



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61B 17/00 (2023.08); A61F 2/02 (2023.08); G09B 23/28 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023128004, 31.10.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.10.2023Дата регистрации:
11.01.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.10.2023

(45) Опубликовано: 11.01.2024 Бюл. № 2

Адрес для переписки:

194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева,
6, лит. Ж, Военно-медицинская академия, отдел
организации НР и подготовки НПК,
начальнику Крюков Евгений Владимирович

(72) Автор(ы):

ОРЛОВ Владимир Петрович (RU),
НАЩЕКИНА Юлия Александровна (RU),
НИШТ Алексей Юрьевич (RU),
ТОЛКАЧ Павел Геннадьевич (RU),
ГАВРИЛЮК Борис Леонтьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
военное образовательное учреждение
высшего образования "Военно-медицинская
академия имени С.М. Кирова" Министерства
обороны Российской Федерации (ВМедА)
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2018025186 A1, 08.02.2018. RU
2805813 C1, 24.10.2023. АГАПОВА О.И.
Биоинженерные конструкции на основе
фиброина шелка и спидроина для
регенеративной медицины и тканевой
инженерии (обзор). Современные технологии
в медицине 2017, том 9 N 2: 190-206. ASSAF K
et al, Sciatic nerve repair using poly(ε-
caprolactone) tubular prosthesis associated with
(см. прод.)

(54) Способ восстановления нерва с помощью имплантата ствола нерва, содержащего фиброин шелка, в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной медицине, а именно к нейрохирургии, тканевой инженерии. Перед проведением хирургических манипуляций крысам выполняют неингаляционную анестезию путём введения раствора золетила. Затем в области левого бедра выполняют разрез кожи длиной 1,0см. После этого тупым и острым путем выделяют седалищный нерв. Пересекают левый седалищный нерв на уровне середины бедра, концы его подшивают к концам искусственного нерва в виде

полимерной трубки из поликапролактона, заполненной коллагеновым гелем и нитями фиброина шелка длиной 10 мм, двумя швами. Затем рану послойно ушивают, а прорастание нерва контролируют через 1,5 и 3,0 месяца. Способ позволяет восстановить нерв, с помощью искусственного имплантата, который увеличивает уровень прорастания нерва до 70-80%, что в свою очередь обеспечивает быстрое восстановление активных движений в конечности и отсутствие выраженных трофических нарушений. 4 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

nanoparticles of carbon and graphene. Brain Behav. 2017 Jun 30;7(8).

R U 2 8 1 1 3 0 2 C 1

R U 2 8 1 1 3 0 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61B 17/00 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61B 17/00 (2023.08); *A61F 2/02* (2023.08); *G09B 23/28* (2023.08)

(21)(22) Application: **2023128004**, **31.10.2023**

(24) Effective date for property rights:
31.10.2023

Registration date:
11.01.2024

Priority:

(22) Date of filing: **31.10.2023**

(45) Date of publication: **11.01.2024** Bull. № 2

Mail address:

**194044, Sankt-Peterburg, ul. Akad. Lebedeva, 6,
lit. ZH, Voенno-meditsinskaya akademiya, otdel
organizatsii NR i podgotovki NPK, nachalniku
Kryukov Evgenij Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**ORLOV Vladimir Petrovich (RU),
NASHCHEKINA Yuliya Aleksandrovna (RU),
NISHT Aleksej Yurevich (RU),
TOLKACH Pavel Gennadevich (RU),
GAVRILYUK Boris Leontevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
voенnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Voенno-meditsinskaya
akademiya imeni S.M. Kirova" Ministerstva
oborony Rossijskoj Federatsii (VMedA) (RU)**

(54) **METHOD OF NERVE RESTORATION USING NERVE TRUNK IMPLANT CONTAINING SILK FIBROIN IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: experimental medicine; neurosurgery and tissue engineering.

SUBSTANCE: before surgical procedures, rats are given non-inhalational anesthesia by administering a solution of zoletil. Then a 1.0 cm long skin incision is made in the left thigh area. After this, the sciatic nerve is isolated using a blunt and sharp method. The left sciatic nerve is transected at the level of the mid-thigh, its ends are sutured to the ends of the artificial nerve in the form of a polymer tube made of polycaprolactone,

filled with collagen gel and silk fibroin threads 10 mm long, with two sutures. Then the wound is sutured layer by layer, and nerve germination is monitored after 1.5 and 3.0 months.

EFFECT: method allows to restore the nerve using an artificial implant, which increases the level of nerve germination to 70–80%, which in turn ensures rapid restoration of active movements in the limb and the absence of pronounced trophic disorders.

1 cl, 4 dwg, 1 ex

C 1
2 8 1 1 3 0 2
R U

R U
2 8 1 1 3 0 2
C 1

Изобретение относится к области медицины, в частности, к моделированию тканезаместительной терапии и тканевой инженерии, а также нейрохирургии.

Травматическое повреждение периферических нервов до сих пор остается одной из значимых проблем современной нейрохирургии из-за высоких цифр
5 неудовлетворительных результатов лечения. В России ежегодно до 7 тысяч пациентов нуждаются в хирургическом вмешательстве по поводу травмы периферической нервной системы. Исходы этого лечения оставляют желать лучшего. Пациенты зачастую
10 выписываются из стационара с грубым неврологическим дефицитом, что приводит в последующем к инвалидизации. Например, уровень благоприятного результата хирургического лечения при травме седалищного нерва, не смотря на значимый прогресс в медицине, до сих пор остается в пределах 20%.

Известно, что периферическая нервная система обладает хорошим
посттравматическим регенераторным потенциалом, однако проблема высокой степени
инвалидизации больных до сих пор не решена [Lee S . K ., Wolfe S . W . Peripheral nerve
15 injury and repair . J . Am . Acad . Orthop . Surg . 2000; 8(4): 243-52 . Navarro X . Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview . Eur . J . Neurosci . Epub ahead of print . 2015 .]. В значительной степени это связано с нерешенностью задачи преодоления протяженных диастазов нерва.

Неудовлетворительные результаты лечения травм периферических нервов, связаны
20 с изменениями, описанными еще в 1850 г. А. Waller. Сразу после повреждения нерва запускаются процессы его дегенерации. Основной проблемой при регенерации нерва является формирование грубой рубцовой ткани в месте повреждения нерва, соединительная ткань полностью блокирует прорастание нервных волокон из проксимального конца нерва в дистальный.

С целью предотвращения прорастания соединительной ткани между концами
25 повреждённого нерва активно разрабатываются кондуиты нерва из биосовместимых материалов, которые предназначены для направления и поддержания регенерации нервных волокон.

Среди тубулированных тканеинженерных конструкций кондуит из поли (ε-
30 капролактона) (PCL) обладает оптимальными механическими свойствами и способностью к биодegradации [Николаев С. И., Галлямов А. Р., Мамин Г. В. и др. Кондуит нерва на основе поли(ε-капролактона) и локальная доставка генов vegf и fgf2 стимулируют нейрорегенерацию . Клеточные технологии в биологии и медицине 2014; 1: 44-49. Chang C. J. The effect of pulse-released nerve growth factor from genipin-crosslinked
35 gelatin in schwann cell-seeded polycaprolactone conduits on large-gap peripheral nerve regeneration. Tissue Eng. Part A. 2009; 15(3): 547-57.]

Среди полимеров природного происхождения особый интерес представляют такие белки внеклеточного матрикса, как коллаген и фибрин, а также белок природного происхождения фиброин шелка (ФС). Наиболее интенсивно используемым фиброином
40 в тканевой инженерии является шелк, полученный от тутового шелкопряда *Bombyx mori*, для которого характерно высокое содержание глицина и аланина (77 %), а также серина и тирозина (11 %) (Кричевский, 2001). Молекулярная масса ФС колеблется от 25 кДа для «легких» цепей до 350 кДа для «тяжелых», которые связаны между собой дисульфидными связями (Altman, 2003).

Известен токопроводящий полимерный композит, состоящий из
45 поликапролактонового фумарата и полипиррола (электропроводящего полимера), предназначенный для регенерации нерва. При пропускании сквозь нерв тока в присутствии упомянутого композита наблюдалось восстановление нервного волокна

к гистологическому исследованию. На фиг.4 представлены данные гистологического исследования, показывающие полное прораствание нерва; на фиг.4а показан проксимальный участок нерва, поперечный срез X100 окраска (гематоксилин-эозин), на фиг.4б показан дистальный участок нерва, поперечный срез X400 окраска (гематоксилин-эозин), на фиг.4в показан проксимальный участок нерва в кондуите, продольный срез X100 окраска (гематоксилин-эозин), на фиг.4г показан дистальный участок нерва в кондуите, продольный срез X100 окраска (гематоксилин-эозин), на фиг.4д показан дистальный участок нерва в кондуите, продольный срез X400 окраска по (Маллори), на фиг.4е показан дистальный участок нерва в кондуите, продольный срез X100 окраска по (Маллори).

В своих экспериментах мы применяли созданный нами искусственный нерв. Искусственный нерв представляет собой полимерную трубку, заполненную коллагеновым гелем и нитями фиброина шелка. Полимерную трубку готовили по ранее запатентованной методике (Нащекина Ю.А., Юдинцева Н.М., Никонов П.О., Блинова М.И., Нащекин А.В., Москалюк О.О., Юдин В.Е., Михайлова Н.А. патент на изобретение «Способ получения биорезорбируемого сосудистого протеза малого диаметра» RU 2 709 621 C1 от 19.12.2019). Она изготавливалась из поли (ε-капролактона) со средней молекулярной массой (Sigma, США). Диаметр полимерной трубки, возможно, варьировать в зависимости от потребностей. Толщина трубки составила 50-100 мкм. Длина полимерной трубки также может варьировать в зависимости от размера повреждения нерва. В полимерную трубку вводятся нативные нити фиброина шелка тутового шелкопряда. Диаметр нитей фиброина шелка составляет порядка 10 мкм (Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Юдинцева Н.М., Нащекин А.В., Лихачёв А.И., Москалюк О.А., Юдин В.Е., Блинова М.И. «Взаимодействие мезенхимных клеток костного мозга с нативными волокнами фиброина шёлка», Цитология, 2016, Том 58, № 11, стр. 843-849.). Трубки с нитями заполняли раствором коллагена с концентрацией 2 мг/мл. Раствор полимеризовался в гель внутри трубки. Все процедуры проводили в стерильных условиях с предварительно простерилизованными полимерными трубками и нитями фиброина шелка. Готовую конструкцию можно использовать как сразу после приготовления, так и спустя 1-3 месяц после приготовления. При длительном хранении коллагеновый гель высыхает, но при выдерживании в физиологическом растворе повторно частично набухает, что позволяет создавать аксонам благоприятную среду для миграции (Фиг.1).

Способ экспериментального применения искусственного нерва
Исследование проводили на крысах-самцах (n= 5) массой 180-220 грамм, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатowski институт» (пос. Рапполово Ленинградской обл.).

В работе руководствовались требованиями нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [1, 2]. Перед проведением хирургических манипуляций крысам выполняли неингаляционную анестезию путём введения раствора золетила («Virbac S.A.», Франция). Для введения в анестезию внутрибрюшинно вводили раствор золетила в дозе 20 мг/кг, при этом состояние седации развивалось через 6-7 мин. Для поддержания анестезии золетил вводили однократно подкожно в дозе 10 мг/кг. В области левого бедра выполняли раз кожи длиной 1,0см, затем тупым и острым путем выделяли седалищный нерв. Левый седалищный нерв на уровне середины бедра пересекали, концы его подшивали к концам искусственного нерва длиной 10 мм двумя швами.

(Фиг.2а,б,в). Рану послойно ушивали. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Контроль прорастания нерва контролировали через 1,5 и 3,0 месяца. Во время наблюдения за крысами отмечалось быстрое восстановление активных движений в конечности и отсутствие выраженных трофических нарушений. Кроме того через 1,5 месяца при ЭНМГ регистрировался М-ответ икроножной мышцы, равный 50% аналогичного ответа с контрольной (здоровой стороны). Через 3 месяца животных выводили из эксперимента и готовили препараты для гистологического исследования (Фиг.3а,б). Результаты гистологического исследования представлены на Фиг.4а-е.

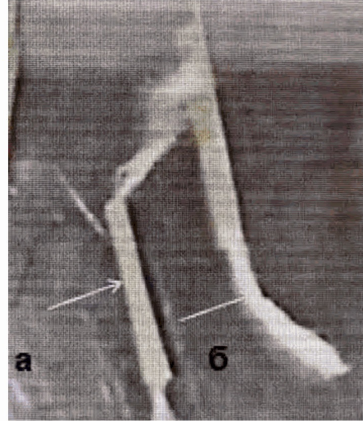
1. ГОСТ 33044-2014 Принципы лабораторной практики GLP. – М. : Стандартинформ, 2015. – 16 с.

2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными. – СПб.: Rus-LASA, 2012. – 48 с.

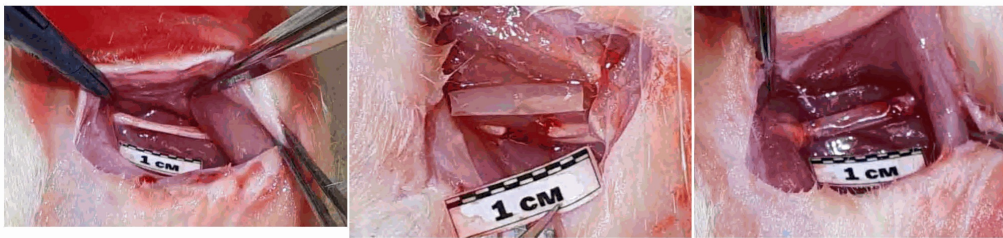
(57) Формула изобретения

Способ восстановления нерва с помощью имплантата ствола нерва, содержащего фиброин шёлка, в эксперименте, отличающийся тем, что перед проведением хирургических манипуляций крысам выполняют неингаляционную анестезию путём введения раствора золетила, затем в области левого бедра выполняют разрез кожи длиной 1,0 см, затем тупым и острым путем выделяют седалищный нерв, левый седалищный нерв на уровне середины бедра пересекают, концы его подшивают к концам искусственного нерва в виде полимерной трубки из поликапролактона, заполненной коллагеновым гелем и нитями фиброина шелка длиной 10 мм двумя швами, затем рану послойно ушивают; прорастание нерва контролируют через 1,5 и 3,0 месяца.

1



Фиг. 1

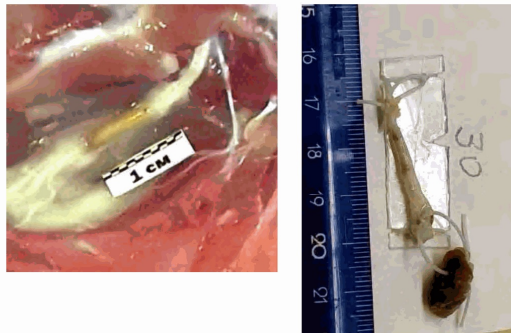


а)

б)

в)

Фиг. 2

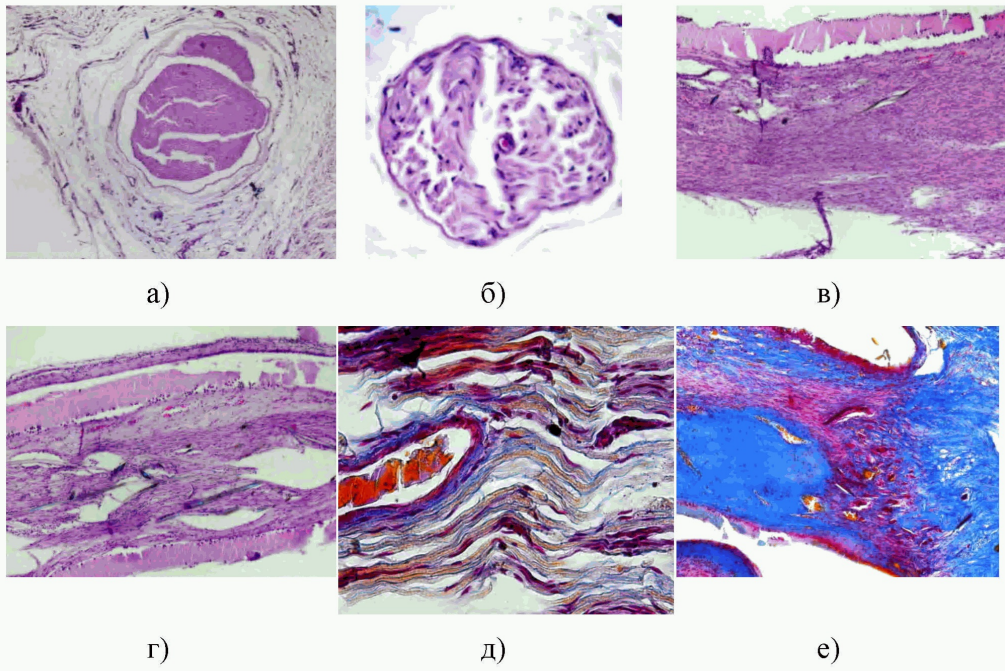


а)

б)

Фиг. 3

2



Фиг.4