



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **154551** (13) **U**
(51) МПК (2023.01)
A61L 17/00
A61F 2/04 (2013.01)
C08J 5/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2023 01813</p> <p>(22) Дата подання заявки: 19.04.2023</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 23.11.2023</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 22.11.2023, Бюл.№ 47</p>	<p>(72) Винахідник(и): Суходуб Людмила Борисівна (UA), Суходуб Леонід Федорович (UA), Кумеда Марія Олександрівна (UA), Потапов Олександр Олександрович (UA), Циндренко Олександр Олександрович (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, буд. 2, м. Суми, 40007 (UA)</p> <p>(74) Представник: ГУДКОВ СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ</p>
---	--

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ НЕРВОВОГО ПРОВІДНИКА (КОНДУЇТА) З ПІДВИЩЕНОЮ МЕХАНІЧНОЮ МІЦНІСТЮ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ТА КАЛЬЦІЮ ФОСФАТІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЛІКУВАННІ УШКОДЖЕНИХ ПЕРИФЕРИЧНИХ НЕРВІВ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення нервового провідника (кондуїта) з підвищеною механічною міцністю на основі хітозану та кальцію фосфатів для застосування при лікуванні ушкоджених периферичних нервів включає приготування розчину хітозану заданої молекулярної маси в льодяній оцтовій кислоті та формування кондуїта. При приготуванні до розчину хітозану додають сіль кальцію, і після залиття у трубчасті форми піддають п'ятикратному циклу заморожування при температурі -20°C та розморожування під дією мікрохвильового випромінювання (300 W). До отриманого композиту вносять фосфати іонів PO_4^{3-} шляхом насичення в розчині однієї з сполук фосфору для утворення мікросфер нанокристалічних кальцію фосфатів в об'ємі хітозанової матриці. Здійснюють іонотропне зв'язування макромолекул хітозану іонами $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ в розчині триполіфосфату натрію. Отриманий композит насичують біоактивними домішками та висушують при кімнатній температурі і отримують композит.

UA 154551 U

Корисна модель належить до галузі біомедичних матеріалів, зокрема до матеріалів, які сприяють відновленню ушкоджених периферичних нервів.

Дефекти периферичних нервів, спричинені механічними травмами в результаті дорожньо-транспортних пригод чи військових дій, є одними з найпоширеніших травм сьогодення. Після пошкодження нерва дистальні відділи кінцівок втрачають сенсорні та моторні функції. Це призводить до фізичної непрацездатності та погіршує якість життя пацієнтів. Дефект малого сегмента нерва може самовідновлюватись, в той час як дефект довгого сегмента потребує хірургічного застосування ауто трансплантата або імплантації нервового провідника (кондуїта), щоб спрямувати ріст проксимального відновного нерва. Нервовий кондуїт - це трубчастий пристрій із натуральних та/або синтетичних полімерних матеріалів. Нервовий кондуїт може створювати фізичний бар'єр проти проникнення сполучної тканини в нервовий сегмент та запобігати формуванню рубців; він сприяє накопиченню нейротрофічних факторів, запобігає утворенню невром і використовує хемотаксис дистального нерва для відновлення дефектів периферичного нерва на великих відстанях.

В даний час аутологічна трансплантація нерва є загальноживаним клінічним методом лікування пошкодження нерва, але вона обов'язково супроводжується порушеннями функції донорського місця, обмеженістю джерел донорів трансплантів. В останні роки з розвитком інженерії нервової тканини поширюється використання штучно виготовлених нервових каналів, які можуть сприяти регенерації нервів та забезпечити їх відновлення. Ідеальний нервовий кондуїт, як камера регенерації нерва, може забезпечити простір для росту нервових волокон та сприяти регенерації пошкоджених нервів. Серед основних вимог до штучних нервових каналів є такі їх характеристики, як вибіркова проникність, здатність до біодеградації *in vivo*, біосумісність, легкість обробки та формування. Однак наявні на даний момент матеріали все ще не ідеальні, а недостатня біосумісність і низька біоактивність є головними недоліками більшості штучних нервових провідників.

Серед природних матеріалів хітозан (CS) та гідроксіапатит кальцію $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) є одними з найбільш біосумісних з середовищем організму матеріалів в тканинній інженерії [Wang, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003, 24, 2133-2151]. ГА є хімічним аналогом мінеральної складової кісткової тканини ссавців і часто застосовується для заміщення кісткових дефектів. Однак, в ряді наукових досліджень показано, що наногідроксіапатит (n-ГА) може відновити механічне пошкодження нерва, викликане розтягуванням [Benita Wiatrak; Paulina Sobierajska; Marta Szandruk-Bender; Paulina Jawien; Maciej Janeczek; Maciej Dobrzynski; Patrycja Pistor; Adam Szelag; Rafal J. Wiglusz; (2021). Nanohydroxyapatite as a Biomaterial for Peripheral Nerve Regeneration after Mechanical Damage-In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, . doi:10.3390/ijms22094454], а також впливати на регенерацію ушкодженого нерва [Ardhani, Retno; Ana, Ika Dewi; Tabata, Yasuhiko (2020). Gelatin hydrogel membrane containing carbonate hydroxyapatite for nerve regeneration scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, jbm.a.37000-. doi:10.1002/jbm.a.37000]. CS - природний біологічний матеріал, єдиний лужний полісахарид, який містить позитивний заряд, має хорошу біосумісність, здатність до біологічного розкладання, протимікробну активність. Ці властивості можуть сприяти адгезії та росту клітин Шванна та ендотеліальних клітин, пригніченню росту фібробластів та формуванню рубців. Контролюючи пористість нервового провідника та ступінь деацетилювання вихідного хітозану, можна регулювати час деградації нервового провідника, який має відповідати часу відновлення нерва. Оскільки ідеальний нервовий провідник ще не винайдений, робота дослідників є актуальною. Так, відомий композит на основі CS та бактеріальної целюлози (Патент CN112773941A "A kind of chitosan microsphere-bacterial cellulose composite material and its preparation and application"), в якому на фібрилах бактеріальної целюлози сформовані мікросфери хітозану шляхом дифузії розчину хітозану, обробленого високою температурою та високим тиском, у внутрішню мережу бактеріальної целюлози або окисленої діальдегідом бактеріальної целюлози, з подальшим замочуванням у водному розчині натрію фосфату. Процес *in situ* формування композиту потребує тривалого часу та застосування хімічних реактивів, які можуть залишатися у складі матеріалу та створювати токсичний ефект. Було отримано хітозановий нервовий канал, який з'єднує нервову тканину під дією світла (Патент CN111450318A "Chitosan nerve conduit with light bridged nerve tissue and its preparation method and application"). До складу матеріалу входить модифікований хітозан, отриманий шляхом щеплення з 4-(4-гідроксиметил-2-метокси-5-нітрофенокси) метилбутиратом та зшитий генепіном. В умовах опромінення синім світлом з довжиною хвилі 365-405 нм гідроксильна група, прищеплена до хітозану, перетворюється на альдегідну групу, через яку хітозановий нервовий провідник може взаємодіяти з аміногрупою на поверхні нервової тканини через ковалентний зв'язок. Матеріал має ряд ефективних

властивостей, а саме досягнення тісної інтеграції з нервовою тканиною, уникнення використання хірургічних швів. Однак заявлене сублімаційне сушіння на завершальній стадії може надавати матеріалу надмірної пористості, ступінь набрякання та швидкої деградації.

Відомий матеріал (Патент CN113546215A "A kind of chitosan-based nerve graft catheter and preparation method thereof") для застосування як кондуїта (найближчий аналог). Його склад та технологія отримання є найближчими до заявленого нами в даному повідомленні, тому вибираємо його як прототип. Даний винахід пропонує нервовий трансплантат на основі хітозану, а саме канал, виготовлений з хітозану як основної сировини, вихідна концентрація якого в льодяній оцтовій кислоті складає 1-7 мас. %. Використовують хітозан з певним розподілом молекулярної маси (від 10 до 500 kDA), що впливає на пористість кондуїта та час його розкладання в організмі людини. За пористістю і молекулярною масою хітозану, кондуїти поділяють на кондуїти короткочасного використання (М.М.=10-20 kDA, пористість 70-85 %); кондуїти середньострокового використання (М.М.20-300 kDA, пористість 65-70 %); та кондуїти тривалого використання (М.М.300-500 kDA, пористість 65-70 %). Щоб отримати кондуїт, який відповідає вибраному терміну деградації, розчин хітозану в оцтовій кислоті заливається в форму і кондуїт формується шляхом швидкого заморожування в рідкому азоті з наступним перебуванням протягом 1-10 годин в холодильній камері при температурі від - 10 °C до - 30 °C. Наступними стадіями є ліофілізація, занурення в розчин NaOH або KOH з масовою концентрацією 10-80 %, повторна ліофілізація. Кондуїт за цим винаходом може регулювати час деградації відповідно до швидкості росту нерва. Матеріал на 100 % складається з хітозану. Його можна використовувати окремо або в поєднанні з підтримуючими PGLA волокнами, які забезпечують напрямок і умови прикріплення нерва, що само по собі не впливає на механічну міцність кондуїта. Всі вище згадані кондуїти мають ряд ефективних властивостей, але мають низьку механічну стійкість.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення нервового провідника (кондуїта) для лікування ушкоджених периферичних нервів з посиленими механічними властивостями, який є біорозкладним, біосумісним, має біоактивність за рахунок присутності нанокристалічних кальцій фосфатних сполук, які є прекурсорами кальційдефіцитного гідроксіапатиту (кдГА).

Поставлена задача вирішується тим, що у способі виготовлення нервового провідника (кондуїта) з підвищеною механічною міцністю на основі хітозану та кальцію фосфатів для застосування при лікуванні ушкоджених периферичних нервів, що включає приготування розчину хітозану заданої молекулярної маси в льодяній оцтовій кислоті та формування кондуїта, згідно з корисною моделлю, при приготуванні до розчину хітозану додають сіль кальцію (кальцію нітрат або кальцію ацетат, або кальцію гідроксид), заливають у спеціальні трубчасті форми (довжиною від 1 до 5 см, з внутрішнім діаметром 1,5-2 см), піддають п'ятикратному циклу заморожування при температурі -20 °C та розморожування під дією мікрохвильового опромінювання (300 W), після чого до отриманого композиту вносять фосфати іонів PO_4^{3-} шляхом насичення в розчині однієї з сполук фосфору (ортофосфорна кислота - H_3PO_4 ; гідроортофосфат натрію - Na_2HPO_4 ; дигідроортофосфат натрію - NaH_2PO_4) для утворення мікросфер нанокристалічних кальцію фосфатів в об'ємі хітозанової матриці, далі здійснюють іотропне зв'язування макромолекул хітозану іонами $P_3O_{10}^{5-}$ в розчині триполіфосфату натрію, і після цього отриманий композит насичують біоактивними домішками та висушують при кімнатній температурі і отримують композит, що має склад (мас. %):

хітозан (М.М. 20-40 kDA, DD 70-80 % або 100-150 kDA, DD 80-90 % або 300-500 kDA, DD 85-90 %) - 87-90;

кальцію фосфати, в т.ч. кальційдефіцитний гідроксіапатит (кдГА) - 10,5-7,5;

біоактивні речовини, в т.ч. ПАР, екстракт лікарських трав, лікарський засіб - 2,5.

Також, у нервовому провіднику (кондуїті) для лікування ушкоджених периферичних нервів як біоактивні домішки використовують екстракти лікарських трав та лікарські засоби.

Кальцію фосфати, в т.ч кдГА, у складі композиту є армуючою біоактивною домішкою, яка підвищує механічні властивості нервових провідників, забезпечує вивільнення Ca^{2+} в оточуюче середовище, впливаючи на пряму регенерацію нейронів. Іони Ca^{2+} , що знаходяться на поверхні кальцій фосфатних кристалітів, мають можливість формування координаційних зв'язків між аміногрупами CS та ГА.

Модуль Юнга (E) отриманих зразків складає від 540 до 780 МПа для трьох груп кондуїтів, залежно від ММ та DD вихідного хітозану, в той час, як для зразка, не підсиленого кальцій фосфатною добавкою, E=400 МПа.

ММ та DD хітозану впливають на час біорозкладання кондуїта. Чим вища ММ та вищий ступінь деацетилювання хітозану, тим довший час розкладання кондуїта, і навпаки.

Приклад отримання кондуїта.

Нервовий провідник для лікування ушкоджених периферичних нервів отримують наступним чином:

- Хітозан зважують та готують 6 % розчин у 1 % льодяній оцтовій кислоті. Додають 0,5-0,167 М розчин однієї із сполук кальцію (кальцію нітрат або кальцію ацетат, або кальцію гідроксид) для отримання співвідношення Ca/CS=0.45 та заливають у форму для отримання кондуїта. Суміш піддають п'ятикратному циклу заморожування при температурі - 20 °С та розморожування під дією мікрохвильового опромінення (300W). Після цього до складу композиту додають фосфат іони PO_4^{3-} шляхом насичення в 0,3-0,1М розчині однієї із сполук фосфору (ортофосфорна кислота, гідроортофосфат натрію, дигідроортофосфат натрію) для утворення мікросфер з нанокристалічних кальцію фосфатів, в тому числі кдГА в об'ємі хітозанової матриці. Наступними стадіями є іонотропне зв'язування макромолекул хітозану іонами $P_3O_{10}^{5-}$ в 1 % розчині триполіфосфату натрію з додаванням поверхнево-активної речовини-пропіленгліколю, промивання, насичення біоактивними домішками (екстракт радіоли рожевої та лікарський засіб прегабалін), висушування при кімнатній температурі, стерилізація під дією УФ випромінювання. В результаті отримують кондуїт довжиною від 1 до 5 см, з внутрішнім діаметром 1,5-2 мм та товщиною стінки 1-1,5 мм.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб виготовлення нервового провідника (кондуїта) з підвищеною механічною міцністю на основі хітозану та кальцію фосфатів для застосування при лікуванні ушкоджених периферичних нервів, що включає приготування розчину хітозану заданої молекулярної маси в льодяній оцтовій кислоті та формування кондуїта, який **відрізняється** тим, що при приготуванні до розчину хітозану додають сіль кальцію, і після заливки у трубчасті форми піддають п'ятикратному циклу заморожування при температурі -20 °С та розморожування під дією мікрохвильового випромінювання (300 W), після чого до отриманого композиту вносять фосфати іонів PO_4^{3-} шляхом насичення в розчині однієї з сполук фосфору для утворення мікросфер нанокристалічних кальцію фосфатів в об'ємі хітозанової матриці, далі здійснюють іонотропне зв'язування макромолекул хітозану іонами $P_3O_{10}^{5-}$ в розчині триполіфосфату натрію, і після цього отриманий композит насичують біоактивними домішками та висушують при кімнатній температурі, і отримують композит, що має склад (мас. %): хітозан (М.М. 20-40 kDA, DD 70-80 % або 100-150 kDA, DD 80-90 % або 300-500 kDA, DD 85-90 %) - 87-90; кальцію фосфати, в т. ч. кальційдефіцитний гідроксіапатит (кдГА) - 10,5-7,5; біоактивні речовини, в т. ч. ПАР, екстракт лікарських трав, лікарський засіб - 2,5.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як біоактивні домішки використовують екстракт лікарських трав та лікарські засоби.