



(11) **RO 127812 B1**

(51) **Int.Cl.**

**A61L 27/00** (2006.01),

**A61L 31/04** (2006.01),

**A61L 31/14** (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01241**

(22) Data de depozit: **25.11.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2015** BOPI nr. **4/2015**

(41) Data publicării cererii:  
**28.09.2012** BOPI nr. **9/2012**

(73) Titular:  
• **SPITALUL CLINIC DE URGENȚĂ  
"BAGDASAR-ARSENI", ȘOS.BERCENI  
NR.10-12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **FLORESCU IOAN PETRE, STR.OINEI  
NR.25, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MIHAI IOANA RUXANDRA,  
STR.ELENA CLUCEREASA NR.49,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **LUNGU MARIA, STR. PROMETEU NR.29,  
BL.16 G, SC.3, AP.34, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MOLDOVAN LUCIA,  
BD. CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,  
SC.A, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**

• **ZĂRNESCU OTILIA, BD. IULIU MANIU  
NR.59, BL.10, SC.1, AP.17, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **COROIU VIORICA,  
STR.DEALUL ȚUGULEA NR.46-50, BL.12,  
SC.B, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **UTOIU ELENA, STR.TEIUL DOAMNEI  
NR.6, BL.22, SC.A, AP.8, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STANCIUC ANA-MARIA, ȘOS. OLTENIȚEI  
NR.58, BL.11 B, SC.2, AP.76, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**WO 2008/140413 A1; US 4863668;  
EP 2380601 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI CONDUCT DE GHIDARE  
NERVOASĂ PENTRU REGENERAREA NERVILOR  
PERIFERICI ȘI CONDUCE NERVOASE OBȚINUTE PRIN  
ACEST PROCEDURE**



1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui conduct de ghidare  
nervoasă pentru regenerarea nervilor periferici, și la conducte nervoase realizate dintr-un  
3 biocompozit bazat pe un polimer sintetic solubil în apă - alcoolul polivinilic (PVA) și un  
polimer natural.

5 Lezarea nervilor periferici reprezintă o problemă majoră de sănătate, 2,8% dintre  
pacienții cu traume dobândind dizabilități pe termen lung. Pentru regenerarea nervilor  
7 periferici se utilizează autogrefe, alogrefe sau conducte nervoase (CN). Un conductor nervos  
(CN) reprezintă o cale de a ghida creșterea axonală în procesul de regenerare a nervului.  
9 În prezent, este unanim acceptat, în lumea științifică medicală de specialitate, că o ghidare  
fizică a axonilor este vitală pentru refacerea nervilor periferici lezați.

11 Cercetări recente s-au lansat pe sintetizarea unor conducte de ghidare nervoasă, din  
biomateriale naturale sau sintetice, micro - și nanofibre. Factorii care determină selecția unui  
13 anumit material pentru obținerea de conducte nervoase (CN) sunt: biocompatibilitatea,  
capacitatea de biodegradare, integritatea mecanică, posibilitatea de implantare și sterilizare.  
15 Conductele nervoase (CN) susțin regenerarea nervoasă și împiedică invadarea țesutului  
fibros la nivelul situsului lezat (Ahmed M.R., Venkateshwarlu U., Jayacumar R., *Multilayered*  
17 *peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair*, 2004, *Biomaterials*, 25,  
2585-2594).

19 Tohill și colaboratorii (Tohill M., Montovani C, McGrouther D. A., Wiberg M.,  
*Extracellular matrix macromolecules enhance Schwann cell growth and peripheal nerve*  
21 *regeneration through bio-engineered conduits*, 2003, *European Cells and Materials*, 6, 54)  
propun utilizarea unui CN biodegradabil, din polihidroxibutirat. S-au obținut conducte  
23 nervoase din spumă de acid polilactic (Schmidt CE., Leach J.B., *Natural tissue engineering:*  
*strategies for repair and regeneration*, 2003, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 5, 293-347).

25 Se cunoaște utilizarea polimerilor naturali în obținerea conductelor nervoase. De  
exemplu, colagenul (tip I și III) permite obținerea de structuri (tuburi) cu o bună  
27 biocompatibilitate și resorbabilitate, care permit proliferarea celulelor Schwann (Alluin O.,  
Wittmann C, Marqueste T., Chabas J-F, Garcia S., Levant M-N., Decherchi P., *Funcțional*  
29 *recovery after peripheal nerve injury and implantation of a collagen guide*, 2009,  
*Biomaterials*, 30, 363-373). Acidul hialuronic poate fi un bun biomaterial pentru obținerea  
31 conductelor nervoase (Hou S., Xu Q., Tian W., Cui F., Lee I.S., *The repair of brain lesion by*  
*implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin*, 2005, *J. of Neuroscience*  
33 *Methods*, 148, 60-70). Un grup de cercetători chinezi au realizat tuburi din chitosan și  
carboxi-chitosan, pe care le-au utilizat la regenerarea nervilor periferici, arătând că aceste  
35 materiale pot asigura un suport pentru regenerarea celulelor nervoase timp de aproximativ  
8 săptămâni (Lu G., Kong L., Sheng B., Wang G., Zhang X., *Degradation of covalently cross-*  
37 *linked carboxy methyl chitosan and its potențial application for peripheal nerve regeneration*,  
2007, *European Polymer Journal*, 43, 3807-3818).

39 Un polimer sintetic care se pretează la obținerea de conducte nervoase este și  
poliuretanul (Hausner T., Schmihammer R., Schultz A., Hertz H., Redl H., *Nerve*  
41 *regeneration using tubular scaffolds from biodegradable polyurethane*, 2007, *Acta Neurochir.*  
Wien, 100, 69-72).

43 **WO2008/140413 A1** se referă la un conduct pentru repararea nervilor pe bază de  
fibrină bioresorbabilă, produsă din adeziv tisular. Conductul pentru repararea nervului poate  
45 fi sub forma unei foi sau a unui tub, și mai include în plus o serin protează și/sau factorul XIII  
și/sau ioni de calciu. Serin proteaza este aleasă din grupul constând în trombină, plasmină,  
47 elastază și activatori de plasminogen sau combinații ale acestora. Conductul de reparare  
nervoasă poate fi încărcat cu celule Schwann și/sau celule stem și/sau factori de creștere,

# RO 127812 B1

pentru o regenerare mai bună a nervilor. În plus, este descrisă o metodă pentru producerea conductului de reparare a nervului menționat mai sus, care cuprinde fibrinogen și serin protează, pentru întărire, care conține fluide sub forma unui adeziv tisular ce conține fibrinogen, într-o matrită echipată cu un ax central, pentru crearea unui canal în conductul de reparare nervoasă. Mai mult, este descrisă utilizarea unui adeziv tisular pe bază de fibrinogen, pentru prepararea unui conduct pentru refacerea nervului pe bază de fibrină. Este prezentată o metodă de tratare a leziunilor nervilor prin plasarea unui conduct de reparare a nervului la cel puțin un capăt al nervilor, care să permită conductului repararea nervoasă și ghidarea capătului nervos în timpul regenerării.

**US 4863668** se referă la o metodă de formare a unui material care include straturi alterative de fibrină și colagen, format în tuburi utilizate pentru repararea fibrelor de nervi, secționati fie prin tubulizarea capetelor de nervi apropiate, sau ca o grefă artificială care este plasată la capetele secționate ale nervului, pentru promovarea creșterii economice și de regenerare a nervului. Noul material este tratat pentru a reduce antigenicitatea, și este resorbit în corp după regenerarea fibrelor nervoase.

**EP2380601 B1** se referă la fabricarea de conducte nervoase multicanal, pentru utilizare în repararea leziunilor nervoase. În special, invenția se referă la conducte nervoase multicanal, din colagen, toate care sunt adecvate pentru utilizarea în repararea nervilor periferici.

Ingineria tisulară ghidată, cu aplicații în regenerarea nervoasă periferică, reprezintă o provocare, în condițiile în care bazele chimice și fiziologice ale multor maladii neurologice nu sunt complet elucidate. În acest sens se caută noi soluții pentru construcția conductelor nervoase.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în refacerea nervilor periferici lezați, prin realizarea unor conducte pentru ghidarea nervoasă.

Procedee conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit din următoarele etape:

- prepararea membranelor de biocompozit, prin combinarea unei soluții de alcool polivinilic 10% cu colagen nederaturat, într-un raport 1:1 în greutate, sau cu hidrolizat de colagen, într-un raport de 9:1 în greutate, amestecul obținut se toarnă în suporturi de polimetil metacrilat și se usucă în etuvă la 33°C, timp de 12 h, obținându-se membrane cu grosimea de 0,1...0,3 mm, în cazul colagenului nederaturat, sau cu o grosime de 0,05...0,2 mm, în cazul hidrolizatului de colagen;

- reticularea membranelor de biocompozit prin imersarea membranelor obținute în etapa anterioară, într-o soluție de etanol 40%, timp de 30 min, la TC, urmată de imersarea într-o soluție de glutaraldehidă 3%, timp de 22 h, la TC;

- spălarea succesivă a membranelor cu clorură de sodiu 1 M de două ori, și cu apă distilată de șase ori, apoi se usucă în etuvă la 33°C, timp de 12 h;

- obținerea tuburilor prin tăierea membranelor cu dimensiuni de 20±2 mmX 9±1 mm, umectarea prin imersie în apă pură timp de 10 min, rulare pe suporturi de teflon cu diametrul exterior de 2,4±0,1 mm și uscare în etuvă la 33°C, timp de 12 h;

- sterilizarea tuburilor cu radiații UV timp de 24 h.

Conductele pentru ghidare nervoasă, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că sunt construite dintr-un biocompozit polimeric, obținut din 50...90 părți în greutate alcool polivinilic cu greutatea moleculară 72000 g/mol, în soluție apoasă 10%, și 10...50 părți în greutate colagen, ales între gel de colagen nederaturat, cu greutate moleculară medie de 250000...300000 D, sau hidrolizat de colagen cu greutatea moleculară medie de 7000...15000 D, obținute prin procedeul definit în revendicarea 1.

# RO 127812 B1

1 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:  
- o bună biocompatibilitate și o rată de resorbție bine controlată (nu foarte rapidă),  
3 care să permită o regenerare tisulară completă;  
- prezența colagenului, care este un component al matricei extracelulare în  
5 compoziția materialului, contribuie la regenerarea nervilor periferici;  
- procedeul de obținere a tuburilor pentru conducte nervoase este simplu și nu implică  
7 niște consumuri energetice și de materiale deosebite;  
- procedeul este ecologic.

9 Într-un aspect preferat, polimerul natural utilizat este colagenul nendenaturat tip I, din  
dermă bovină, obținut prin extracție enzimatică din tendon bovin, purificat prin precipitări  
11 selective.

Într-un alt aspect preferat, polimerul natural utilizat este hidrolizatul de colagen obținut  
13 prin hidroliză acidă, din dermă bovină, și având masa moleculară de 10000...15000 Da.

Un alt aspect al invenției constă în stabilirea condițiilor și etapelor de obținere a  
15 conductelor nervoase, din biocompozit pe bază de PVA și colagen.

Scopul prezentei invenții este realizarea unui procedeu eficient de obținere de  
17 conducte nervoase, din biocompozit pe bază de alcool polivinilic (PVA) și colagen.

Procedeul conform invenției cuprinde următoarele etape:

19 **Etapa 1: Prepararea și condiționarea membranelor din biocompozit pe bază de alcool  
polivinilic (PVA) și colagen**

21 Se prepară o soluție 10% în apă, din pulbere de alcool polivinilic (PVA), 72.000 g/mol,  
produs Merk, Lot #32710422, prin menținere sub agitare pe baie de apă la 65°C, timp de  
23 24 h.

Se prepară un gel de colagen nendenaturat, cu masa moleculară de 250000...300000  
25 Da, obținut din dermă bovină, prin extracție cu soluție diluată de acid acetic sau tartric, la  
temperatura de 4°C, timp de 48 h, cu un conținut de: 82% colagen, pH 5,5, substanță uscată  
27 0,57%.

Hidrolizatul de colagen (HC) obținut prin hidroliza acidă și atomizare, având o  
29 greutate moleculară de 7000...15000 Da, a fost pregătit sub formă de soluție apoasă de  
10%, la 60°C, sub agitare timp de 30 min.

31 Se realizează 2 amestecuri:

- 90 părți în greutate soluție 10% PVA și 10 părți în greutate soluție 10% HC;  
33 - 50 părți în greutate soluție 10% PVA și 50 părți în greutate gel de colagen  
nendenaturat.

35 Amestecurile au fost turnate pe suporturi de PMMA (polimetilmetacrilat) cu  
dimensiunile de 60 mm x 30 mm x 3 mm, învelite în folie de polietilenă, uscarea acestor  
37 amestecuri realizându-se în etuvă la 33°C, timp de 12 h, rezultatul fiind obținerea unor  
membrane cu grosimea de 0,1...0,3 mm.

39 **Etapa 2: Reticularea membranelor**

Se imersează membranele într-o soluție de etanol 40%, timp de 30 min, la  
41 temperatura camerei, urmată de imersarea într-o soluție de 3% glutaraldehidă, timp de 22 h,  
la temperatura camerei.

43 **Etapa 3: Spălarea membranelor**

După reticulare, membranele au fost supuse unor spălări succesive în soluție de  
45 clorură de sodiu 1 M (2 spălări de câte 1 h) și apă distilată (6 spălări de câte 1 h). După cele  
8 spălări succesive urmează uscarea membranelor în aceleași condiții ca la etapa 1, în  
47 etuvă, la 33°C, timp de 12 h.

# RO 127812 B1

<b>Etapa 4: <u>Obținerea tuburilor</u></b>	1
Membranele sunt tăiate în bucăți cu dimensiunile de 20±2 mmX 9±1mm, umectate prin imersie în apă pură (Apa MilliQ), timp de 10 min, rulate pe suporturile (bare) din teflon cu diametrul exterior de 2,4±0,1 mm, și uscate în etuvă la 33°C, timp de 12 h.	3
<b>Etapa 5: <u>Sterilizarea</u></b>	5
Sterilizarea tuburilor care vor fi utilizate ca și conducte nervoase se face cu radiații UV, timp de 24 h.	7
Parametrii caracteristici procedurii de obținere a conductelor nervoase din biocompozit pe bază de PVA și colagen sunt următorii:	9
<b>temperaturi:</b>	
- temperatura de dizolvare a PVA . . . . . 65°C;	11
- temperatura de extracție a colagenului nendenaturat, din dermă bovină . . . . . 4°C;	
- temperatura de dizolvare a hidrolizatului de colagen (HC) . . . . . 60°C;	13
- temperatura de uscare a membranelor . . . . . 33°C;	
<b>timp:</b>	15
- timpul de dizolvare a PVA . . . . . 24 h;	
- timpul de extracție a colagenului nendenaturat . . . . . 48 h;	17
- timpul de dizolvare a HC . . . . . 30 min;	
- timpul de uscare a membranelor . . . . . 12 h;	19
- timpul de reticulare a membranelor cu glutaraldehidă . . . . . 22 h;	
- durata unei spălări . . . . . 1 h;	21
- timpul de sterilizare . . . . . 24 h.	
În continuare se dau 2 exemple de realizare a invenției, în legătură cu cele patru figuri ce reprezintă:	23
- fig. 1 prezintă martorul de cultură (NCTC);	25
- fig. 2 prezintă morfologia celulelor cultivate în prezența membranelor de polimer natural (A) și sintetic (B) neamestecați, după 48 h de cultivare;	27
- fig. 3 prezintă morfologia celulelor cultivate în prezența membranelor de PVA și colagen nendenaturat, după 48 h;	29
- fig. 4 prezintă plasarea și fixarea conductului nervos.	
<b>Exemplul 1</b>	31
<b>Etapa 1: <u>Prepararea și condiționarea membranelor din biocompozit pe bază de alcool polivinilic (PVA) și colagen nendenaturat</u></b>	33
Într-un vas de sticlă de 500 ml se cântăresc 15...30 g pulbere de alcool polivinilic (PVA), se adaugă 135...270 g apă pură și se mențin sub agitare pe baie de apă la 65°C, timp de 24 h. S-au obținut 150...300 g soluție 10% PVA. Soluția de PVA s-a amestecat cu 150...300 g colagen nendenaturat. Amestecul a fost turnat pe suporturi de PMMA (polimetilmetacrilat) cu dimensiunile de 60 mmx30 mmx3 mm, învelit în folie de polietilenă și uscat în etuvă la 33°C, timp de 12 h, rezultatul fiind obținerea unor membrane cu grosimea de 0,1...0,3 mm.	35
<b>Etapa 2: <u>Reticularea membranelor</u></b>	41
Se imersează membranele într-o soluție de etanol 40%, timp de 30 min, la temperatura camerei, după care se imersează într-o soluție de 3% glutaraldehidă, timp de 22 h, la temperatura camerei.	43
<b>Etapa 3: <u>Spălarea membranelor</u></b>	45
După reticulare, membranele au fost supuse unor spălări succesive în soluție de clorură de sodiu 1 M (2 spălări de câte 1 h) și apă distilată (6 spălări de câte 1 h).	47

# RO 127812 B1

1 După cele 8 spălări succesive, se usucă în aceleași condiții ca la etapa 1, în etuvă,  
la 33°C, timp de 12 h.

## 3 **Etapa 4: Obținerea tuburilor**

5 Membranele au fost tăiate în bucăți cu dimensiunile de 20±2 mmX 9±1 mm, umectate  
prin imersie în apă pură (Apa MilliQ) timp de 10 min, rulate pe suporturile (bare) din teflon  
cu diametrul exterior de 2,4±0,1 mm, și uscate în etuvă la 33°C, timp de 12 h. S-au obținut  
7 tuburi din biocompozit.

## 9 **Etapa 5: Sterilizarea**

9 Sterilizarea tuburilor s-a făcut cu radiații UV, timp de 24 h.

## 11 **Exemplul 2**

11 **Etapa 1: Prepararea și condiționarea membranelor din biocompozit pe bază de alcool  
polivinilic (PVA) și hidrolizat de colagen (HC)**

13 Într-un vas de sticlă de 500 ml s-au cântărit 15...30 g pulbere de alcool polivinilic  
(PVA); s-au adăugat 135...270 g apă pură și s-au menținut sub agitare pe baie de apă, la  
15 65°C, timp de 24 h. S-au obținut 150...300 g soluție 10% PVA. Într-un vas de 100 ml s-au pus  
1,5...3 g pulbere alb-gălbuie de hidrolizat de colagen și 13,5...27,5 g apă pură, s-au  
17 amestecat prin agitare continuă pe baie de apă, la 60°C, timp de 30 min, și s-a obținut o  
soluție 10% de hidrolizat de colagen (HC).

19 S-a turnat soluția de HC peste soluția de PVA și s-a omogenizat timp de 5 min, prin  
agitare mecanică. Amestecul a fost turnat pe suporturi de PMMA (polimetilmetacrilat) cu  
21 dimensiunile de 60 mmx30 mmx3 mm, învelite în folie de polietilenă și uscate în etuvă la  
33°C, timp de 12 h, rezultatul fiind obținerea unor membrane cu grosimea de 0,05...0,2 mm.

23 Pentru etapele următoare s-a procedat ca în exemplul 1.

25 Biocompozitul obținut pe bază de PVA și colagen a fost testat din punct de vedere  
al biocompatibilității *in vitro* și *in vivo*.

27 Membranele obținute au fost pregătite pentru testarea *in vitro*, în vederea evaluării  
calitative a biocompatibilității. Acestea au fost prelucrate în secțiuni de 5 mm<sup>2</sup> și sterilizate  
prin expunere la radiații UV timp de 24 h.

29 Testarea biocompatibilității s-a realizat prin metoda contactului direct.

31 Pentru contactul direct se adaugă câte un fragment de membrană de 5 mm<sup>2</sup>/500 μl  
suspensie celulară. Testele au fost realizate pe linia celulară NCTC, derivată din țesut  
33 conjunctiv de șoarece (*Mus musculus*); clona 929 este obținută de la The European  
Collection of Cell Cultures (ECACC) și este menținută în MEM suplimentat cu 10% ser fetal  
bovin (SFB), 1% PSN (penicilină, streptomycină, neomicină), în incubator, la 37°C, și în  
35 atmosfera umedă, cu 5% CO<sub>2</sub>. Morfologia și creșterea celulelor au fost monitorizate cu  
ajutorul unui microscop inversat, cu contrast de fază.

37 Biocompatibilitatea membranelor a fost evaluată atât prin metode calitative (colorarea  
citochimică a celulelor cu Giemsa), cât și prin metode cantitative (testul MTT). Pentru analiza  
39 morfologiei celulare, celulele au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri la densitatea  
standard de 5x10<sup>4</sup> celule/ml. După aderență (24 h), cultura este adusă în contact cu probele.  
41 La 24 și 48 h, celulele, astfel cultivate și tratate, au fost spălate cu PBS, fixate cu metanol  
rece (-20°C), colorate cu soluție Giemsa și fotografiate cu ajutorul unui microscop optic Zeiss  
43 Axio Vision Observer.

45 Viabilitatea celulară a fost determinată prin testul MTT. Metoda spectrofotometrică  
se bazează pe conversia bromurii de dimetiliazol-2-difeniltetrazolium (MTT) la cristale  
insolubile purpurii de formazan, sub acțiunea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii.  
47 Cantitatea de formazan produsă este proporțională cu numărul celulelor vii, și se determină  
spectrofotometric, după dizolvarea cristalelor într-un solvent potrivit.

# RO 127812 B1

Pentru experiment, celulele au fost însămânțate la o densitate de  $5 \times 10^4$  celule/ml, în plăci cu 24 godeuri, și incubate la  $37^\circ\text{C}$ , în atmosfera umedă, cu 5%  $\text{CO}_2$ , timp de 24 h, pentru a permite aderența celulelor. După perioada de incubare, mediul a fost îndepărtat cu grijă și înlocuit cu mediu de cultivare proaspăt, secțiunile fiind așezate peste substratul celular. După 24 și, respectiv, 48 h, mediul a fost îndepărtat și s-a adăugat soluția de MTT (0,25 mg/ml), iar celulele au fost incubate la  $37^\circ\text{C}$ , timp de 3 h. Ulterior, cristalele de formazan formate au fost solubilizate cu izopropanol, iar absorbanta colorantului dizolvat a fost măsurată la 570 nm, cu ajutorul unui cititor de plăci Tecan. Conform scalei de citotoxicitate din standardul european SR EN ISO 10993-5:2003, se constată că, deși polimerul sintetic neamestecat cu biopolimer este ușor citotoxic, amestecarea lui cu collagen conduce la o creștere sensibilă a viabilității, deci se realizează o bună biocompatibilizare a acestuia.

Astfel, asocierea PVA cu collagen nativ (nedenaturat) a dus la o viabilitate celulară mai bună (între 80,99% și 84,90% la 24 h, și între 87,03% și 96,79% la 48 h - probele 3, 4 și 5) față de PVA simplu (80,34% la 24 h și 82,55% la 48 h - proba 2).

În urma testării citotoxicității prin metoda cu MTT, s-a ajuns la concluzia că amestecul ce conține, ca polimer sintetic, PVA și Col în proporție de 1:1 a conferit cel mai bun grad de biocompatibilitate.

Probele a căror citotoxicitate a fost analizată prin metoda cantitativă cu MTT au fost supuse și metodei de analiză calitativă, fiind observată morfologia celulelor cultivate în prezența sau absența (proba martor) materialelor polimerice respective.

Rezultatele obținute în urma acestei analize confirmă datele obținute prin metoda cu MTT. Celulele își păstrează morfologia caracteristică liniei NCTC L929, nu se observă modificări, aspectul culturii fiind asemănător cu cel al martorului de cultură. Deci rezultatele testului cantitativ au fost confirmate de observațiile de morfologie.

Morfologia celulară a fost analizată prin microscopie optică, în urma colorației Giemsa. Rezultatele obținute sunt prezentate în fig. 2...4. Testarea *in vivo* a conductelor nervoase, precum și a asocierii conduct nervos-celule stem mezenchimale, în vederea stabilirii eficienței acestora în regenerarea nervilor periferici lezați, s-a efectuat pe animale de laborator (respectiv, șobolani Wistar). Metoda a fost standardizată conform normelor bioetice.

Cu o compoziție și o formă finală stabilite, conductele nervoase alese pentru testarea *in vivo* au fost cele de PVA<sub>M</sub> - Collagen 1:1. Acestea au prezentat o bună biocompatibilitate, demonstrată prin aderența pe suprafața lor a celulelor stem mezenchimale, care au păstrat o morfologie normală după 6 zile de cultivare, cunoscându-se faptul că biocompatibilitatea este una dintre condițiile esențiale pe care trebuie să le îndeplinească un conduct nervos. Testarea *in vivo* s-a realizat pe 60 de șobolani Wistar, femele, cu greutate cuprinse în intervalul 180...220 g. Șobolanii au fost împărțiți în 3 grupe:

- Lotul A - lotul de grefe nervoase, constituit din 20 de șobolani;
- Lotul B - lotul de conducte nervoase, constituit din 20 de șobolani. NC au fost realizate din collagen:alcool polivinilic într-un raport de 1:1. Conductele au avut o lungime de 1 cm și un diametru intern de 1,5 mm;
- Lotul C - lotul de conducte nervoase și celule stem mezenchimale, constituit din 20 de șobolani.

Cele trei loturi au fost comparate cu șobolani la care nu s-a practicat nicio intervenție terapeutică pe sciatic.

# RO 127812 B1

1 În cazul tuturor loturilor (deci a lotului C - de conducte nervoase asociate cu celule  
stem mezenchimale), nervul sciatic drept a fost expus de aceeași manieră, prin incizie în  
3 partea posterioară a coapsei. S-a creat un defect de 10 mm, care a fost surmontat printr-o  
grefă (lot A), printr-un NC din collagen:APV în raport de 1:1. Suturele microchirurgicale  
5 epineurale s-au realizat cu nylon 10.0, sub o magnificație de 40 x.

7 La lotul C, după coaptare s-au injectat MSC la nivelul capătului proximal, utilizând o  
seringă de 27 G de tuberculină, cu umplerea întregului tub. Ulterior s-au realizat miografie și  
9 sutură tegumentară cu vycril 4.0. Postoperator animalele au fost cazate în cuști individuale  
și li s-au administrat antibiotic și antialgice, permițându-le să se miște liber. Hrana și apa au  
fost administrate *ad libitum*.

11 Animalele au fost urmărite timp de 12 săptămâni, prin analiza comportamentului,  
măsurarea greutateii, urmărirea eventualelor modificări tegumentare și ale părților moi.  
13 Animalele n-au suferit modificări importante ale greutateii, cu excepția unei scăderi de 3% în  
cursul primei săptămâni, ulterior greutatea normalizându-se. Modificările părților moi ar fi  
15 putut fi contracturile în flexie, ulcerațiile cronice, infecțiile postoperatorii, escarele de decubit  
și leziunile de autotomie. Niciunul dintre șobolanii operați nu a dezvoltat escare de decubit,  
17 ulcerații cronice sau contracturi în flexie. Din cohorta de șobolani operați, cu defecte ale  
sciaticului, 5 din grupa cu conducte nervoase, 4 din grupa cu grefe și 2 din grupa NC cu MSC  
19 au prezentat automutilări limitate doar la regiunea unghială. Evaluarea funcțională a reparării  
nervoase s-a realizat prin analize clinice, teste motorii (abducția digitală), senzitive (testul  
21 înțepăturii - pin prick) și indexul funcțional sciatic, iar evaluarea denervării gastrocnemianului  
s-a realizat prin indexul muscular gastrocnemian (GMI). Animalelor li s-a urmărit mersul,  
23 precum și postura.

25 Evaluarea testării motorii și senzitive nu a relevat diferențe semnificative statistic între  
grupuri de-a lungul reperelor de timp.

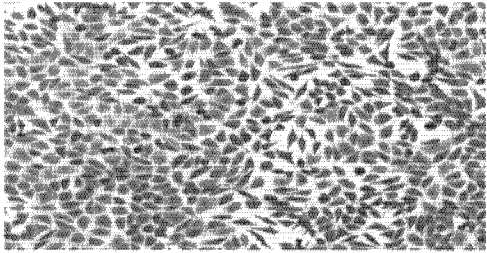


# RO 127812 B1

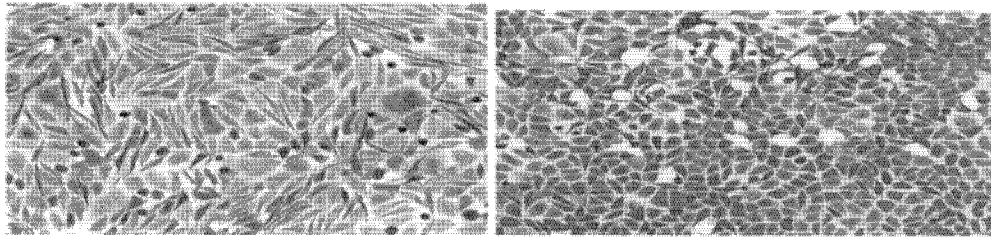
## Revendicări

1. Procedeu de obținere a unei conducte de ghidare nervoasă, pentru regenerarea nervilor periferici, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: 3
- prepararea membranelor de biocompozit, prin combinarea unei soluții de alcool polivinilic 10% cu colagen nedenaturat, într-un raport 1:1 în greutate, sau cu hidrolizat de colagen, într-un raport de 9:1 în greutate, amestecul obținut se toarnă în suporturi de polimetil metacrilat, și se usucă în etuvă la 33°C, timp de 12 h, obținându-se membrane cu grosimea de 0,1...0,3 mm, în cazul colagenului nedenaturat, sau cu o grosime de 0,05 ... 0,2 mm, în cazul hidrolizatului de colagen; 5
  - reticularea membranelor de biocompozit, prin imersarea membranelor obținute în etapa anterioară, într-o soluție de etanol 40%, timp de 30 min, la TC, urmată de imersarea într-o soluție de glutaraldehidă 3%, timp de 22 h, la TC; spălarea succesivă a membranelor cu clorură de sodiu 1 M de două ori, și cu apă distilată de șase ori, apoi se usucă în etuvă la 33°C, timp de 24 h; 11
  - obținerea tuburilor prin tăierea membranelor cu dimensiuni de 20±2 mmX 9±1 mm, umectarea prin imersie în apă pură, timp de 10 min, rularea pe suporturile de teflon cu diametrul exterior de 2,4±0,1 mm și uscarea în etuvă la 33°C, timp de 12 h; 17
  - sterilizarea tuburilor cu radiații UV timp de 24 h. 19
2. Conducte pentru ghidare nervoasă, cu grosimea pereților de 0,05...0,3 mm, **caracterizate prin aceea că** sunt construite dintr-un biocompozit polimeric, obținut din 50...90 părți în greutate alcool polivinilic, cu greutatea moleculară 72000 g/mol, în soluție apoasă 10%, și 10...50 părți în greutate colagen, ales între gel de colagen nedenaturat, cu greutate moleculară medie de 250000...300000 D, sau hidrolizat de colagen cu greutatea moleculară medie de 7000...15000 D, obținute prin procedeul definit în revendicarea 1. 21

(51) Int.Cl.  
**A61L 27/00** (2006.01),  
**A61L 31/04** (2006.01),  
**A61L 31/14** (2006.01)



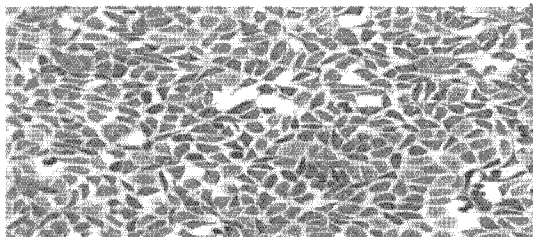
**Fig. 1**



A

B

**Fig. 2**



**Fig. 3**

(51) Int.Cl.

**A61L 27/00** (2006.01);

**A61L 31/04** (2006.01);

**A61L 31/14** (2006.01)

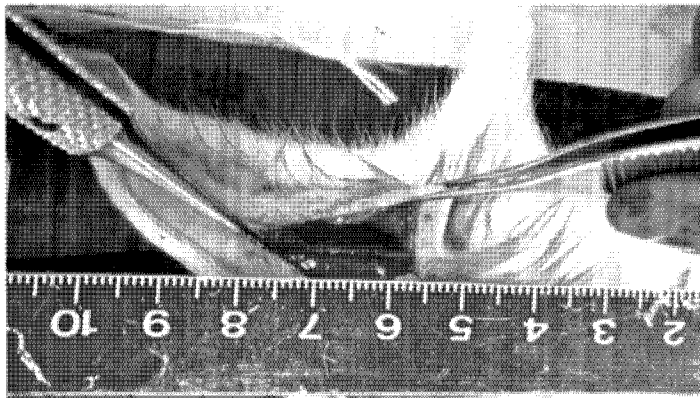


Fig. 4

