosi in commercio sono stati visti anche dei casi clinici.

Nel terzo capitolo vengono descritti tutti i materiali e i metodi impiegati nella presente tesi. In particolare, sono riportati i protocolli sperimentali utilizzati per la realizzazione dell'hydrogel a base di OxPVA e di hydrogel a base di OxPVA caricato con nanotubi di carbonio, la fabbricazione dei provini e la reticolazione dell'hydrogel, le prove meccaniche di trazione e *suture retention*. Tra la strumentazione sono stati descritti il sistema Bose<sup>®</sup> ElectroForce Planar Biaxial TestBench, utilizzato per le prove meccaniche e il microscopio PCE-MM200 UV impiegato per l'acquisizione delle immagini.

Nel quarto capitolo sono esposti i risultati ottenuti sia per quanto riguarda l'analisi d'immagine, sia per quanto riguarda le prove di trazione mono-assiale e le prove di *suture retention*.

# Capitolo 1. Il sistema nervoso

Il termine sistema nervoso indica l'insieme degli organi e delle strutture che permettono di trasmettere segnali tra le diverse parti del corpo e di coordinare le sue azioni. È composto dal cervello, dal midollo spinale, dagli organi di senso e da tutti i nervi che mettono in comunicazione questi organi con il resto del corpo. Il sistema nervoso è distinguibile in centrale e periferico, questi sono a loro volta ripartibili in più parti, ognuna dotata di una funzione specifica.

## 1.1 Sistema nervoso centrale

La funzione del sistema nervoso centrale è quella di integrare e coordinare le percezioni sensoriali provenienti sia dall'esterno che dall'interno del corpo e di elaborare delle risposte motorie che attivino o modulino l'attività di specifici organi come i muscoli o le ghiandole. Il sistema nervoso centrale (SNC), chiamato anche nevrassa, è composto dal midollo spinale e dall'encefalo. Esso si trova nella parte assiale del corpo umano ed è all'interno del canale vertebrale (midollo spinale) e della scatola cranica (encefalo). Il midollo spinale è una struttura di tessuto nervoso, di forma cilindrica, collocato all'interno del canale vertebrale. È protetto quindi dallo scheletro osseo vertebrale. Dal midollo spinale si ripartono 31 paia di nervi spinali (Figura 1.1). Ciascun paio di nervi fuoriesce dalla colonna vertebrale, attraversando i fori intervertebrali. Sono così divisi: 8 paia di nervi cervicali, 12 paia di nervi toracici, 5 paia di nervi lombari, 5 paia di nervi sacrali e un singolo nervo coccigeo. Essi presentano una radice sensitiva dorsale che emerge dal solco postero-laterale, e una radice motoria ventrale che emerge dal solco antero-laterale. Nonostante i nervi spinali emergano lungo tutta la lunghezza della colonna vertebrale, il midollo spinale si estende solo per i due terzi della lunghezza. Nel midollo spinale sono localizzate la sostanza grigia e la sostanza bianca. La prima è localizzata in un'area interna a forma di "H", mentre la sostanza bianca è localizzata attorno alla grigia. La sostanza grigia svolge diverse funzioni cruciali, tra cui: l'elaborazione e l'integrazione delle informazioni sensoriali, motorie e cognitive; il controllo dei movimenti volontari; la regolazione delle funzioni viscerali; la trasmissione delle informazioni. La sostanza bianca ha la funzione di collegamento e interazione degli stimoli motori.

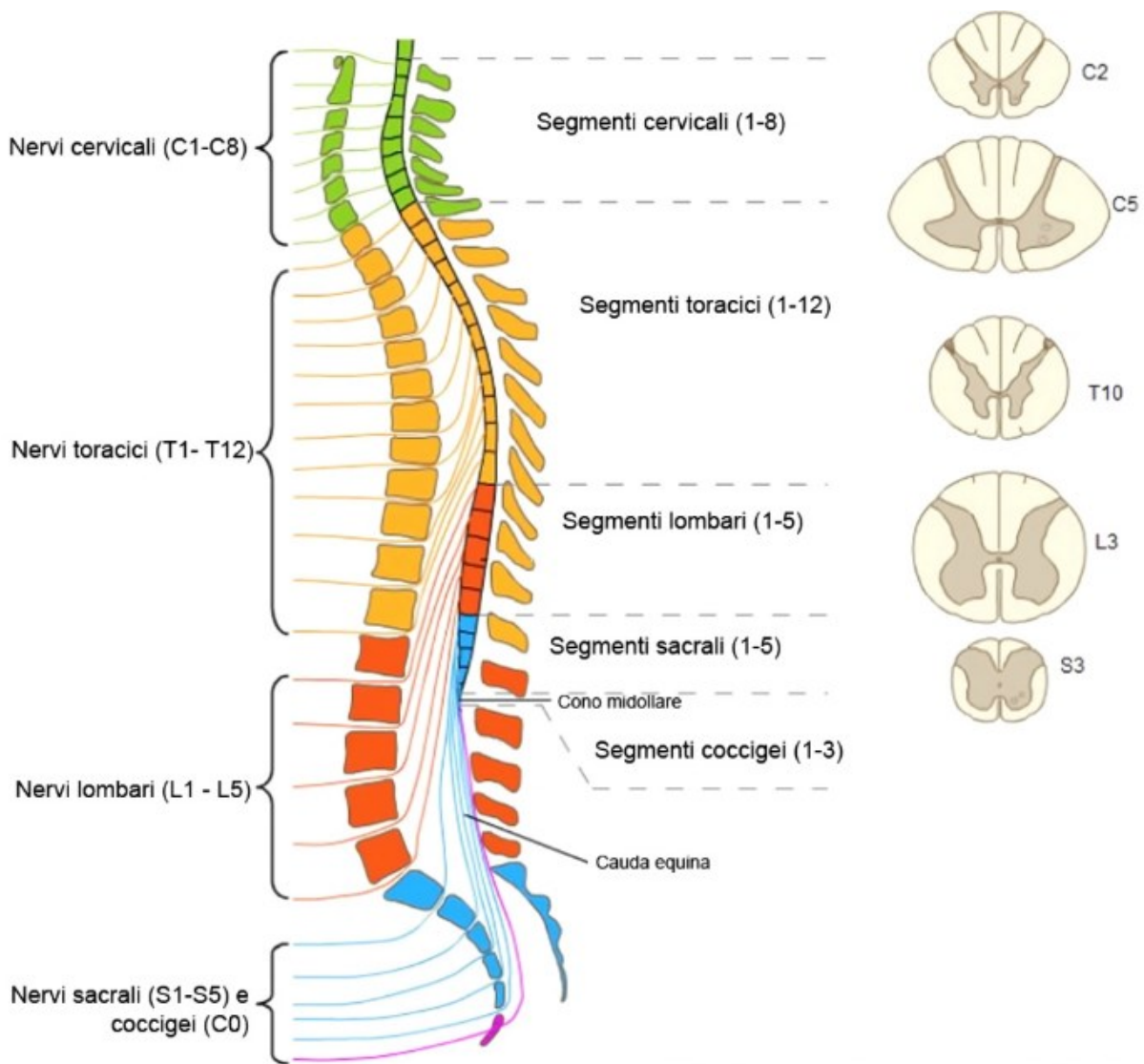


Figura 1.1 Nervi spinali [1].

L'encefalo è sede di funzioni cognitive importanti come l'intelligenza, la memoria, l'apprendimento e le emozioni. Esso è costituito da tre parti principali: prosencefalo, cervelletto e tronco encefalico. Il prosencefalo è diviso nei due emisferi destro e sinistro e consta di cervello e diencefalo. Il cervello – contenuto all'interno della scatola cranica – è formato da una parte più esterna che contiene i corpi dei neuroni (la corteccia cerebrale o sostanza grigia) e una parte più interna in cui si trovano le fibre nervose formate dai loro prolungamenti che trasmettono informazioni al resto dell'organismo nonché quelle che invece ricevono informazioni dalle altre parti del corpo. All'esterno della corteccia tutte queste fibre sono circondate da mielina, di colore bianco, per cui la parte interna del cervello prende il nome di sostanza bianca. All'interno del cervello sono presenti numerose strutture, fra cui il talamo, l'epitalamo, l'ipotalamo, l'ipofisi (o



ghiandola pituitaria) e i gangli della base, che includono al loro interno l'amigdala, il nucleo caudato e il nucleo lenticolare (a sua volta costituito da putamen e globo pallido). Nel loro insieme il caudato e il putamen formano il corpo striato.

Il cervello è diviso in due emisferi uniti fra loro ed è in continuità diretta con il midollo spinale, tramite cervelletto e tronco encefalico. Entrambi sono circondati da una serie di membrane protettive (le meningi). I due emisferi sono protetti anche dal liquido cerebrospinale prodotto dal cervello, che scorre all'interno dello spazio delimitato da due delle meningi (la pia madre e l'aracnoide). Da entrambi si dipartono nervi diretti verso altre parti del corpo. Il cervelletto svolge funzioni fondamentali nel controllo dell'attività motoria e nel mantenimento dell'equilibrio. Il tronco encefalico invece è diviso in mesencefalo, ponte e midollo allungato. Dal tronco dell'encefalo si propagano dodici paia di nervi cranici, essi sono dei nervi periferici che si originano direttamente dall'encefalo e non dal midollo spinale. Le strutture del cervello e del midollo spinale sono speculari: la parte centrale del midollo spinale è difatti sostanza grigia formata dai corpi dei neuroni, mentre la parte esterna è formata da materia bianca. Il sistema nervoso è composto da cellule nervose, i neuroni, e da cellule di sostegno, le cellule della glia.

### 1.1.1 Cellule del sistema nervoso centrale

Il 90% del sistema nervoso centrale è costituito da cellule gliali, anche dette neuroglia, le quali includono molte tipologie di cellule che supportano, isolano e proteggono i neuroni. Tra le cellule gliali abbiamo:

- **Astroцити**

Abbondanti cellule stellate che rappresentano quasi la metà del tessuto neurale. Danno sostegno ai neuroni, assicurano l'isolamento dei tessuti nervosi e la protezione da corpi estranei in caso di lesioni. Tra le altre funzioni degli astrociti abbiamo la funzione di modulazione della trasmissione sinaptica, il mantenimento dell'omeostasi degli elettroliti del liquido extracellulare per stabilizzare l'eccitabilità cellulare e la funzione di protezione dalle sostanze tossiche e dagli stress ossidativi.

- **Microglia**

Le cellule della microglia sono responsabili della difesa immunitaria del sistema nervoso centrale, costituendo la prima linea di difesa contro sostanze estranee come batteri e detriti cellulari.

- Cellule ependimali

Sulla superficie apicale presentano delle ciglia che hanno il compito di muovere il liquido cerebrospinale e formare un cuscino acquoso protettivo attorno al sistema nervoso centrale.

- Oligodendrociti

Gli oligodendrociti sono cellule deputate alla produzione di mielina, si attorcigliano intorno alle fibre nervose, offrendo rivestimenti isolanti grassi chiamati guaine mieliniche.

Formano la mielina attorno agli assoni del sistema nervoso centrale.

Sebbene la neuroglia da un punto di vista strutturale, assomiglino ai neuroni, non è in grado di trasmettere impulsi nervosi [2].

### 1.1.2 Il neurone

Il neurone è una cellula altamente specializzata nella raccolta e nella trasmissione degli impulsi nervosi. Essi sono cellule eccitabili che ricevono, trasmettono e analizzano le informazioni e coordinano una risposta adeguata. Tutti i neuroni presentano un corpo cellulare (soma) contenente un nucleo, un assone (o occasionalmente nessuno) e i dendriti (Figura 1.2).

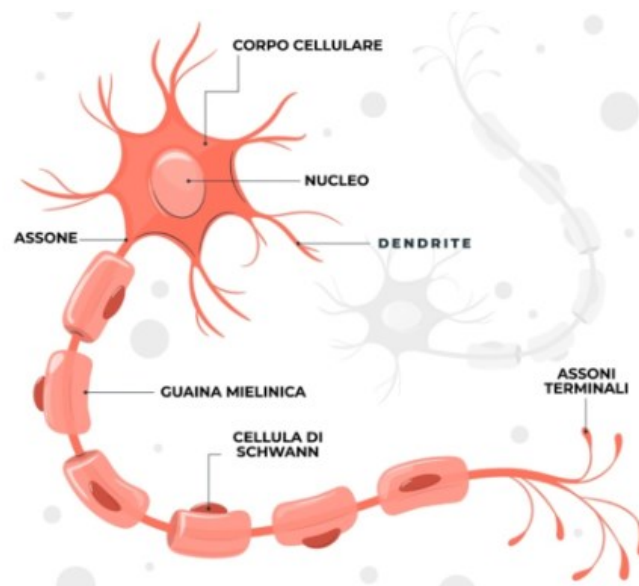


Figura 1.2 Neurone [2].

Il corpo cellulare neuronale ha un diametro che va da pochi micron ( $\mu\text{m}$ ) fino a oltre 100  $\mu\text{m}$ . Il corpo cellulare contiene il nucleo e molti degli organuli intracellulari tra cui: il reticolo endoplasmatico rugoso (*rough endoplasmic reticulum*, RER), l'apparato di Golgi (coinvolto nell'accumulo di potenziali messaggeri, nel loro trasporto e nel loro rilascio), numerosissimi

mitocondri. Il soma svolge molte funzioni importanti, come la sintesi proteica ed il metabolismo cellulare [3]. Nella maggior parte dei casi, i dendriti occupano la superficie maggiore della cellula nervosa. Essi si diramano dal corpo cellulare ricevendo afferenze da altri neuroni attraverso delle giunzioni chiamate sinapsi. Il neurone presinaptico rilascia un neurotrasmettitore all'interno della giunzione e questo diffondendosi va a legarsi a specifici recettori localizzati sulla membrana postsinaptica. A differenza del dendrite, la cui funzione è quella di ricevere informazioni, il compito dell'assone è infatti inviarle. L'assone ha una lunghezza variabile (fino a più di 1m) dal pirenoforo (parte della cellula nervosa in cui è presente il nucleo) [3]. Quando gli assoni sono più spessi di 1 o 2  $\mu\text{m}$  sono isolati da una guaina mielinica, formata dall'oligodendroglia, nell'SNC, o dalle cellule di Schwann, nel SNP. L'assone si origina in corrispondenza del cono d'emergenza e nel suo tratto iniziale contiene i canali  $\text{Na}^+$ , da cui si origineranno i potenziali d'azione (Figura 1.3).

Un aumento transitorio della permeabilità del sodio e del potassio è alla base dell'origine del potenziale d'azione. I segnali nervosi si misurano partendo dal potenziale di membrana. Il potenziale di membrana viene calcolato inserendo un elettrodo all'interno dell'assone e misurando la tensione di questo rispetto ad un altro elettrodo posto nel liquido extracellulare. Il potenziale di membrana a riposo di un neurone misura circa  $-70\text{ mV}$ . In seguito a degli stimoli, il potenziale di membrana varia improvvisamente diventando meno negativo, si depolarizza. Il valore soglia per il quale scatta il potenziale d'azione è di circa  $10\text{-}20\text{ mV}$ , che corrisponde a un potenziale di membrana di  $50\text{-}60\text{ mV}$ . Un potenziale d'azione in un neurone è diviso in tre fasi:

1. Depolarizzazione. La prima fase consiste in una rapida depolarizzazione durante la quale il potenziale di membrana del neurone passa da  $-70\text{ mV}$  a  $+30\text{ mV}$ . A questa fase corrisponde l'apertura dei canali di  $\text{Na}^+$ , il sodio entrando depolarizza il neurone, facendolo avvicinare al potenziale d'equilibrio di tale ione ( $+60\text{ mV}$ ).
2. Ripolarizzazione. Nella seconda fase avviene la ripolarizzazione del potenziale di membrana. Il potenziale di membrana torna al suo valore iniziale di  $-70\text{ mV}$  in  $1\text{ ms}$ . Dopo l'incremento della permeabilità del sodio, questa diminuisce rapidamente. In questo momento si aprono anche i canali del potassio che uscendo dalla cellula secondo gradiente elettrochimico, ripolarizzano la membrana riportandola al potenziale di riposo.
3. Iperpolarizzazione. La terza fase viene definita iperpolarizzazione postuma. Questo potenziale più negativo è dovuto ai canali del potassio che rimangono aperti per circa  $5\text{-}15\text{ ms}$  permettendo alla membrana di arrivare a valori di potenziale di equilibrio simili a quelli del  $\text{K}^+$ .

Durante ed immediatamente dopo un potenziale d'azione la membrana ha una ridotta eccitabilità. Questo periodo viene definito periodo refrattario ed è diviso in due fasi: periodo refrattario assoluto e periodo refrattario relativo. Durante il periodo refrattario assoluto nessun potenziale d'azione può essere generato in risposta a uno stimolo. Questo comprende tutta la fase di depolarizzazione rapida più gran parte della fase di ripolarizzazione. Il periodo refrattario relativo si verifica dopo quello assoluto per una durata di circa 5-15 ms (tempo in cui i canali del potassio risultano ancora aperti e c'è una iperpolarizzazione della membrana). Durante questo periodo è possibile generare un secondo potenziale d'azione, ma solo nel caso in cui lo stimolo sia molto più intenso di quello necessario a raggiungere il valore soglia.

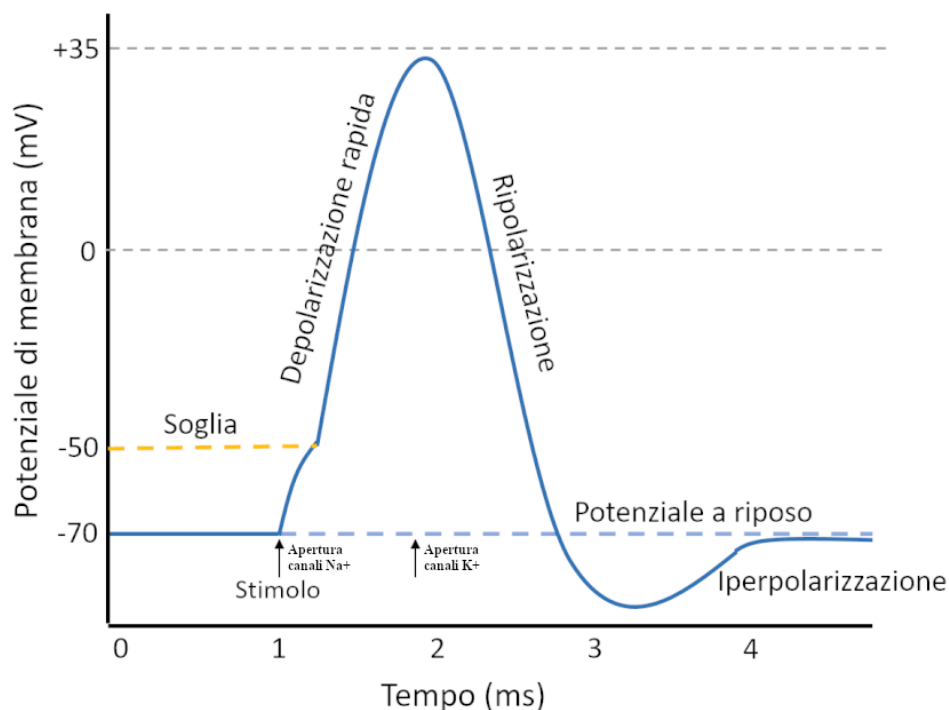


Figura 1.3 Diverse fasi potenziale d'azione e apertura canali ionici [4].

## 1.2 Sistema nervoso periferico

Il sistema nervoso periferico (SNP) (Figura 1.4) costituisce la porzione del sistema nervoso al di fuori del sistema nervoso centrale (SNC). Il suo ruolo principale è quello di trasmettere le sensazioni sensoriali al SNC e di portare i comandi motori dal SNC alla periferia. Queste informazioni, sia sensoriali che motorie, sono trasportate attraverso fasci di assoni che formano i nervi. I nervi che connettono il midollo spinale alla periferia sono chiamati nervi spinali (presenti in 31 paia), mentre quelli che collegano l'encefalo alla periferia sono noti come nervi cranici o

encefalici (12 paia). Il sistema nervoso periferico si divide a sua volta in afferente (o sensoriale) ed efferente (o motorio). La divisione motoria può essere suddivisa in due gruppi:

- Sistema nervoso somatico, che permette di controllare consapevolmente i muscoli scheletrici.
- Sistema nervoso autonomo (SNA), il quale regola eventi involontari come l'attività della muscolatura liscia, del muscolo cardiaco e delle ghiandole. Suddiviso a sua volta in: sistema nervoso simpatico, sistema nervoso parasimpatico e sistema nervoso enterico.

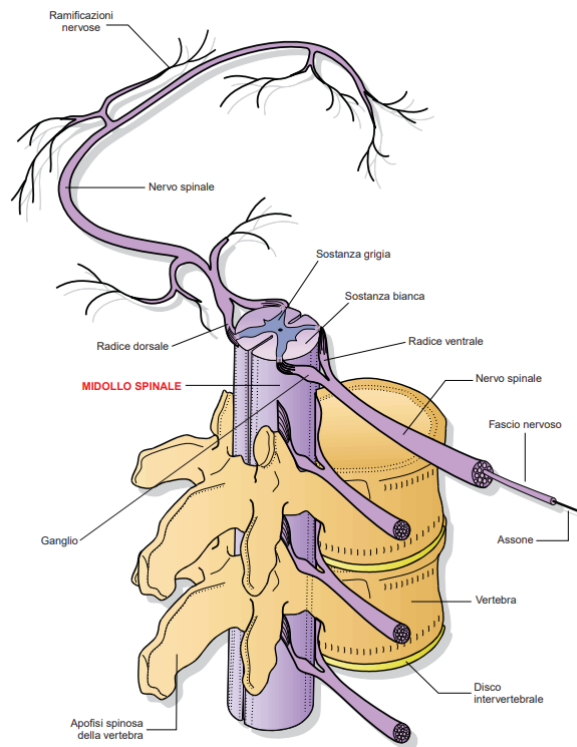


Figura 1.4 Sistema nervoso periferico [5].

Una tipologia importante di cellule presenti nel sistema nervoso periferico sono le cellule di Schwann. Esse hanno come principale funzione quella di formare un avvolgimento di mielina attraverso gli assoni dei neuroni. La mielina serve a isolare i neuroni, in modo che questi ultimi possano trasmettere il potenziale d'azione in modo più veloce. Le cellule di Schwann formano la mielina attorno agli assoni del sistema nervoso periferico (Figura 1.5); una cellula di Schwann fornisce mielina soltanto per un singolo assone [6]. La guaina mielinica viene interrotta lungo il suo decorso dai nodi di Ranvier, in cui la membrana dell'assone contiene i canali voltaggio-dipendenti per il sodio e per il potassio che permettono la trasmissione dei potenziali d'azione.

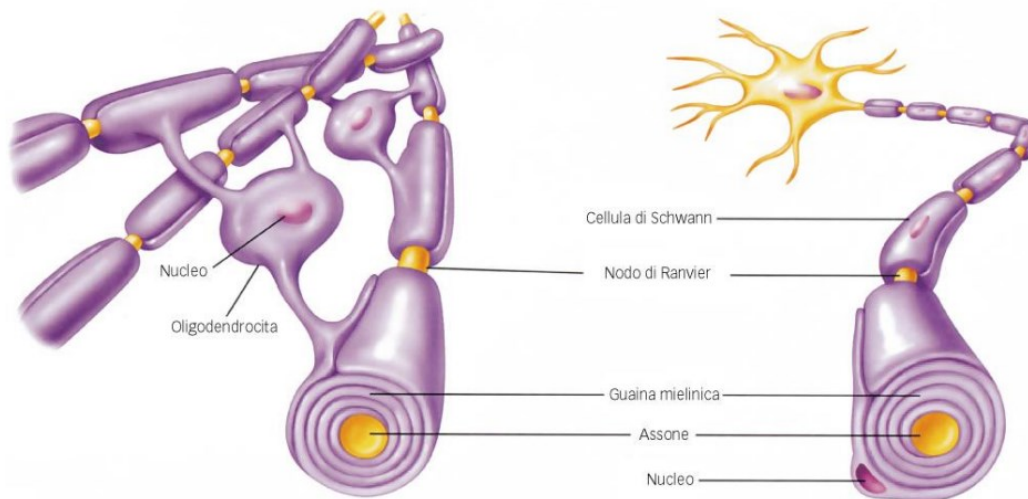


Figura 1.5 Disposizione degli strati di mielina formati dalle cellule di Schwann [6].

### 1.3 Anatomia dei nervi

I nervi sono strutture anatomiche del sistema nervoso periferico avvolte da una guaina di tessuto connettivo e costituiti da fasci di assoni che trasportano informazioni da o verso il SNC (Figura 1.6). Ogni fibra nervosa è circondata da uno strato endoneurale. Queste fibre nervose sono riunite in fascicoli e circondate da una guaina chiamata perinevrio. A loro volta questi grandi fasci sono tenuti insieme da uno strato connettivo chiamato epinevrio.

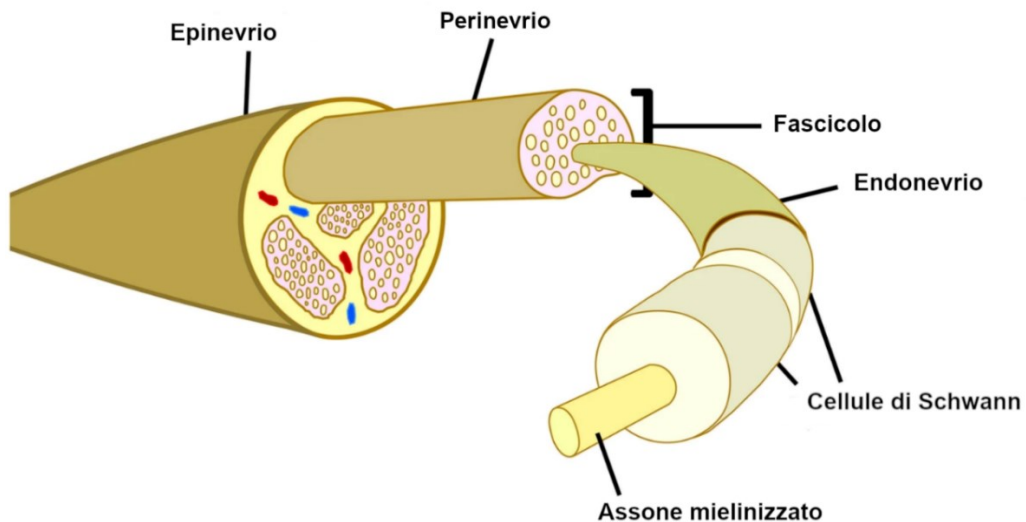


Figura 1.6 Rappresentazione di un nervo periferico [7].

L'endonevrio è uno strato di tessuto connettivo lasso che circonda ciascuna fibra nervosa o assone. Esso è formato da fini fibre collagene disposte in direzione longitudinale. Queste fibre di collagene

sono strettamente collegate alla membrana basale delle cellule di Schwann, queste ultime supportano la crescita dell'assone, tramite una grande varietà di fattori di crescita. L'endonevrio si distingue in due parti: una interna che si trova immediatamente all'esterno delle cellule di Schwann ed entra in contatto con i nodi di Ranvier e una esterna molto simile che non entra in contatto con i nodi di Ranvier. Nelle fibre nervose mieliniche o amieliniche molto piccole non vi è alcuna separazione rilevabile tra gli strati endoneurici. Il perinevrio è la guaina che racchiude i fasci di nervi o fascicoli, è formato da diversi strati di collagene con fibre disposte in direzione circolare, obliqua e longitudinale. A racchiudere i fascicoli circondati da perinevrio è uno spesso strato di tessuto connettivo chiamato epinevrio. L'epinevrio è costituito da un tessuto connettivo contenente collagene ed elastina [8]. L'epinevrio contiene piccoli vasi sanguigni che nell'endonevrio formano una rete capillare irrorando le fibre nervose.

## 1.4 Lesioni del nervo

Le lesioni dei nervi periferici (*Peripheral nerve injuries*, PNI) colpiscono un milione di persone in tutto il mondo ogni anno, per questo risultano uno dei principali problemi nei centri traumatologici. La valutazione delle lesioni nervose inizia con un'accurata anamnesi e un esame fisico, queste due analisi sono sufficienti per diagnosticare specifici deficit. Le lesioni nervose periferiche possono coinvolgere tutte le componenti del nervo, incluse le fibre nervose, le cellule di Schwann, il tessuto connettivo e i vasi sanguigni. Le lesioni dei nervi periferici possono ostacolare il recupero delle funzioni e il ritorno al lavoro, e possono causare dolore cronico. La comprensione della classificazione, della patofisiologia e dell'elettrodiagnosi di tali lesioni è essenziale per raggiungere una diagnosi accurata, localizzare il danno nervoso periferico e gestirlo in modo appropriato. Queste lesioni portano un'interruzione degli impulsi nervosi e la rigenerazione nervosa dipende sia da fattori intrinseci che estrinseci al nervo. A differenza del SNC, il SNP ha un forte potenziale di rigenerazione nervosa, quindi la gravità e le conseguenze delle neuropatie causate da lesioni dei nervi periferici tendono a essere più flessibili e variabili in base al tipo di danno. Le lesioni lievi dei nervi periferici, hanno buona probabilità di guarire in autonomia, mentre le lesioni più gravi necessitano di interventi chirurgici. Le PNI sono state classificate in diversi modi, le principali classificazioni sono quelle proposte Sunderland e Seddon [9]. Quest'ultimo ha classificato le PNI in tre gradi sulla base della presenza di demielinizzazione del nervo e dell'entità del danno agli assoni e al tessuto connettivo. Sunderland ha poi fornito un'ulteriore suddivisione sulla base della discontinuità di diversi strati di tessuti connettivi nei nervi periferici.

I tre gradi di Seddon includono la neuroaprassia, l'assonotmesi e la neurotmesi. La neuroaprassia si verifica in seguito a un danno ischemico acuto al nervo, avviene una demielinizzazione focale e blocco della conduzione nervosa, successivamente si ha perdita della funzione del nervo stesso (motoria e/o sensitiva). Le fibre dei motoneuroni sono le più suscettibili a questa lesione, inizialmente perdono la loro capacità di funzionamento, ma poi la riacquistano. In questo tipo di danno, la capacità di diffusione del potenziale d'azione del nervo viene parzialmente o completamente persa, ma la continuazione assonale essenziale rimane interamente preservata. Poiché il danno non produce lesione dell'assone, avviene la rimielinizzazione del nervo e non è necessario intervenire, il blocco di funzione è transitorio e consente una ripresa totale e generalmente rapida, entro tre mesi.

La assonotmesi è causata da un danno al nervo più grave rispetto alla neuroaprassia, a causa di questa lesione le fibre nervose vengono gravemente danneggiate e portano al deterioramento periferico. La degradazione dell'assone lesionato prende il nome di degenerazione Walleriana al termine della quale il nervo potrà rigenerare ad una velocità teorica di circa 1 mm al giorno (circa 2.5 – 3 cm al mese) quindi una guarigione più lenta rispetto al recupero che si avrebbe con la neuroaprassia. Il recupero però è generalmente completo e l'intervento chirurgico non necessario.

La neurotmesi è il terzo grado di lesione nervosa che provoca la lesione dei costituenti del tessuto connettivo neurale e ha effetti sul perinevrio, epinevrio e/o endonevrio. La fibra nervosa è interamente divisa in due estremità e porta alla paralisi totale motoria. Per tali lesioni il recupero funzionale è possibile solo tramite la ricostruzione chirurgica del nervo lesionato.

Nel 1951, lo scienziato Sunderland ha ampliato la classificazione di Seddon e l'ha suddivisa in cinque gradi in base all'entità del danno ai tessuti. Il primo grado è la neuroaprassia, una condizione che comporta un blocco temporaneo degli impulsi nervosi e un leggero danno alla guaina mielinica. L'assonotmesi introdotta da Seddon precedentemente, viene divisa in tre gradi. Il danno di grado due consiste in una separazione della guaina mielinica dall'assone. I tessuti connettivi rimangono integri. La conseguenza è una denervazione delle aree coinvolte con problemi alle funzioni sensoriali e motorie. Il recupero completo può richiedere da alcune settimane a diversi mesi, la rigenerazione assonale è essenziale, ma di solito non è necessario un intervento chirurgico. Nel caso del danno di grado 3, sia l'assone che la guaina assonale si separano dallo strato endoneurale, rendendo il recupero funzionale più difficile. La lesione di grado quattro è ancora più grave, solo l'epinevrio è mantenuto intatto mentre gli altri strati e la guaina assonale sono disconnessi. Nella



lesione di grado 5, endoneurio, perinevrio, epinevrio e la guaina mielinica sono disconnessi. In quest'ultimo grado l'intervento chirurgico è necessario per il raggiungimento del recupero totale. Di seguito viene riportata la tabella con il confronto tra la classificazione di Seddon e di Sunderland (Tabella 1.1).

| Classificazione Seddon | Classificazione Sunderland | Definizione e Caratteristiche   | Meccanismo di recupero                                | Prognosi                       |
|------------------------|----------------------------|---|---|--------------------------------|
| Neuroaprassia          | Grado 1                    | Demielinizzazione senza perdita assonale  | Rimielinizzazione                                     | Pieni recupero; < 3 mesi       |
| Assonotmesi            | Grado 2                    | Lesione assonale senza danni all'architettura nervosa di supporto; si verifica degenerazione Walleriana                               | Ricrescita assonale; ipertrofia delle fibre muscolari | Recupero parziale (1mm/giorno) |
|                        | Grado 3                    | La lesione all'assone e all'endonevrio causa disorganizzazione intrafascicolare; si verifica degenerazione Walleriana                 |   |                                |
|                        | Grado 4                    | La lesione alla guaina mielinica, all'assone, all'endonevrio e al perinevrio causa una disorganizzazione interna massiva; si verifica |   |                                |

|            |         |   |  |
|------------|---------|---|--|
|            |         | degenerazione<br>Walleriana   |  |
| Neurotmesi | Grado 5 | Distruzione<br>dell'intera<br>architettura del<br>nervo; transezione;<br>si verifica<br>degenerazione<br>Walleriana | Nessun recupero senza intervento<br>chirurgico |

Tabella 1.1 Classificazione delle lesioni ai nervi periferici secondo Seddon e Sunderland [10].

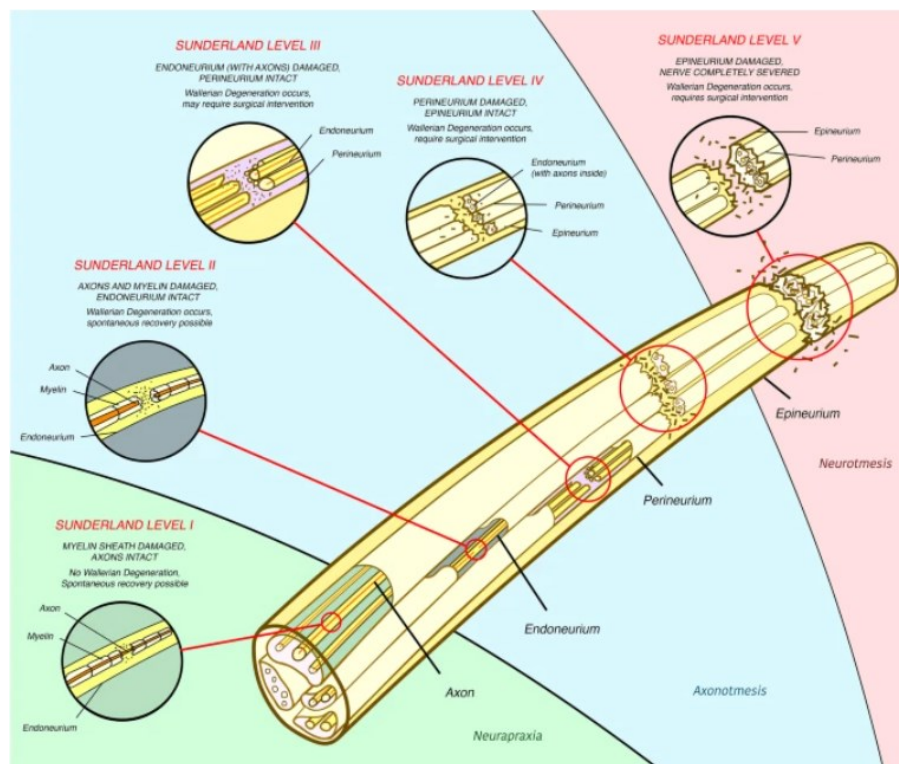


Figura 1.7 Una rappresentazione schematica delle lesioni dei nervi periferici [7].

## 1.5 Trattamento delle lesioni nervose

Al fine di aiutare medici e chirurghi negli anni Settanta nasce una nuova branca dell'ingegneria biomedica: l'ingegneria tissutale (*Tissue Engineering TE*) (Figura 1.8). Essa è un'interdisciplina che combina conoscenze e metodologie provenienti da diverse aree, come le scienze biologiche, la medicina, la chimica, la fisica e l'ingegneria, per sviluppare soluzioni che utilizzano cellule viventi,

materiali biocompatibili e fattori biochimici e fisici per la rigenerazione di tessuti e organi danneggiati o malati. L'obiettivo principale dell'ingegneria tissutale è quello di sviluppare sostituti biologici che possano imitare, sostituire o rigenerare tessuti/organi malati o danneggiati nel corpo umano. La maggior parte dell'ingegneria tissutale si basa sull'uso delle cellule viventi, ed è molto importante garantirne un'adeguata fornitura. Queste cellule possono derivare da tessuti donatori, da cellule staminali o progenitrici. Le cellule staminali possiedono due proprietà molto interessanti:

- l'auto-rinnovamento: la capacità di attraversare numerosi cicli di divisione cellulare e di avere un'elevata capacità proliferativa, mantenendo lo stato indifferenziato;
- la pluripotenza: la capacità di differenziarsi in cellule specializzate di diverso tipo.

L'uso delle cellule staminali embrionali umane (*embryonic stem cells*, ES) rappresenta un problema etico e questo è un ostacolo significativo per l'adozione industriale. Tuttavia, progressi recenti nell'utilizzo delle cellule staminali adulte, delle cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Stem Cell*, cellule iPS) e delle cellule staminali provenienti da fonti placentari e ombelicali hanno in parte superato questo problema, consentendo l'uso di alternative alle cellule ES.

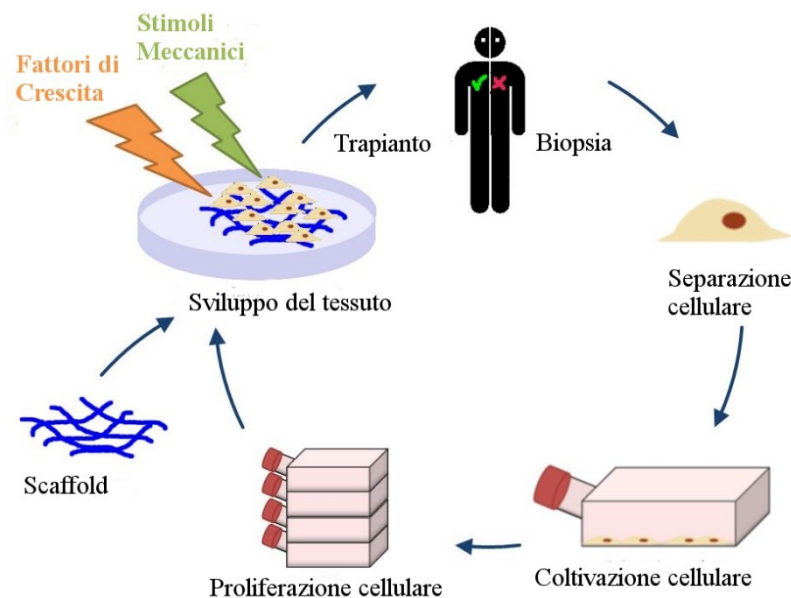


Figura 1.8 Schema rappresentativo di un processo nell'ingegneria tissutale [11].

In Figura 1.8 viene rappresentato uno schema delle varie fasi del processo di ingegneria tissutale che portano allo sviluppo di un tessuto che potrà essere utilizzato, per esempio, per la riparazione di nervi periferici. Infatti, dato che le PNI causano una potenziale perdita delle funzioni sensoriali

e motorie, la riparazione dei nervi periferici (*peripheral nerves repair*, PNR) rimane un obiettivo impegnativo, che potrebbe essere raggiunto proprio mediante l'approccio dell'ingegneria dei tessuti.

### 1.5.1 Tecniche di riparazione dei nervi periferici

L'attuale trattamento gold standard per le PNI è l'autoinnesto, perché fornisce ECM nativa, cellule di Schwann autologhe e fattori di crescita per promuovere e sostenere la rigenerazione dei nervi. Tuttavia, l'uso dell'autotrapianti nervosi ha diversi svantaggi, tra cui le limitate fonti nervose del donatore, l'aumento del tempo operatorio, la morbilità del sito del donatore, la perdita funzionale e possibili complicazioni come il neuroma. Inoltre, gli autotrapianti sono attualmente limitati a spazi di 5 cm o meno. A causa di queste limitazioni, si stanno cercando nuove alternative all'innesto nervoso per la riparazione dei nervi periferici [12], come per esempio la generazione e commercializzazione di allotrapianti acellularizzati e condotti di guida nervosa ottenuti mediante ingegneria tissutale, chiamate anche tubulazioni nervose. Le tecniche di tubulazione nervosa consentono di limitare la formazione di cicatrici sui nervi e agevolare il corretto percorso delle fibre nervose in crescita, attraverso orientamento e confinamento meccanico. Questo processo aiuta a prevenire problemi come neuromi e altri disturbi funzionali causati da una crescita assonale disordinata. La tubulazione nervosa è diventata un metodo consolidato per promuovere la rigenerazione nervosa. In questo studio ci concentreremo sulla realizzazione di neuroguide per la ricostruzione nervosa, tramite l'utilizzo di scaffold. I condotti di guida nervosi (*nerve guide conduits*, NCG) sono strutture tubulari realizzate in materiali naturali o sintetici, progettati al fine di inviare segnali biochimici e meccanici per la rigenerazione neurale. Le neuroguide potrebbero superare le limitazioni poste dagli allotrapianti. Innanzitutto, eliminano la necessità di un sito donatore, riducendo così la morbilità associata all'intervento chirurgico. Inoltre, poiché le neuroguide possono essere prodotte in modo sintetico, potrebbero potenzialmente risolvere i problemi legati alla fornitura limitata di tessuto da donatore. Quindi si elimina la necessità di una seconda incisione per prelevare il tessuto di innesto, semplificando il procedimento chirurgico e riducendo il rischio di complicazioni. In definitiva, l'utilizzo dei neuroguide potrebbe portare a risultati più sicuri ed efficaci per i pazienti che necessitano di rigenerazione o riparazione del tessuto nervoso. Le neuroguide hanno la funzione di intubulare le estremità distali e prossimali di un nervo reciso. Questi condotti forniscono una guida per la ricostruzione degli assoni e una barriera tra il nervo in guarigione e l'infiammazione circostante. Gli essudati formati dal nervo ferito contengono fattori neutrofici e di crescita che daranno origine a una matrice di fibrina e alla

formazione di una lamina basale. Queste ultime promuoveranno la crescita degli assoni e delle cellule di Schwann. Le neuroguide possono essere realizzate con materiali sintetici e/o biologici caricati o meno di cellule o di fattori di crescita. Le principali caratteristiche base che devono rispettare i materiali utilizzati per le neuroguide includono la biocompatibilità e la biodegradabilità, oltre a proprietà meccaniche adeguate. I polimeri naturali offrono anche un effetto biomimetico e un ambiente favorevole alle cellule, anche se non hanno buone proprietà meccaniche. Per ovviare a ciò, spesso si utilizzano delle miscele di polimeri naturali e sintetici. Tra le classi di materiali maggiormente utilizzati ci sono gli hydrogel, formati da catene polimeriche reticolate con un elevato contenuto d'acqua.

### 1.5.2 Trattamento delle lesioni ai nervi periferici

I metodi di trattamento della PNI possono essere raggruppati in due categorie principali: trattamenti chirurgici e non chirurgici. I metodi non chirurgici includono l'applicazione di stimolazione elettrica, stimolazione magnetica, fototerapia laser e fattori di crescita. I metodi di trattamento chirurgico comprendono la neurorrafia, l'innesto (alloinnesti e autoinnesti) (Figura 1.9) e l'ingegneria tissutale.

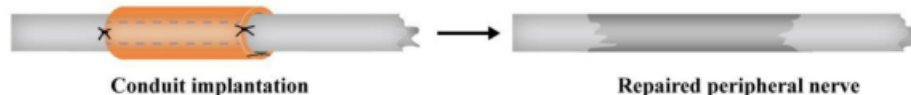


Figura 1.9 Procedura di innesto di neuroguide [13].

Parlando di metodi di trattamento non chirurgici, la tecnica più diffusa è la stimolazione elettrica a bassa frequenza. Alcuni studi condotti in vitro e in vivo su radici di gangli dorsali, riportati nel giornale *Biomolecules* [14], dimostrano che l'esposizione a campi elettrici porta a una maggiore crescita nervosa. Hoffman fu il primo a descrivere gli effetti dell'elettrostimolazione (*electrical stimulation*, ES) sui neuroni danneggiati. Gli esperimenti sono stati effettuati sul nervo mediano e il nervo sciatico dei ratti, ma ulteriormente supportati in altri modelli animali. Nonostante questa tecnologia garantisca effetti positivi, essa non è ancora stata implementata nella pratica clinica. Altri trattamenti non chirurgici sono la stimolazione magnetica e la fototerapia laser. Neurotrofine e altri fattori di crescita potrebbero essere isolati e applicati nella rigenerazione nervosa, ma nonostante l'introduzione di questi fattori abbia aumentato il tasso di rigenerazione, gli autoinnesti nervosi risultano maggiormente funzionali. Oltretutto l'applicazione e l'efficacia di questi metodi è stata per ora testata solo su gap di lunghezza inferiore a 3 cm.

Per le PNI vengono più frequentemente utilizzati i metodi di trattamento chirurgico. Tra i metodi chirurgici, si possono nominare la neurorrafia, la neurorrafia end-to-side, la neurotizzazione, l'utilizzo di nervi autologhi, di nervi con allotrapianto, l'allograpianto di nervi umani acellulari e l'utilizzo di neuroguide.

#### *1.5.2.1 Neurorrafia*

Se il gap nervoso è molto corto (minore di 1 cm), la chirurgia più comune è la neurorrafia [15]. La neurorrafia è una sutura chirurgica tra le parti prossimali e distali di un nervo reciso. Tuttavia, questa procedura è adatta solo a divari nervosi corti perchè in gap nervosi lunghi (maggiori di 2 cm) causerebbe una eccessiva tensione sopra la linea di sutura [16]. Negli anni Settanta è stata introdotta la colla di fibrina per sigillare il nervo. Alcuni studi [17] hanno dimostrato che “nei gruppi con colla di fibrina si verificava una minore infiammazione granulomatosa rispetto ai metodi di sutura convenzionali, con una rigenerazione assonale comparabile e recupero delle velocità di conduzione nervosa” [15].

#### *1.5.2.2 Neurorrafia end-to-side*

La neurorrafia end-to-side è una potenziale strategia per il trattamento delle lesioni ai nervi, quando i monconi prossimali non sono utilizzabili [18]. Essa presuppone che un nervo integro possa trasferire assoni alla parte distale di un nervo danneggiato [16]. Già ai primi anni del Novecento, Balance et al. avevano utilizzato un trattamento analogo per la rigenerazione di un nervo facciale. Solo novanta anni dopo questa tecnica è stata reintrodotta da Viterbo e colleghi negli studi sperimentali su modelli animali e sui nervi facciali umani. Nella neurorrafia end-to-side, è essenziale prendere in considerazione tre elementi principali:

- 1) l'attivazione della crescita assonale collaterale nel nervo donatore;
- 2) la capacità degli assoni collaterali di attraversare i diversi strati congiuntivali, incluso il potenziale delle lamine basali del nervo donatore di reinnervare il nervo ricevente;
- 3) la plasticità funzionale e l'adattamento comportamentale dei singoli motoneuroni che potrebbero adottare nuove unità motorie [18].

Negli studi condotti sugli arti superiori dei ratti si è rilevata una predominanza della rigenerazione sensoriale rispetto alla rigenerazione motoria. L'aggiunta di fattori neurotrofici è molto importante per la rigenerazione nervosa. Infatti, alcuni fattori come il fattore di crescita nervosa e il fattore neurotrofico ciliare hanno l'abilità di indurre alla “germogliazione” degli assoni danneggiati in vivo.

### *1.5.2.3 Neurotizzazione*

La neurotizzazione è il trasferimento di un segmento nervoso, utilizzato come donatore, posto vicino al nervo da rigenerare, per la ricostruzione di un tronco nervoso. Alcuni fascicoli vengono “sacrificati” per raggiungere gli organi motori, prima che questi non siano più funzionali. È fondamentale selezionare in modo appropriato il nervo donatore per ridurre al minimo la morbilità del sito donatore. Ci sono alcune limitazioni riguardo questa procedura. Tra cui la morbilità nella zona del nervo donatore e lesioni preesistenti al nervo donatore.

### *1.5.2.4 Autoinnesto nervoso*

L'autoinnesto nervoso per ora offre i risultati migliori nella rigenerazione nervosa. Il nervo donatore è solitamente un nervo sensoriale funzionante, come il nervo surale che è tra i più utilizzati. Gli svantaggi dell'autoinnesto sono la morbilità del sito donatore, la disponibilità limitata, la seconda incisione per prelevare il tessuto da innestare e la perdita funzionale. Nonostante sia la metodologia migliore di intervento, il successo dell'autotrapianto dopo l'intervento chirurgico è solo del 50%. L'autoinnesto nervoso a differenza degli allotrapianti e degli allotrapianti di nervi umani acellulari ha meno problemi immunologici. Per superare i problemi dovuti agli autoinnesti e agli allotrapianti i condotti guida nervosi vengono considerati sempre di più come trattamenti alternativi.

Gli attuali metodi chirurgici di riparazione dei nervi, come la sutura diretta, gli autoinnesti e gli innesti di nervi acellulari (*autocellular nerve grafts*, ANG), presentano i rispettivi svantaggi: tensione nervosa, morbilità del sito donatore, discrepanza dimensionale e immunogenicità [7].

## Capitolo 2. Neuroguide

Dato che l'autoinnesto nervoso per il trattamento delle PNI, presenta una serie di complicanze, da gravi a moderate [19], sono in fase di sviluppo diversi condotti neurali o neuroguide (*Neural guide conduits*, NGC), che, attraverso la bioattività chimica e il supporto strutturale, possono promuovere la proliferazione assonale, l'orientamento cellulare e i processi molecolari che portano alla rigenerazione nervosa [20]. Sebbene i nervi periferici umani abbiano la capacità di rigenerarsi dopo le lesioni, questo processo può essere ostacolato da alcuni fattori, quali: la lunghezza del divario nervoso, il tempo trascorso dall'infortunio, l'età del paziente [15]. Gli NGC agiscono come ponti tra le terminazioni nervose danneggiate, fornendo un supporto strutturale e trofico per entrambe le estremità del nervo danneggiato. Questo supporto aiuta a promuovere l'invasione dei tessuti circostanti e la ricrescita degli assoni lungo il condotto, facilitando così il processo di guarigione e ripristino della funzione nervosa. I requisiti desiderabili di una neuroguida sono i seguenti:

- Permeabilità. La permeabilità risulta importante per lo scambio di nutrienti e ossigeno che devono diffondersi nel sito di rigenerazione, per garantire la vitalità delle cellule di supporto aggiunte;
- Flessibilità. La flessibilità del condotto è importante al fine di evitare lesioni ai tessuti circostanti, soprattutto quando il nervo è stato suturato su un giunto;
- Rigonfiamento. Un rigonfiamento inappropriato potrebbe bloccare il condotto e ostacolare la rigenerazione dei nervi o addirittura ferire il nervo rigenerato.
- Grado di degradazione. La neuroguida dovrebbe rimanere intatta fino alla completa rigenerazione nervosa, per poi degradarsi gradualmente con il minore gonfiore possibile per i tessuti circostanti. Se la degradazione è troppo veloce, essa può portare all'infiammazione locale. Se la degradazione avviene in modo troppo lento, la guida può comprimere troppo il nervo causando un rigetto immunitario [21] (Figura 2.1).



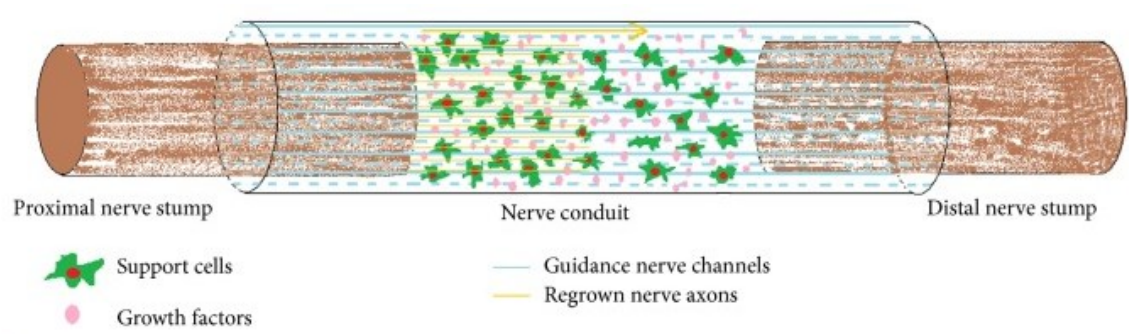


Figura 2.1 Microambiente prodotto dai condotti nervosi per promuovere la rigenerazione nervosa [21].

## 2.1 Struttura delle neuroguide

Sono attualmente utilizzati diversi modelli di neuroguide, caratterizzati da diverse strutture. Si possono distinguere in cinque categorie principali: struttura cava/non porosa, struttura porosa, struttura scanalata, struttura multicanale e struttura con riempitivi (Figura 2.2).

La struttura cava o non porosa è la più semplice da realizzare e consiste di un tubo cavo di materiale naturale o sintetico. Presenta grosse limitazioni, tra le quali la scarsa permeabilità dei nutrienti e dei fattori di crescita. Tali svantaggi ostacolano la rigenerazione nervosa. Per ovviare a questi problemi è stata ideata una struttura porosa.

La struttura porosa è stata realizzata tramite elettrofilatura, risolvendo i problemi di permeabilità. Infatti, questa tecnica consente di ottenere una elevata permeabilità, che permette il passaggio di nutrienti e di fattori di crescita, ma anche l'interazione e l'integrazione dei tessuti circostanti. Le fibre nello strato interno forniscono indicazioni topografiche per il corretto allineamento degli assoni dei neuroni, mentre la superficie esterna fibrosa è orientata in modo casuale per fornire resistenza meccanica allo scaffold. La difficoltà di questa fabbricazione è il controllo della dimensione dei pori [15].

La struttura scanalata prevede la scanalatura sulla superficie interna del condotto. Questa struttura tubolare fa sì che la rigenerazione degli assoni avvenga in direzione allineata con il solco delle superfici interne [22]. Questo design è di difficile fabbricazione e quindi non è ampiamente adottato.

Le strutture multicanale sono dei condotti con canali intraluminali. I canali possono essere caricati di elementi bioattivi e fattori di crescita come fattori di crescita del nervo (*Nerve Growth Factor*;

NGF), fattori neurotrofici ciliari (*Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF*) e peptidi RGD. Anche in questo caso la fabbricazione risulta ardua.

Gli NGC con riempitivi contengono fibre elettrofilate o sono riempiti di hydrogel nel lume o nei canali intraluminali. I riempitivi nel lume servono a imitare il fascicolo nervoso. La fabbricazione dei design con riempitivi risulta complessa perché bisogna fabbricare la struttura in due step, una per il tubo esterno e una per il riempitivo. L'hydrogel risulta un ottimo riempitivo perché ha un ambiente favorevole alla crescita cellulare e i segnali biochimici possono essere incorporati al suo interno.

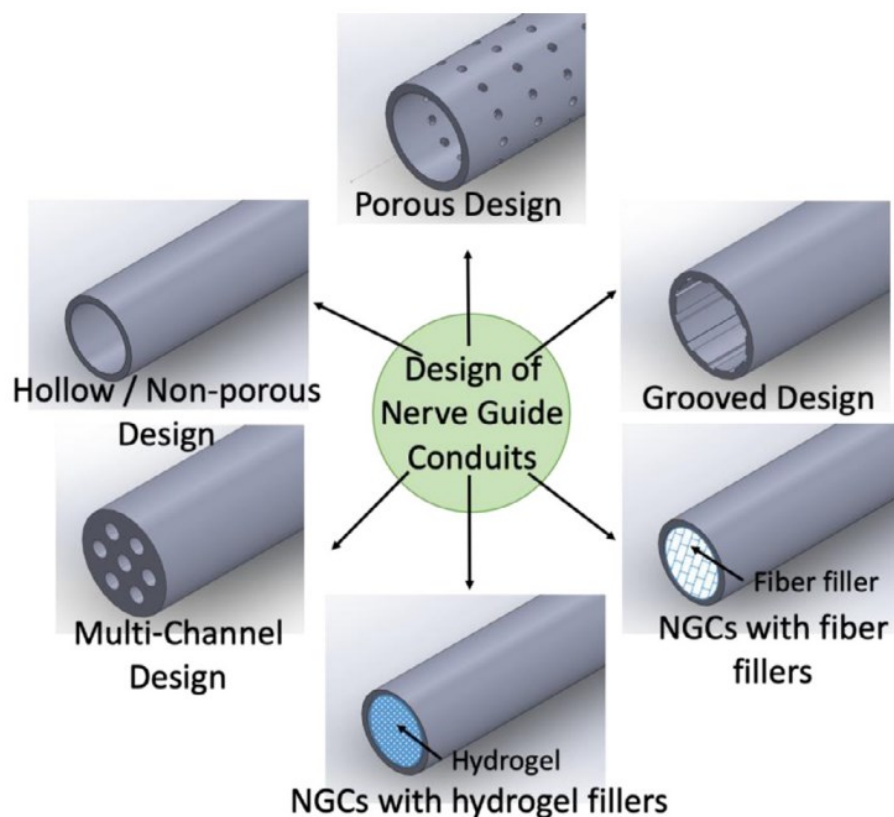


Figura 2.2 Differenti design dei condotti di guida nervosi [15].

## 2.2 Materiali per la creazione di condotti nervosi

I materiali più utilizzati sono polimeri naturali o sintetici. Tra i polimeri sintetici abbiamo polimeri non degradabili come il silicone, la plastica e il politetrafluoroetilene. Gli NGC in elastomero siliconico sono stati tra i primi condotti utilizzati come neuroguide sintetiche per riparare nervi sciatici nei ratti, grazie alla flessibilità, biocompatibilità dei polidimetilsilossani (PDMS) e alla trasparenza dei siliconi. Sebbene questi condotti sintetici non necessitino di un intervento per

prelevare nervi autologhi, hanno comunque bisogno di un secondo intervento per rimuovere la neuroguida dopo la rigenerazione nervosa. Inoltre, causano sempre delle reazioni immunologiche ai tessuti circostanti che possono comprimere il nervo e ostacolare la rigenerazione [21], [23].

## 2.2.1 Polimeri sintetici biodegradabili

Esistono anche polimeri sintetici biodegradabili e biorisorbibili come l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), acido poli (lattico co-glicolico) (PLGA), il policaprolattone (PCL), PCL acrilato e così via. I materiali biodegradabili sono preferibili, e spesso vengono utilizzate delle miscele di polimeri naturali e sintetici.

### Acido polilattico (PLA)

Il PLA è un poliestere biodegradabile prodotto da risorse rinnovabili. È ottenuto attraverso la polimerizzazione dell'acido lattico (LA) [24] (Figura 2.3). I PLA vengono sostanzialmente sintetizzati in tre fasi: 1) produzione di acido lattico mediante fermentazione microbica, 2) purificazione dell'LA seguita dalla preparazione del dimero ciclico e 3) policondensazione dell'LA o polimerizzazione dell'anello di lattidi. Le resine PLA sono approvate dall'agenzia statunitense Food and Drug Administration (FDA) e dalle autorità di regolamentazione Europee per tutti gli alimenti e per alcune applicazioni chirurgiche e sistemi di rilascio di farmaci [25].

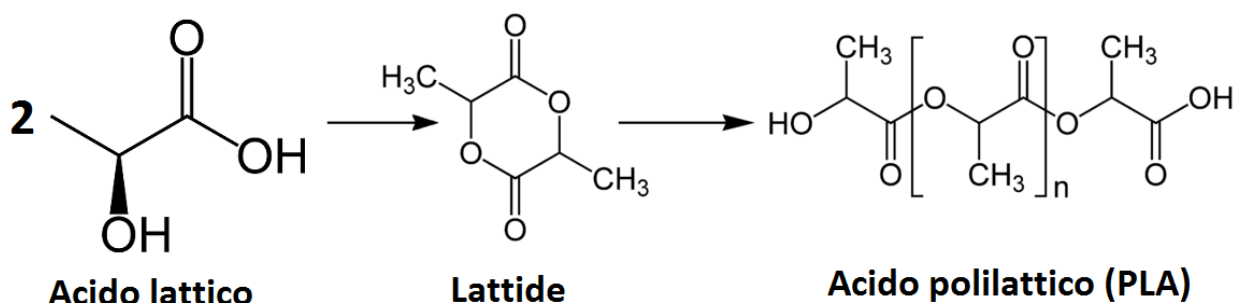


Figura 2.3 Composizione chimica del PLA [26].

Il PLA, come anche il PGA e il PCL, sono comunemente usati nell'ingegneria biomedica per la loro eccellente biocompatibilità. Inoltre, i condotti in PLA non necessitano di un secondo intervento chirurgico per rimuovere lo scaffold, dato che sono riassorbibili; questo diminuisce i costi medici e permette un recupero graduale delle funzionalità del tessuto. Un altro vantaggio del PLA come polimero biorisorbibile è che, una volta riassorbito, non blocca la tomografia computerizzata (CT) e facilita le successive valutazioni via imaging. Un limite del PLA è la natura idrofobica del polimero che ostacola l'adesione cellulare.

### Acido poli (lattico co-glicolico) (PLGA)

Il PLGA è un copolimero, sintetizzato mediante co-polimerizzazione catalizzata mediante l'apertura dell'anello di due monomeri, i dimeri ciclici dell'acido lattico e dell'acido glicolico (Figura 2.4). I legami che uniscono i due monomeri sono legami esterei.

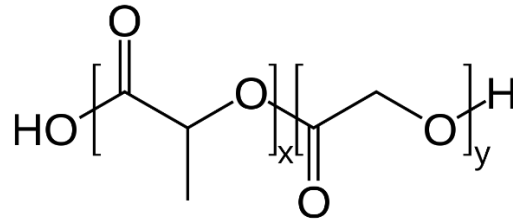


Figura 2.4 Struttura molecolare del PLGA [27].

Il PLGA è molto diffuso in nanomedicina grazie alla sua biocompatibilità e alla sua efficace capacità di biodegradazione, che avviene tramite l'idrolisi dei legami esterei del lattato e del glicolato [28].

### Policaprolattone (PCL)

Il Policaprolattone (PCL) un poliesteri alifatico sintetico composto da unità ripetute di esanoato (Figura 2.5). Per sintetizzare il PCL vengono utilizzate due strategie: la condensazione dell'acido 6-idrossicaproico (6-idrossiesanoico) e la polimerizzazione con apertura dell'anello (ROP) di  $\epsilon$ -CL. Il meccanismo è mostrato nella figura sottostante [29].

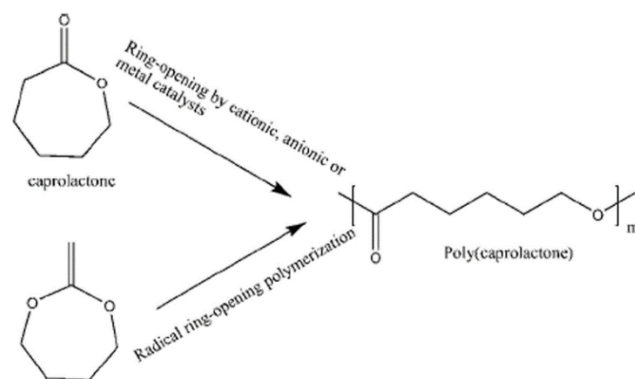


Figura 2.5 Sintesi del PCL tramite polimerizzazione dell'anello radicale aperto [29].

È un materiale biodegradabile, relativamente economico e facilmente utilizzabile come stampo per sviluppare scaffold. Il PCL è approvato dalla FDA, ha una stabilità termica eccellente ed è adatto sia per il carico che per le applicazioni di resistenza nell'ingegneria tissutale non portante. Questo

lo rende suscettibile a modifiche superficiali, con proprietà come l'idrofobicità e la degradazione che possono essere notevolmente alterate. L'idrofobicità determina un tasso di degradazione lento, questo è un limite di questo materiale. Alcune ricerche riportano una stima del tasso di degradazione completa degli scaffold polimerici basati su PCL, che risulta essere circa 3-4 anni. Le proprietà meccaniche possono essere migliorate miscelando insieme al PCL un'ampia gamma di polimeri, sia naturali, sia sintetici e anche ceramici (Figura 2.6). La capacità di elaborare il PCL è semplice, quindi è stato impiegato con successo nella riparazione di vari difetti tissutali.

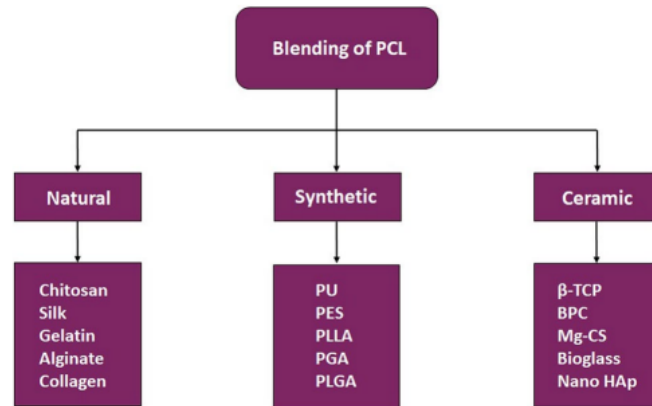


Figura 2.6 L'ampia gamma di polimeri per la miscelazione del PCL [29].

Gli scaffold ottenuti con una miscela di nanofibre di PCL con collagene hanno una migliore resistenza alla trazione rispetto agli scaffold in matrice o gel. Inoltre, la miscela di nanofibre di PCL con collagene conferisce una migliore aderenza cellulare allo scaffold per permettere la migrazione e la proliferazione delle cellule [30] (Figura 2.7).

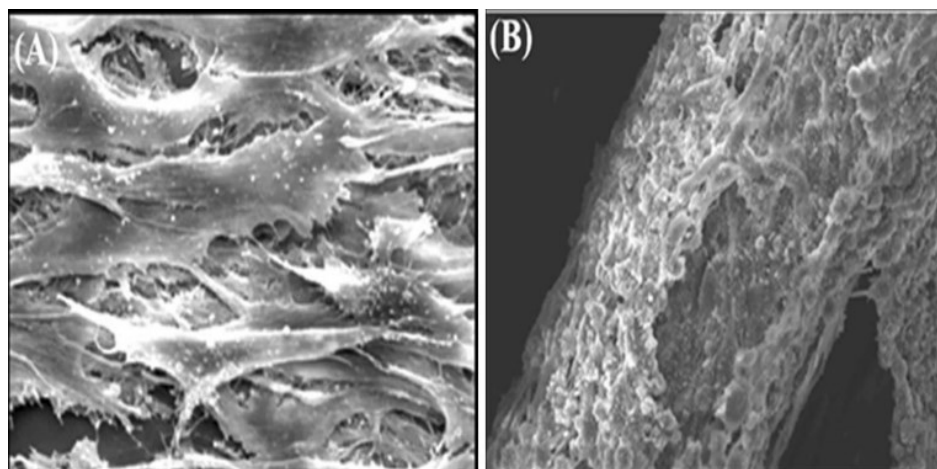


Figura 2.7 Aderenza cellulare del PCL (A) e nanofibre di PCL rivestite di collagene (B) [30].

### 2.2.2 Polimeri naturali

I polimeri naturali sono a base di proteine come collagene, gelatina, trombina, e fibrinogeno oppure a base di polisaccaridi come la cellulosa, la chitina, la fibroina della seta e il chitosano.

#### Collagene

Il collagene è un materiale molto impiegato per la costruzione di neuroguide. È la principale molecola della matrice extracellulare (ECM) che si autoassembla in fibrille incrociate, fornisce supporto per la crescita cellulare ed è responsabile della resilienza meccanica dei tessuti connettivi. [31]. Il collagene è molto presente nei tessuti umani, e per via delle sue proprietà intrinseche, come segnali di riconoscimento cellulare, la capacità di formare scaffold 3D di varie conformazioni fisiche, proprietà meccaniche controllabili e biodegradabilità, è una delle prime scelte nell'ingegneria tissutale. La componente di matrice extracellulare viene percepita dal nostro organismo come costituente endogeno e non corpo estraneo. La struttura primaria della molecola del collagene è costituita da sequenze ripetitive di amminoacidi come glicina, prolina e idrossiprolina. Queste catene polipeptidiche (struttura primaria) formano delle  $\alpha$ -eliche (struttura secondaria) che si avvolgono l'una intorno all'altra formando una tripla elica (struttura terziaria), che è stabile grazie ai legami idrogeno. Queste triple eliche si uniscono per formare fibrille di collagene (struttura quaternaria), che a loro volta si aggregano in fibre più grandi (Figura 2.8). Queste fibre conferiscono struttura e resistenza meccanica ai tessuti [31], [32].

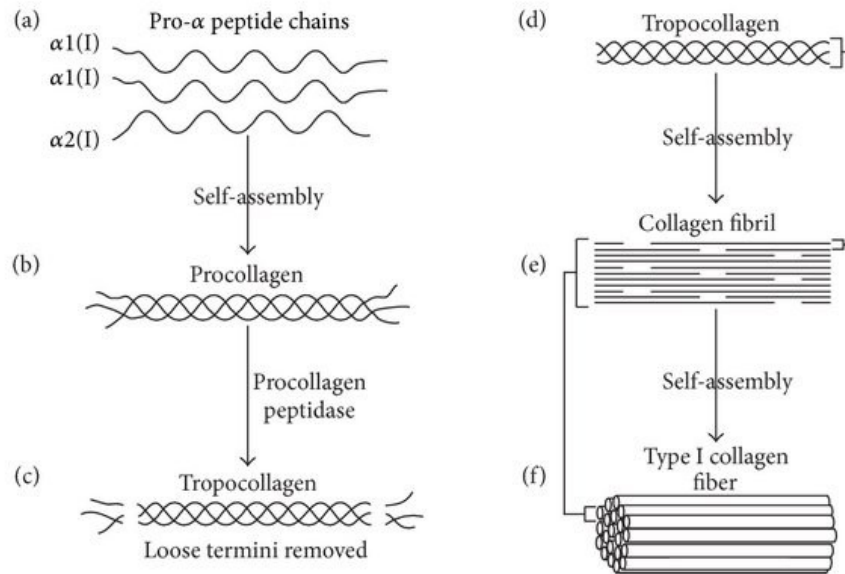


Figura 2.8 Il processo di sintesi del collagene di tipo I. a) Due catene peptidiche identiche  $\alpha 1(I)$  e una  $\alpha 2(I)$  si autoassemblano per formare procollagene (b). c) La peptidasi della procollagene rimuove i termini sciolti per creare una molecola di tropocollagene di tipo I (d). Le molecole di tropocollagene si autoassemblano per formare una fibrilla di collagene in crescita (e). L'autoassemblaggio delle fibrille di collagene forma una fibra di collagene di tipo I (f) [33].

In alcuni studi, gli scaffold di collagene 3D sono stati incorporati a cellule di Schwann per supportare la crescita neuronale in vivo in nervi sciatici di ratto con gap lungo 5mm. Diverse guide create con collagene di tipo 1 sono state approvate dalla Food And Drugs Administration (FDA) e commercializzate. Nei condotti nervosi, le fibre di collagene possono essere avvolte in una forma tubulare oppure essere utilizzate come riempitivo luminale. Risultano avere una buona biocompatibilità le miscele di collagene e chitosano. In un altro studio [23], i condotti nervosi sono stati fabbricati con fibroina della seta e collagene e poi co-coltivati con cellule di Schwann e cellule staminali di derivazione adiposa (ADSC). I risultati in vivo hanno mostrato un miglioramento del microambiente rigenerativo e un'accelerazione della rigenerazione dei nervi.

### Fibrinogeno

Il fibrinogeno è una glicoproteina fibrosa, grande e complessa con tre paia di catene polipeptidiche collegata insieme da ponti disolfuro [34]. Questa glicoproteina è normalmente presente nel plasma sanguigno umano, è essenziale per l'emostasi, la guarigione delle ferite, l'infiammazione, l'angiogenesi e altre funzioni biologiche. Alcuni studi hanno dimostrato che gli scaffold creati con elettrofilatura del fibrinogeno supportano la crescita cellulare e una distribuzione cellulare omogenea. Gli scaffold in fibrinogeno risultano essere biomimetici nell'ambiente cellulare [35].

### Fibroina della seta (SF)

La fibroina della seta che viene utilizzata per le applicazioni di ingegneria tissutale è ricavata dal baco da seta (*Bombyx mori*). È costituita da catene polipeptidiche quasi totalmente in conformazione  $\beta$  con disposizione antiparallela. La SF contiene 18 tipi di aminoacidi, tra cui la glicina, l'alanina e la serina che rappresentano l'80% della composizione totale [36] (Figura 2.9).

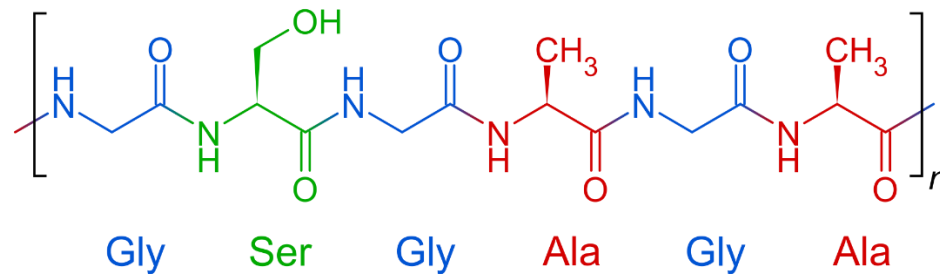


Figura 2.9 Sequenza primaria della fibroina della seta [37].

La SF ha la capacità di biodegradarsi in vivo senza presentare citotossicità. La degradazione avviene tramite proteolisi. Il tasso di degradazione è un processo lento che può essere accelerato però mediante ultrasuoni focalizzati a bassa intensità. Per la sua biocompatibilità è stata approvata dalla FDA per la costruzione di condotti, suture, e per sistemi di somministrazione dei farmaci. Le proprietà meccaniche chimiche e biologiche della fibroina della seta possono essere modificate facilmente grazie al gran numero di gruppi amminici e carbossilici disponibili nei suoi peptidi.

### Alginato

L'alginato è un polisaccaride derivato dalle pareti cellulari delle alghe marine brune, è costituito da due monomeri, l'acido 1,4- $\beta$ -D-mannuronico (MA) e l'acido 1,4- $\alpha$ -L-guluronico (GA) che organizzati in blocchi, formano una lunga catena di polimero di natura anionica (Figura 2.10).



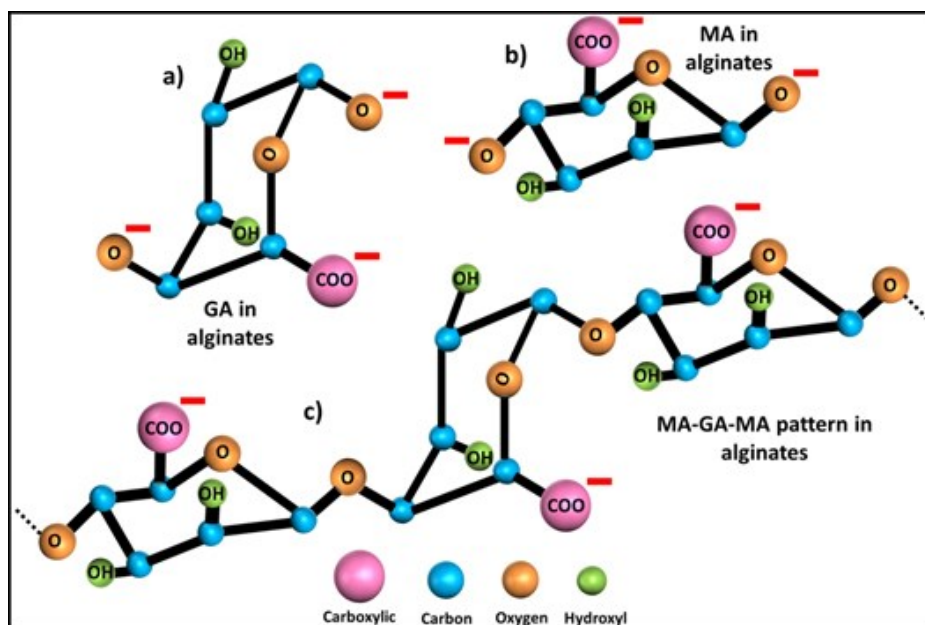


Figura 2.10 La struttura chimica di una catena di alginato. (a) struttura GA, (b) struttura MA e (c) una sequenza alternativa di GA e MA [38].

Gli alginati possiedono proprietà ottime per l'utilizzo di esso nel campo della farmacia, dell'ingegneria tissutale, nella medicina rigenerativa e negli impianti. Le caratteristiche che possiamo nominare sono: biocompatibilità, solubilità (in sali o esteri post-modificati), porosità (favorendo la diffusione delle molecole e dei nutrienti attraverso i pori), degradabilità in vivo o in vitro, regolazione della viscosità e la capacità di assottigliamento del taglio. Nonostante queste ottime proprietà, gli alginati non hanno una buona stabilità meccanica (modulo e resistenza) e stabilità biologica a causa dell'assenza nelle molecole RGD (responsabili dell'attaccamento cellulare) [39]. Per ovviare a queste limitazioni, l'alginato viene reticolato con altri elementi, quali il calcio, il bario, il magnesio e lo stronzio. Il calcio è quello più utilizzato per la reticolazione per la sua atossicità, mentre gli altri risultano lievemente tossici.

### Chitosano

Il chitosano, un polisaccaride naturale della chitina, è un biomateriale promettente per varie applicazioni grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità, attività antibatterica e facilità di modifica [40]. Esso deriva dalla chitina deacetilata (Figura 2.11) e proviene principalmente dall'esoscheletro di crostacei come granchi e aragoste.

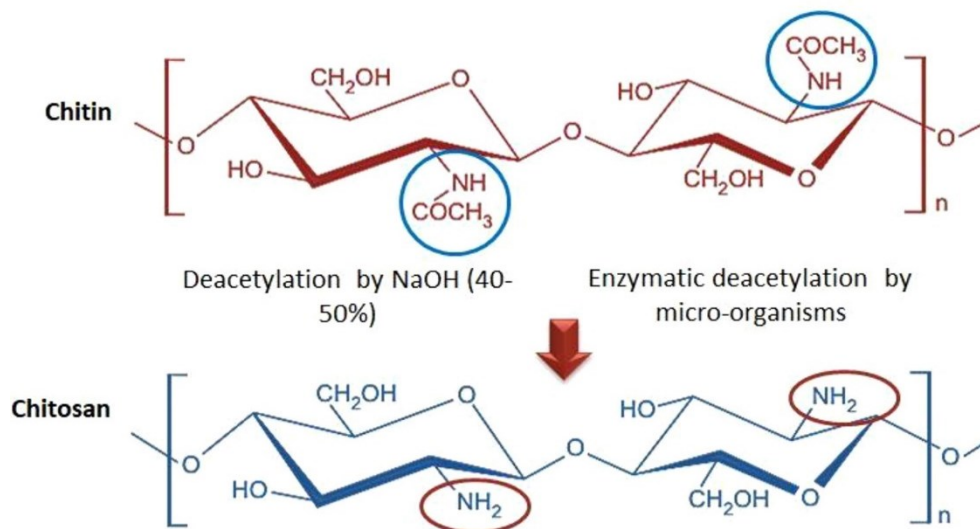


Figura 2.11 Formula chimica della chitina e del chitosano [41].

Il gruppo amminico presente nel chitosano è cruciale per la sua sensibilità e per le funzionalità relative al pH, le quali dipendono dal grado di acetilazione durante il processo di preparazione del chitosano. Il chitosano è stato utilizzato in numerosi studi soprattutto per la sua biocompatibilità e non tossicità, ma poiché risulta avere una resistenza meccanica relativamente bassa non è tra i materiali più adatti alla costruzione di neuroguide. Si è notato che iniettando il chitosano in strutture di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), le proprietà meccaniche del condotto nervoso sono migliorate [40].

## 2.3 Tecniche di fabbricazione delle neuroguide

Le tecniche di fabbricazione 3D delle guide nervose sono diverse e variano a seconda del materiale di utilizzo, naturale o sintetico. Tra le tecniche di lavorazione le più ampiamente usate sono: colata a solvente, colata a solvente con lisciviazione di sale, stampaggio per immersione (*dip-coating*), liofilizzazione (*freeze-drying*), *gas foaming*, stampa a getto di inchiostro, ed elettrofilatura.

### Colata a solvente

La fusione con solvente è il metodo più semplice ed economico per realizzare degli scaffold porosi. Il primo step consiste nello sciogliere il polimero in un solvente organico. Il secondo passo è quello di aggiungere i porogeni e di dare la forma desiderata allo stampo. Infine, l'evaporazione del solvente darà luogo a una struttura porosa [15], [22] (Figura 2.12). Il vantaggio di questa tecnica di fabbricazione è che è facilmente ripetibile, economica e permette il controllo della porosità e della grandezza dei pori. Lo svantaggio è che i solventi utilizzati sono altamente tossici, la forma

dei pori è irregolare e c'è una scarsa interconnettività tra i pori. Per migliorare la connettività e la porosità degli scaffold, si adotta una tecnica che combina la colata con solvente al processo di lisciviazione del sale. Questo procedimento implica l'aggiunta di particelle di sale di dimensioni specifiche alla miscela polimerica. Successivamente, il solvente viene fatto evaporare, creando una matrice polimerica con le particelle di sale incastonate al suo interno. Quando l'impalcatura viene immersa in acqua, il sale si dissolve, generando una struttura altamente porosa nell'impalcatura stessa. Un limite della lisciviazione del sale è che le particelle residue rimangono nella matrice polimerica.

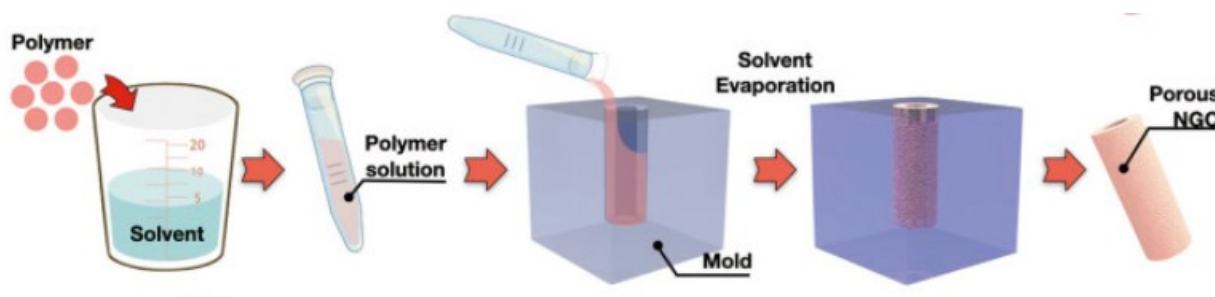


Figura 2.12 Tecnica colata a sovente [22].

### Dip coating

Il metodo dip coating è il metodo più utilizzato perché più semplice per fabbricare scaffold 3D. Il *dip coating* richiede alcuni passaggi. Per prima cosa è necessaria l'emulsione polimerica. Questa viene preparata sciogliendo i polimeri nei solventi. Il secondo passo consiste nell'immergere lo stampo cilindrico (rivestito di un'emulsione polimerica) nell'emulsione polimerica preparata. Il terzo passaggio consiste nel rimuovere lo stampo cilindrico dall'emulsione polimerica e nel far indurire l'emulsione polimerica tramite evaporazione o polimerizzazione. Infine, è possibile produrre una struttura di condotto rimuovendo lo stampo cilindrico [22] (Figura 2.13). Questa tecnica è stata generalmente usata per creare scaffold in policaprolattone e in PLGA.

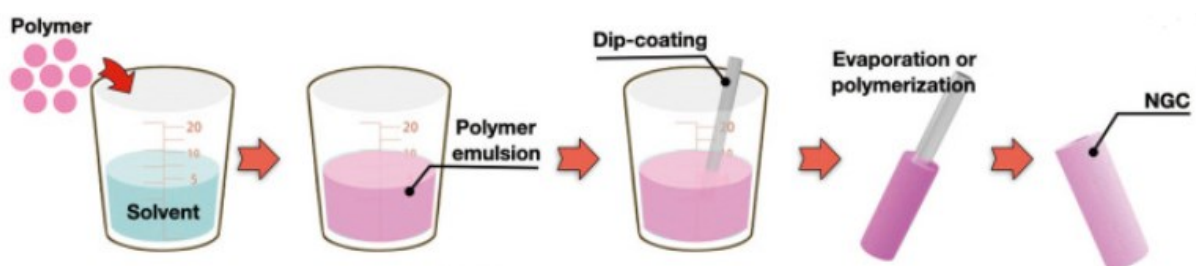


Figura 2.13 Procedimento di *dip-coating* [22].

### Freeze-drying

Il processo di *freeze-drying* viene utilizzato per la creazione di scaffold polimerici porosi. Questa tecnica consiste di due fasi. Il primo step è quello di raffreddare il polimero a una certa temperatura, in questa fase si formano dei cristalli di ghiaccio che forzano le molecole del polimero ad aggregarsi negli spazi interstiziali. La seconda fase è quella della rimozione del solvente, in cui viene applicata una bassa pressione inferiore alla pressione di vapore di equilibrio del solvente congelato. A questo punto il solvente è totalmente sublimato, lasciando una struttura polimerica porosa interconnessa (Figura 2.14). Il vantaggio è che si possono realizzare porosità superiori al 90%. Lo svantaggio principale è che i pori che si formano per liofilizzazione sono relativamente irregolari.

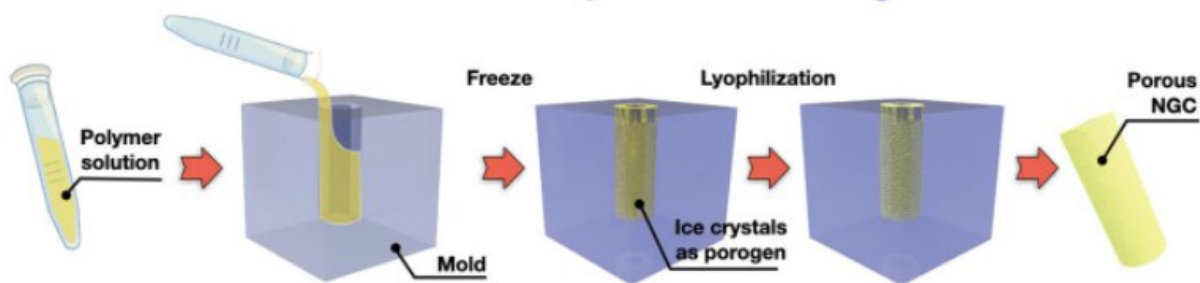


Figura 2.14 Fabbricazione per *freeze-drying* [22].

### Gas foaming

Durante il processo di *gas foaming*, la soluzione polimerica viene compressa fino a raggiungere uno stato solido (Figura 2.15). Se necessario, porogeno e particelle di sale possono essere incorporate nella matrice polimerica. Successivamente, la matrice polimerica solida viene sottoposta a elevate pressioni utilizzando agenti schiumogeni come anidride carbonica, anidride carbonica e azoto, acqua o fluoroformio fino a raggiungere il punto di saturazione. Il principale vantaggio di questo processo è l'assenza di solventi tossici. Tuttavia, una limitazione significativa è rappresentata dalla scarsa interconnettività dei pori e dalla mancanza di porosità sulla superficie esterna del materiale risultante.

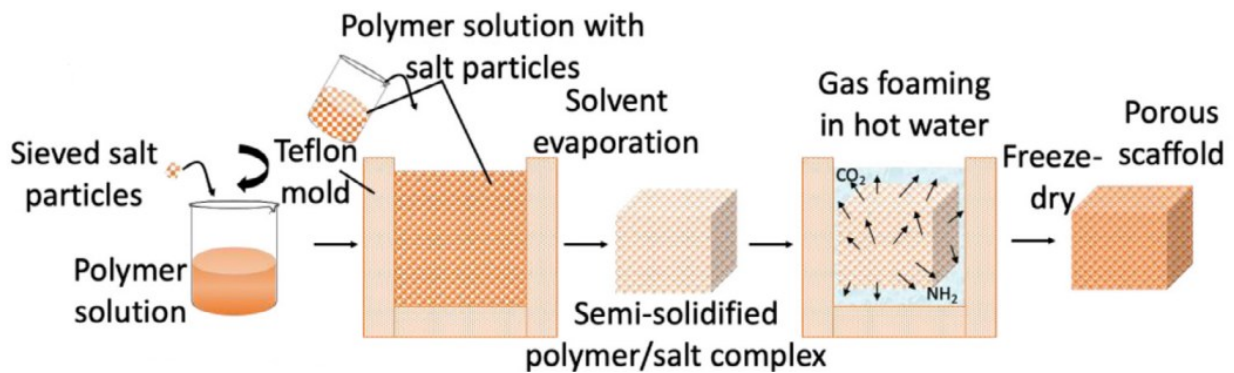


Figura 2.15 Tecnica del *gas foaming* [15].

### Elettrofilatura

L'elettrofilatura, detta anche filatura elettrostatica, è una tecnica altamente versatile che consente di fabbricare fibre su micro e nanoscala da soluzioni utilizzando un getto di fluido forzato elettricamente [35] (Figura 2.16). È la tecnica più utilizzata per la realizzazione di NGC. Nella prima fase dell'elettrofilatura, una soluzione polimerica viene spinta attraverso la punta di un ugello sotto elevata tensione. Invece di cadere per gravità, la soluzione si accumula sulla punta dell'ugello a causa della tensione superficiale. Durante questo processo, le cariche si accumulano sulla superficie della soluzione grazie alla tensione applicata. Queste cariche generano una forza repulsiva che supera la tensione superficiale, causando l'espulsione della soluzione polimerica. La soluzione espulsa viene quindi guidata verso il collettore dal campo elettrico circostante. Mentre la soluzione si muove verso il collettore, i solventi evaporeranno, dando luogo alla formazione di nanofibre attraverso un processo noto come fissione secondaria [22].

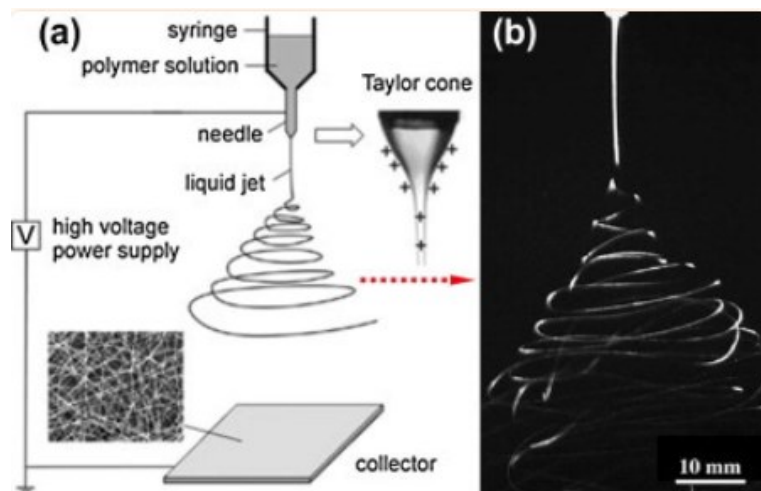


Figura 2.16 a) Illustrazione schematica di setup base dell'elettrofilatura [42] b) Fotografia dei tipici getti di elettrofilatura catturati da un video ad alta velocità che mostra l'instabilità di flessione del getto.

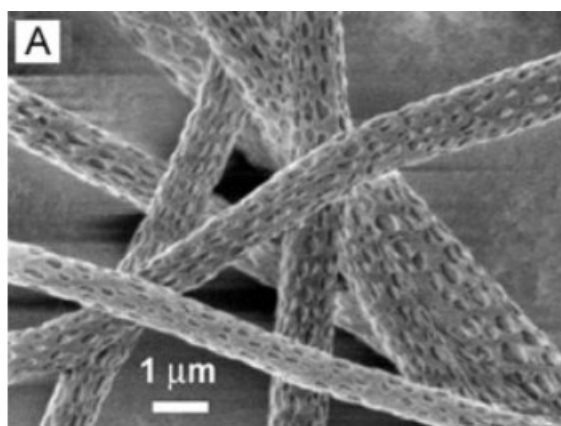


Figura 2.17 A) Immagine SEM di fibre porose di poli(L-lattide) (PLA) fabbricate mediante elettrofilatura di una soluzione di PLA in diclorometano [42].

Nonostante i numerosi vantaggi dell'elettrofilatura, ci sono alcune limitazioni. Per esempio, le fibre prodotte da questa tecnica hanno orientazione casuale e altamente disordinata; a causa della struttura a tessuto non tessuto non possono essere utilizzate per molte applicazioni che richiedono uno specifico allineamento delle fibre.

### Micro patterning

Il *micro patterning* è una tecnica che consente di posizionare delle biomolecole in microdomini specifici combinando tecniche di modificazione della superficie e microfabbricazione [43] (Figura 2.18). Viene utilizzata per fabbricare NGC con vari design interni per l'allineamento assonale. In primo luogo, bisogna fabbricare una membrana a *micropattern*. Dopodiché, la microstruttura della membrana verrà arrotolata per fabbricare il condotto. Il *micropattern* può essere creato tramite tecniche di fotolitografia e di *soft-lithography*. Il vantaggio del *micropatterning* è che può allineare gli assoni in base a fattori morfologici all'interno dell'NGC.

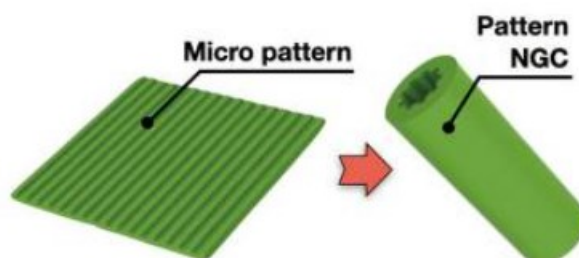


Figura 2.18 Tecnica *micropatterning* [22].



## Additive manufacturing (AM)

L'*additive manufacturing* è comunemente utilizzata per indicare processi che si basano su stampa 3D mediante l'aggiunta di materiali strato per strato. I metodi più utilizzati per la creazione di scaffold sono tre: stampa basata su estrusione, stereofotolitografia, stampa a getto di inchiostro 3D. I vantaggi dell'AM sono che il grado di libertà della forma è elevato; quindi, le caratteristiche morfologiche della struttura possono essere controllate e la riproducibilità è alta. Tuttavia, a seconda del metodo AM, i materiali sono limitati ed è richiesta la costruzione di una struttura complessa.

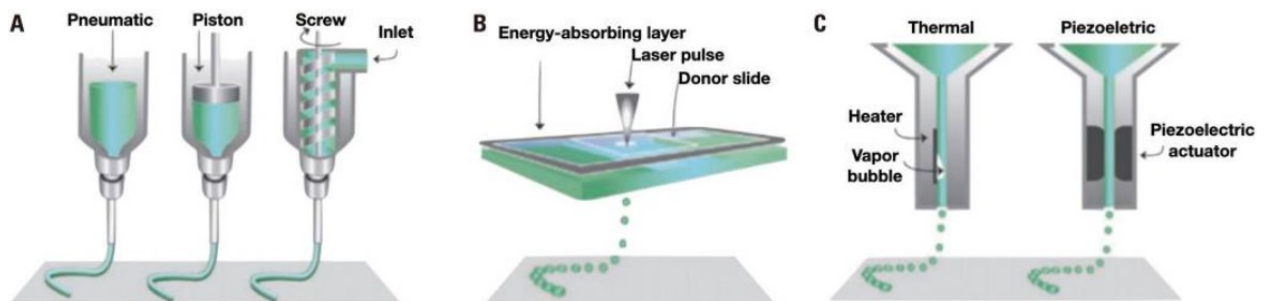


Figura 2.19 A) Stampa basata su estrusione. B) Stereofotolitografia. C) Stampa a inchiostro 3D [22].

La stampa basata su estrusione è una tecnica di produzione che sfrutta l'estrusione e il deposito di materiali attraverso l'uso di componenti pneumatici, pistoni, viti e ugelli. Questo metodo è suddiviso in diverse categorie, tra cui FDM (*Fused Deposition Modeling*), deposizione per estrusione di precisione e plottaggio 3D, a seconda del processo di estrusione impiegato. Un vantaggio significativo della stampa basata su estrusione è la capacità di produrre strutture complesse in un unico passaggio, utilizzando una vasta gamma di materiali compositi che potrebbero essere difficili da ottenere con i metodi di produzione tradizionali. Tuttavia, ci sono anche dei limiti associati a questa tecnica. L'efficienza e l'accuratezza della stampa possono essere compromesse, principalmente a causa dell'utilizzo di un ugello, che è suscettibile di ostruzioni. Questo può portare a risultati meno precisi e alla necessità di manutenzione frequente dell'attrezzatura.

La stereofotolitografia (*StereoLithography Apparatus*, SLA) viene utilizzata per la creazione di strutture tridimensionali complesse con elevata precisione. Questa tecnica di stampa 3D sfrutta la polimerizzazione di resine fotosensibili tramite l'esposizione a una sorgente di luce ultravioletta (UV). Il primo passo del processo di SLA è aggiungere una resina fotosensibile al serbatoio e livellarla. Successivamente, l'irradiazione con luce UV della resina causa la sua polimerizzazione,

formando uno strato polimerizzato. La piattaforma di lavoro viene poi riempita con uno strato successivo di resina per continuare il processo strato dopo strato, fino a ottenere la struttura tridimensionale desiderata. I vantaggi delle tecniche SLA includono una maggiore precisione e riproducibilità rispetto alle tecniche di stampa basate sull'estrusione. Tuttavia, questo metodo è limitato all'uso di resine fotosensibili e richiede l'aggiunta di fotoiniziatori per valutare la citotossicità del materiale.

La stampa 3D a getto d'inchiostro è una tecnica di stampa 3D che utilizza leganti fotopolimerizzabili e materiali in polvere. Il primo passo del processo di stampa 3D a getto d'inchiostro consiste nel livellare i materiali in polvere per creare una superficie piana. Successivamente, il legante fotopolimerizzabile viene spruzzato sulla superficie e indurito per formare uno strato singolo. La piattaforma di lavoro viene quindi riempita con nuovi materiali in polvere e il processo viene ripetuto strato dopo strato fino a ottenere la struttura tridimensionale desiderata. Questo processo di stampa ha un'alta risoluzione e una buona versatilità.

## 2.4 Neuroguide commerciali

Sono attualmente in commercio diverse tipologie di NGC. Le considerazioni che vengono fatte per commercializzare un NGC sono diverse. La scalabilità, la riproducibilità, il controllo della qualità, la stabilità, la purificazione dei componenti biologici, l'adattamento di processi complessi su una linea di processo commerciale e sulla logistica della consegna del prodotto e l'assemblaggio sono fattori molto importanti. Come parte del processo di produzione dei dispositivi medici impiantabili, questi devono essere sterilizzati prima di essere confezionati. Solitamente vengono sterilizzati mediante radiazioni ultraviolette o tramite etanolo. È importante che i dispositivi proposti siano progettati in modo da poter essere sterilizzati in maniera efficace, perché le modifiche post sterilizzazione sono molto difficili e onerose. Un'altra proprietà fondamentale è la durata di conservazione e la data di scadenza del dispositivo medico. Per gli NCG approvati dalla FDA la data di scadenza deve essere compresa tra i 18 mesi e i 5 anni. Le neuroguide in commercio, realizzate con materiali xenogenici, che rispettano le normative FDA, sono riassunte nella tabella sottostante (Tabella 2.1).



| Product name   | Material  | 510(k) Number                 | Sterilization Method | Structure  | Intended repair length   | Company   |
|--|---|-------------------------------|----------------------|--|--|---|
| <b>VersaWrap Nerve Protector</b>                               | Calcium alginate and hyaluronic acid hydrogel   | K201631                       | Electron Beam        | Resorbable, flexible, thin sheet   | "no substantial loss of nerve tissue"  | Alafair Biosciences, Austin, TX, USA                  |
| <b>NeuroShield™</b>  | Chitosan  | K190246                       | Ethylene Oxide       | Porous, transparent membrane   | "no gap" or "gap closure achieved by flexion of the extremity"                               | Monarch Bioimplants GmbH, Switzerland                 |
| <b>Reaxon Plus</b>   | Chitosan  | K180222<br>K143711            | Ethylene Oxide       | Transparent hollow tube  | "gap closure achieved by flexion of the extremity"   | Medovent GmbH, Mainz, Germany                         |
| <b>NeuroFlex™ (Flexible Collagen Nerve Cuff)</b>               | 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        |
| <b>Reinforced Flexible Collagen Nerve Cuff</b>                 | 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        |
| <b>NeuraGen: 3D and 3D Nerve Guide Matrix</b>                  | Bovine-derived Collagen Type I + porous inner matrix collagen/glycosaminoglycan (chondroitin-6-sulfate) | K163457<br>K130557            | Unspecified          | Semipermeable, fibrillar structure of the collagen                         | "gap closure achieved by flexion of the extremity"   | Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ, USA          |
| <b>AxoGuard™ Nerve Connector</b>                               | Porcine small intestine   | K162741                       | Ethylene Oxide       | Resorbable, permeable wrap   | "gap closure achieved by flexion of the extremity"   | Cook Biotech Products, West Lafayette, IN, USA        |
| <b>Nerbridge™</b>  | 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                         |
| <b>Cova Ortho-nerve Resorbable Collagen Membrane Neurolac™</b> | 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    |
|  | Poly(D,L-lactide-co-ε-caprolactone)   | K112267<br>K050573<br>K032115 | Ethylene Oxide       | Synthetic and transparent PLCL tubular structure                           | ≤ 20 mm  | Polyganics BV, Groningen, Netherlands                 |
| <b>Salutunnel™</b>   | 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                      |
| <b>NeuroMend™ (Collagen Nerve wrap)</b>                        | 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        |
| <b>NeuraWrap™</b>  | 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          |
| <b>NeuroMatrix™ (Collagen Nerve Cuff)</b>                      | 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        |
| <b>Neurogen Nerve Guide</b>                                    | Collagen (type/species unspecified)   | K011168                       | Unspecified          | Porous, absorbable, collagen tube  | "gap closure achieved by flexion of the extremity"   | Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ, USA          |
| <b>SaluMedica Nerve Cuff</b>                                   | 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                      |
| <b>Neurotube®</b>  | Polyglycolic acid, PGA  | K983007                       | Unspecified          | Absorbable woven PGA Mesh Tube   | ≥ 8 mm and ≤ 30 mm   | Synovis Micro Companies Alliance, Birmingham, AL, USA |
| <b>Fastube Nerve Regeneration Device</b>                       | Not specified   | K850785                       | Unspecified          | Unspecified  | Not available  | Research Medical, Inc., West Midvale, UT, USA         |
| <b>Non-510(k) clearance Avance Nerve Graft</b>                 | Human decellularized nerve allograft  | N/A                           | Gamma Irradiation    | Human decellularized nerve allograft                                       | ≤ 70 mm  | Axogen Corporation, FL, USA                           |

Tabella 2.1 Condotti nervosi in commercio approvati dall'FDA [44].

### *VersaWrap nerve protector*

Il condotto nervoso VersaWrap (Alafair Biosciences, Austin, Texas, USA) è un involucro realizzato o in hydrogel biorisorbibile a base vegetale o in alginato di calcio, è stato recentemente approvato negli Stati Uniti per l'uso come bendaggio nervoso. Veniva inizialmente utilizzato esclusivamente per bendaggi, ma successivamente è stato utilizzato per il trattamento delle lesioni ai nervi, soprattutto in quelle con difficile cicatrizzazione. VersaWrap sembra essere un prodotto innovativo nel campo delle fasciature nervose. Il suo foglio di hydrogel ultrasottile, composto da acido ialuronico e alginato, offre diversi vantaggi per l'avvolgimento dei nervi periferici. La sua natura sottile e flessibile, insieme alla superficie liscia e idrofila, lo rende particolarmente adatto per fornire un'interfaccia non costringente per tendini e nervi. Alcuni dei benefici chiave di VersaWrap includono la sua facilità di posizionamento senza la necessità di suture, la capacità di adattarsi a diversi diametri di nervo periferico e la sua trasparenza, che consente la visualizzazione del nervo avvolto sottostante. Inoltre, il fatto che VersaWrap venga biorisorbito tramite idrolisi e attività metabolica lo rende una scelta interessante rispetto agli impianti a base di collagene, che possono tradursi in un aumento di massa nel tempo nel sito di riparazione del nervo. Infine, il suo design privo di componenti di tessuto di derivazione animale o umana riduce le preoccupazioni legate alla risposta immunitaria e alla trasmissione di malattie. Questa combinazione di caratteristiche lo rende una potenziale opzione di fasciatura nervosa avanzata, offrendo vantaggi sia durante il processo di guarigione che per la sicurezza del paziente. VersaWrap è stato utilizzato come protettore dei nervi nelle neuropatie compressive ricorrenti negli arti superiori per ridurre le cicatrici postoperatorie [45].

### *NeuraGen®*

Tra i condotti nervosi realizzati in collagene abbiamo le neuroguide NeuraGen (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ) (Figura 2.20), NeuroFlex (Collagen Matrix, Inc.) e NeuroMatrix (Collagen Matrix, Inc.). Le misure di un condotto nervoso NeuraGen variano da 1.5 mm a 7 mm di diametro e dai 2 cm ai 3 cm di lunghezza.



Figura 2.20 NeuraGen® Nerve Guide.

In uno studio condotto da Summa et Al. [46] su modello animale di ratto, questi condotti in collagene sono stati arricchiti di cellule di Schwann (*Schwann cells*, SC), cellule staminali mesenchimali e fattori neutrofici per supportare la rigenerazione nervosa [46]. Si è evinto che i condotti NeuraGen®+SC hanno migliorato l'adesione delle cellule di Schwann ( $5,18 \pm 0,29$  mm) rispetto ai condotti NeuraGen® vuoti ( $3,85 \pm 0,26$  mm) (Figura 2.21).

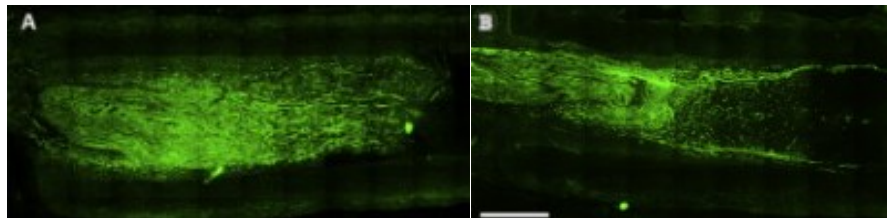


Figura 2.21 La colorazione PGP 9.5 mostra la rigenerazione assonale nei condotti del collagene vuoti o seminati con SC. A) Condotto di collagene vuoto. B) Condotto di collagene seminato con SC.

Da uno studio di Bedar et al. [47] su modelli animali di coniglio a cui veniva impiantato NeuraGen e NeuraGen seminato con MSC si è dedotto che non c'è una grossa differenza tra i due casi, questo fa dedurre che i condotti nervosi NeuraGen sono sicuri per l'uso in futuri esperimenti volti a migliorare la rigenerazione dei nervi motori.

#### *NeuraWrap™ Nerve Protector*

NeuraWrap™ (Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ), è una neuroguida realizzata in collagene di tipo I, biocompatibile e altamente purificata. È indicata per la gestione delle lesioni dei nervi periferici in cui non si è verificato sostanziale perdita di tessuto nervoso. È, invece, controindicato se un paziente ha una nota ipersensibilità ai materiali derivati dai bovini [48]. Le neuroguide NeuraWrap possono avere misure di diametro dai 3 ai 10 mm e di lunghezza dai 2 ai 4 cm.

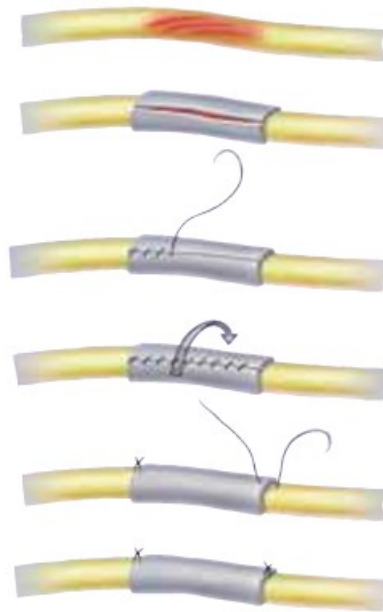


Figura 2.22 Fasi di applicazione di una NeuroWrap [48].

Un'applicazione della neuroguida Neurawrap si può trovare in uno studio condotto da Stocco Et Al.[49] in cui sono stati messi a confronto degli impianti in Neurawrap, in OxPVA e in LFP (Figura 2.23).



Figura 2.23 Modello animale di impianto di bendaggi. In particolare, sono stati utilizzati NeuraWrap e involucri a base di OxPVA e LFPm [49].

L'intervento chirurgico è stato eseguito al nervo sciatico dei ratti ed è stato ben tollerato dai ratti di tutti i gruppi sperimentali. Tutti gli animali hanno mostrato un rapido e adeguato recupero dopo la neurorrafia end-to-end e l'impianto dei bendaggi. Il monitoraggio regolare delle loro condizioni, che includeva la valutazione delle attività quotidiane, l'assenza di perdita di peso, e l'assenza di infezioni o malattie delle ferite, ha confermato la loro buona salute. Inoltre, durante lo studio non è stata osservata alcuna autotomia (Figura 2.24).

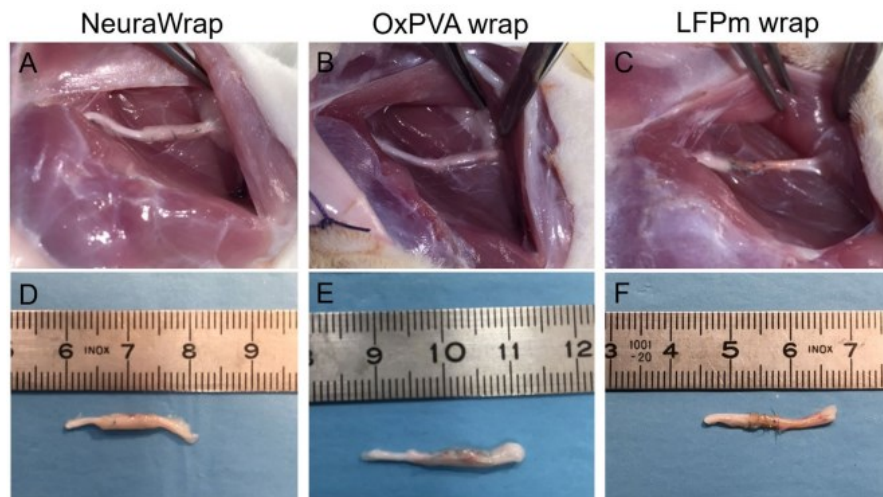


Figura 2.24 Aspetto macroscopico del campo chirurgico e degli espianti di nervi operati a 12 settimane dall'intervento. Impianto *in situ* (A–C) e aspetto dopo l'escissione (D–F), degli involucri basati su NeuraWrap (A, D), OxPVA (B, E) e LFPm (C, F). Dopo 12 settimane, non sono stati osservati infiammazioni, tessuto cicatriziale o neuromi. I residui dell'avvolgimento sono stati identificati solo per NeuraWrap e OxPVA mentre LFP è stato riassorbito [49].

È stata realizzata un'analisi morfologica su sezioni semisottili colorate con blu di toluidina, grazie alla quale si sono ottenute le sezioni trasversali totali, le aree dei fasci, la densità e il numero degli assoni per fascio sia nella parte prossimale che distale degli espianti (Figura 2.25).



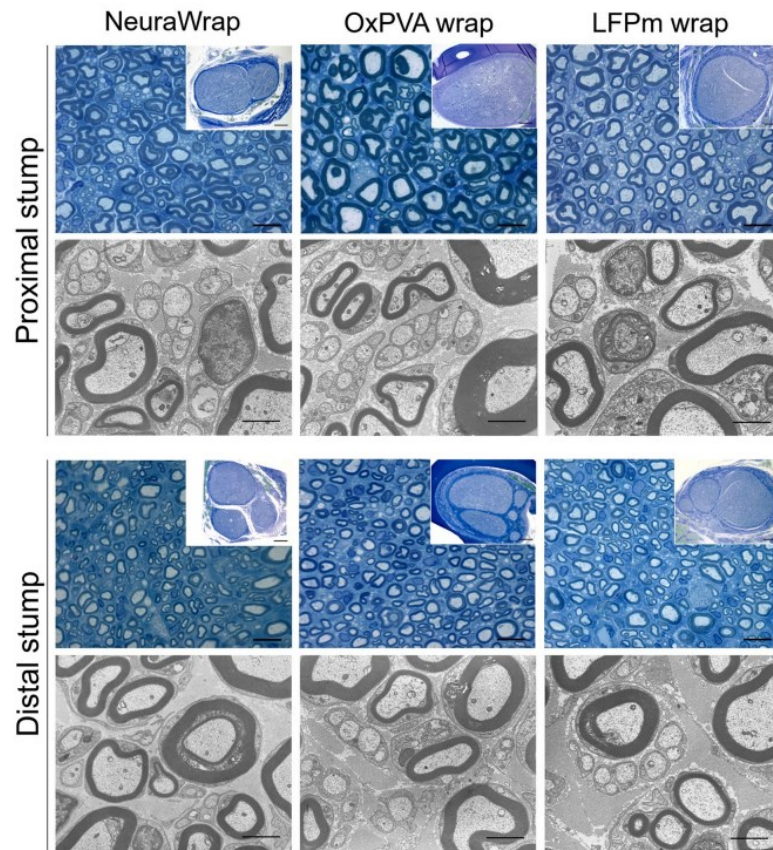


Figura 2.25 Caratterizzazione degli espianti del nervo sciatico Sprague-Dawley a 12 settimane dall'intervento chirurgico. Sezioni trasversali delle porzioni prossimali e distali degli espianti valutati con colorazione blu di toluidina (scala: 10  $\mu\text{m}$ ; scala nell'inserto in alto a destra: 200  $\mu\text{m}$ ) e microscopia elettronica a trasmissione (*transmission electron microscope*, TEM) (scala: 2  $\mu\text{m}$ ) [49].

A livello prossimale, la densità totale degli assoni era significativamente più alta ( $p < 0,01$ ) per NeuraWrap ( $0,059 \pm 0,007 / \mu\text{m}^2$ ) rispetto all'OxPVA ( $0,035 \pm 0,005 / \mu\text{m}^2$ ) ma non rispetto agli avvolgimenti LFPm ( $0,041 \pm 0,004 / \mu\text{m}^2$ ); mentre, considerando la porzione distale, non sono emerse differenze tra i gruppi (NeuraWrap,  $0,044 \pm 0,005$ ; OxPVA wrap,  $0,052 \pm 0,004$ ; Avvolgimento LFPm,  $0,047 \pm 0,004$ ).

#### *SaluTunnel Nerve Protector*

Il SaluTunnel è una guaina tubolare flessibile creata per offrire un ambiente protettivo durante la riparazione dei nervi periferici dopo un infortunio. Dotato di una fessura longitudinale, il SaluTunnel può essere aperto agevolmente per il posizionamento sulla lesione. È progettato per essere posizionato tra il nervo e il suo letto, e può anche fungere da guida per la crescita assonale attraverso una fessura nervosa, se necessario. È disponibile in diverse dimensioni, con diametri

interni compresi tra 2 e 10 mm. Ogni dispositivo SaluTunnel deve essere fissato per evitare la migrazione e deve essere selezionato in base alle dimensioni appropriate. Il dispositivo è realizzato utilizzando il biomateriale Salubria, a base di PVA.

### *Neurotube®*

Il Neurotube® (Synovis Micro Companies Alliance, Inc.) è un NGC a base di acido poliglicolico con un'intrecciatura esterna per dare maggiore resistenza alle pareti (Figura 2.26). La sua permeabilità permette lo scambio di nutrienti e ossigeno, creando un ambiente ideale per la mobilità neutrofica. Viene utilizzato dal 2005 per la ricostruzione di nervi facciali [50]. In questo studio è stato notato che il decorso postoperatorio e il recupero funzionale sono stati positivi nel 71% circa dei pazienti. Questi risultati, ottenuti utilizzando Neurotube®, sono paragonabili ad altre tecniche come la tubulizzazione biologica o l'innesto nervoso autologo, ma con il vantaggio di tempi operatori più brevi. Neurotube® ha consentito un intervento chirurgico rapido e semplice. Non va tuttavia dimenticato che il recupero del nervo è strettamente legato al tipo di trauma e alla sede della lesione nervosa [50].



Figura 2.26 Neurotube® [51].

## Capitolo 3. Materiali e metodi

In questo capitolo verranno analizzati e discussi i materiali e i metodi utilizzati nella presente attività di tesi. Il materiale usato per la realizzazione delle neuroguide è stato l'hydrogel a base di PVA parzialmente ossidato e successivamente caricato con nanotubi di carbonio. Verranno descritti i procedimenti per la realizzazione del PVA e le tecniche di *freeze-thawing* per la realizzazione delle neuroguide.

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 PVA

I materiali impiegati in questa ricerca sono tutti a base di alcol polivinilico (PVA). Il PVA è un polimero sintetico, idrofilico, con un alto livello di biodegradabilità e un'eccellente biocompatibilità che contiene un grande numero di gruppi funzionali idrossilici, che possono essere reticolati per formare gli hydrogel. È ottenuto per idrolisi, di norma alcalina, del polivinilacetato (Figura 3.1).

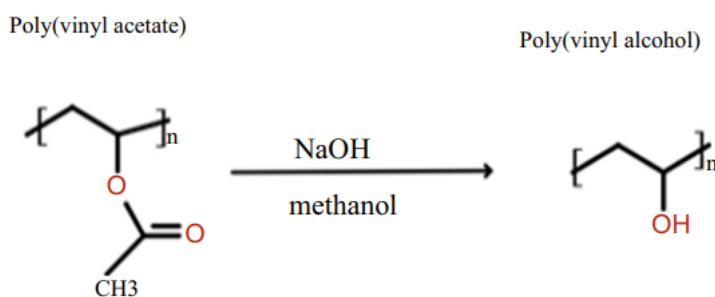


Figura 3.1. Sintesi dell'alcol polivinilico [52].

Ha eccellenti proprietà di resistenza alla trazione, flessibilità e barriera ai gas.

| Proprietà              | Range                  |
|------------------------|------------------------|
| Densità                | 1.19 g/cm <sup>3</sup> |
| $T_g$                  | 400 K                  |
| Punto di fusione       | 400 K                  |
| Indice di rifrazione   | 1.47 a 630 nm          |
| Punto d'infiammabilità | 352.59 K               |

Tabella 3.1 Proprietà del PVA [52].

Grazie alle sue caratteristiche uniche, inclusa la biocompatibilità, la non tossicità, la non cancerogenicità e la facilità di lavorazione, il PVA è stato riconosciuto dalla FDA come



biomateriale polimerico per uso clinico e ha ottenuto la Certificazione Europea (CE). Le applicazioni del PVA sono molteplici nell'ambito biomedico; variano dall'uso per la creazione di lenti a contatto, di tessuti sintetici per la riparazione chirurgica del cuore, dalla somministrazione controllata di farmaci fino alla medicazione di ferite.

### 3.1.2 PVA parzialmente ossidato (OxPVA)

Nonostante il PVA possieda numerosi vantaggi che lo rendono un materiale ideale per la realizzazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale, il suo utilizzo è limitato dalla scarsa capacità di degradazione in ambiente biologico. Per migliorare la biodegradabilità Stocco et Al. [53] hanno proposto l'ossidazione chimica del PVA. Il PVA utilizzato in questo studio è stato parzialmente ossidato all'1% (Figura 3.2). Le proprietà meccaniche dell'OxPVA messe a confronto con quelle del PVA sono riportate in Tabella 3.2.

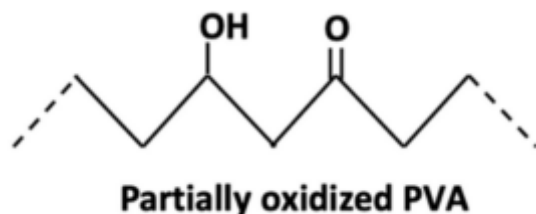


Figura 3.2 PVA parzialmente ossidato [54].

|          | Modulo secante (KPa) | Tensione a rottura (KPa) | Deformazione a rottura (%) |
|----------|----------------------|--------------------------|----------------------------|
| PVA      | 52.0 ± 13.4          | 330.0 ± 116.6            | 192 ± 23                   |
| 1% OxPVA | 42.9 ± 16.5          | 152.8 ± 25.8             | 162 ± 18                   |

Tabella 3.2 Proprietà meccaniche di PVA e 1% OxPVA [53].

L'OxPVA ha modulo secante, tensione a rottura e deformazione a rottura più bassi rispetto al PVA, ma è risultato avere un miglior comportamento al rigonfiamento e al rilascio di proteine. L'ossidazione conferisce al polimero anche una minore cristallinità, una velocità di dissoluzione più rapida e una minore viscosità in ambienti acquosi.

### 3.1.3 Nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio appartengono alla classe dei nanomateriali, e hanno dimensioni che variano dagli 1 ai 100 nm. I CNT sono strutture tubulari costituite da uno strato di grafene arrotolato in un cilindro [55]. Queste nanoparticelle sono classificate in base al numero di fogli della parete nella

loro struttura: nanotubi a parete singola (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNT) costituiti da un singolo grafene e nanotubi di carbonio a parete multipla (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*, MWCNT) costituiti da più fogli che formano cilindri concentrici. I nanotubi di carbonio possono essere classificati anche in base alla forma, a seconda dell'arrotolamento dei fogli: *armchair*, zig-zag, chirali (Figura 3.3 [55]).

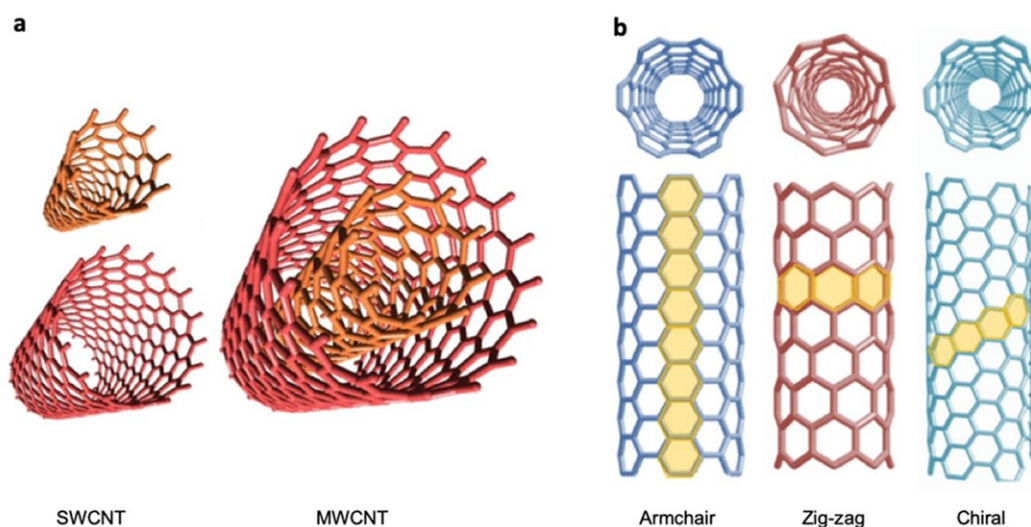


Figura 3.3 Classificazione dei nanotubi. a) In base al numero di fogli, sono SWCNT o MWCNT. b) In base all'arrotolamento dei fogli, possono essere *armchair*, zig-zag o chirali [55].

I nanotubi di carbonio vengono studiati in biomedicina per le ottime proprietà elettriche e per l'ibridazione  $sp^2$  di tutti gli atomi di carbonio che permette la loro funzionalizzazione con varie biomolecole. Inoltre, il legame carbonio-carbonio lo rende il materiale organico più resistente. Vengono utilizzati anche per la realizzazione di *scaffold* nella produzione di tessuti per l'ingegneria tissutale. Nonostante queste ottime proprietà, i nanotubi possiedono alcuni problemi come la scarsa solubilità, la bassa biodegradabilità e dispersività.

## 3.2 Metodi

### 3.2.1 Preparazione hydrogel a base di OxPVA

Per la realizzazione del PVA parzialmente ossidato all'1%, i reagenti come il PVA nativo in polvere e il permanganato di potassio ( $KMnO_4$ ) sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), l'acido perclorico è stato fornito da Carlo Erba (Milano, RPE-ACS Cod.409052), la membrana semipermeabile per dialisi è stata fornita da Prodotti Gianni (Cod. SR4413002), lo strumento per

misurare la conducibilità è stato procurato da Dionex Conductivity Detector (Model CDM-1, Serial N. 830935) [53].

La preparazione della soluzione di PVA ossidato all'1% inizia con la solubilizzazione di 10 g di PVA nativo in acqua deionizzata con l'ausilio di un bagno d'acqua riscaldante e agitazione magnetica. Dopo 2h il polimero è completamente solubilizzato e la temperatura della soluzione viene abbassata a 35-36°C. In parallelo, 154 mg di permanganato di potassio ( $KMnO_4$ ) sono stati aggiunti a 10 ml di acqua deionizzata e agitati fino a completa solubilizzazione. Alla soluzione vengono poi aggiunti 952  $\mu$ L di acido perclorico ( $HClO_4$ ). In stechiometria la reazione (riferita ad un ipotetico monomero di alcol vinilico) che avviene è la seguente:



Questa soluzione viene velocemente aggiunta alla soluzione di PVA nativo e viene riposta sull'agitatore magnetico riscaldante, mantenendo una temperatura di circa 35 °C, fino a completa decolorazione. Successivamente alla fase di ossidazione, la soluzione risultante è stata dializzata. La dialisi è una tecnica utilizzata per purificare le soluzioni separando molecole in base alla loro dimensione attraverso una membrana semipermeabile. La soluzione è stata versata in una membrana semipermeabile; subito il sistema è stato posto in acqua deionizzata e lasciato in immersione e in agitazione per due giorni. La fase di dialisi si è ritenuta conclusa quando la conducibilità ionica della soluzione di OxPVA è risultata inferiore a 20-30  $\mu$ S (micro-Siemens). Successivamente il materiale è stato liofilizzato con un sistema *freeze-drying*. Infine, le membrane liofilizzate sono state ridotte in frammenti e sono state conservate a temperatura ambiente fino all'uso.

### 3.2.2 Preparazione hydrogel a base di OxPVA caricato con nanotubi di carbonio

L'hydrogel nano-composito di OxPVA con CNT è stato ottenuto tramite incorporazione meccanica di CNT nella soluzione di hydrogel. Una soluzione acquosa al 16% di OxPVA è stata ottenuta solubilizzando il polimero liofilizzato in acqua deionizzata a 110°C per circa 8 ore. I nanotubi di carbonio *multi-walled* (MWCNT) sono stati funzionalizzati con gruppi solfonati per aumentarne la solubilità. Quindi, dopo aver preparato la soluzione di OxPVA e la sospensione di MWCNT, i nanotubi sono stati incorporati meccanicamente nella soluzione di hydrogel, precedentemente riscaldata a 60°C fino a raggiungere lo 0.1%, lo 0.5, l'1% in peso.

### 3.2.3 Fabbricazione dei provini

Per la realizzazione delle membrane, la soluzione di PVA e di OxPVA+CNT è stata colata tra due superfici. È stata eseguita la reticolazione con 6 cicli di *freeze-thawing* (FT), il congelamento è avvenuto a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 6 h, lo scongelamento a temperatura ambiente per 1 h. Dopo i cicli di FT, il materiale è stato tenuto in congelamento. Al momento dell'utilizzo, le membrane di OxPVA sono state scongelate e tagliate con un bisturi in provini rettangolari di circa 8 mm di larghezza. I provini utilizzati per le prove di trazione sono delle membrane di forma rettangolare di lunghezza 34 mm, spessore circa 0.6 mm (Figura 3.4). I campioni hanno la stessa geometria che avrebbero le neuroguide srotolate: questa forma ci ha permesso di fissare meglio le estremità delle membrane durante le prove di trazione. Sono stati testati prima i provini in hydrogel con OxPVA e poi quelli caricati con CNT alle diverse percentuali di 0.1, 0.5 e 1. Le membrane in OxPVA hanno un colore semitrasparente, mentre le membrane in OxPVA+CNT hanno una colorazione che varia tra il grigio e il nero. Questa colorazione varia in base alla percentuale di nanotubi di carbonio inseriti all'interno dell'hydrogel; più la percentuale è alta, più la membrana è tendente al nero (Figura 3.4).

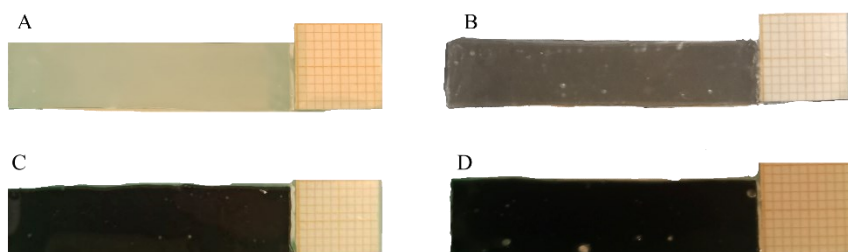


Figura 3.4 A) Provino in OxPVA. B) Provino in OxPVA+CNT allo 0.1%. C) Provino in OxPVA+CNT allo 0.5%. D) Provino in OxPVA+CNT all'1%.

Per le prove di *suture retention* i campioni a base di OxPVA e OxPVA+CNT allo 0.1% sono stati suturati da un chirurgo plastico prima delle prove sperimentali (Figura 3.5). La sutura è stata realizzata a 3 mm dal margine del campione, con un monofilamento in nylon 9/0 Monosof™ della Covidien. Anche in questo caso la colorazione scura delle membrane con i CNT deriva dalla percentuale inserita nell'hydrogel.

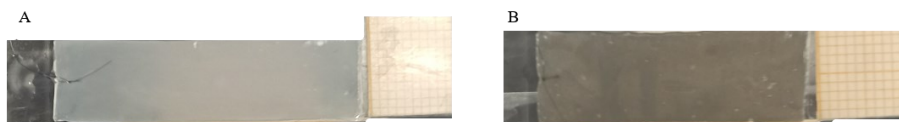


Figura 3.5 A) Provino in OxpVA con sutura. B) Provino in OxpVA caricato con CNT allo 0.1% con sutura.

### 3.2.4 Preparazione delle neuroguide

Le neuroguide sono state realizzate tramite la tecnica del *cast moulding*. Nello specifico, l'hydrogel è stato precedentemente riscaldato a 60 °C in una mini-stufa analogica Falc. Quindi, la soluzione è stata aspirata in uno stampo cilindrico in acciaio inox, e uno stampo cilindrico interno dal diametro inferiore (0.7 mm) è stato inserito coassialmente per creare il lume interno della neuroguida (Figura 3.6). Per assicurare la coassialità del sistema, due piccoli cilindri sono stati posti tra i due stampi e il sistema è stato posto su una struttura di supporto. La reticolazione viene eseguita con 6 cicli di congelamento-scongelo, il congelamento avviene a -20°C per 6 h, lo scongelamento a temperatura ambiente per 1 h. Infine, le neuroguide vengono estratte e conservate a -20°C fino all'uso.

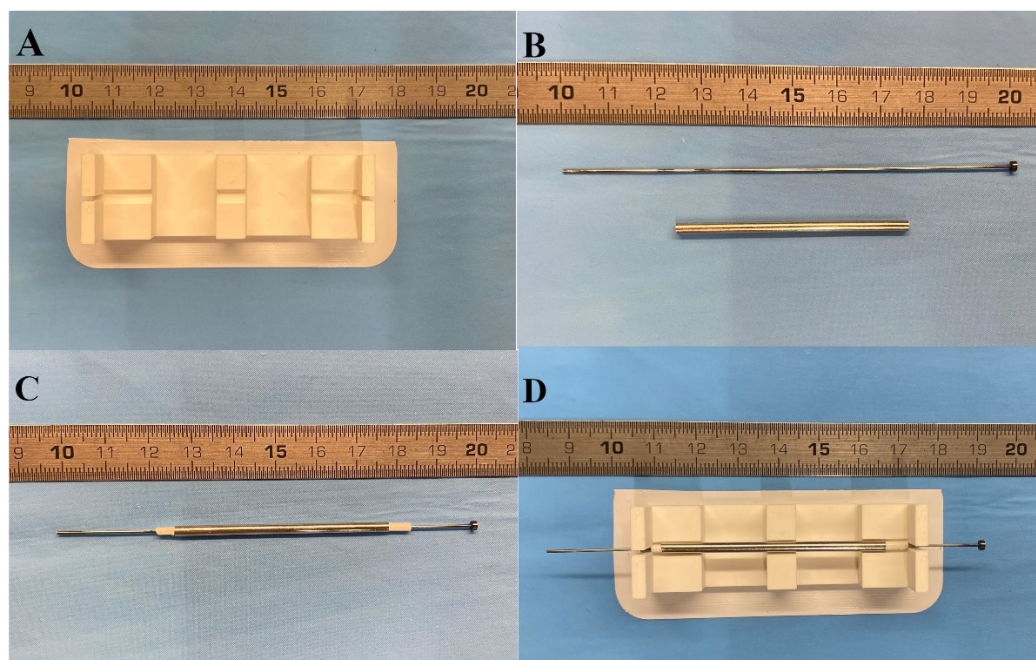


Figura 3.6 Strumenti utilizzati per la realizzazione di una neuroguida. A) Base su cui poggia la neuroguida. B) Cilindro cavo e stantuffo. C) Modalità di inserimento dello stantuffo con i cilindri per la coassialità all'interno del cilindro cavo. D) Configurazione finale.

La prima produzione dei cilindri è avvenuta tramite la stampante 3D Ultimaker 2+ Connect presente nel Dipartimento di Anatomia dell'Università degli Studi di Padova (Figura 3.6). Il programma utilizzato per la costruzione del modello 3D è stato Autodesk Fusion. L'Ultimaker 2+ Connect è una stampante 3D a estrusione singola con ugelli intercambiabili di 0.25 mm, 0.4 mm, 0.6 mm e 0.8 mm che permette una precisione millimetrica e un'alta affidabilità. L'ugello inserito è stato quello da 0.4 mm. La temperatura di stampa dell'ugello varia dai 180 ai 260°C, e la temperatura del piatto dai 20 ai 120°C [56]. È stato usato un filamento di PLA. Con questa stampante (Figura 3.7) si è riusciti ad arrivare alle dimensioni del cilindro di diametro esterno uguale a 1.9 mm e diametro interno 1 mm.

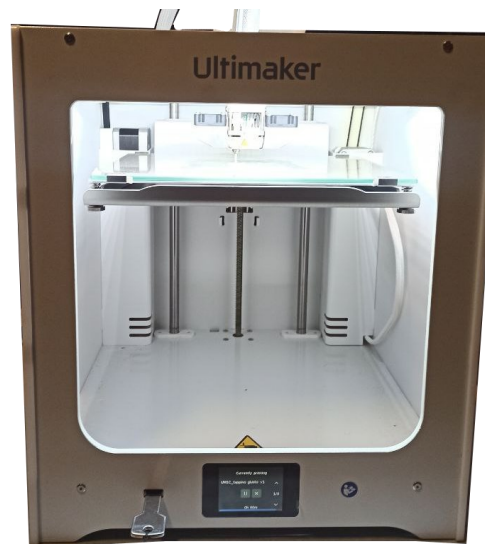


Figura 3.7 Stampante 3D Ultimaker 2+ Connect.

La fase e la riuscita della produzione dei cilindri risulta importante per far sì che la neuroguida mantenga la coassialità lungo tutta la sua lunghezza.

### 3.2.5 Microscopia digitale e analisi d'immagine

Per poter valutare lo spessore, l'area trasversale e la coassialità delle neuroguide è stata misurata la geometria delle sezioni tramite microscopia digitale e l'analisi d'immagine. Il microscopio impiegato è un PCE-MM200 UV (Figura 3.8), un microscopio USB con luce ultravioletta che mostra gli oggetti fino a 200 ingrandimenti, ha 8 LED di UV disposti a forma di anello intorno alla lente [57].





Figura 3.8 A sinistra microscopio PCE-MM200 UV [57].

Per questa analisi sono state considerate tre neuroguide, una realizzata senza i cilindri per la coassialità e le altre due con i cilindri. Le neuroguide sono state sezionate in otto segmenti dello spessore di pochi mm e l'immagine della loro sezione è stata acquisita tramite il microscopio digitale.

Lo spessore della neuroguida è stato misurato con un plugin di ImageJ. Questo plugin, dopo che l'operatore disegna due curve d'interesse, in questo caso gli estremi della corona circolare della sezione della neuroguida, acquisisce la distanza tra le due curve in 30 punti (Figura 3.9). In un file Excel salvato in formato .csv in precedenza, il software restituisce: la media delle lunghezze, la deviazione standard e il range di valori dal minimo al massimo di lunghezza per ogni linea. I dati delle misurazioni sono inizialmente riportati in pixel, dopodiché è stata fatta una conversione in millimetri, tramite il programma ImageJ. La conversione è avvenuta impostando la stessa scala della carta millimetrica presente nelle foto. Da queste informazioni possiamo ottenere quanto è deviato l'asse rispetto all'asse di riferimento sul quale è stata orientata la neuroguida (coassialità) [58]. Dei campioni realizzati con i cilindri per la coassialità, si è calcolato il valore medio degli spessori forniti dal software. Poiché il valore di spessore in uscita del software presentava già deviazione standard, è stata considerata la propagazione dell'errore. Essa è stata calcolata secondo il teorema centrale del limite in cui si considera la variabile aleatoria  $S_n$  costituita dalla somma degli  $n$  campioni; lo scarto quadratico medio sarà  $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ .

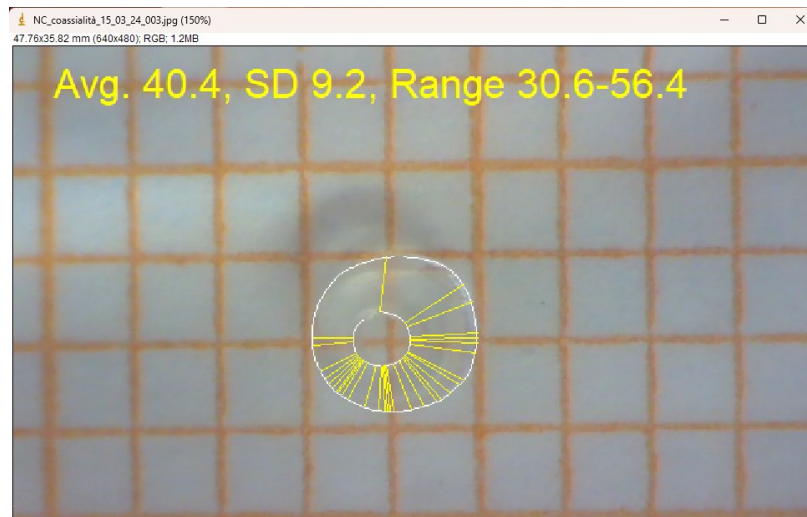


Figura 3.9 Esempio di analisi svolta con il plugin del software ImageJ.

### 3.2.6 Strumentazione per prove meccaniche

Le prove di trazione uniassiale e le prove di *suture retention* sono state eseguite sulla macchina di test Bose® ElectroForce Planar Biaxial TestBench (TA Instruments), presente nei Laboratori del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell'Università degli Studi di Padova (Figura 3.10). Lo strumento è composto da quattro attuatori lineari con una capacità di forza di 22, 200 e 400 N, con un intervallo di spostamento di 13 mm, montati su una piastra orizzontale traforata. Le staffe di reazione sono progettate per permettere il fissaggio dei componenti o dei campioni di prova alla piastra di base di montaggio [59]. Questa configurazione consente di eseguire sia prove mono-assiali, sia prove bi-assali utilizzando tutti e quattro i motori. Nel nostro caso sono state effettuate prove mono-assiali.



Figura 3.10 Bose® ElectroForce Planar Biaxial TestBench (TA Instruments) con quattro attuatori lineari [60].



Il software di controllo utilizzato per interfacciare le celle di carico e i motori si chiama Wintest. Grazie a questo sistema integrato possiamo avere un completo controllo dei motori, monitorando e regolando tutti gli aspetti del loro funzionamento, incluso la gestione dei parametri operativi e delle modalità di lavoro. Possiamo avere un'acquisizione temporale dei dati, registrando in modo continuo e temporale le grandezze fisiche rilevanti, come velocità, temperatura, pressione, e altri parametri critici del motore. Questo permette di avere una cronologia dettagliata delle prestazioni del motore durante i test. Inoltre, Wintest consente di impostare e modificare automaticamente tutti i parametri del motore tramite un'interfaccia informatizzata. Infine, offre strumenti per l'analisi dei dati acquisiti, permettendoci di identificare problemi e ottimizzare le prestazioni del motore basandoci su dati accurati e dettagliati raccolti durante le prove [61].

### 3.2.7 Protocollo prove di trazione

Nel presente studio sono state eseguite prove di trazione mono-assiali per la caratterizzazione meccanica delle membrane. Per misurare le forze sviluppate durante la prova è stata utilizzata una cella di carico in grado di rilevare la forza applicata per un massimo di 22N. Prima delle prove sperimentali i provini in hydrogel sono stati scongelati, tagliati nelle dimensioni richieste per la prova (trazione: 0.6 mm di spessore, 8 mm di larghezza, 24 mm di lunghezza; *suture retention*: 0.6 mm di spessore, 8 mm di larghezza, 20 mm di lunghezza) e mantenuti idratati in soluzione salina tamponata con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). Sono stati testati: 14 provini in OxPVA, 4 in OxPVA+CNT allo 0.1%, 8 in OxPVA+CNT allo 0.5%, 8 in OxPVA+CNT all'1%. Durante la prova il provino è stato mantenuto sempre idratato tramite un sistema a goccia montato al di sopra dei provini fissati (Figura 3.11).

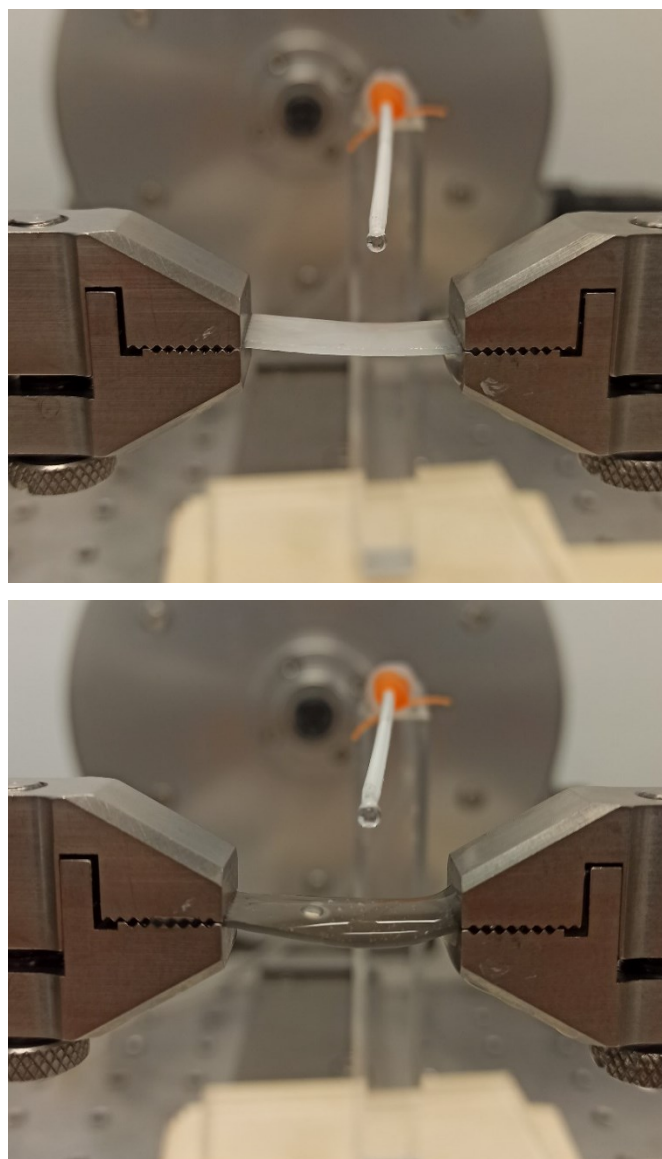


Figura 3.11 In alto campione in OxPVA fissato alle staffe degli attuatori lineari. In basso campione in OxPVA+CNT allo 0.1%.

I parametri che sono stati utilizzati in queste prove sono:

- lunghezza libera iniziale ( $l_0$ ) di 24 mm;
- allungamento massimo ( $\Delta l$ ) di 24 mm, quindi del 100%;
- velocità di deformazione  $v=0.5 \% s^{-1}= 0.12 \text{ mm s}^{-1}$ .

Con questo protocollo di trazione abbiamo ottenuto la misura della forza in Newton, in risposta all'applicazione del carico. I dati sperimentali sono stati ottenuti mediante il software di controllo Wintest connesso al Bose® ElectroForce Planar Biaxial TestBench. Grazie ai valori acquisiti, è

stato possibile elaborare i dati su Excel e ottenere per i vari gruppi sperimentali i valori di tensione nominale  $\sigma_{nominale}$ , e deformazione nominale  $\epsilon$ . La tensione  $\sigma_{nominale}$  è stata calcolata nel seguente modo:

$$(\text{forza istantanea}/\text{area trasversale}) * 1000 \text{ [KPa]}.$$

Da questi valori sono stati ricavati i grafici di sforzo-deformazione. Sono stati ricampionati i valori delle  $\sigma_{nominale}$  sulla base di una polinomiale di quarto grado. La curva della  $\sigma_{normalizzata}$  è stata ottenuta inserendo in un grafico  $\epsilon$  e la  $\sigma_{nominale}$  ricampionata. Per poter confrontare le proprietà meccaniche dei diversi gruppi sperimentali si è poi calcolato il modulo secante elastico a due livelli deformativi (10% e 20%), calcolato come rapporto tra la tensione normalizzata e la deformazione. Infine, sono state calcolate la media la deviazione standard delle tensioni di tutti i gruppi sperimentali.

### 3.2.8 Protocollo *suture retention*

Il protocollo di *suture retention* si è svolto con prove di trazione mono-assiali in cui la sutura della membrana era posta a 3 mm dal margine della stessa. Il filo è stato incollato tra due pezzi di balsa e ancorato alle staffe di fissaggio (Figura 3.12).

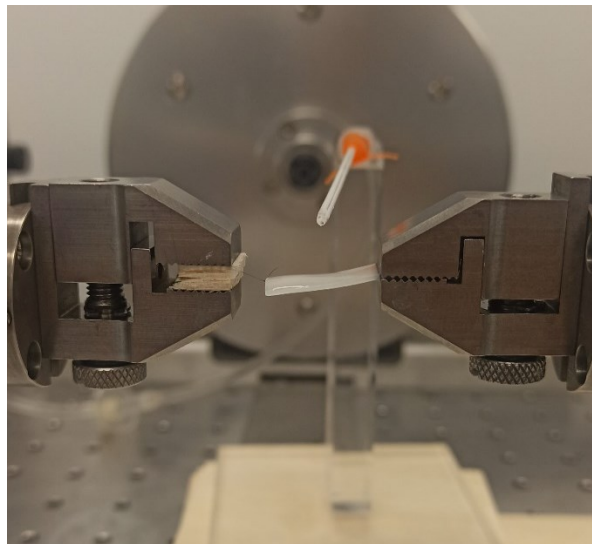


Figura 3.12 Membrana in OxpVA con sutura montata tra le due staffe degli attuatori lineari del Bose®.

I parametri che sono stati utilizzati sono gli stessi delle prove di trazione senza sutura, a eccezione della lunghezza libera:

- lunghezza libera iniziale ( $l_0$ ) di 20 mm;

- allungamento massimo ( $\Delta l$ ) di 24 mm, quindi del 100%;
- larghezza media ( $w$ ) delle membrane di 8 mm;
- velocità di trazione  $v=0.5 \% s^{-1}= 0.12 \text{ mm } s^{-1}$ .

Prima delle prove, le membrane sono state scongelate, tagliate e lasciate in idratazione in soluzione di PBS. Come per le prove di trazione, durante i test i campioni sono stati tenuti idratati con sistema goccia a goccia di PBS. Sono state testate 4 membrane in OxPVA e 4 membrane in OxPVA+CNT allo 0.1%. Anche in questo protocollo, i dati sperimentali sono stati ottenuti mediante il software di controllo Wintest connesso al Bose® ElectroForce Planar Biaxial TestBench. In un file Excel sono stati inseriti tutti i risultati presenti nel software Wintest, e sono state ottenute le curve sforzo-allungamento per ogni prova eseguita. Un altro valore ottenuto è stato quello della forza massima a cui può essere sottoposto il filo prima della rottura dello stesso.

## Capitolo 4. Risultati e discussione

### 4.1 Analisi d'immagine

Dopo aver sezionato la neuroguida in 8 segmenti, sono state realizzate le foto tramite il microscopio PCE-MM200 UV, alcuni esempi delle immagini ottenute sono mostrate in Figura 4.1.

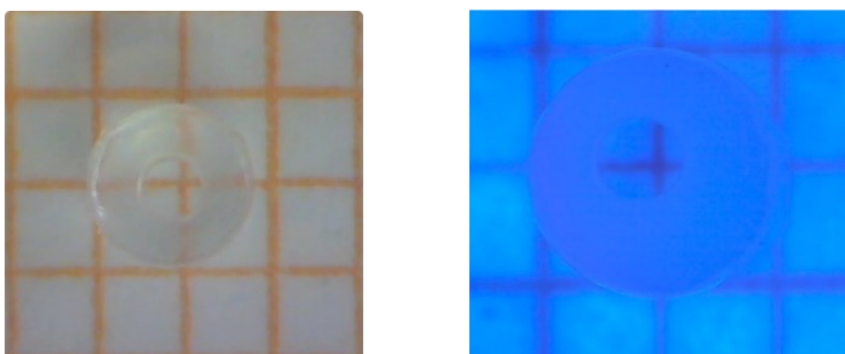


Figura 4.1 Foto da microscopio PCE-MM200 UV. A sinistra sezione di neuroguida con luce normale. A destra sezione di neuroguida con luce blu.

I valori acquisiti dalle immagini di neuroguide realizzate senza i cilindri per la coassialità sono quelli riportati in Tabella 4.1.

| Media delle medie | SD    |
|-------------------|-------|
| 0.607             | 0.011 |

Tabella 4.1 Media e deviazione standard della neuroguida senza cilindri.

Da questi valori possiamo dedurre che il lume interno della neuroguida non risulta coassiale, in quanto il valore minimo della linea messo a confronto con il valore massimo risultano molto diversi fra loro, questo significa che il lume in quel punto è fortemente deviato rispetto all'asse centrale. Il valore della media dello spessore di 0.607 conferma la corrispondenza con lo spessore utilizzato nelle membrane.

Una seconda analisi è stata eseguita con una neuroguida con i cilindri in PLA prodotti con la stampante Ultimaker 2+ Connect. I risultati sono riportati in Tabella 4.2 (Neuroguida 1). Dai risultati dell'analisi d'immagine si è rilevato che lo spessore minimo tra tutte le sezioni è stato di 0.457 mm mentre quello massimo di 0.855 mm. Anche in questo caso non c'è perfetta coassialità,

ma dai dati rilevati, possiamo affermare che i cilindri hanno migliorato in parte la centralità del lume rispetto all'asse centrale.

|              | Media delle medie | SD    |
|--------------|-------------------|-------|
| Neuroguida 1 | 0.651             | 0.012 |
| Neuroguida 2 | 0.740             | 0.010 |

Tabella 4.2 Media e deviazione standard delle neuroguide 1 e 2 con cilindri in PLA.

La terza neuroguida analizzata è stata realizzata con i cilindri in PLA e illuminata con luce blu. La luce blu, applicando un contrasto alto all'immagine, ha permesso una più efficace misurazione dei contorni della neuroguida. Questo terzo condotto di guida ha riportato risultati di coassialità migliori. Infatti, la dispersione attorno alla media è più bassa rispetto alle precedenti prove. I dati sono riportati in Tabella 4.2 (Neuroguida 2).

## 4.2 Risultati prove di trazione

Come descritto in precedenza, le prove di trazione sono state eseguite su diversi provini in OxpVA, e in OxpVA caricato con nanotubi di carbonio a diverse concentrazioni di 0.1%, 0.5% e 1%. Le curve ottenute per le prove di trazione del gruppo sperimentale dei provini in OxpVA sono riportate in Figura 4.2.

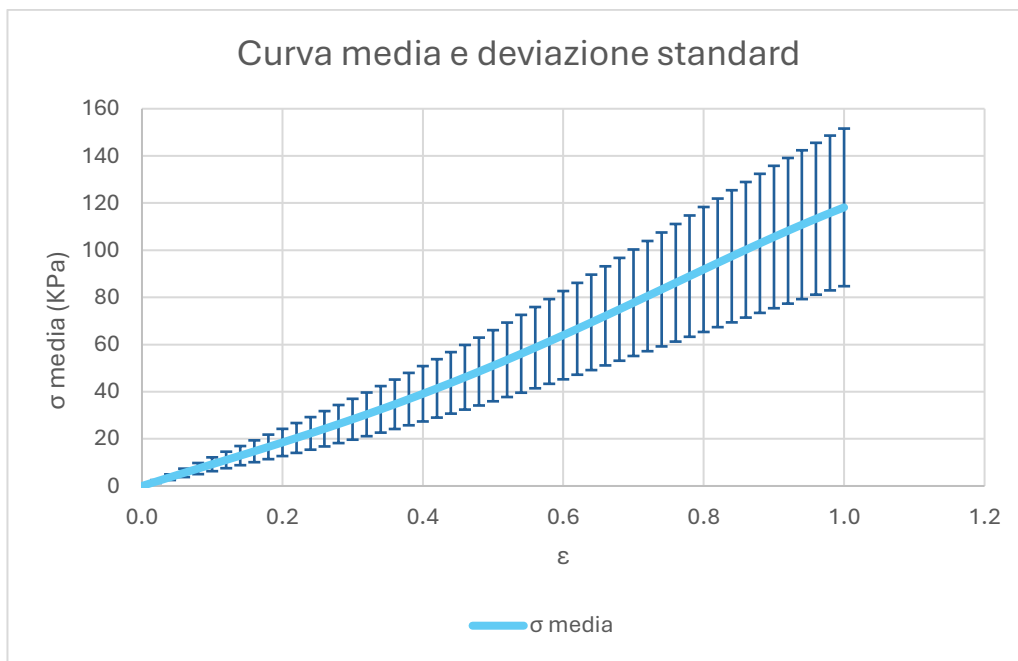


Figura 4.2 Curva media campioni in OxpVA e relativa deviazione standard.

Dal grafico in Figura 4.2 è possibile osservare che il materiale OxPVA presenta un andamento non lineare a trazione.

Le stesse analisi sono state effettuate sui restanti gruppi sperimentali. La curva media e deviazione standard delle prove di trazione dei campioni in OxPVA+CNT sono rappresentate in Figura 4.3.

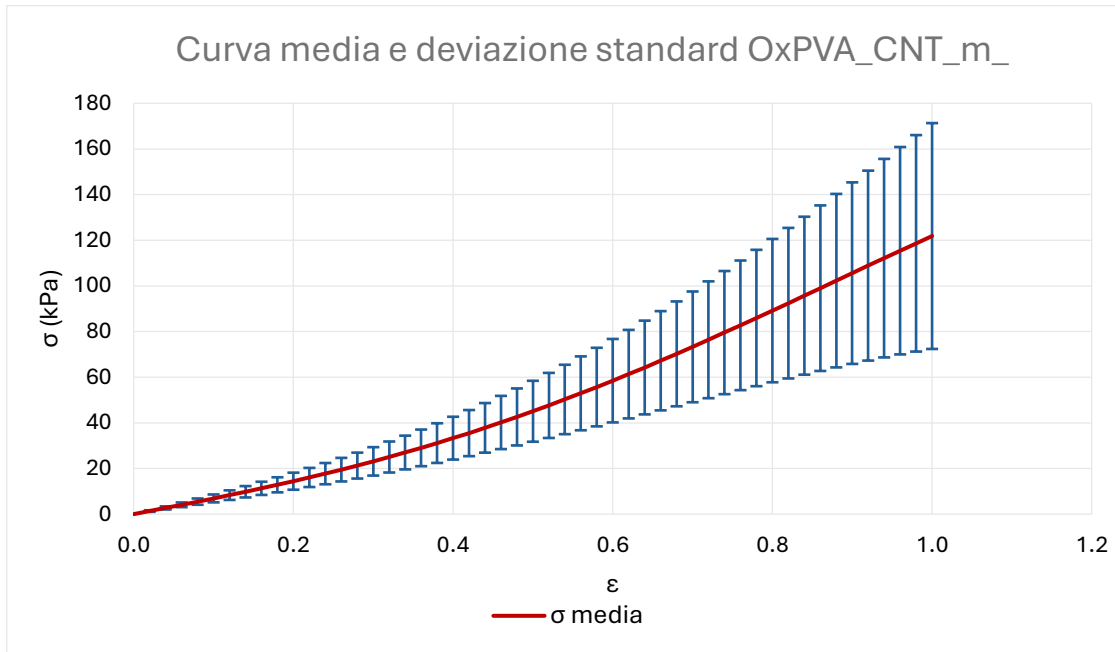


Figura 4.3 Curva media e relativa deviazione standard.

Le prove di trazione e la curva media con deviazione standard dei campioni di OxPVA+CNT allo 0.5% sono mostrati in Figura 4.4.

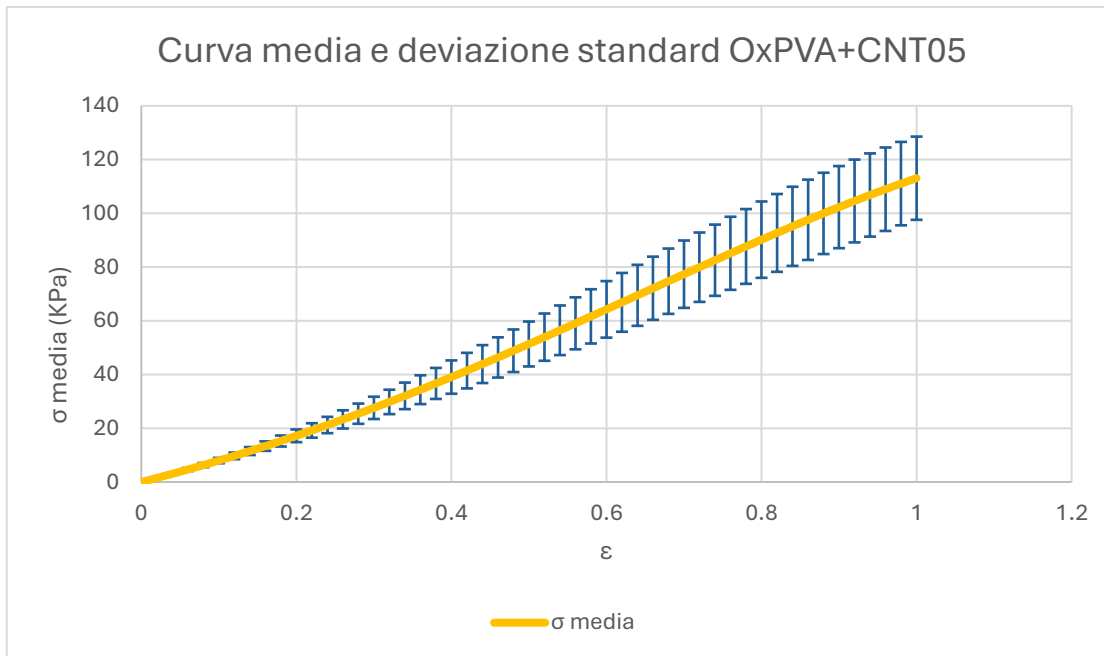


Figura 4.4 Curva media dei campioni in OxPVA+CNT allo 0.5% e relativa deviazione standard.

I risultati ottenuti dalle prove di trazione e dalla curva media con deviazione standard del gruppo sperimentale OxPVA caricato con nanotubi di carbonio all'1% sono mostrati in Figura 4.5.

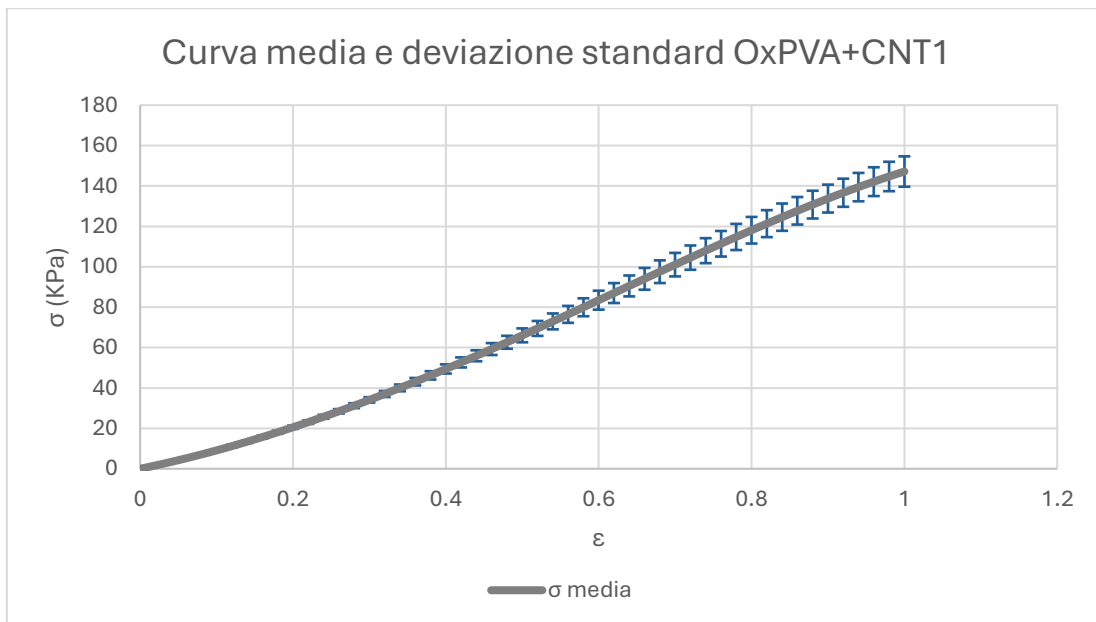


Figura 4.5 Curva media dei campioni in OxPVA+CNT all'1% e relativa deviazione standard.



La curva sforzo-deformazione mostra delle tensioni al 100% di deformazione, in tutti e gli otto campioni, molto simili tra loro, nel range dei 130/160 KPa.

Nella Figura 4.6 vengono messe a confronto le curve medie di tutti i gruppi sperimentali.

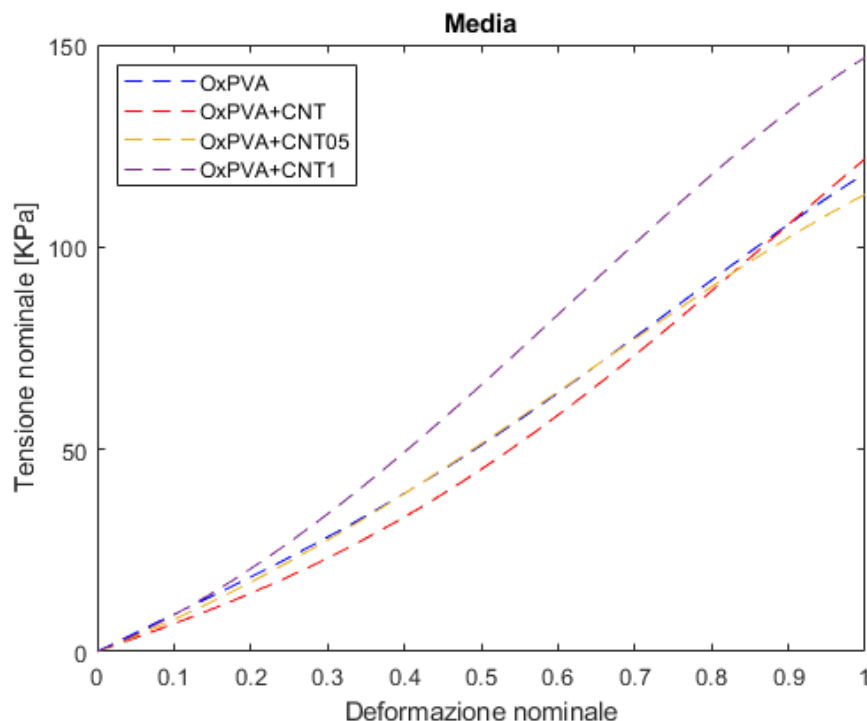


Figura 4.6 Confronto tra curve medie dei quattro gruppi sperimentali.

Sono stati calcolati, infine, i moduli secanti di ciascun gruppo sperimentale; i risultati sono riportati in Tabella 4.3.

| $\epsilon$ | OxPVA  |        | OxPVA_CNT |        | OxPVA_CNT05 |        | OxPVA_CNT1 |       |
|------------|--------|--------|-----------|--------|-------------|--------|------------|-------|
|            | Media  | SD     | Media     | SD     | Media       | SD     | Media      | SD    |
| 0.1        | 70.327 | 14.602 | 68.910    | 17.335 | 79.750      | 9.895  | 91.346     | 7.223 |
| 0.2        | 71.419 | 14.917 | 72.164    | 18.682 | 85.938      | 11.832 | 100.509    | 6.908 |

Tabella 4.3 Moduli secanti di ciascun gruppo sperimentale: OxPVA, OxPVA+CNT, OxPVA+CNT05, OxPVA+CNT1.

Dai risultati raccolti possiamo affermare che non risulta esserci troppa differenza tra i gruppi sperimentali in OxPVA e OxPVA con lo 0.1% di nanotubi di carbonio, né nelle tensioni, né nella rigidità del campione. Si può appurare che lo 0.1% di nanotubi di carbonio non altera di molto le proprietà dell'OxPVA. Il gruppo sperimentale OxPVA+CNT all'1% ha mostrato un ottimo comportamento meccanico rispetto agli altri gruppi sperimentali, e quindi campioni con CNT

all'1% saranno riutilizzati in futuro per ulteriori test, e per misurare in vitro e in vivo la conduttività elettrica e termica. L'hydrogel in OxPVA+CNT all'1% ha la media del modulo secante più alta; quindi, la concentrazione dei nanotubi di carbonio influisce in positivo sulla resistenza a trazione e aumenta la rigidità del materiale. Infatti, il modulo di Young è inversamente proporzionale alla deformabilità del materiale.

In uno studio condotto da Stocco et Al. [62] sono state analizzate le proprietà meccaniche di membrane in OxPVA e OxPVA funzionalizzato con diversi peptidi: si può affermare che i risultati ottenuti dalla caratterizzazione meccanica sono in linea con quelli ottenuti in questa tesi. Per quanto riguarda i dati ottenuti dalle prove di trazione sull'hydrogel a base di OxPVA+CNT, essendo un campo di ricerca recente, sono necessarie ulteriori analisi per supportare la validità dei risultati raggiunti.

### 4.3 Risultati protocollo di *suture retention*

Per quanto riguarda il protocollo di *suture retention*, i gruppi sperimentali sono stati due: OxPVA e OxPVA+CNT allo 0.1%. Sono state elaborate delle curve forza-allungamento che sono state rappresentate fino al punto di forza massima, corrispondente al punto di rottura del filo o del provino (Figura 4.7).



Figura 4.7 A) Rottura di una membrana in OxPVA. B) Rottura di una membrana in OxPVA+CNT allo 0.1%.

I valori di forza massima del primo gruppo sperimentale (OxPVA) sono risultati molto simili fra loro, come evidenziato nella Tabella 4.4.

| Campione 1 | Campione 2 | Campione 3 | Campione 4 | Campione 5 | Campione 6 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Fmax (N)   | Fmax (N)   | Fmax (N)   | Fmax (N)   | Fmax (N)   | Fmax (N)   |
| 0.271      | 0.242      | 0.270      | 0.252      | 0.272      | 0.232      |

Tabella 4.4 Valori di forza massima per i campioni del gruppo sperimentale OxPVA.

Nella Figura 4.8 sono rappresentate tutte le curve dei campioni fino al punto di rottura. I gradini presenti in alcune curve sono riconducibili all'inizio della rottura del provino.

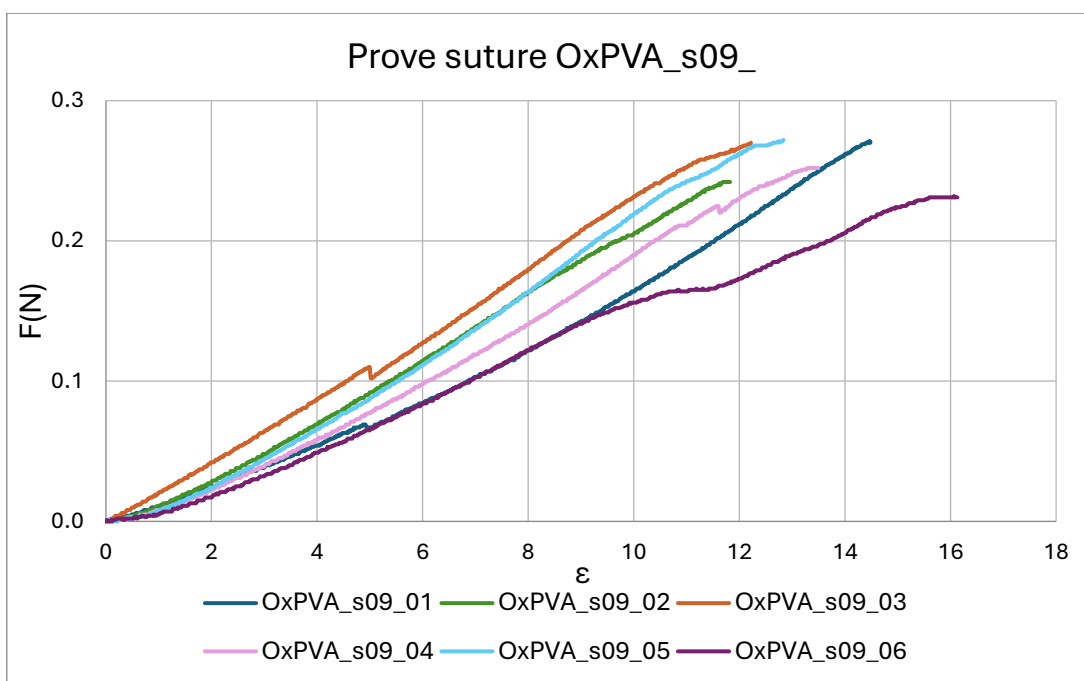


Figura 4.8 Curve prove di *suture retention* nei campioni di OxPVA.

Nella Tabella 4.5 sono riportati i valori di forza massima a rottura dei campioni di OxPVA+CNT allo 0.1%. I valori di forza sono molto simili tra loro e anche ai valori della precedente tabella.

| Campione 1 | Campione 2 | Campione 3 | Campione 4 | Campione 5 | Campione 6 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Fmax (N)   | Fmax (N)   | Fmax       | Fmax       | Fmax       | Fmax       |
| 0.222      | 0.227      | 0.193      | 0.186      | 0.131      | 0.294      |

Tabella 4.5 Valori di forza massima per i campioni del gruppo sperimentale OxPVA+CNT allo 0.1%.

Nella Figura 4.9 sono raffigurate le curve delle prove di *suture retention* per le membrane di OxPVA+CNT allo 0.1%. Si può notare come fino al valore di allungamento di circa 8 mm le curve siano molto simili tra loro, le membrane iniziano a rompersi oltre i valori di 0.100 N.

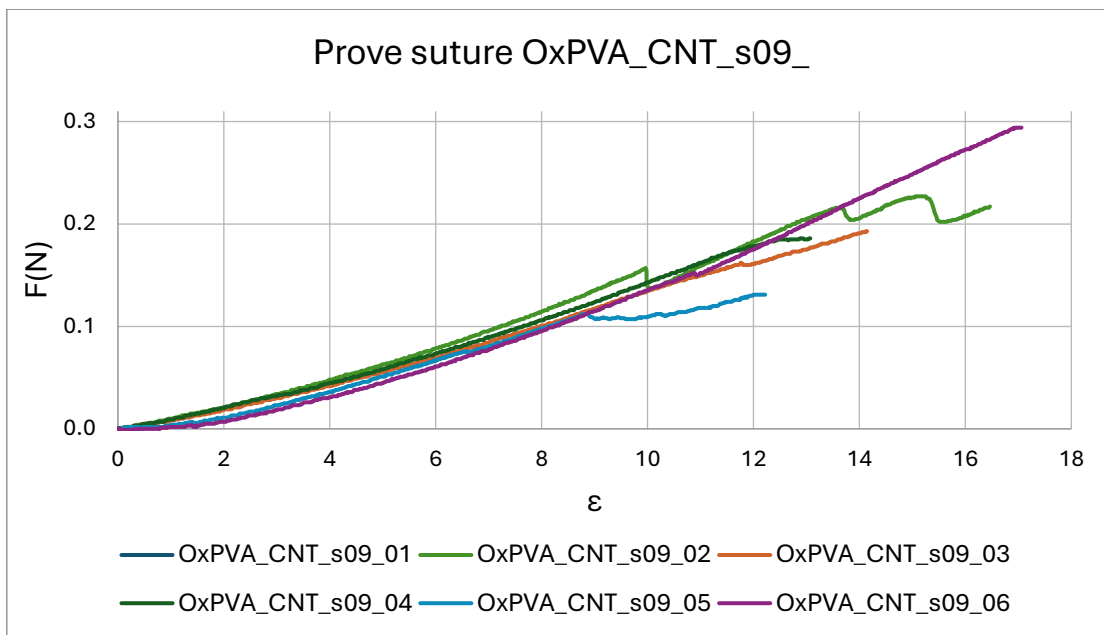


Figura 4.9 Curve prove di *suture retention* nei campioni di OxPVA+ CNT allo 0.1%.

Tang et Al. sperimentarono in precedenza la resistenza alla sutura di alcuni tubi in PVA e di altri materiali compositi per la realizzazione di vasi sanguigni artificiali, riportando per il PVA, agli stessi valori di spessore, valori di forza massima simili a quelli che sono stati ottenuti in questo lavoro di tesi [63]. I valori di forza massima riportati nei vasi sanguigni ingegnerizzati umani è di 0.46 N. Una concentrazione di nanotubi maggiore che porta a una resistenza elevata a trazione potrebbe incrementare la forza massima di resistenza alla sutura.

## Conclusioni

In questo lavoro di tesi, si è provveduto alla caratterizzazione meccanica di diverse membrane in hydrogel a base di PVA parzialmente ossidato, caricato o meno con nanotubi di carbonio a diverse percentuali. Si è, inoltre, fatta l'analisi della coassialità di neuroguide in OxPVA. La caratterizzazione che è stata fatta in questa tesi di ricerca risulta essere un'attività preliminare allo sviluppo di neuroguide impiantabili in vivo. L'OxPVA è risultato avere buone proprietà meccaniche che dovranno essere confrontate con quelle dei tessuti nativi. I nanotubi di carbonio in percentuale 1 hanno aumentato la rigidità delle membrane e la resistenza a trazione, mentre non sono state notate grosse differenze nelle percentuali inferiori. In futuro, i nanotubi di carbonio all'1% potranno essere impiegati nuovamente per ulteriori test, mentre saranno escluse le altre percentuali. Anche l'OxPVA+CNT1 dovrà essere comparato alle proprietà meccaniche del tessuto nativo. In questo lavoro, non si è riuscita ad ottenere la totale coassialità del lume delle neuroguide. I cilindri impiegati esternamente hanno migliorato la centralità del lume rispetto alle precedenti neuroguide realizzate senza di essi. Dovranno essere sperimentate altre metodologie per migliorare questo aspetto. Le prove di *suture retention* hanno registrato buoni risultati, con poca variabilità, per quanto riguarda la forza massima a cui i diversi materiali possono resistere, ma anche questi saranno da comparare in vivo. Gli sviluppi futuri su cui potrebbero vertere le prossime ricerche sono la verifica sulla permeabilità dei materiali, la sperimentazione dell'OxPVA+CNT sulla solubilità in acqua e sulla biodegradabilità, e le applicazioni in vivo per testare se la conduttività elettrica più alta nei CNT migliora effettivamente la rigenerazione nervosa. In futuro, sarà utile trovare una metodologia più rigorosa e ripetibile per rendere le neuroguide coassiali.

In conclusione, i materiali che sono stati testati hanno ottenuto dei buoni risultati, con un leggero margine di miglioramento, riguardo le prove di trazione e di *suture retention*. Per quanto riguarda la coassialità invece, il margine di miglioramento è ampio. Riguardo l'applicabilità in interventi per le PNI, c'è ancora da sperimentare la conduttività e la permeabilità dei materiali.

## Bibliografia

- [1] “Medicina Online Website.” Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: <https://medicinaonline.co/2019/07/09/frattura-vertebrale-cause-classificazione-rischi-cure-paralisi/>
- [2] Cooper Wilmot, *Anatomia umana: Una guida pratica ed accessibile alla Scoperta del Corpo Umano Attraverso lo Studio e l’Esplorazione di Tutte le Sue Componenti* . 2023.
- [3] D. L. Felten, M. K. O’Banion, and M. Summo Maida, *Atlante di Neuroscienze di Netter*, Terza edizione. 2017.
- [4] “Chimica Online Website.” Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.chimica-online.it/biologia/bottone-sinaptico.htm>
- [5] “Atlas Website.” Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.edatlas.it/>
- [6] C. L. Stanfield and W. J. Germann, *Fisiologia*. 2009.
- [7] Q. Meng, J. C. Burrell, Q. Zhang, and A. D. Le, “Potential Application of Orofacial MSCs in Tissue Engineering Nerve Guidance for Peripheral Nerve Injury Repair,” *Stem Cell Rev Rep*, vol. 19, no. 8, pp. 2612–2631, Nov. 2023, doi: 10.1007/s12015-023-10609-y.
- [8] A. F. Battista and R. Lusskin, “The Anatomy and Physiology of the Peripheral Nerve,” *Foot Ankle*, vol. 7, no. 2, pp. 65–70, Oct. 1986, doi: 10.1177/107110078600700202.
- [9] L. R. Robinson, “Traumatic injury to peripheral nerves,” *Muscle Nerve*, vol. 66, no. 6, pp. 661–670, Dec. 2022, doi: 10.1002/mus.27706.
- [10] E. A. Bateman, J. Larocerie-Salgado, D. C. Ross, T. A. Miller, and S. Pripotnev, “Assessment, patient selection, and rehabilitation of nerve transfers,” *Frontiers in Rehabilitation Sciences*, vol. 4, Nov. 2023, doi: 10.3389/fresc.2023.1267433.
- [11] “Wikimedia Commons Website”, Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tissue\\_engineering\\_english.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tissue_engineering_english.jpg)
- [12] R. Rebowe, A. Rogers, X. Yang, S. Kundu, T. Smith, and Z. Li, “Nerve Repair with Nerve Conduits: Problems, Solutions, and Future Directions,” *J Hand Microsurg*, vol. 10, no. 02, pp. 61–65, Aug. 2018, doi: 10.1055/s-0038-1626687.
- [13] H. Jiang, Y. Qian, C. Fan, and Y. Ouyang, “Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, Sep. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.582646.
- [14] L. Juckett, T. M. Saffari, B. Ormseth, J.-L. Senger, and A. M. Moore, “The Effect of Electrical Stimulation on Nerve Regeneration Following Peripheral Nerve Injury,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 12, p. 1856, Dec. 2022, doi: 10.3390/biom12121856.
- [15] S. Vijayavenkataraman, “Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods,” *Acta Biomater*, vol. 106, pp. 54–69, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.003.

- [16] E. O. Johnson and P. N. Soucacos, "Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides," *Injury*, vol. 39, no. 3, pp. 30–36, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.injury.2008.05.018.
- [17] M. Sameem, T. J. Wood, and J. R. Bain, "A Systematic Review on the Use of Fibrin Glue for Peripheral Nerve Repair," *Plast Reconstr Surg*, vol. 127, no. 6, pp. 2381–2390, Jun. 2011, doi: 10.1097/PRS.0b013e3182131cf5.
- [18] F. Zhang and K. A. Fischer, "End-to-side neurorrhaphy," *Microsurgery*, vol. 22, no. 3, pp. 122–127, Jan. 2002, doi: 10.1002/micr.21736.
- [19] K. Liu *et al.*, "3D Printed Personalized Nerve Guide Conduits for Precision Repair of Peripheral Nerve Defects," *Advanced Science*, vol. 9, no. 12, Apr. 2022, doi: 10.1002/advs.202103875.
- [20] I. Regas, F. Loisel, H. Haight, G. Menu, L. Obert, and I. Pluvy, "Functionalized nerve conduits for peripheral nerve regeneration: A literature review," *Hand Surg Rehabil*, vol. 39, no. 5, pp. 343–351, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.hansur.2020.05.007.
- [21] A. Muheremu and Q. Ao, "Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury," *Biomed Res Int*, vol. 2015, pp. 1–6, 2015, doi: 10.1155/2015/237507.
- [22] N.-U. Kang, S.-J. Lee, and S.-J. Gwak, "Fabrication Techniques of Nerve Guidance Conduits for Nerve Regeneration," *Yonsei Med J*, vol. 63, no. 2, p. 114, 2022, doi: 10.3349/ymj.2022.63.2.114.
- [23] S. Houshyar, A. Bhattacharyya, and R. Shanks, "Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures," *ACS Chem Neurosci*, vol. 10, no. 8, pp. 3349–3365, Aug. 2019, doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00203.
- [24] M. Murariu and P. Dubois, "PLA composites: From production to properties," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 107, pp. 17–46, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
- [25] M. S. Singhvi, S. S. Zinjarde, and D. V. Gokhale, "Polylactic acid: synthesis and biomedical applications," *J Appl Microbiol*, vol. 127, no. 6, pp. 1612–1626, Dec. 2019, doi: 10.1111/jam.14290.
- [26] K. Szuman, I. Krucińska, M. Boguń, and Z. Draczyński, "PLA/PHA-Biodegradable Blends for Pneumothermic Fabrication of Nonwovens," *Autex Research Journal*, vol. 16, no. 3, pp. 119–127, Sep. 2016, doi: 10.1515/aut-2015-0047.
- [27] E. Lagreca, V. Onesto, C. Di Natale, S. La Manna, P. A. Netti, and R. Vecchione, "Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery," *Prog Biomater*, vol. 9, no. 4, pp. 153–174, Dec. 2020, doi: 10.1007/s40204-020-00139-y.
- [28] C. V. Rocha, V. Gonçalves, M. C. da Silva, M. Bañobre-López, and J. Gallo, "PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 4, p. 2034, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23042034.

- [29] N. Siddiqui, S. Asawa, B. Birru, R. Baadhe, and S. Rao, "PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications," *Mol Biotechnol*, vol. 60, no. 7, pp. 506–532, Jul. 2018, doi: 10.1007/s12033-018-0084-5.
- [30] J. Venugopal, Y. Z. Zhang, and S. Ramakrishna, "Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering," *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2138–2142, Oct. 2005, doi: 10.1088/0957-4484/16/10/028.
- [31] A. Soroushanova *et al.*, "The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development," *Advanced Materials*, vol. 31, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1002/adma.201801651.
- [32] A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, and G. Ciardelli, "Collagen for bone tissue regeneration," *Acta Biomater*, vol. 8, no. 9, pp. 3191–3200, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014.
- [33] T. E. Kruger, A. H. Miller, and J. Wang, "Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated Bone Regeneration," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, pp. 1–6, 2013, doi: 10.1155/2013/812718.
- [34] J. W. Weisel, "Fibrinogen and Fibrin," 2005, pp. 247–299. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70008-5.
- [35] M. C. McManus, E. D. Boland, D. G. Simpson, C. P. Barnes, and G. L. Bowlin, "Electrospun fibrinogen: Feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model," *J Biomed Mater Res A*, vol. 81A, no. 2, pp. 299–309, May 2007, doi: 10.1002/jbm.a.30989.
- [36] K. Chen, Y. Li, Y. Li, W. Pan, and G. Tan, "Silk Fibroin Combined with Electrospinning as a Promising Strategy for Tissue Regeneration," *Macromol Biosci*, vol. 23, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1002/mabi.202200380.
- [37] Md. H.-A. Mamun, Md. A. Hossain, M. Khan, A. Mostofa, Md. Zakaria, and M. S. Yeasmin, "Natural Dyes Extract from Chinese Tallow (&lt;i>Triadica sebifera</i>) Tree Leaves Extraction in Alkaline Medium and Their Application on Silk Fabrics," *Journal of Textile Science and Technology*, vol. 04, no. 01, pp. 1–17, 2018, doi: 10.4236/jtst.2018.41001.
- [38] P. Rastogi and B. Kandasubramanian, "Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 11, no. 4, p. 042001, Sep. 2019, doi: 10.1088/1758-5090/ab331e.
- [39] P. Rastogi and B. Kandasubramanian, "Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 11, no. 4, p. 042001, Sep. 2019, doi: 10.1088/1758-5090/ab331e.
- [40] A. D. Gholap *et al.*, "Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications," *Carbohydr Polym*, vol. 323, p. 121394, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121394.



- [41] M. E. Abd El-Hack *et al.*, “Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review,” *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 2726–2744, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153.
- [42] D. Li and Y. Xia, “Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?,” *Advanced Materials*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, Jul. 2004, doi: 10.1002/adma.200400719.
- [43] M. Patel, H. J. Hong, and W.-G. Koh, “Micropatterned fibrous scaffolds for biomedical application,” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 80, pp. 729–738, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jiec.2019.02.029.
- [44] B. J. Parker, D. I. Rhodes, C. M. O’Brien, A. E. Rodda, and N. R. Cameron, “Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: A commercial perspective,” *Acta Biomater*, vol. 135, pp. 64–86, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.08.052.
- [45] K. M. Hones, D. S. Nichols, H. Barker, E. Cox, J. A. Hones, and H. Chim, “Outcomes following use of VersaWrap nerve protector in treatment of patients with recurrent compressive neuropathies,” *Front Surg*, vol. 10, Mar. 2023, doi: 10.3389/fsurg.2023.1123375.
- [46] P. G. di Summa, P. J. Kingham, C. C. Campisi, W. Raffoul, and D. F. Kalbermatten, “Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair,” *Neurosci Lett*, vol. 572, pp. 26–31, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.neulet.2014.04.029.
- [47] M. Bedar, A. J. van Wijnen, and A. Y. Shin, “Safety of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Seeding of NeuraGen Nerve Guides in a Rabbit Model,” *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 29, no. 2, pp. 43–53, Feb. 2023, doi: 10.1089/ten.tec.2022.0159.
- [48] “Integralife Website.” Accessed: May 21, 2024. [Online]. Available: <https://products.integralife.com/neuragen-nerve-guide/product/nerve-tendon-neuragen-nerve-guide>
- [49] E. Stocco *et al.*, “New bioresorbable wraps based on oxidized polyvinyl alcohol and leukocyte-fibrin-platelet membrane to support peripheral nerve neuroorrhaphy: preclinical comparison versus NeuraWrap,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 17193, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53812-z.
- [50] M. Navissano, F. Malan, R. Carnino, and B. Battiston, “Neurotube® for facial nerve repair,” *Microsurgery*, vol. 25, no. 4, pp. 268–271, 2005, doi: 10.1002/micr.20128.
- [51] “Quamedical Website.” Accessed: Jun. 11, 2024. [Online]. Available: <https://quamedical.nl/en/synovis-microsurgery/gem-neurotube-peripheral-nerve-repair-device/>
- [52] R. Singh, S. Gautam, B. Sharma, P. Jain, and K. D. Chauhan, “Biopolymers and their classifications,” in *Biopolymers and their Industrial Applications*, Elsevier, 2021, pp. 21–44. doi: 10.1016/B978-0-12-819240-5.00002-X.

- [53] E. Stocco *et al.*, “Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering,” *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 11, no. 7, pp. 2060–2070, Jul. 2017, doi: 10.1002/term.2101.
- [54] E. Stocco *et al.*, “Bioactivated Oxidized Polyvinyl Alcohol towards Next-Generation Nerve Conduits Development,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 19, p. 3372, Sep. 2021, doi: 10.3390/polym13193372.
- [55] V. Negri, J. Pacheco-Torres, D. Calle, and P. López-Larrubia, “Carbon Nanotubes in Biomedicine,” *Top Curr Chem*, vol. 378, no. 1, p. 15, Feb. 2020, doi: 10.1007/s41061-019-0278-8.
- [56] “Ultimaker 2+ Connect Website.” Accessed: May 27, 2024. [Online]. Available: <https://ultimaker.com/3d-printers/s-series/ultimaker-2-connect/>
- [57] “Pce Italia Website.” Accessed: May 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.pce-italia.it/html/dati-tecnici-1/microscopio-pce-mm200uv.htm>
- [58] “Accretech Europe Website.” Accessed: Jun. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.accretech.eu/it/misurare-la-forma/misurare-la-coassolita/>
- [59] “TA Instruments Website.” Accessed: May 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.tainstruments.com/testbench-systems/>
- [60] “News Medical Website.” Accessed: May 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.news-medical.net/ElectroForce-Planar-Biaxial-4-Motor-TestBench-Test-Instrument-from-TA-Instruments>
- [61] “Ta Instruments Website.” Accessed: Jun. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.tainstruments.com/>
- [62] E. Stocco *et al.*, “Development and preclinical evaluation of bioactive nerve conduits for peripheral nerve regeneration: A comparative study,” *Mater Today Bio*, vol. 22, p. 100761, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100761.
- [63] J. Tang, L. Bao, X. Li, L. Chen, and F. F. Hong, “Potential of PVA-doped bacterial nanocellulose tubular composites for artificial blood vessels,” *J Mater Chem B*, vol. 3, no. 43, pp. 8537–8547, 2015, doi: 10.1039/C5TB01144B.