



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00555**

(22) Data de depozit: **15/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OLĂREȚ ELENA, STR.CLOȘCA, NR.5,
BL.PS11B, SC.1, ET.2, AP.8, GALAȚI, GL,
RO;**

• **STANCU IZABELA-CRISTINA,
CALEA GRIVIȚEI NR. 232, BL. 2, SC. F,
ET. 1, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **IOVU HORIA, STR.MARIA TĂNASE NR.3,
BL.13, SC.B, ET.4, AP.49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DINESCU SORINA,
BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR. 45, BL. J41,
AP. 81, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE STRUCTURI
TUBULARE FIBROASE MULTILUMEN
PENTRU REGENERAREA NERVILOR PERIFERICI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la suporturi tubulare tip canal de ghidare sau înveliș fibros pentru regenerarea nervilor periferici și la un procedeu de obținere a acestora. Suporturile tubulare conform invenției sunt constituite dintr-un înveliș de gelatină și canale interioare longitudinale fabricate din gelatină cu concentrația cuprinsă între 50...70%, gelatina fiind extrasă din pește de apă rece, cu posibilitatea de adăugare a unor particule de nanodiamant cu concentrație de 0,5% și 1%. Procedeu de fabricare conform invenției are trei etape:

1) fabricarea tuburilor fibroase și a învelișului fibros prin electrofilare cu controlul temperaturii și a umidității, utilizând soluții de gelatină de pește cu concentrații de proteină cuprinse între 50...70%, cu sau fără particule de nanodiamant, utilizând colectori cilindrici metalici cu diametre convenabile și aplicând o mișcare paralelă a acului de injectare a soluției/dispersiei pe toată lungimea colectorului,

2) stabilizarea structurilor fibroase pentru a preveni dizolvarea în mediul fiziologic, prin reticularea proteinei din structurile fibroase tubulare direct pe

colector, urmată de reticularea meșei după rularea acestora pe tuburile dispuse intraluminal, și

3) dimensionarea și asamblarea structurilor, astfel încât să se poată fabrica substituenți nervoși cu arhitectura dorită, similară cu cea obținută din analiza imagistică a nervului lezat, pentru realizarea substituenților tip tub de ghidare multicanal:

a) tuburile cu diametre potrivite se inserează într-un tub manta realizat din gelatină de pește, mai lung cu 5 mm decât canalele interioare și cu lungime mai mică cu 1 mm la ambele capete față de lungimea defectului nervos, iar

b) în cazul învelișului umplut intraluminal cu canale, tuburile cu lungime mai mică cu 1 mm la ambele capete decât defectul nervos sunt aranjate împreună, iar apoi mănuchiul se acoperă cu o meșă fibroasă de gelatină de pește, mai lungă cu 5 mm la ambele capete.

Revendicări: 4
Figuri: 9



**Procedeu pentru obținerea de structuri tubulare fibroase multilumen pentru
regenerarea nervilor periferici**

**Inventatori: Elena Olăreț, Izabela-Cristina Stancu, Horia Iovu, Sorina Dinescu, Marieta
Costache**

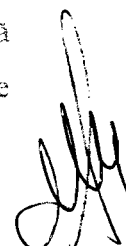
DESCRIERE

Incidența crescută a leziunilor de la nivelul sistemului nervos periferic precum și efectul acestora asupra calității vieții au dus dezvoltarea produselor de tip conduct care să ajute procesul de regenerare a nervilor [1]. În prezent, standardul de aur este încă reprezentat de autogrefe a căror utilizare înregistrează cea mai mare rată de succes (50%), urmate de alo- și xeno-grefe [2]. Cu toate acestea, dezavantajele precum disponibilitatea redusă, morbiditatea zonei donatoare, necesitatea unor intervenții chirurgicale suplimentare sau necesitatea administrării de imunosupresoare în cazul alo-/xeno-grefelor, reprezintă de asemenea motive serioase pentru dezvoltarea de produse artificiale biocompatibile cu dimensiuni ajustabile.

Prima generație de astfel de dispozitive este reprezentată de tuburi neresorbabile de silicon [3] care în cele din urmă necesitau o a doua intervenție pentru înlăturare [4]. De atunci, numeroase alte materiale atât naturale (colagen de tip I, laminină, fibroină, acid hialuronic, chitosan, alginat, polihidroxibutirați etc.) cât și sintetice (polilactidă, acid poliglicolic, policaprolactonă, alcool polivinilic) sau compozite (în general polimerii naturali sunt cei ranforșați cu nanoparticule de sticlă, carbon sau nanoparticule cu proprietăți magnetice ori electrice) au fost formulate ca tuburi pentru regenerarea nervilor periferici.

Pentru a obține structuri tubulare, principalele tehnici de fabricare sunt: turnarea în matriță, acoperirea unui suport prin imersare într-o soluție, rularea unor filme sau membrane, împletire sau țesere și electrofilare. Desigur, procesul de fabricare poate implica și o combinație, în general a două astfel de tehnici. În ultimii ani, pentru fabricarea de tuburi se folosește și printarea tri-dimensională (3D) [5][6].

În funcție de materialele și tehnicile de fabricare alese, produsele tubulare sunt caracterizate de anumite proprietăți. Pentru un succes cât mai apropiat de cel al standardului de aur, un astfel de conduct trebuie să îndeplinească cel puțin următoarele caracteristici: trebuie să fie biocompatibil, să asigure captarea capătului proximal și distal al nervului lezat, să asigure



difuzia oxigenului și a nutrienților în zona de regenerare, să asigure stabilitatea mecanică. Ideal, produsul trebuie să fie bioresorbabil, să permită înglobarea și eliberarea controlată a unor biomolecule și să prezinte elemente de ghidare celulară [7]. Există deja o serie de astfel produse aprobate de către Food and Drug Administration (FDA), toate fiind biodegradabile iar cele mai multe fiind fabricate din colagen de tip I sau având acest biomaterial în compoziția lor.

Importanța și actualitatea domeniului de cercetare la nivel mondial este demonstrată și prin numărul din ce în ce mai mare în fiecare an al publicațiilor științifice prin care se încearcă rezolvarea dezavantajelor pe care încă le posedă dispozitivele curente, îmbunătățirea proprietăților pentru stimularea unei regenerări nervoase superioare, pentru obținerea unui produs cu o eficiență maximă și un raport calitate preț convenabil, astfel încât să devină larg accesibil pentru aplicații clinice. De aceea, invențiile care vizează regenerarea nervilor periferici abordează fie arhitecturi tubulare deosebite, fie compoziții optime sau ambele aspecte. În continuare sunt prezentate astfel de invenții.

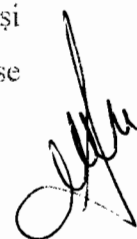
Brevetul **US9585666B2** descrie un procedeu de fabricare de conduct nervos prin rularea unei membrane de policaprolactonă obținută prin turnare într-o matriță prevăzută cu elemente longitudinale care asigură formarea unor canale pe suprafața acesteia. Pe suprafața orientată către lumenul tubului sunt depuse fibre orientate longitudinal (prin electrofilare) și membrana se rulează astfel încât în interior să formeze o spirală prevăzută cu canalele existente pe membrană. Invenția exemplifică procedeul și printr-o compoziție policaprolactonă-colagen. Invenția **EP2344208B1** descrie obținerea de conduct cu o arhitectură stratificată prin suprapunerea mai multor filme de policaprolactonă-acid polilactic și rularea lor până când capetele se întâlnesc și sunt lipite prin încălzire. Un alt brevet care folosește ca tehnică de obținere a structurii tubulare rularea este **US20020018799A1**. Invenția se referă la obținerea de tuburi pentru regenerarea nervilor prin rularea unei membrane BioGide® și lipirea sau suturarea marginilor ce se intersectează. De asemenea, sunt descrise metode de preparare a unor geluri de colagen I și colagen IV, pentru umplerea tubului sau pentru acoperirea membranelor înainte de rulare. Brevetul **US20190262500A1** descrie obținerea unui conduct din poliuretani cu blocuri alternante biodegradabile și hidrofiele, prin imersarea unei tije de oțel inoxidabil în soluțiile de polimeri. Conductul este liofilizat și astfel prezintă o arhitectură poroasă. Invenția **RO128003B1** prezintă un procedeu de condiționare și reticulare a colagenului de tip I pentru obținerea de conduct nervos prin turnarea între doi cilindri concentrici cu diametru diferit. Brevetul **US10405963B2** descrie fabricarea de conduct nervos biomimetic din gelatină porcină metacrilată, prin printare 3D. Invenția presupune scanarea țesutului și transferul modelului 3D

obținut către imprimantă. În acest fel poate fi printat un conduct nervos biomimetic încărcat cu biomolecule diferite pentru regenerarea unui defect complex (ce conține o bifurcație). **US20190070338A1** descrie obținerea unui hidrogel pe bază de gelatină bovină metacrilată și tropoelastină metacrilată sub formă cilindrică, liofilizat pentru regenerarea nervilor. **US9017714B2** prezintă o metodă de fabricare a unor structuri tubulare pentru regenerarea nervilor periferici în defecte mai mari de 40 mm, cu proprietăți mecanice, anti-îndoire, biodegradabilitate și interacțiuni celulare îmbunătățite, utilizând tuburi fibroase pe bază de poliesteri alifatici biodegradabili, impregnate la exterior cu o soluție de collagen cu viscozitate redusă iar apoi cu soluții cu viscozitate crescută (până la 50 de straturi), cărora li se aplică tratament de reticulate sau liofilizare.

Au fost dezvoltate o serie de produse comerciale de tip canal de ghidare nervoasă sau înveliș pentru protejarea nervului lezat (trecute în revistă de exemplu în [8]). De exemplu, produsele dezvoltate de Integra (*Integra® Peripheral Nerve Portfolio*, [9]) sau Synovis Micro Companies Alliance, Inc. De exemplu, NeuraGen Nerve Guide este singurul conduct din collagen bovin de tip I disponibil cu diametru de 1.5mm, considerat de producător ideal pentru nervii de la nivelul degetelor. De exemplu, la nivelul mâinii și articulației mâinii sunt prezenți nervi cu diametre între aproximativ 1 mm și 3 mm [10]. Un alt exemplu este produsul NEUROTUBE, fabricat din PGA și recomandat pentru defecte între 8 mm și 30 mm [11].

În acest context se poate observa că majoritatea soluțiilor dezvoltate pentru asistarea regenerării nervilor periferici propun metode de fabricare a unor structuri tubulare cu diverse arhitecturi, folosind biomateriale aprobate de FDA, pe bază de polimeri sintetici precum poliesteri alifatici biodegradabili sau polimeri naturali precum collagenul și se referă la produse de asistare a regenerării pe bază de tuburi pentru ghidare cu un singur lumen, sau învelișuri polimerice care înfășoară defectul nervos generând un micromediu ce permite regenerarea. Brevetele descrise mai sus au avantajul de a dezvolta produse simple, care ghidează regenerarea la nivelul defectului nervos, dar au dezavantajul că permit dispersarea axonilor, uneori conducând la un efect nedorit de neuroni motori cu proiecție dublă, pe ramuri nervoase diferite. Pentru a soluționa această problemă, este necesară o nouă abordare – cea a conductelor nervoase multicanal.

Literatura de specialitate [8] și brevetele **EP2380601** și **US20110276066A1** enumeră caracteristicile unui conduct nervos artificial: biocompatibilitate, flexibilitate, biodegradare ajustabilă pentru defectul tratat, suficientă rezistență mecanică pentru a împiedica compresia și colapsarea structurii, metodă de fabricare a biomaterialului ușoară și reproductibilă. Invenția se



referă la fabricarea unui nou tip conduct din colagen, multicanal, utilizând un procedeu secvențial de turnare în formă și uscare în aer. Pentru prima dată au fost obținute în mod reproductibil structuri tubulare de tip conduct nervos cu canale multiple sub-milimetrice. Invenția evidențiază proprietățile mecanice superioare ale conductului multicanal din colagen față de cel monocanal fabricat cu tehnologie asemănătoare pentru produsul comercial NeuraGen®. În plus, foarte important pentru inducerea unei regenerări mai eficiente a nervilor periferici, prezența mai multor canale cu orientare longitudinală asigură o ghidare mai bună împiedicând dispersarea axonilor în procesul de reinervare. Structurile cu 4 sau 7 canale au fost indicate ca favorizând regenerarea. Structurile multicanal prezintă potențialul de reducere a dispersării axonilor în interiorul conductului, fără a reduce cantitativ rezultatul regenerării. Procedeu de obținere de conduct cu multilumen este descris și în brevetul **US6214021B1**. Această invenție presupune folosirea unei matrițe cilindrice din oțel inoxidabil, în care se fixează fire de oțel inoxidabil cu diametre între 60 și 500 μm, ce pot fi aranjate astfel încât să se obțină arhitecturi diferite. Soluția polimerică pe bază de poliesteri biodegradabili (polilactidă (PLA), poliglicolidă (PGA) și copolimerii lor (PLGA)), este turnată în matrița prevăzută cu fire de oțel inoxidabil. Prin lumen a fost circulată o soluție de laminină de concentrație 10 mg/ml timp de 4 ore, ulterior fiind populat cu celule Schwann într-o manieră similară.

În plus, electrofilarea s-a dezvoltat ca tehnologie ce poate permite obținerea de analogi de țesut ce mimează natura fibrilară a matricei extracelulare [12,13]. Substraturile electrofilate asigură o suprafață mai mare de contact cu micromediul tisular, inclusiv cu celulele [13]. Această tehnologie a devenit atractivă pentru regenerare nervoasă, așa cum se arată în literatura de specialitate [14,15]. Tehnica de electrofilare este utilizată în brevetul **US9572909B2** pentru a obține structuri cilindrice formate din micro- sau macrofibre (în funcție de diametrul cilindrului). Acești cilindri sunt structuri pline cu fibre orientare longitudinal, ce servesc drept elemente de ghidare pentru celule, fiind prevăzuți cu o teacă obținută fie prin electrofilare cu fibre neorientate, sau prin electropulverizare fie prin imersare într-un material biocompatibil având rolul de a îmbunătăți rezistența la compresiune și de a împiedica celulele inflamatorii să pătrundă în zona de regenerare. Brevetul **US9938373B2** descrie metode de electrofilare a poli(glicerolului sebacat) combinat cu alți polimeri precum alcoolul polivinilic, gelatina și PLGA și obținerea de structuri fibroase 3D pentru diverse aplicații din domeniul ingineriei tisulare. Brevetul **US9707000B2** combină tehnica rulării și tehnica electrofilării pentru a obține structuri tubulare cu suprafața internă fibroasă. Această invenție pornește de la fabricarea unei membrane biodegradabile care este ulterior acoperită cu un hidrogel încărcat cu biomolecule și

cu o rețea de nanofibre cu sau fără orientare longitudinală. Nanofibrele sunt și ele acoperite cu biomolecule din matricea extracelulară, precum laminină și heparină. Membrana multistrat este apoi rulată, iar capetele sunt lipite. Se poate observa că aceste structuri electrofilate sunt cu un singur lumen.

În acest context, prezenta invenție se referă la un nou tip de grefe nervoase fibroase pentru regenerarea nervilor periferici și fabricarea acestora. Mai exact, invenția se referă la fabricarea a două tipuri de substituenți nervoși fibroși din gelatină: (1) conducte nervoase de tip tub sau (2) învelișuri nervoase de tip rețea fibroasă rulată, ambele prezentând intraluminal multiple canale de ghidare a regenerării. Atât tubul cât și învelișul rulabil precum și canalele interne sunt fabricate prin electrofilare, utilizând un proces în 3 etape. Dispozitivele fabricate conform invenției sunt fabricate din biomateriale biocompatibile, biodegradabile și sunt caracterizate de o morfologie nanofibroasă. Canalele interioare pot fi fabricate din gelatină sau din gelatină cu elemente nanostructurate precum nanoparticule de diamant ce stimulează activitatea celulelor nervoase având potențialul de a induce/încuraja procesul de regenerare nervoasă. De asemenea, procedeul permite obținerea de tuburi și învelișuri fibroase de diferite lungimi și diametre, ce pot fi asamblate personalizat, aspect neprezentat până acum în alte brevete.

Procedeul de fabricare presupune 3 etape. **Prima etapă** este reprezentată de fabricarea tuburilor fibroase și învelișului fibros prin electrofilare, cu controlul temperaturii și umidității. Se prepară soluție apoasă de gelatină sau dispersie de nanoparticule de diamant într-o soluție apoasă de gelatină de pește, cu viscozitate medie de aproximativ 0.5 Pa în intervalul de viteze de forfecare $10^0 - 10^2 \text{ s}^{-1}$ și concentrații de proteină 50-70%. Pentru obținerea de tuburi nanofibroase au fost utilizați colectori rotativi de diferite diametre (între 1 și 2 mm pentru tuburile interioare și între 2 și 10 mm pentru tubul exterior), iar pentru învelișul fibros se pot folosi colectori rotativi cu diametre convenabile (de exemplu 2 cm sau 9 cm). S-a realizat electrofilarea utilizând o viteză de rotație a collectorului în jurul axei de 70 rpm pentru a asigura depunerea fibrelor uniform pe întreaga suprafață. Pentru a obține o distribuție cât mai omogenă a fibrelor pe colector, acul prin care trece soluția/dispersia a avut o mișcare paralelă pe toată lungimea collectorului, cu o viteză de 5 mm/s. Parametrii de electrofilare sunt: tensiunea aplicată 20-22 kV, temperatura 25°C, umiditatea relativă 40%, iar debitul de injecție între 4 și 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Analiza microstructurală a confirmat obținerea de substraturi cu fibre omogene, fără defecte (Figura 1j,k,l). **A doua etapă** este o etapă de stabilizare a structurilor fibroase obținute pentru a împiedica dizolvarea gelatinei în medii apoase precum fluidele fiziologice. Astfel de procese

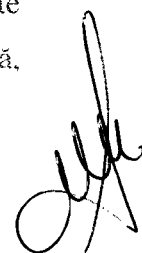
sunt descrise în literatura de specialitate și se realizează cu reticulanti precum aldehida glutarică, transglutaminază, carbodiimide etc. Stabilizarea se realizează printr-un proces de reticulare a gelatinei în atmosferă saturată în vapori de soluție apoasă de aldehidă glutarică de concentrație 50% (% masă/volum), timp de 7 zile (Figura 2). Structurile fibroase sunt reticulate direct pe colector (Figura 2a) evitând astfel defectele structurale ce ar fi apărut în procesul de detașare de pe colector, precum și schimbarea dimensiunilor prin contractare la reticulare, folosind metoda descrisă în [15]. Pe scurt, colectori încărcați cu substratul fibros obținut prin electrofilare sunt fixați pe câte un suport, în poziție verticală, și introduși într-un recipient ce se închide ermetic și care conține soluție de reticulare astfel încât probele nu intră în contact cu soluția (Figura 2b). După ce probele au stat 7 zile în atmosfera saturată de vapori de aldehidă glutarică (Figura 2c), urmează o etapă de spălare în apă bidistilată filtrată (cu filtre de 0.22μm), etapă în care tuburile se hidratează complet și se pot detașa de pe colector ușor (Figura 2d). Etapa de spălare durează 4 zile, cu înprospătarea apei de 3 ori pe zi în primele 24 de ore, iar ulterior apa se schimbă o singură dată pe zi. După detașarea probelor de pe colectori, acestea de dimensionează după interes (Figura 3a). Se obțin astfel structuri tubulare cu morfologie fibroasă și diferite dimensiuni (Figura 3b și Figura 3c), ce vor fi ulterior asamblate într-un mănunchi, astfel încât să se obțină arhitecturile dorite (Figura 3d și Figura 3e). Substraturile fibroase pe bază de gelatină de pește și gelatină de pește îmbogățită cu nano-particule de diamant au fost puse în contact cu o cultură primară de neuroni izolați din rădăcina dorsală a nervilor spinali. Pentru a confirma prezența neuronilor în sistemul tridimensional obținut, s-a realizat marcajul acestora cu β-III-tubulină, o formă de tubulină specifică neuronilor. Atât pe materialul din gelatină (Figura 3f), dar și pe cel îmbogățit cu nanoparticule de diamant (Figura 3g) a fost evidențiată prezența corpurilor neuronali și prelungirile dendritice ale acestora. S-a observat o proporție mai mare în prezența gelatinei nanostructurate cu nanodiamant (Figura 3g). Analizele microstructurale au indicat structura fibroasă a pereților tuburilor, cu orientare longitudinală cu axul longitudinal al tubului (Figurile 4, 5 și 6). **Etapa a treia.** În funcție de arhitectura dorită, diametrul și lungimea tuburilor pot fi controlate, astfel încât să se poată fabrica substituenți nervoși cu arhitectura similară cu cea obținută din analiza imagistică a nervului lezat (Figura 7). Pentru varianta de substituent **tip tub de ghidare multicanal**, tuburile cu diametre potrivite se inserează într-un tub manta realizat din gelatină de pește, mai lung decât canalele interioare (Figura 5). Analizele de microtomografie computerizată confirmă structura multicanal, cu tuburi fibroase distribuite intraluminal într-un tub manta (Figurile 4, 5). Pentru **învelișul umplut intraluminal cu canale**, tuburile cu lungime egală cu a defectului nervos sunt aranjate împreună, iar apoi mănunchiul se acoperă cu o meșă de gelatină de pește fabricată în

mod similar, dar folosind un colector metalic cu diametrul mai mare (2 cm sau 9 cm). Figurile 4 și 6 sunt relevante în acest sens. În acest mod se obțin substituenți nervoși fibroși, încărcăți intraluminal cu canale fibroase ce pot fi nanostructurate cu nanoparticule: aceste produse pot fi personalizate din punct de vedere dimensional pentru defectul nervos vizat. Aceste produse se hidratează rapid (mai puțin de 30 minute) și sunt elastice în stare hidratată, nestrangându-se la îndoire (Figura 8). Acest comportament reprezintă un avantaj important față de tuburile simple, monocanal, pentru aplicația clinică a dispozitivului, așa cum s-a precizat pentru dispozitive multicanal din colagen (EP2380601 și US20110276066A1). Dispozitivele obținute sunt fabricate din biomateriale biocompatibile [15.16], biodegradabile, nanostructurate [15.16], și pot fi încărcate cu biomolecule (factori de creștere, peptide de adeziune celulară) care să stimuleze suplimentar procesul de regenerare. Sterilizarea se poate realiza prin diverse metode precum incubarea în etanol absolut, expunere la radiație UV sau oxid de etilenă [17].

Invenția este explicată în detaliu în 7 exemple și 8 figuri, după cum urmează:

Exemplu 1

În această invenție a fost folosită o soluție de gelatină de pește de concentrație 50% masă/volum și nanoparticule de diamant (cu diametrul între 5 și 10 nm) în concentrație de 0.5% masă/volum. Astfel, cantitatea de nanoparticule de diamant se dispersează în volumul aferent de apă bidistilată filtrată prin tratament de ultrasonare timp de 30 de minute, pe baie de gheață. După cele 30 de minute se adaugă cantitatea necesară de gelatină de pește, sub agitare continuă în baie de apă la 40°C (recipientul este închis), timp de minim 4 ore. Dispersia astfel obținută se transferă într-o seringă cu volumul de 2.5 ml ce se atașează la pompă echipamentului de electrofilare. Seringa este prevăzută cu tubulatura necesară la care este montat un ac G18. Colectorul cilindric cu diametrul de 1.6 /2 mm și lungimea de 17 cm din oțel inoxidabil se rotește cu viteza de 70 rpm. Tensiune aplicată este de 22 kV, iar temperatura și umiditatea sunt setate la 25°C respective 40%. Procesul de electrofilare are loc până când se atinge volumul de 1 ml soluție electrofilată la un debit de 5 μl/min. Colectorul se demontează din echipament și se introduce într-un recipient prevăzut cu închidere etanșă ce conține 20 ml soluție apoasă de aldehidă glutarică 50% astfel încât fibrele să nu intre în contact cu soluția. Astfel, timp de 7 zile are loc reticularea materialului electrofilat în atmosfera saturată de vapori de aldehidă glutarică. Acest proces stabilizează materialul făcându-l nedizolvabil în medii apoase. Ulterior, colectorul cu fibrele reticulate se introduce într-un alt recipient cu apa bidistilată, filtrată și se începe procesul de spălare timp de 4 zile. În prima zi apa este schimbată de 3 ori, iar apoi apa este înprospătată în fiecare zi. În aceasta etapa de spălare, constructul format se hidratează,



gonflează și se desprinde ușor de pe colector. După ce procesul de spălare este încheiat, tubul este dimensionat (tăiat în tuburi cu lungimile dorite, în cazul de față 3 cm). Probele astfel obținute sunt deshidratate în băi succesive de etanol după cum urmează: probele sunt imersate în soluții etanolice de concentrații 20% , 40%, 60%, timp de 30 de minute, apoi în soluții de concentrație 80% și 100% timp de 60 minute. Ultima incubare, în etanol 100% asigură și sterilizarea produsului. Ulterior sunt uscate în etuvă la 37° timp de 24 de ore și păstrate în vase Petri închise, în condiții sterile.

Exemplul 2

Procedeul de fabricare este conform celui descris în exemplul 1, cu excepția concentrației de nanoparticule de diamant care în acest exemplu este de 1%. Etapele de stabilizare, spălare, dimensionare, deshidratare și sterilizare sunt similare celor descrise în exemplul 1.

Exemplul 3

Sunt fabricate tuburi fibroase conform exemplului 1, utilizând colectori metalici cu diametrul de aproximativ 300 μm . Două tuburi, cu perete gros de 150 μm , sunt obținute injectând 700 μl , iar un tub cu peretele de 50 μm se obține injectând 350 μl . Pentru un tub manta cu grosimea peretelui de aproximativ 50 μm , se fabrică un tub din gelatină de pește de concentrație 70% masă/volum, utilizând un colector cu diametrul 1.6 mm și injectând 500 μl soluție în condițiile de electrofilare din exemplul 1. Tuburile au fost reticulate pe colector conform exemplului 1. Astfel, 3 tuburi cu lungime de 3 cm, diametre interioare de aproximativ 300 μm și perete cu grosime de 150 μm și de 50 μm sunt introduse în interiorul tubului manta, astfel încât să rămână în fiecare capăt 5 mm exces de tub exterior pentru a permite montarea (prin suturare) pe bonturile nervului lezat. Acest construct de tip **tub de ghidare multicanal** este prezentat în Figura 4a și Figura 8.

Exemplul 4

Sunt fabricate tuburi cu morfologie fibroasă conform exemplului 1. Suplimentar se fabrică o meșă din gelatină de pește de concentrație 70% masă/volum. Cantitatea de gelatină de pește este solubilizată în baie de apă la 40°C timp de minim 4 ore. Soluția este electrofilată similar descrierii din exemplu 1, cu excepția faptului că se folosește un colector metalic cu diametrul mai mare, și anume 2 cm și se electrofilează un volum total de 1.5 ml. Meșa astfel obținută se desprinde de colector, se secționează longitudinal, și se folosește pentru a înveli tuburile deshidratate obținute în exemplul 1. Astfel, 5 tuburi cu lungime de 3 cm și diametru interior de

2 mm sunt așezate pe meșa fabricată în acest exemplu și sunt rulate împreună sub formă de mănunchi, astfel încât să rămână în fiecare capăt 5 mm exces de meșă pentru a permite montarea învelișului (prin suturare) pe bonturile nervului lezat. Acest construct de **tip înveliș umplut intraluminal cu canale**, este mai departe reticulat conform procesului de stabilizare descris în exemplul 1. (Figura 4f)

Exemplul 5

Procedeul de obținere a structurilor **tip tub de ghidare multicanal** similar procedeuului descris în exemplul 4 cu excepția faptului că nu este folosită o meșă drept înveliș, ci un **tub manta** fabricat conform procedeuului din exemplul 1 cu următoarele excepții: (1) a fost folosită o soluție de gelatină de pește de concentrație 50% masă/volum; (2) a fost folosit un colector cu diametru de 5 mm pentru obținerea tubului manta. Tubul manta obținut, este dimensionat astfel încât să aibă lungimea de 4 cm și este umplut cu 4 tuburi de lungime 3 cm și diametru de 2 mm obținute conform exemplului 2 (Figura 4b).

Exemplul 6

Procedeul de obținere a conductului de ghidare **tip înveliș umplut intraluminal cu canale** similar exemplului 4, cu excepția faptului că în interiorul învelișului au fost introduse 3 tuburi de diametre diferite (2 tuburi cu diametrul de 2 mm și un tub cu diametrul de 1.6 mm) obținute conform exemplului 1 (Figura 4c, g).

Exemplul 7

Procedeul de obținere a conductului de ghidare **tip înveliș umplut intraluminal cu canale** similar exemplului 6, cu excepția faptului că în interiorul învelișului au fost introduse 3 tuburi de diametre diferite (1 tub cu diametrul de 2 mm, un tub cu diametrul de 1.6 mm și un tub cu diametrul de 1.4 mm) obținute conform exemplului 1 (Figura 4d, e).

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

Aplicarea prezentei invenției conduce la următoarele avantaje tehnice:

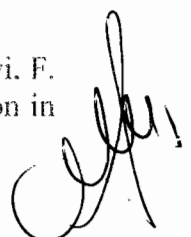
- soluții de ghidare a regenerării nervilor periferici
- posibilitatea unui tratament personalizat pentru regenerarea nervilor periferici, sub forma unor tuburi sau învelișuri încărcate cu canale longitudinale proiectate și fabricate pentru a fi similare cu ramurile nervului pacientului, imitând arhitectura respectivă, după o imagistică adecvată;

- utilizarea acestor produse cu canale fibroase este avantajoasă comparativ cu tuburile simple monocanal sau învelișurile protectoare simple, întrucât prin prezența rețelei de fibre se asigură o suprafață mai mare de interacțiune cu celulele, iar datorită canalelor interne se evită strangularea constructului sau dispersarea axonilor către ramuri nervoase diferite, astfel stimulându-se o mai bună ghidare a regenerării nervoase;
- prezența nanoparticulelor de diamant asigură și posibilitatea biofuncționalizării cu molecule bioactive precum factori de creștere ce pot stimula o regenerare nervoasă îmbunătățită.



BIBLIOGRAFIE

- [1] R. Li, Z. Liu, Y. Pan, L. Chen, Z. Zhang, L. Lu, Peripheral Nerve Injuries Treatment: a Systematic Review, *Cell Biochem. Biophys.* 68 (2014) 449–454. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9742-1>.
- [2] W. Daly, L. Yao, D. Zeugolis, A. Windebank, A. Pandit. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery, *J. R. Soc. Interface.* 9 (2012) 202–221. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0438>.
- [3] G. Lundborg, L.B. Dahlin, N. Danielsen, R.H. Gelberman, F.M. Longo, H.C. Powell, S. Varon, Nerve regeneration in silicone chambers: Influence of gap length and of distal stump components, *Exp. Neurol.* 76 (1982) 361–375. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(82)90215-1).
- [4] R. Gaudin, C. Knipfer, A. Henningsen, R. Smeets, M. Heiland, T. Hadlock. Approaches to Peripheral Nerve Repair: Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/3856262>.
- [5] S. Wang, L. Cai, Polymers for Fabricating Nerve Conduits. *Int. J. Polym. Sci.* 2010 (2010) 1–20. <https://doi.org/10.1155/2010/138686>.
- [6] S. Song, X. Wang, T. Wang, Q. Yu, Z. Hou, Z. Zhu, R. Li, Additive Manufacturing of Nerve Guidance Conduits for Regeneration of Injured Peripheral Nerves, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590596>.
- [7] G.C.W. de Ruyter, M.J.A. Malessy, M.J. Yaszemski, A.J. Windebank, R.J. Spinner, Designing ideal conduits for peripheral nerve repair, *Neurosurg. Focus.* 26 (2009) E5. <https://doi.org/10.3171/FOC.2009.26.2.E5>.
- [8] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy, *Injury.* 43 (2012) 553–572. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
- [9] Integra sell sheet, Accesat la data 23.08.2021, ora 10.08. (n.d.). <http://app.sales.integralife.com/nerve-tendon/nerve/neuragen/product-information/selling-neuragen/nerve-portfolio-quick-reference-sell-sheet.pdf>.
- [10] R. Ortiz, R.F. Westenberg, C.G. Langhammer, W.J. Knaus, N.C. Chen, K.R. Eberlin, Nerve Diameter in the Hand, *Plast. Reconstr. Surg. - Glob. Open.* 7 (2019) e2155. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002155>.
- [11] NEUROTUBE IFU. Synovis Micro Companies Alliance, Inc., Accesat la data 23.08.2021, ora 10:09, (n.d.). https://www.synovismicro.com/html/products/gem_neurotube.html#tab1-content.
- [12] J. Hong, M. Yeo, G.H. Yang, G. Kim, Cell-Electrospinning and Its Application for Tissue Engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 6208. <https://doi.org/10.3390/ijms20246208>.
- [13] S. Panseri, C. Cunha, J. Lowery, U. Del Carro, F. Taraballi, S. Amadio, A. Vescovi, F. Gelain, Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in



sciatic nerve transections, *BMC Biotechnol.* 8 (2008) 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-39>.

- [14] J. Hu, D. Kai, H. Ye, L. Tian, X. Ding, S. Ramakrishna, X.J. Loh, Electrospinning of poly(glycerol sebacate)-based nanofibers for nerve tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 70 (2017) 1089–1094. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.035>.
- [15] E. Olăreț, D.-M. Drăgușin, A. Serafim, A. Lungu, A. Șelaru, A. Dobranici, S. Dinescu, M. Costache, I. Boerașu, B. Ștefan Vasile, D. Steinmüller-Nethl, H. Iovu, I.-C. Stancu, Electrospinning Fabrication and Cytocompatibility Investigation of Nanodiamond Particles-Gelatin Fibrous Tubular Scaffolds for Nerve Regeneration, *Polymers (Basel)*. 13 (2021) 407. <https://doi.org/10.3390/polym13030407>.
- [16] A. Șelaru, D.-M. Drăgușin, E. Olăreț, A. Serafim, D. Steinmüller-Nethl, E. Vasile, H. Iovu, I.-C. Stancu, M. Costache, S. Dinescu, Fabrication and Biocompatibility Evaluation of Nanodiamonds-Gelatin Electrospun Materials Designed for Prospective Tissue Regeneration Applications, *Materials (Basel)*. 12 (2019) 2933. <https://doi.org/10.3390/ma12182933>.
- [17] G. Monaco, R. Cholas, L. Salvatore, M. Madaghiele, A. Sannino, Sterilization of collagen scaffolds designed for peripheral nerve regeneration: Effect on microstructure, degradation and cellular colonization, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.030>.



REVENDICĂRI

- 1. Suporturi tubulare tip canal de ghidare sau înveliș fibros, încărcate intraluminal cu canale longitudinale fibroase cu sau fără nanostructurare**, caracterizate prin aceea că sunt fabricate prin electrofilare, în mai multe etape, învelișul din gelatină de pește de apă rece, cu concentrație între 50% și 70%, și canale interioare longitudinale fabricate din gelatină de pește de apă rece, cu concentrație între 50% și 70% și cu posibilitate de adăugare nanoparticule de diamant (0.5%, 1%).
- 2. Suporturi tubulare și tip canal de ghidare sau înveliș fibros, încărcate intraluminal cu canale longitudinale fibroase și nanostructurate, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că realizează o arhitectură personalizată**, pe baza utilizării de informații arhitecturale și dimensionale furnizate prin imagistică tip tomografie computerizată a nervului lezat.
- 3. Suporturi tubulare tip canal de ghidare sau înveliș fibros, încărcate intraluminal cu canale longitudinale fibroase cu sau fără nanostructurare, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că elementele componente exterioare se fabrică prin electrofilare dimensionând corespunzător atât diametrul cât și lungimea (prin alegerea colectorului cu dimensiuni potrivite), iar numărul și dimensiunile canalelor interne se stabilește în concordanță cu imagistica specifică nervului de tratat.**
- 4. Procedeu de fabricare a suporturilor tubulare și tip înveliș protector multicanal**, caracterizate prin aceea că procedeul implică 3 etape, constând în: (1) fabricarea tuburilor fibroase și învelișului fibros prin electrofilare cu controlul temperaturii și umidității, a unor soluții de gelatină de pește cu concentrații de proteină 50-70% cu sau fără nanoparticule de diamant, utilizând colectori rotativi cu diametre convenabile și utilizând o mișcare paralelă a acului de injectare a soluției/dispersiei pe toată lungimea colectorului, (2) stabilizarea structurilor fibroase pentru evitarea dizolvării în medii apoase prin reticularea proteinei din structurile fibroase tubulare direct pe colector urmată de, în cazul sistemului cu înveliș protector, reticularea meșei rulate pe tuburile dispuse intraluminal și (3) dimensionarea și asamblarea structurilor, astfel încât să se poată fabrica substituenți nervoși cu arhitectura dorită, inclusiv similară cu cea obținută din analiza imagistică a nervului lezat. Pentru varianta de substituent **tip tub de ghidare multicanal**, tuburile cu diametre potrivite se înserează într-un tub manta realizat din gelatină de pește, mai lung cu 5 mm decât canalele interioare, cu lungime mai mică cu 1 mm la ambele capete față de lungimea defectului nervos. În cazul **învelișului umplut intraluminal cu canale**, tuburile cu lungime mai mică cu 1 mm la ambele capete lungimii defectului nervos sunt aranjate împreună, iar apoi mănunchiul se acoperă cu o meșă fibroasă de gelatină de pește, mai lungă cu 5 mm la ambele capete.



FIGURI

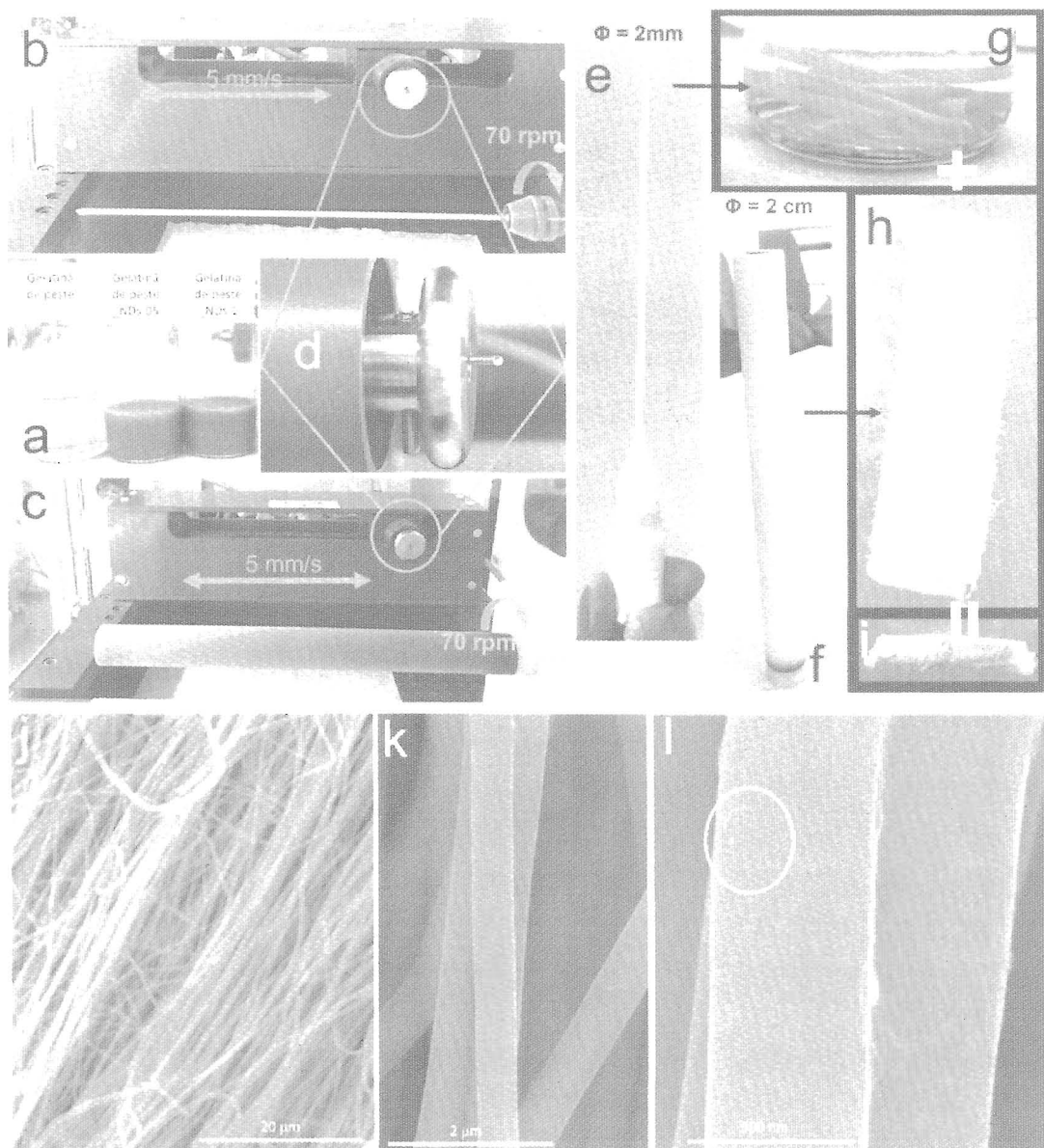


Figura 1. Imagini reprezentative din timpul etapei de fabricare: a – exemple de soluție precursoră de gelatină de pește de concentrație 70% și suspensii precursoră cu nanodiamant în concentrații de 0.5% și 1%; b,c – exemple de colectori cu diametre diferite (b- diametru 2 mm și c- diametru 2 cm) montați în incinta echipamentului de electrospinning; d – duza în care este fixat acul prin care precursorul este expulzat; e – colectorul cu diametrul de 2 mm acoperit cu fibre; f – colectorul cu diametrul de 2 cm acoperit cu fibre; g – exemple de tuburi cu perete exclusiv din fibre obținute folosind colectorul de la punctul (e); h – meșă fibroasă după ce a fost detașată de colectorul de 2 cm; i – exemplu de construct de tip înveliș umplut intraluminal cu canale obținut folosind tuburi de la punctul (g) și o parte din meșă fibroasă de la punctul (h); exemple de aspect microstructural al fibrelor din structurile electrofilate (analiză

de microscopie electronică de baleiaj). j – fibre de gelatină; k,l – fibre din gelatină nanostructurată cu 1% nanoparticule de diamant (cercul alb indică prezența unor nanoparticule). Se poate observa că fibrele sunt omogene, cu diametre de aproximativ 500 nm.

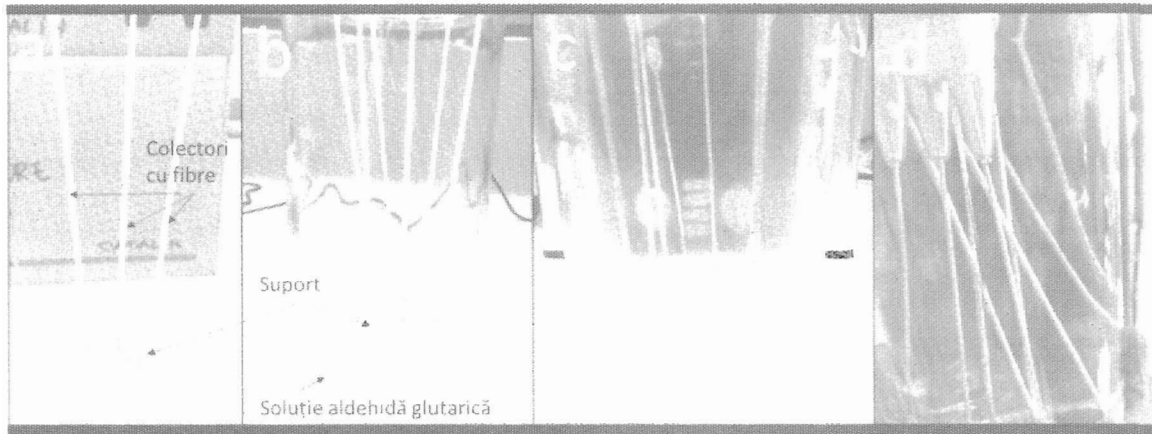


Figura 2. Aspecte preparative reprezentative din timpul etapei de reticulare. a – exemple de tuburi din fibre electrofilate din gelatină de pește, depuse pe colectori cu diametrul de 1.6 mm, fixați pe suporturi de plastic pentru etapa de reticulare; b – exemple de tuburi din fibre electrofilate din gelatină de pește, pe colectori fixați pe suporturi din plastic, în camera de reticulare, la începutul procesului de reticulare – ziua 1; c - exemple de tuburi din fibre electrofilate pe colectori fixați pe suporturi din plastic, în camera de reticulare, în timpul procesului de reticulare – ziua 7 – se remarcă modificarea culorii, tuburile devin gălbui după reticulare; d - exemple de tuburi din fibre electrofilate, reticulate, în timpul spălării cu apă distilată – se observă că tuburile nu se dizolvă.

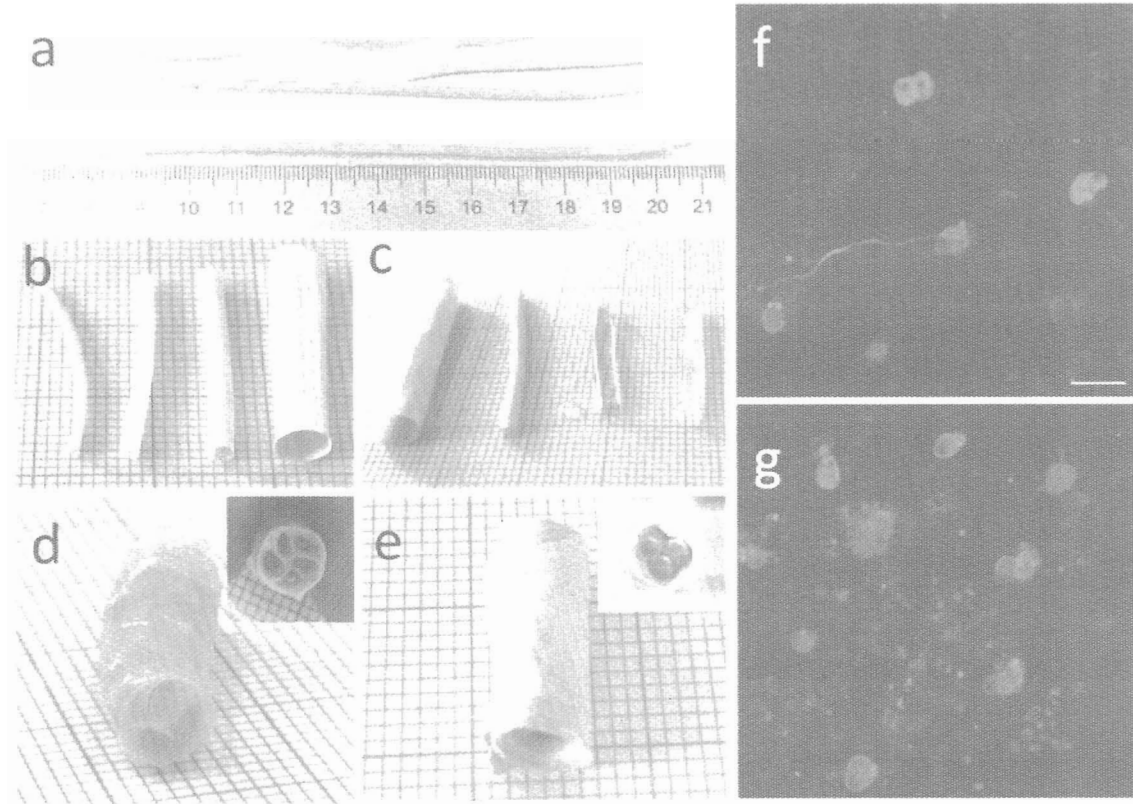


Figura 3. Exemple de structuri tubulare obținute prin electrofilare. a – tuburi electrofilate pe bază de gelatină de pește, hidratate - dimensionarea lungimii după interes; b, c- exemple de structuri tubulare fibroase de diametre diferite (1.4 mm - 4 mm) în stare deshidratată (b) și în stare hidratată (c); d, e – exemple de construct de tip multicanal obținute utilizând un înveliș fibros din gelatină de pește, încărcat cu canale tubulare fibroase din gelatină cu nanoparticule de diamant în stare hidratată (d); în stare deshidratată (e); Cultură primară de neuroni din ganglionii spinali la contactul cu substrat fibros pe bază de gelatină (f) și gelatină nanostructurată cu nanoparticule de diamant (g) (Corpii neuronali și prelungirile acestora au fost marcați cu β -III-tubulină în roșu, iar nucleii au fost marcați cu Hoechst 33342 în albastru).

[Handwritten signature]

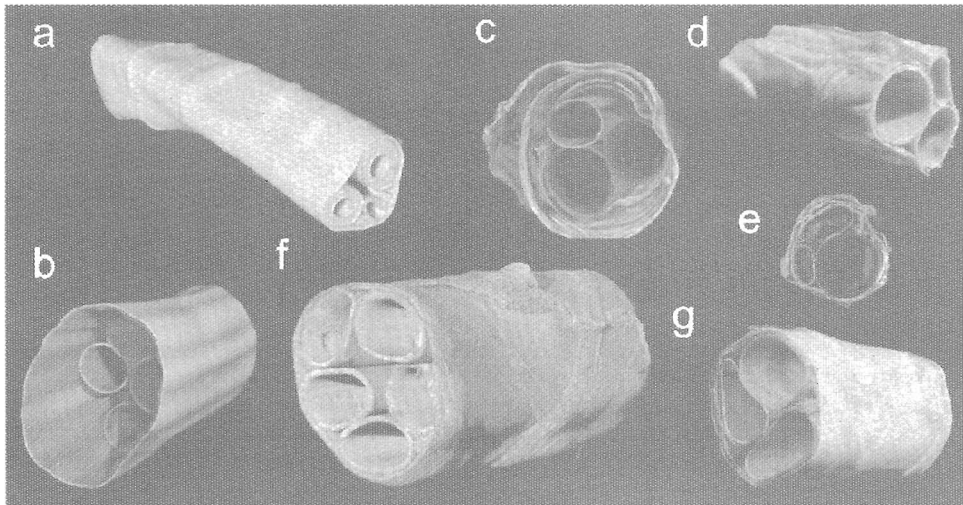


Figura 4. Exemple de constructe multicanal obținute prin cele două metode: a, b- constructe de tip tub de ghidare multicanal și c,d,e,f,g - construct de tip înveliș umplut intraluminal cu canale

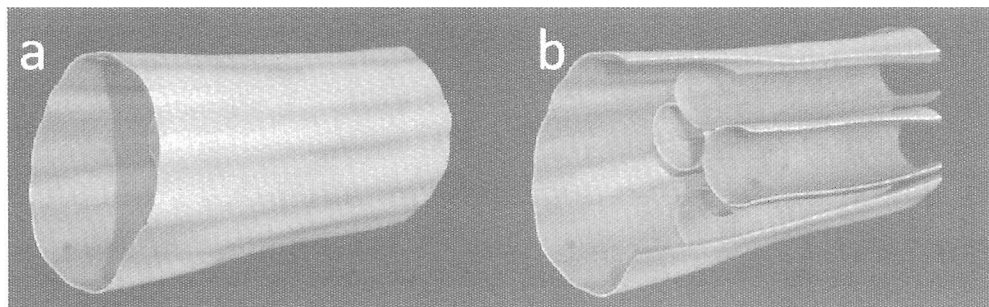


Figura 5. Exemple de imagini de tomografie micro-computerizată ce descriu arhitectura unui construct de tip tub de ghidare multicanal: a – vedere laterală generală; b – secțiune longitudinală. Se confirmă dispunerea longitudinală, paralelă, a tuburilor dispuse intraluminal în tubul manta, care este mai lung față de tuburile interioare, pentru a putea asigura montarea pe bonturile nervului lezat.

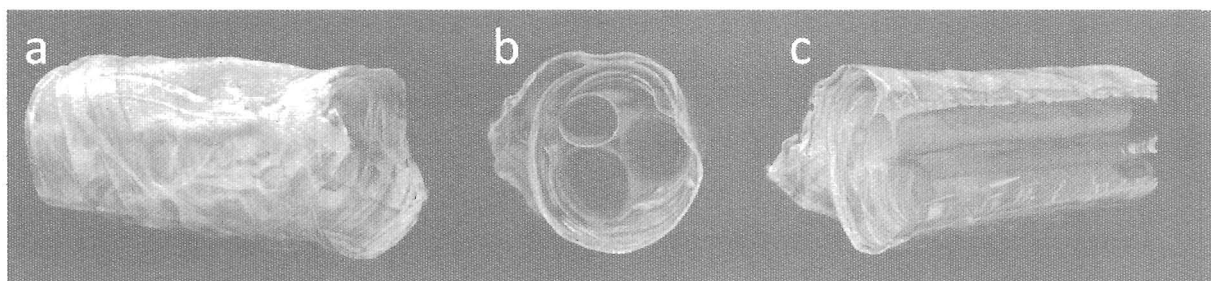


Figura 6. Exemple de imagini de tomografie micro-computerizată ce descriu arhitectura constructului de tip înveliș umplut intraluminal cu canale: a – vedere generală din lateral, b – vedere transversală – se observă intraluminal 3 tuburi; c – secțiune longitudinală ce confirmă dispunerea tuburilor interioare paralel cu axa longitudinală a constructului.

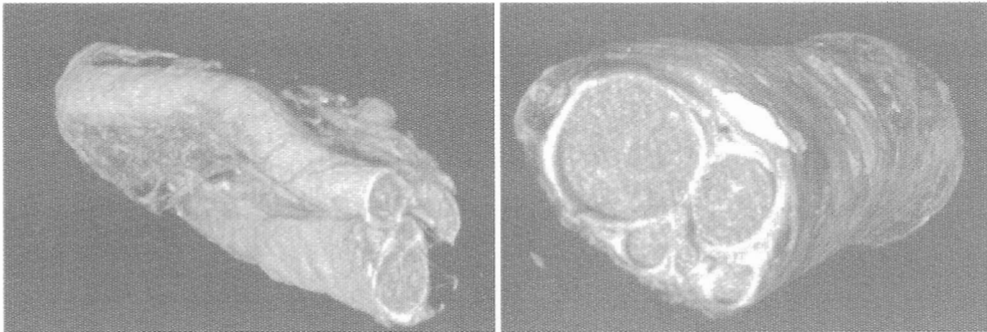


Figura 7. Exemple de imagini de tomografie micro-computerizată ce descriu anatomia unui nerv sciatic de șobolan (diametru mediu 2 mm); se observă ramurile nervului, cu diametre diferite.

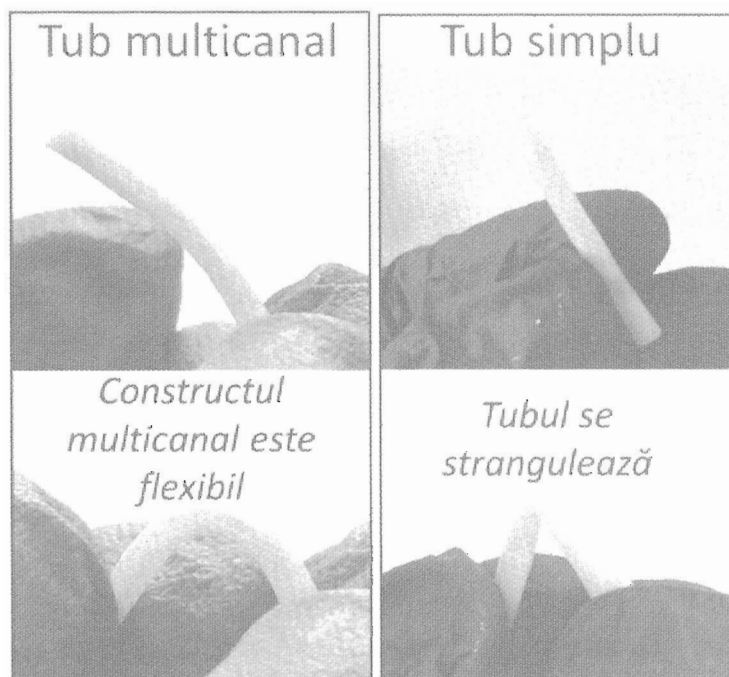


Figura 8. Exemple de comparație a rezistenței la strangulare a unei structuri de tip tub multicanal hidratat (fabricat conform exemplului 3), față de un tub simplu, monocanal, hidratat, folosit ca martor.

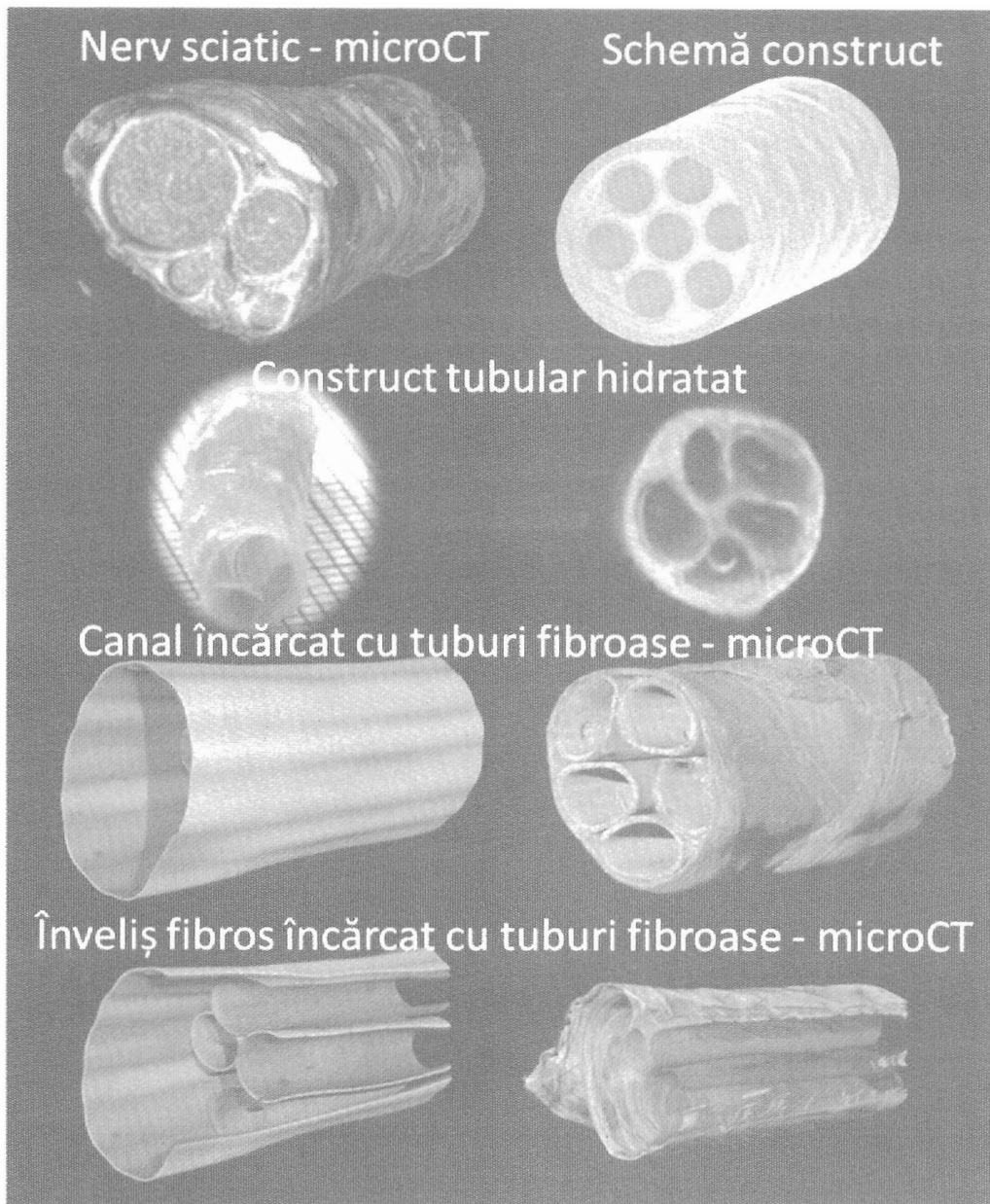


Figura 9. Pt rezumat