

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391986 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.10(22) Дата подачи заявки
2022.11.10(51) Int. Cl. A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
D04H 1/728 (2012.01)(54) БИОНИЧЕСКИЙ ТРАНСПЛАНТАТ НЕРВА И СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ
ТРАНСПЛАНТАТА НЕРВА

(31) 202211269678.0

(32) 2022.10.18

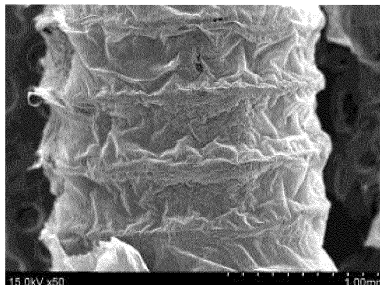
(33) CN

(86) PCT/CN2022/131041

(87) WO 2023/179045 2023.09.28

(71) Заявитель:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)(72) Изобретатель:
Гу Сяосун, Дай Сю, Гу Синчжун, Гун
Лэйлэй, Ли Мэйюань, Сунь Хуалинь,
Цянь Тяньмэй, Ван Хункуй, Сюй Лай
(CN)(74) Представитель:
Забегаета У.Г., Мурашев П.М.,
Давыдова Е.Л. (RU)

(57) Изобретение раскрывает трансплантат нерва и способ изготовления трансплантата нерва. Бионический трансплантат нерва включает спиральный каркас, нановолокнистую мембрану, направляющие волокна и hBMSC-ECM. Нановолокнистая мембрана нанесена на поверхность спирального каркаса, а направляющее волокно и hBMSC-ECM помещены в полость спирального каркаса. Более того, сырьем для спирального каркаса, нановолокнистой мембраны и направляющего волокна является хитозан. Способ изготовления включает метод литья в форму для изготовления спирального каркаса, метод электропрядения для нанесения нановолокнистой мембраны на поверхность спирального каркаса и метод шаблона для подготовки направляющих волокон. Направляющие волокна и hBMSC-ECM помещены внутрь спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной. Представленный в изобретении способ является простым и недорогим. Кроме того, изготовленный бионический трансплантат нерва не только обеспечивает достаточную механическую поддержку, хорошую податливость и направление, но также обеспечивает достаточное пространство для передачи питательных веществ для регенерации нерва. Также трансплантат нерва предоставляет элементы микроокружения для регенерации нервов, обладает хорошей биосовместимостью и низкой иммуногенностью.



A1

202391986

202391986

A1

Бионический трансплантат нерва и способ изготовления трансплантата нерва

1. Область техники

Данное изобретение относится к области техники биоматериалов и, в частности, относится к бионическому нервному трансплантату и способу его изготовления.

2. Уровень техники

Дефект периферических нервов является распространенным клиническим заболеванием с неблагоприятным прогнозом и инвалидностью, что серьезно влияет на качество жизни пациентов. В настоящее время автотрансплантация по-прежнему является «золотым стандартом» по восстановлению дефектов периферических нервов. Однако ограниченные источники донорских нервов, отсутствие функции нерва в донорском участке, несоответствие размеров между нервом донора и нервом реципиента и неправильная функция пучка нерва ограничивают клиническое применение аутологичной трансплантации нерва.

Материалы крепежей материала обладают преимуществами регулируемого структурного размера, большого количества источников материала и хорошей технологичности, что обеспечивает новый метод лечения для восстановления поврежденных нервов. Благодаря достижениям в нано технологиях, технологии электроспиннинга, технология 3D-печати и технологии разделения фаз и т.д. может быть сконструирован нервный трансплантат бионической ткани с пористой структурой, упорядоченной структурой, многоканальной структурой, многослойной структурой или разветвленной структурой. За последние 20 лет при конструировании нервных трансплантатов большое количество исследований показало, что инженерные каркасы нервной ткани с направленной

микроструктурой могут индуцировать направленное расположение и рост нервных клеток. (Rao Feng. Выровненный гидрогель нановолокон хитозана с привитыми пептидами, имитирующими биоактивный нейротрофический фактор головного мозга и фактор роста эндотелия сосудов, восстанавливает отдаленные дефекты седалищного нерва у крыс. Тераностика, 2020, 10(4): 1590-1603). Хотя исследователи добились определенного прогресса в создании бионических тканевых трансплантатов нервов в последние годы, все еще существуют некоторые проблемы в реконструкции их микроокружения. Более того, не существует стандартного протокола реконструкции, который может обеспечить идеальный баланс между стабильностью микросреды и функциональной реконструкцией бионических нервных трансплантатов.

Природные биоматериалы обладают такими преимуществами, как хорошая биосовместимость, легкое всасывание и способность стимулировать адгезию и пролиферацию клеток, и широко используются при изготовлении трансплантатов для регенерации нервов. Однако плохие механические свойства природных биоматериалов могут легко вызвать перелом и коллапс (проседание), что сильно влияет на стабильность микроокружения регенерируемого нерва. Хорошие механические свойства необходимы для поддержания стабильности микроокружения. Чтобы обеспечить достаточную механическую поддержку для реконструкции микроокружения регенеративного нерва, можно использовать метод добавления сшивающих агентов или синтетических полимеров с отличными механическими свойствами для улучшения механических свойств нервных трансплантатов. Однако сшивающие агенты, особенно химические сшивающие агенты, очень токсичны, и их трудно удалить. Кроме того, биосовместимость синтетических полимеров, таких как поликапролактон (PCL) или полимолочная кислота (PLA), значительно уступает природным материалам, которые не способствуют реконструкции бионической микросреды и

восстановлению функции нервов. Сейчас на повестке дня стоит вопрос, как подготовить трансплантаты нервов с превосходными механическими свойствами и хорошей биосовместимостью. Этот вопрос необходимо решить при конструировании бионических трансплантатов нервов.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является преодоление недостатков предшествующего уровня техники и создание бионического трансплантата нерва и способа его изготовления, который является простым и недорогим, а подготовленный бионический трансплантат нерва обеспечивает достаточную механическую поддержку. Он также обеспечивает достаточно места для передачи питательных веществ, для восстановления нервов, обладает хорошей биосовместимостью и низкой иммуногенностью.

В настоящем изобретении присутствует следующая техническая схема:

Первым объектом является бионический нервный трансплантат, включающий спиральный каркас, нановолокнистую мембрану, направляющее волокно и внеклеточный матрикс мезенхимального ствола костного мозга человека (hBMSC-ECM), а нановолокнистая мембрана покрывает поверхность спирального каркаса. Направляющее волокно и hBMSC-ECM встроены в полость спирального каркаса, а материалы спирального каркаса, нановолокнистой мембраны и направляющего волокна представляют собой хитозан.

Внутренний диаметр спирального каркаса составляет от 1 до 6 мм, длина от 1 до 6 см, шаг от 0,5 до 5 мм.

Длина направляющих волокон составляет от 1 до 3 см, а их количество от 3 до 28.

Вторым объектом предложен способ изготовления бионического

трансплантата нерва, являющегося первым объектом, который включает следующие этапы:

используя хитозан в качестве сырья, спиральный каркас изготавливают методом литья в форму;

используя хитозан в качестве сырья, слой нановолокнистой мембраны наносят на поверхность спирального каркаса методом электропрядения (электроспиннинга) для получения спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной;

используя хитозан в качестве сырья, направляющие волокна изготавливают темплатным методом;

направляющим волокном и hBMSC-ECM заполняют пространство внутри спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной, для получения бионического трансплантата нерва.

Более того, на этапе подготовки спирального каркаса:

приготавливают раствор хитозана с концентрацией от 4 мас. % до 7 мас. %;

раствор хитозана заливают в пресс форму с резьбовым стержнем;

формы внутреннего сердечника с раствором хитозана помещают в 5-20% раствор NaOH для затвердевания и придания формы, а затем промывают водой, сушат и извлекают из пресс формы для получения полуфабриката спирального каркаса;

полуфабрикат спирального каркаса ацетируют путем погружения в раствор уксусного ангидрида, содержащий 5 мас. % метанола, на 6 часов, затем, используя 5-20% раствор NaOH, фиксируют при комнатной температуре в течение 12 часов, промывают и высушивают, чтобы получить спиральный каркас.

Кроме того, этап подготовки спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной на поверхности, включает:

готовят смешанный раствор хитозана и полиэтиленоксида с общей концентрацией от 3 мас. % до 5 мас. %, при этом массовое отношение хитозана к полиэтиленоксиду составляет 100:5-20;

смешанный раствор хитозана и полиэтиленоксида помещают в электропрядильное устройство, спиральный каркас помещают на трубчатое приемное устройство для электропрядения, на поверхность спирального каркаса наносят слой нановолокнистой мембраны;

спиральный каркас, покрытый нановолокнистой мембраной, отверждают и формируют в 5-20% растворе NaOH, затем полиэтиленоксид удаляют промывкой водой, и получают спиральную трубку, покрытую нановолокнистой мембраной на поверхности;

при этом установочные параметры электроспиннинга включают: напряжение от 5 до 35 кВ, расход от 0,1 до 2 мл/ч, расстояние приема от 5 до 35 см, скорость вращения приемного устройства от 5 до 150 об/мин.

Кроме того, на этапе подготовки направляющего волокна:

приготавливают раствор хитозана с концентрацией от 4 мас. % до 7 мас. %;

раствор хитозана заливают в пресс форму с канавками;

помещают форму с раствором хитозана в 5-20% раствор NaOH для затвердевания и придания формы, затем промывают водой, высушивают и извлекают из пресс формы, чтобы получить направляющее волокно.

Канавка пресс формы включает соединенные внутреннюю канавку и внешнюю канавку. Форма поперечного сечения внутренней канавки и внешней канавки представляет собой форму перевернутого символа. Ширина внешней канавки от 100 до 500 мкм, высота внешней канавки от 20 до 50 мкм. Ширина внутренней канавки равна высоте внешней канавки, высота внутренней канавки составляет от 25 до 240 мкм. Ширина внешней канавки в два раза больше суммы высоты внутренней канавки и ширины внутренней канавки, а длина внутренней

канавки и внешней канавки одинакова и составляет от 1 до 3 см.

Кроме того, на этапе подготовки hBMSC-ECM:

в чашку Петри добавляют реагент мезенхимальных стволовых клеток (MSC), разбавленных в 100 раз раствором DPBS;

восстановленные человеческие мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (hBMSCs) добавляют в чашку для культивирования с покрытием, добавляют полную среду и культивируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, при этом среду меняют каждые 2 дня;

когда насыщение клеток достигает 80%, заменяют полной средой, содержащей аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), и меняют среду каждые 2 дня в темноте, через 10 дней питательную среду удаляют, промывают DPBS более 3 раз, а затем обрабатывают сверхчистой водой при 37°C в течение 10 минут, затем удаляют сверхчистую воду, добавляют клеточный лизат для реакции в течение 5 минут и промывают DPBS, после промывки проводят реакцию с DNA фермент (0,1 мг/мл) при 37°C в течение 2 часов, затем промывают DPBS и хранят при 4°C.

По сравнению с известным методом, полезные эффекты настоящего изобретения заключаются в следующем.

(1) Бионический нервный трансплантат, представленный в настоящем изобретении, включает спиральный каркас, нановолокнистую мембрану, направляющие волокна и hBMSC-ECM. Нановолокнистая мембрана нанесена на поверхность спирального каркаса, чтобы обеспечить достаточную механическую поддержку и хорошую податливость бионического нервного трансплантата. Более того, это обеспечивает достаточно места для перемещения регенеративных питательных веществ нервов. Проводниковые волокна и hBMSC-ECM встроены в полость спирального каркаса, что играет хорошую роль в индукции. Это способствует направленному расположению и росту нервных клеток и

обеспечивает элементы микросреды для регенерации нервов, что способствует восстановлению поврежденных нервов.

(2) В бионическом трансплантате нерва по настоящему изобретению исходным материалом спирального каркаса, нановолокнистой мембраны и направляющего волокна является хитозан, который представляет собой разлагаемый природный материал. Он обладает преимуществами хорошей биосовместимости и низкой иммуногенности, что помогает бионическому нервному трансплантату автоматически и постепенно деградировать в процессе восстановления нерва. Кроме того, продукты деградации полностью поглощаются организмом человека, избегая реакции иммунной ткани.

(3) В способе изготовления бионического нервного трансплантата, представленном в настоящем изобретении, используется литье в форму для изготовления спирального каркаса. Кроме того, используется метод электропрядения для покрытия слоя нановолокнистой мембраны на поверхности спирального каркаса. Комбинация литья в форму и технологии электропрядения (электроспиннинга) позволяет бионическому нервному трансплантату одновременно обеспечивать механическую поддержку и перемещение питательных веществ для регенерации нервов, а также может уменьшить общую массу бионического нервного трансплантата и значительно уменьшить иммунное отторжение.

(4) Способ изготовления бионического нервного трансплантата, предусмотренный настоящим изобретением, включает литье в форму, метод шаблона, электропрядение (электроспиннинг) и другие технологии, которые просты в использовании и легко реализуемы, недорогие, а производственный процесс является безопасным и контролируемым.

Описание прилагаемых чертежей

Фиг. 1 представляет собой изображение нановолокнистой мембраной из примера осуществления 1, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа (SEM).

Фиг. 2 представляет собой изображение SEM спиральной трубки, покрытой мембраной из нановолокнистой мембраны, о которой упоминается в примере осуществления 1.

Фиг. 3 представляет собой схематический вид поперечного сечения канавки формы для изготовления направляющих волокон в примере осуществления.

Фиг. 4 представляет собой изображение направляющего волокна, полученного посредством SEM (сканирующего электронного микроскопа), в примере осуществления 2.

Фиг. 5 представляет собой содержание hBMSCs-ECM до и после децеллюляризации в примере осуществления 2.

Фиг. 6 представляет собой окрашенное HE изображение спирального каркаса, деградировавшего изнутри в течение 6 недель после ацетилирования в примере осуществления 2.

Фиг. 7 представляет собой иммунофлуоресцентную картину дистального конца регенерированного нерва и плотность аксонов дистального конца регенерированного нерва, полученную через 8 недель после того, как нервный трансплантат восстановил 10-миллиметровую брешь седалищного нерва у крыс в примере осуществления 2 (TEN: бионическая группа нервов, AUTO: группа аутологичных нервов, SHAM: группа фиктивной хирургии, то же самое ниже).

Фиг. 8 представляет собой полученное посредством просвечивающей электронной микроскопии (масштабная линейка: слева 50 мкм, справа 0,2 мкм) изображение поперечных срезов регенерированных нервов, которые были получены в примере осуществления 2 через 12 недель после операции, и гистограммы слоев миелиновой оболочки и толщины миелиновой оболочки

среди трех группы.

Фиг. 9 представляет собой график потенциала действия сложной мышцы, скорости проведения, проксимальной амплитуды и дистальной амплитуды, полученный через 12 недель после операции в примере осуществления 2;

Фиг. 10 представляет собой диаграмму анализа походки CatWalk через 12 недель после операции в примере осуществления 2.

Конкретные примеры осуществления

Данное изобретение будет дополнительно описано ниже вместе с прилагаемыми чертежами. Следующие примеры осуществления используются только для более ясной иллюстрации технических решений данного изобретения, но не для ограничения объема охраны данного изобретения.

Пример осуществления 1

(1) Растворяют хитозан в 2% растворе уксусной кислоты, перемешивают в течение 30 минут до полного растворения и получают раствор хитозана с концентрацией 4 мас.%. Затем раствор хитозана заливают в форму с внутренним стержнем с резьбой длиной 1 см, диаметром 2 мм, шагом резьбы 1 мм и шириной линии 0,5 мм. Помещают форму с внутренним стержнем с раствором хитозана в 5% раствор NaOH для затвердевания и формирования, промывают водой после формования, высушивают и извлекают из пресс формы для получения полуфабриката спирального карокаса. Полуфабрикатный спиральный каркас вводят путем погружения на 6 часов в раствор уксусного ангидрида, содержащего 5 мас. % метанола. Затем фиксируют 5% раствором NaOH при комнатной температуре в течение 12 часов, промывают и высушивают, чтобы получился спиральный каркас.

(2) Соответствующее количество полиэтиленоксида растворяют в 50% растворе уксусной кислоты и добавляют порошок хитозана для приготовления

раствора для электропрядения. Конечная общая концентрация хитозана и полиэтиленоксида составляет 3 мас. %, а массовое соотношение хитозана и полиэтиленоксида составляет 100:20. Помещают спиральный каркас на вращающееся трубчатое приемное устройство, вводят раствор для электропрядения (электроспиннинга) в шприц электропрядильной машины, устанавливают напряжение равным 5 кВ, скорость потока равным 0,1 мл/ч, расстояние приема равным 5 см и скорость вращения приемного устройства равной 5 об/мин и проводят электропрядение. На поверхность спирального каркаса (как показано на фиг. 1) наносят слой нановолокнистой мембраны (как показано на фиг. 1), чтобы получить спиральную трубку (как показано на фиг. 2), покрытую нановолокнистой мембраной на поверхности.

(3) Заливают раствор хитозана, полученный на этапе (1), в форму с канавками, канавки включают соединенные внутренние канавки и внешние канавки. Форма их поперечного сечения показана на фиг. 3, длина канавки 1 см, ширина внешней канавки 100 мкм. Высота внешней канавки s составляет 20 мкм, внутренняя канавка расположена посередине внешней канавки, ширина внутренней канавки равна s , высота внутренней канавки b составляет 40 мкм. Более того, ширина внешней канавки в два раза больше суммы высоты внутренней канавки и ширины внутренней канавки. Форму с раствором хитозана помещают в 10% раствор NaOH для затвердевания. После формования промывают водой, после сушки извлекают из формы для получения направляющих волокон.

(4) В чашку Петри добавляют адгезивный реагент MSC, разбавленный в 100 раз раствором DPBS. Также добавляют (сажают) восстановленные hBMSC в чашку Петри с покрытием, добавляют полную среду (основная питательная среда NutriStem® MSC XF: добавка NutriStem® MSC XF = 500 мл: 3 мл) и культивируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, среду меняют каждые 2 дня.

Когда насыщение клеток достигает примерно 80%, заменяют полную среду, содержащую аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), и меняют среду каждые 2 дня в темноте. Через 10 дней питательную среду сливают, промывают DPBS более 3 раз, моют сверхчистой водой при 37°C в течение 10 мин. После удаления сверхчистой воды добавляют клеточный лизат (3% TritonX-100, 2% додецилсульфат натрия) для реакции в течение 5 минут. Затем промывают DPBS и проводят реакцию с DNA ферментом (0,1 мг/мл) при 37°C в течение 2 часов после промывки. В итоге, децеллюляризованные клетки промывают DPBS для получения hBMSC-ECM.

(5) 28 направляющих волокон и hBMSC-ECM помещают внутрь спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной. В итоге получают бионический нервный трансплантат с направляющим волокном внутри стенки спирального каркаса.

Пример осуществления 2

(1) Растворяют хитозан в 2% растворе уксусной кислоты, перемешивают в течение 2 часов до полного растворения и получают раствор хитозана с концентрацией 6 мас.%. Затем, раствор хитозана заливают в форму с внутренним стержнем с резьбой длиной 4 см, диаметром 2 мм, шагом резьбы 1 мм и шириной линии 0,5 мм. Помещают форму с внутренним стержнем с раствором хитозана в 5% раствор NaOH для затвердевания и формирования, промывают водой после формования, высушивают и извлекают из пресс формы для получения полуфабриката спирального каркаса. Полуфабрикат спирального каркаса вводят путем погружения на 6 часов в раствор уксусного ангидрида, содержащего 5 мас. % метанола. Затем фиксируют 10% раствором NaOH при комнатной температуре в течение 12 часов, промывают и высушивают, чтобы получился спиральный каркас.

(2) Соответствующее количество полиэтиленоксида растворяют в 50%

растворе уксусной кислоты и добавляют порошок хитозана для приготовления раствора для электропрядения. Конечная общая концентрация хитозана и полиэтиленоксида составляет 4 мас. %, а массовое соотношение хитозана и полиэтиленоксида составляет 100:20. Помещают спиральный каркас на вращающееся трубчатое приемное устройство, вводят раствор для электропрядения (электроспиннинга) в шприц электропрядильной машины, устанавливают напряжение равным 20 кВ, скорость потока равной 0,1 мл/ч, расстояние приема равным 15 см и скорость вращения приемного устройства равной 100 об/мин и проводят электропрядение. На поверхность спирального каркаса наносят слой нановолокнистой мембраны, чтобы получить спиральную трубку, покрытую нановолокнистой мембраной на поверхности.

(3) Раствор хитозана, полученный на этапе (1), заливают в пресс форму с канавками. Форма канавок такая же, как в примере осуществления 1. Длина канавки составляет 3 см, $a = 250$ мкм, $b = 100$ мкм и $c = 50$ мкм. Помещают форму с раствором хитозана в 10% раствор NaOH для затвердевания. Промывают водой после формования, извлекают из пресс формы после сушки, чтобы получить направляющие волокна (как показано на фиг. 4).

(4) В чашку Петри добавляют адгезивный реагент MSC, разбавленный в 100 раз раствором DPBS. Также добавляют (сажают) восстановленные hBMSC в чашку Петри с покрытием, добавляют полную среду (основная питательная среда NutriStem® MSC XF: добавка NutriStem® MSC XF = 500 мл: 3 мл) и культивируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, среду меняют каждые 2 дня. Когда насыщение клеток достигает примерно 80%, заменяют полную среду, содержащую аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), и меняют среду каждые 2 дня в темноте. Через 10 дней питательную среду сливают, промывают DPBS более 3 раз, моют сверхчистой водой при 37°C в течение 10 мин. После удаления сверхчистой воды добавляют клеточный лизат (3% TritonX-100, 2%

додецилсульфат натрия) для реакции в течение 5 минут. Затем промывают DPBS и проводят реакцию с DNA ферментом (0,1 мг/мл) при 37°C в течение 2 часов после промывки. В итоге, децеллюляризованные клетки промывают DPBS для получения hBMSC-ECM.

(5) Пять направляющих волокон и hBMSC-ECM помещают внутрь спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной. В итоге получают бионический нервный трансплантат с направляющим волокном внутри стенки спирального каркаса.

hBMSC-ECM в бионическом трансплантате нерва, полученном в этом примере осуществления, содержит фибронектин, ламинин и коллаген 1 и другие биологически активные компоненты, способствующие регенерации нервов, в них практически не обнаруживается DNA (как показано на фиг. 5). После ацетилирования полуфабриката спирального каркаса степень ацетилирования увеличивается с 4,73% до 74,77%, что обеспечивает хорошую способность к разложению внутри (как показано на фиг. 6). Диаметр электроформованной нановолокнистой мембраны, обернутой внешним слоем, составляет около 100 нм.

Бионический трансплантат нерва, приготовленный в этом примере осуществления, использовали для восстановления 10-мм дефекта седалищного нерва крысы. Об этом свидетельствуют результаты иммунофлуоресцентного анализ (как показано на фиг. 7) и изображения дистального отдела восстановленного нерва через 8 недель после операции, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа (как показано на фиг. 8). Бионический трансплантат нерва имеет хорошую функцию стимулирования восстановления нервов, и его эффект стимулирования восстановления нервов эквивалентен эффекту аутологичных нервов. Функциональные тесты через 12 недель после операции (как показано на фиг. 9 и фиг. 10) показали, что

бионический нерв оказывает хороший восстанавливающий эффект на поврежденный нерв, и его восстанавливающий эффект аналогичен эффекту аутологичного нерва.

Пример осуществления 3

(1) Растворяют хитозан в 2% растворе уксусной кислоты, перемешивают в течение 4 часов до полного растворения и получают раствор хитозана с концентрацией 7 мас.%. Затем, раствор хитозана заливают в форму с внутренним стержнем с резьбой длиной 6 см, диаметром 5 мм, шагом резьбы 10 см и шириной линии 5 мм. Помещают форму с внутренним стержнем с раствором хитозана в 20% раствор NaOH для затвердевания и формирования, промывают водой после формования, высушивают и извлекают из пресс формы для получения полуфабриката спирального каркаса. Полуфабрикат спирального каркаса вводят путем погружения на 6 часов в раствор уксусного ангидрида, содержащего 5 мас. % метанола. Затем фиксируют 20% раствором NaOH при комнатной температуре в течение 12 часов, промывают и высушивают, чтобы получился спиральный каркас.

(2) Соответствующее количество полиэтиленоксида растворяют в 50% растворе уксусной кислоты и добавляют порошок хитозана для приготовления раствора для электропрядения. Конечная общая концентрация хитозана и полиэтиленоксида составляет 5 мас. %, а массовое соотношение хитозана и полиэтиленоксида составляет 100:5. Помещают спиральный каркас на вращающееся трубчатое приемное устройство, вводят раствор для электропрядения (электроспиннинга) в шприц электропрядильной машины, устанавливают напряжение равным 35 кВ, скорость потока равной 2 мл/ч, расстояние приема равным 35 см и скорость вращения приемного устройства равной 150 об/мин и проводят электропрядение. На поверхность спирального каркаса наносят слой нановолокнистой мембраны, чтобы получить спиральную

трубку, покрытую нановолокнистой мембраной на поверхности.

(3) Раствор хитозана, полученный на этапе (1), заливают в пресс форму с канавками. Форма канавок такая же, как в примере осуществления 1. Длина канавки составляет 1 см, $a = 500$ мкм, $b = 225$ мкм и $c = 50$ мкм. Помещают форму с раствором хитозана в 20% раствор NaOH для затвердевания. Промывают водой после формования, извлекают из пресс формы после сушки, чтобы получить направляющие волокна.

(4) В чашку Петри добавляют адгезивный реагент MSC, разбавленный в 100 раз раствором DPBS. Также добавляют (сажают) восстановленные hBMSC в чашку Петри с покрытием, добавляют полную среду (основная питательная среда NutriStem® MSC XF: добавка NutriStem® MSC XF = 500 мл: 3 мл) и культивируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, среду меняют каждые 2 дня. Когда насыщение клеток достигает примерно 80%, заменяют полную среду, содержащую аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), и меняют среду каждые 2 дня в темноте. Через 10 дней питательную среду сливают, промывают DPBS более 3 раз, моют сверхчистой водой при 37°C в течение 10 мин. После удаления сверхчистой воды добавляют клеточный лизат (3% TritonX-100, 2% додецилсульфат натрия) для реакции в течение 5 минут. Затем промывают DPBS и проводят реакцию с DNA ферментом (0,1 мг/мл) при 37°C в течение 2 часов после промывки. В итоге, децеллюляризованные клетки промывают DPBS для получения hBMSC-ECM.

(5) Три направляющих волокна и hBMSC-ECM помещают внутрь спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной. Это необходимо для получения бионического трансплантата нерва с направляющими волокнами в стенке спирального каркаса.

Приведенные выше описания являются лишь предпочтительными примерами осуществления настоящего изобретения, и следует отметить, что для

специалистов в данной области техники это возможно без отклонения от технического принципа настоящего изобретения. Также могут быть сделаны несколько улучшений и модификаций, и эти улучшения и модификации также следует рассматривать как объем охраны настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Бионический трансплантат нерва, содержащий спиральный каркас, нановолокнистую мембрану, направляющие волокна и hBMSC-ECM, при этом нановолокнистая мембрана нанесена на поверхность спирального каркаса, направляющие волокна и hBMSC-ECM встроены в полость спирального каркаса, а материалы спирального каркаса, нановолокнистой мембраны и направляющих волокон представляют собой хитозан.

2. Бионический трансплантат нерва по пункту 1, отличающийся тем, что внутренний диаметр спирального каркаса составляет от 1 до 6 мм, длина от 1 до 6 см, шаг от 0,5 до 5 мм.

3. Бионический трансплантат нерва по пункту 1, отличающийся тем, что длина проводниковых волокон составляет от 1 до 3 см, а количество – от 3 до 28.

4. Способ изготовления бионического трансплантата нерва по любому из пунктов 1-3, включающий следующие этапы:

используя хитозан в качестве сырья, спиральный каркас изготавливают методом литья в форму;

используя хитозан в качестве сырья, слой нановолокнистой мембраны наносят на поверхность спирального каркаса методом электропрядения, чтобы получить спиральную трубку, покрытую нановолокнистой мембраной;

используя хитозан в качестве сырья направляющие волокна изготавливают темплатным методом;

помещают направляющие волокна и hBMSC-ECM внутрь спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной, получая бионический трансплантат нерва.

5. Способ изготовления бионического трансплантата нерва по пункту 4, отличающийся тем, что на этапе подготовки спирального каркаса:

приготавливают раствор хитозана с концентрацией от 4 мас. % до 7 мас. %;

раствор хитозана заливают в форму с внутренним резьбовым стержнем;

помещают форму с внутренним стержнем с раствором хитозана в 5-20%

раствор NaOH для затвердевания и придания формы, затем его промывают водой, сушат и извлекают из формы, в итоге получают полуфабрикат спирального каркаса;

полуфабрикат спирального каркаса ацетируют путем погружения на 6 часов в раствор уксусного ангидрида, содержащий 5 мас. % метанола, затем используют 5-20% раствор NaOH, чтобы зафиксировать при комнатной температуре в течение 12 часов, промывают, сушат и получают спиральный каркас.

6. Способ изготовления бионического нервного трансплантата по пункту 4, отличающийся тем, что на этапе получения спиральной трубки, покрытой нановолокнистой мембраной:

смешанный раствор хитозана и полиэтиленоксида готовят с общей концентрацией в диапазоне от 3 мас. % до 5 мас. %, массовое соотношение хитозана и полиэтиленоксида составляет 100:5-20;

смешанный раствор хитозана и полиэтиленоксида помещают в электропрядильное оборудование, при этом спиральный каркас помещают на трубчатое приемное устройство, электроформируют и на поверхность спирального каркаса наносят слой нановолокнистой мембраны;

спиральный каркас, покрытый нановолокнистой мембраной, отверждают в 5-20% растворе NaOH, затем промывают водой для удаления полиэтиленоксида, получая спиральную трубку, покрытую нановолокнистой мембраной.

7. Способ изготовления бионического нервного трансплантата по пункту 6, отличающийся тем, что заданные параметры электроспиннинга (электропрядения) включают: напряжение от 5 до 35 кВ, скорость потока от 0,1 до 2 мл/ч, дальность приема от 5 до 35 см, скорость вращения приемного устройства от 5 до 150 об/мин.

8. Способ изготовления бионического трансплантата нерва по пункту 4, отличающийся тем, что на этапе подготовки направляющих волокон:

приготавливают раствор хитозана с концентрацией от 4 мас. % до 7 мас. %;

раствор хитозана заливают в пресс форму с канавками;

помещают форму с раствором хитозана в 5-20% раствор NaOH для затвердевания и придания формы, затем промывают водой, высушивают и извлекают из формы, чтобы получить направляющее волокно.

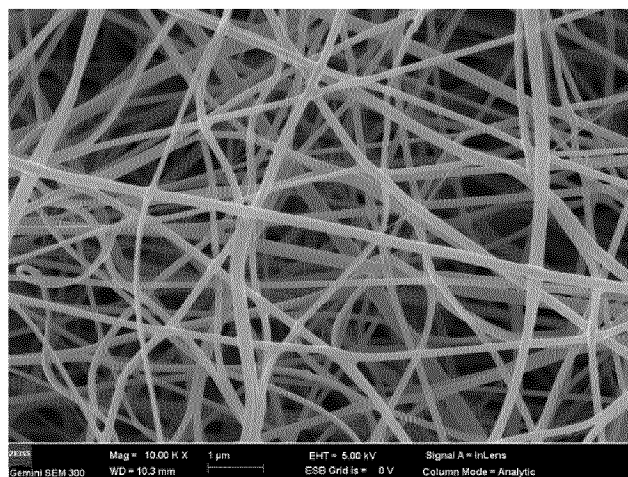
9. Способ изготовления бионического нервного трансплантата по пункту 8, отличающийся тем, что канавка формы содержит соединенные внутреннюю канавку и внешнюю канавку, форма поперечного сечения соединенных внутренней канавки и внешней канавки представляет собой форму перевернутого штифта, ширина внешней канавки составляет от 100 до 500 мкм, а высота внешней канавки составляет от 20 до 50 мкм, ширина внутренней канавки такая же, как и высота внешней канавки, а высота внутренней канавки составляет от 25 до 240 мкм, ширина внешней канавки в два раза больше суммы высоты внутренней канавки и ширины внутренней канавки, а длина внутренней канавки и внешней канавки одинакова и составляет от 1 до 3 см.

10. Способ изготовления бионического нервного трансплантата по пункту 4, отличающийся тем, что на этапе подготовки hBMSC-ECM:

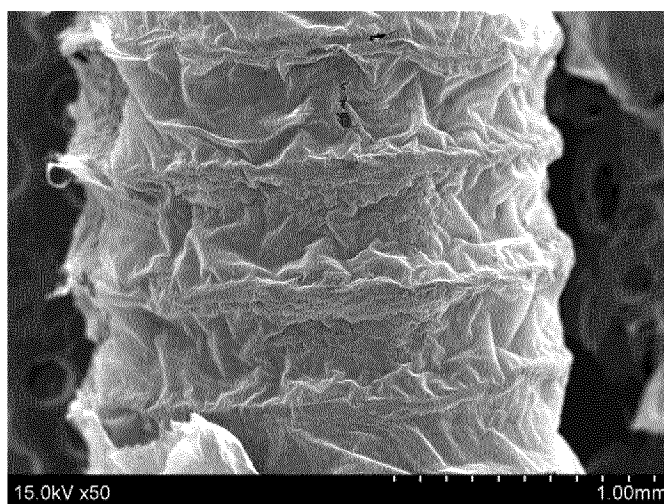
добавляют в чашку Петри (чашку для культивирования) реагент для прилипания MSC, разбавленный в 100 раз раствором DPBS;

после восстановления hBMSC сажают в чашку Петри с покрытием, добавляют полную среду и культивируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, среду заменяют каждые 2 дня;

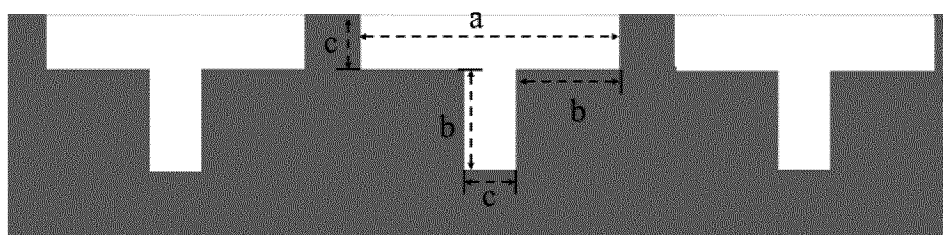
когда насыщение клеток достигает 80%, заменяют полной средой, содержащей аскорбиновую кислоту, и меняют среду каждые 2 дня в темноте, затем выбрасывают питательную среду через день, промывают DPBS более 3 раз, а затем промывают ультрачистой водой при 37° С в течение 10 минут, удаляют сверхчистую воду, добавляют клеточный лизат для реакции в течение 5 минут, промывают DPBS, реагируют с DNA ферментом при 37°C в течение 2 часов после промывки, наконец, промывают DPBS и хранят при 4°C.



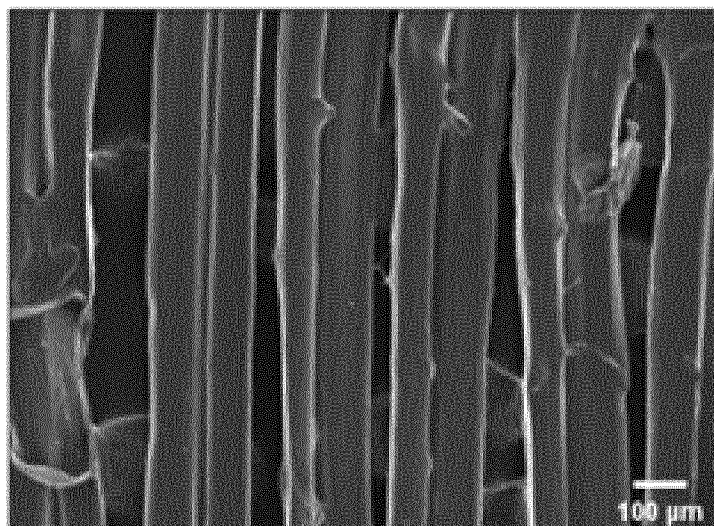
Фиг. 1



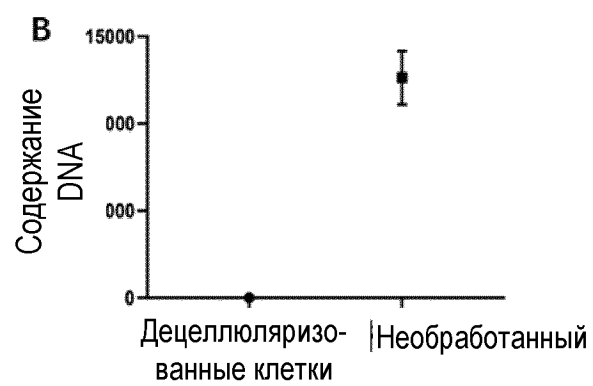
Фиг. 2



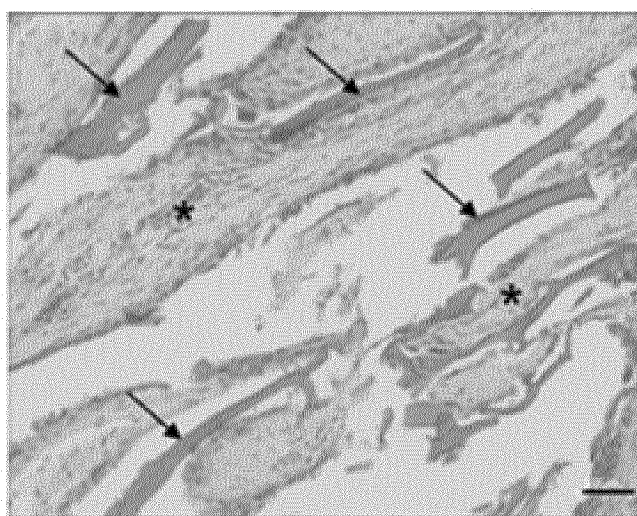
Фиг. 3



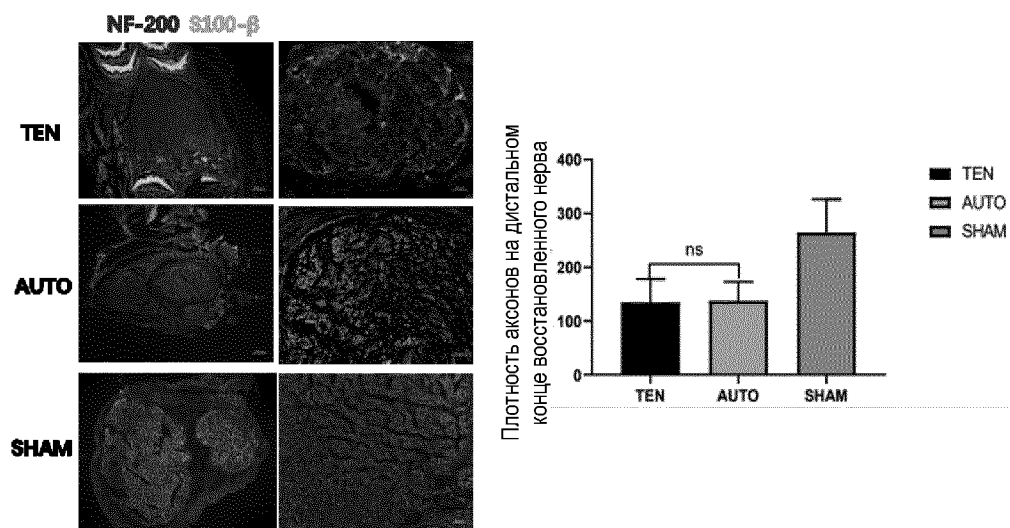
Фиг. 4



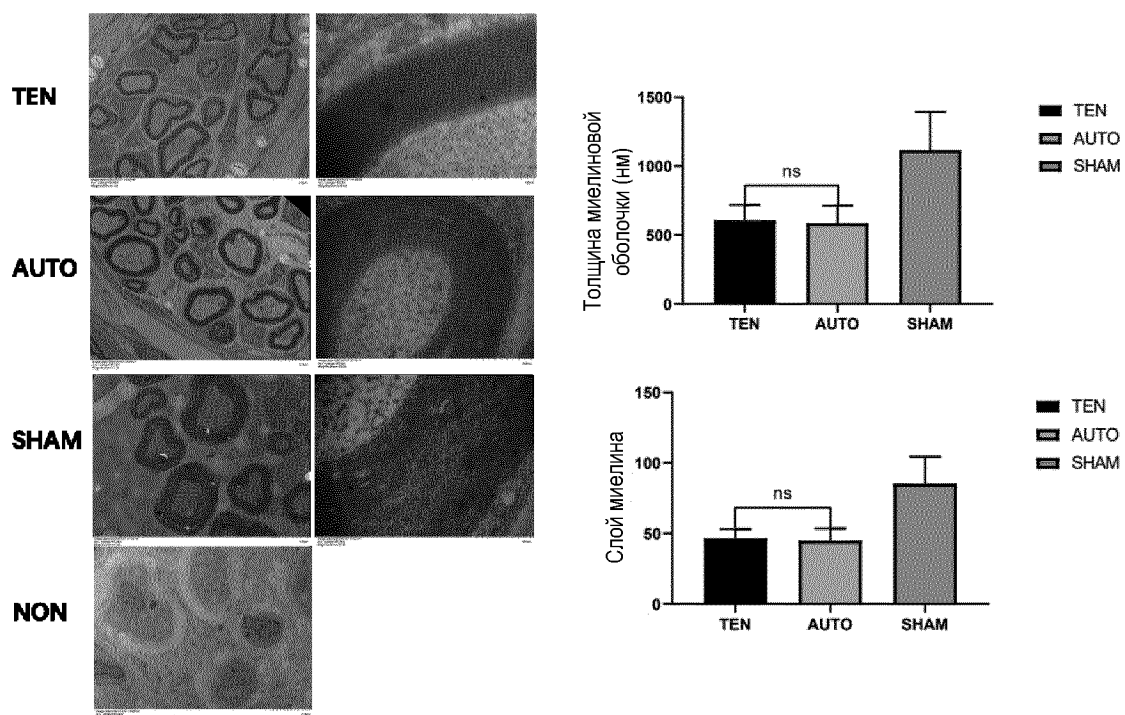
Фиг. 5



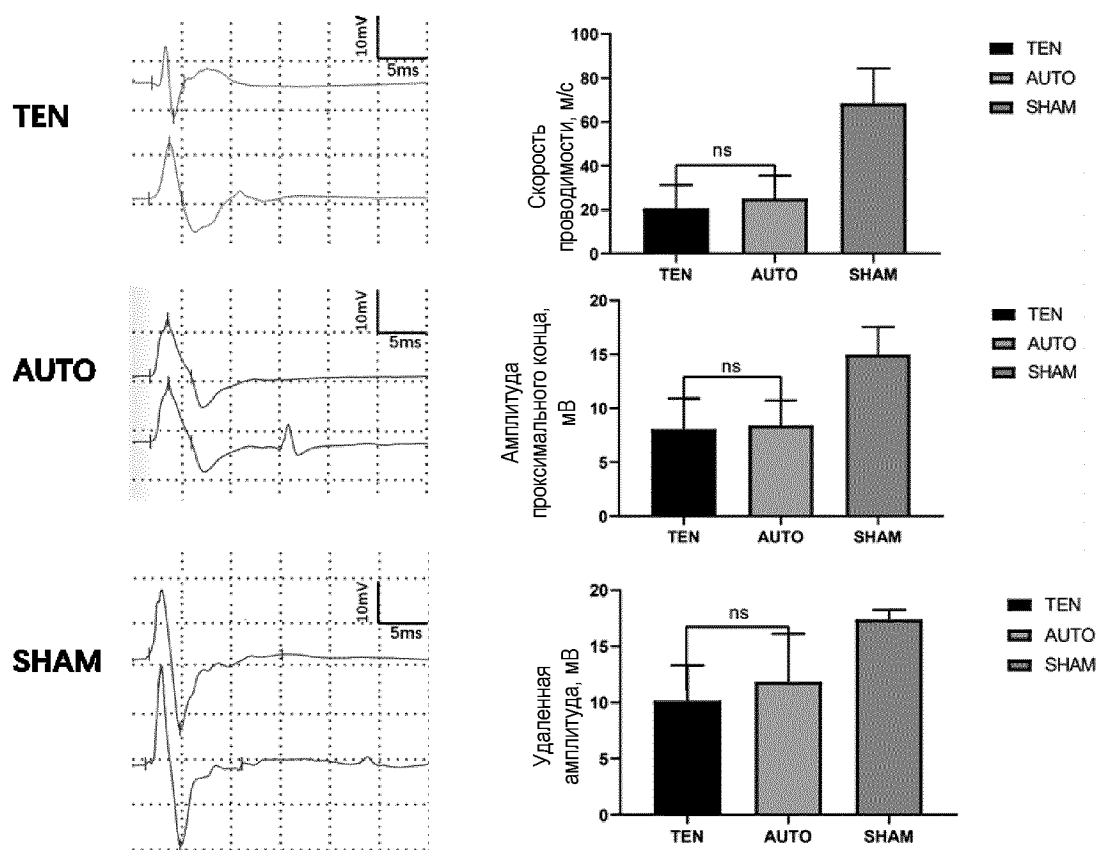
Фиг. 6



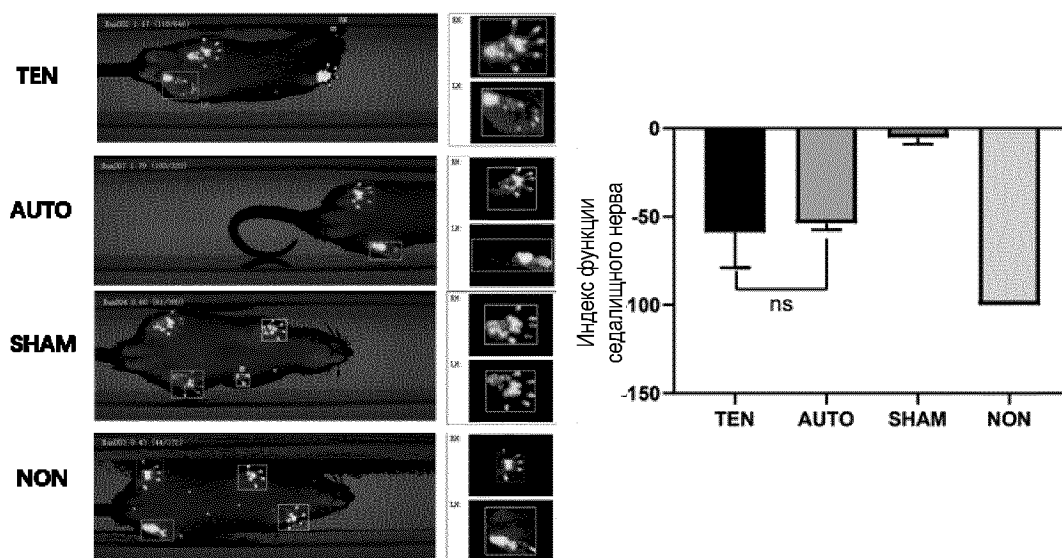
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10