

СВОЙСТВА РЕЗОРБИРУЕМЫХ КОНДУИТОВ НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ИЗ ПОЛИ(L-ЛАКТИДА) И ВОЛОКОН ИЗ ХИТОЗАНА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

© 2024 г. Н.А. Тагандурдыева*,#, М.А. Трубе**, И.О. Шемякин***, Д.Н. Соломицкий***, Г.В. Медведев***, Е.М. Иванькова*, И.П. Добровольская*, ****, В.Е. Юдин*, ****

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
ул. Политехническая, 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

**Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

***Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова,
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

****Институт высокомолекулярных соединений РАН, Большой просп., 31, Санкт-Петербург, 199004, Россия

#E-mail: jemala1996@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2023 г.

После доработки 12.04.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Разработаны трубчатые кондуиты для регенерации периферических нервов и восстановления дефектов с диастазом более 3 см. Оптимальная конструкция кондуита включает трубку на основе нановолокон из поли(L-лактида) и наполнитель в виде композиционных волокон из хитозана, содержащих нановолокна хитина. Проведено исследование *in vivo* двигательного-координационного нарушения с помощью оценки функционального индекса седалищного нерва. Показано, что наличие в конструкции кондуита моноволокон хитозана и композиционных волокон из хитозана, содержащих нановолокна хитина, повышает скорость регенерации седалищного нерва, величина его функционального индекса составляет 76–83. Степень восстановления проводимости нерва, определенная методом измерения амплитуды М-ответа, составляет 46%. Разработанная конструкция кондуита имитирует ориентированную архитектуру нерва, способствует электрической коммуникации между концами поврежденного нерва, создает условия для повышения скорости регенерации нервных волокон и направленности их роста.

Ключевые слова: хитозановые волокна, нановолокна хитина, поли(L-лактид), кондуит, периферические нервные волокна, регенерация.

DOI: 10.31857/S0006302924050173, EDN: MIWKZC

В последние десятилетия произошел скачок в понимании патофизиологии повреждений периферической нервной системы и процесса ее регенерации. На основе новой информации наблюдается активное развитие микрохирургических методов лечения, направленных на восстановление нервных волокон с последующим восстановлением сенсорной и/или моторной функции организма. Однако, эта проблема остается нерешен-

ной, так как функциональное восстановление, как правило, не достигает предтравматического уровня [1].

Поврежденные периферические нервы восстанавливаются с помощью хирургического вмешательства, а именно наложением анастомоза конец в конец, конец в бок и бок в бок. Однако это эффективно лишь при размере поврежденного участка нерва, диастазе, менее 3 см.

При реконструкции повреждений размером более 3 см наложение швов отрицательно влияет на регенерацию нерва ввиду возникающих механических напряжений в нервной ткани. Поэтому в таких случаях применяют трансплантаты различного происхождения, а также имплантаты в виде трубчатых каналов — кондуитов [2, 3].

Сокращения: PLA — полилактид (polylactic acid), PGA — полигликолид (polyglycolic acid), PChs — полифиламентные хитозановые волокна (multifilament chitosan yarn), MChs — монофиламентные хитозановые волокна (monofilament chitosan yarn), Chs-ChNF — монофиламентные хитозановые волокна, наполненные нановолокнами хитина (monofilament chitosan yarn with chitin nanofibrils), SFI — функциональный индекс седалищного нерва (sciatic functional index).

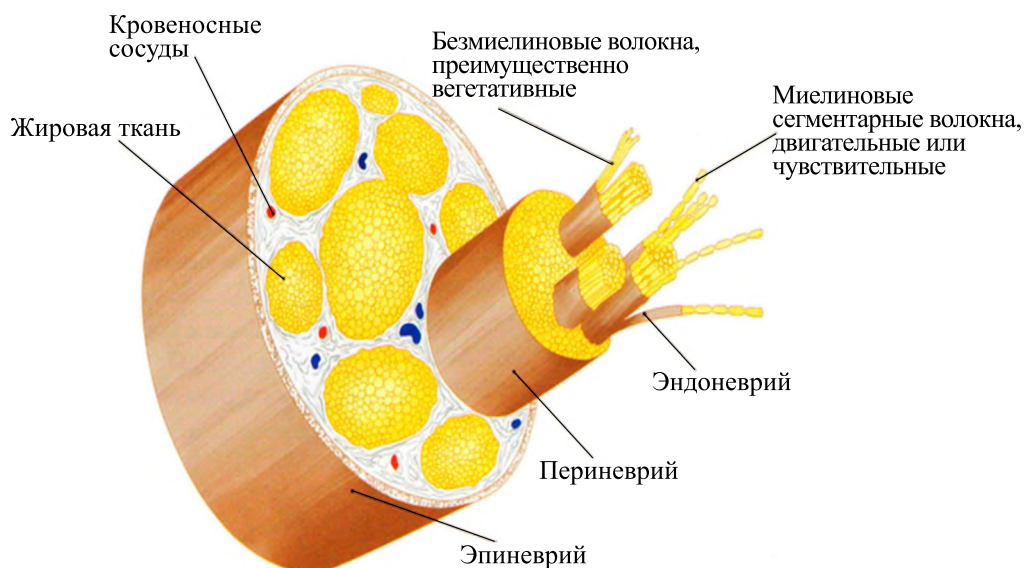


Рис. 1. Строение периферического нерва [26].

Чаще всего восстановление периферического нерва проводят методом аутотрансплантации, который считается «золотым стандартом» [4–7]. Аутотрансплантат является каркасом, который обеспечивает направление регенерации нервных волокон, жизнеспособность шванновских клеток (леммоцитов) и диффузию к месту дефекта нейротрофических факторов [8–10]. Однако этот метод обладает множеством ограничений, связанных с необходимостью многократных операций, с отличием размеров трансплантата и нервной ткани, дефицита донорского материала. Трудности в восстановлении нервной ткани связаны с инвазией рубцовой ткани, что обусловлено миграцией фибробластов в зону диастаза [4, 11].

Перечисленные проблемы частично решаются применением алло- и ксенотрансплантатов, но их клиническое применение ограничено в связи с частными случаями иммунного отторжения, вторичной инфекции и других системных побочных эффектов [12].

Многих перечисленных недостатков лишены кондуиты на основе природных и синтетических полимеров. Однако лишь часть из них превосходит по своим характеристикам аутотрансплантаты, а большинство не позволяет восстанавливать дефекты с диастазом более 3 см. Помимо этого существует сложность их хирургического применения, а продукты разложения могут оказывать негативное воздействие на живой организм. Если имплантат получен из нерезорбируемого материала, требуется повторная операция с целью его удаления [4, 5, 13]. Поэтому исследования по получению конструкций для регенерации нервов продолжаются с учетом результатов современных достижений в области нейрофизиологии, цито-

логии, медицины и материаловедения. Важно отметить, что эти исследования направлены преимущественно на разработку биорезорбируемых кондуитов, конструкция которых стимулирует рост аксонов, приводящий к замещению дефектов с большим диастазом.

Такие конструкции состоят из полимерной трубки, внутренний канал которой содержит стволовые или соматические клетки, компоненты межклеточного матрикса, гелеобразный и/или волокнистый наполнитель [14–21]. Наполнители создают благоприятную среду для направленного движения шванновских клеток, снижению их дезориентации [22, 23]. Клетки выполняют важнейшие функции в процессе регенерации нерва, они стимулируют формирование миелиновой оболочки нейронов, выполняют опорную функцию, способствуют ионному обмену тела нейрона с внешней средой, что приводит к возможности передачи возбуждения по нервным волокнам.

Процесс естественной регенерации нерва при малом диастазе включает формирование фибринового канала между нервными концами (рис. 1). Это обеспечивает инфильтрацию шванновских клеток и образование лент Бюнгнера, состоящих из ориентированных столбцов ламинина и выровненных шванновских клеток. В процессе регенерации аксоны следуют за лентами Бюнгнера до дистального конца, что приводит к реиннервации [24, 25].

Однако при больших дефектах образование фибриновых каналов и лент Бюнгнера затруднительно, поэтому регенерирующим нервным волокнам трудно пересечь большой промежуток без внешней поддержки. Для этого используют

наполнители кондуитов, которые можно разделить на биохимические и физические. Биохимические включают в себя шванновские клетки, нервные стволовые клетки, мезенхимные или эмбриональные стволовые клетки, факторы роста, нейротрофические факторы, нуклеиновые кислоты и молекулы внеклеточного матрикса, такие как коллаген, ламинин и фибронектин и др. [27]. Таким образом, биохимические наполнители позволяют создать в кондуите микросреду, способствующую регенерации аксонов.

В качестве физических наполнителей используют гели, губки, микрофиламенты, микроволокна, нити, многоканальные структуры и их комбинации, которые вводятся непосредственно в просвет канала [5, 27–32]. Подобные наполнители усиливают направленную регенерацию путем имитации ориентированной архитектуры фасцикулярного нерва. Разделение внутреннего просвета кондуита на более мелкие направляющие трубки уменьшает дисперсию аксонов, которая обычно возникает в полых каналах. Наполнители также влияют на *адгезию, пролиферацию и миграцию шванновских клеток*, на транспорт питательных веществ, инфильтрацию кровеносных сосудов, ограничивают инфильтрацию клеток, препятствующую росту аксонов [33, 34].

Введение в просвет кондуита волокнистых материалов приводит к формированию анизотропной структуры пор, продольный размер которых значительно выше поперечного, увеличению площади поверхности внутреннего канала. Это создает оптимальную топологию среды для адгезии и роста клеток [27], усиливает образование миелинизированных аксонов, что способствует восстановлению сенсорной функции органов [14, 19–21, 35].

В литературе можно найти исследования применения различных наполнителей природного происхождения, таких как хитозан [14, 36], фиброины шелка [11, 37–39], коллаген [17], а также такие белки, как ламинин и фибронектин [40–42] и др. при восстановлении целостности нервных волокон. В сравнении с другими природными полимерами хитозан обладает преимуществами. Он способен уменьшать образования рубцовой ткани и поддерживать регенерацию аксонов, продукты резорбции хитозана оказывают нейрозащитное действие, а его физические и химические свойства позволяют моделировать физиологическую структуру периферических нервов [43–47]. Продукты распада хитозана, в частности, хитозановые олигосахариды, способствуют пролиферации клеток и предотвращению апоптоза. Это связано со способностью хитозановых олигосахаридов ускорять клеточный цикл, повышать пролиферативную активность шванновских клеток [48–50].

Однако, несмотря на все достоинства хитозана, получение кондуитов на его основе ограничено из-за сложностей, которые возникают при создании структуры кондуита. Такая структура должна обеспечивать обменные процессы, сопровождающие регенерацию нервной ткани. С другой стороны, препятствовать инфильтрации фибробластов и других клеток в область диастаза до полного восстановления нервной ткани, а также защищать нервную ткань от компрессии.

В качестве полимеров для кондуитов интересны поли- α -гидроксизефир [51], наиболее известными из которых являются полилактид (PLA), полигликолид (PGA), поликапролактон и их сополимеры [52].

В связи с тем что требуется сохранение механических свойств кондуитов на более длительный срок, целесообразно применение в качестве кондуитов PLA. В ряде работ приведены результаты исследований применения PLA в качестве кондуитов самостоятельно или совместно с другими модифицирующими агентами [36, 53–56]. При этом кондуиты на основе этого полимера показали себя как нетоксичные, биосовместимые материалы с контролируемой скоростью резорбции и способностью замещать дефекты более 3 см, также они способствуют образованию значительного количества миелинизированных волокон и кровеносных сосудов, организованных пучков с множеством регенерирующих кластеров, состоящих из нервных волокон, окруженных слоями уплотненных периневриум подобных клеток [54, 55].

В связи с вышесказанным, целью работы являлась разработка конструкции резорбируемого кондуита на основе нановолокон из поли(L-лактида) и композиционных волокон из хитозана, содержащих в качестве наполнителя нанофибриллы хитина, исследование *in vivo* их влияния на регенерацию седалищного нерва крысы и восстановление ее двигательной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для получения трубчатых матриц использовали биорезорбируемый полимер – PLA фирмы Corbion PURAC (Нидерланды) с молекулярной массой 20 кДа. В качестве растворителя использовали хлороформ производства фирмы «Экос-1» (Россия). Полимер растворяли при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 60–90 мин, концентрация полимера в растворе составляла 16 масс. %.

Трубку из нановолокон получали методом электроформования на вращающийся цилиндрический приемный электрод. Диаметр приемного электрода составлял 1.5 мм, скорость его вращения 1500 об/мин, скорость подачи раствора 0.5–0.7 мл/ч,

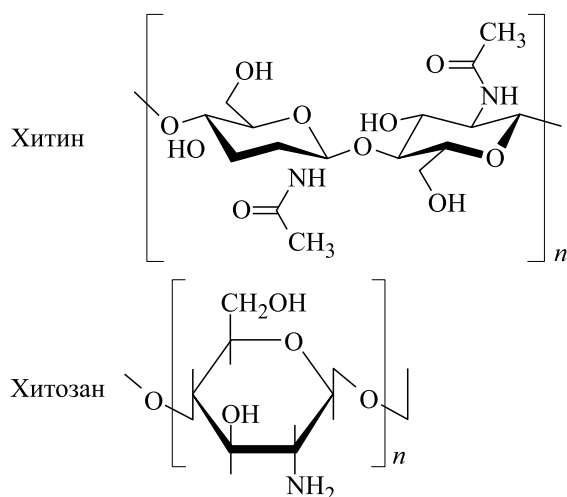


Рис. 2. Структурные формулы макромолекул хитина и хитозана.

напряжение между подающим и приемным электродом 27–29 кВ, расстояние между ними 150 мм. Полученную после электроформования нановолоконную трубку из PLA обрабатывали в фиксированном на электроде состоянии при $T = 90^\circ\text{C}$ в течение часа. Толщина стенки трубки составляла 300–350 мкм.

В качестве наполнителя кондуита использовали волокна на основе хитозана. Хитозан является самым распространенным производным природного полисахарида — хитина (рис. 2). Хитин и хитозан обладают такими ценными характеристиками, как биосовместимость и биорезорбируемость. Хитозан — катионный полисахарид основного характера, включает звенья остатков 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы, соединенных β-(1-4)-гликозидной связью, обладает полиэлектролитными свойствами. Продукты резорбции хитозана оказывают нейрозащитное действие, а его физические и химические свойства позволяют моделировать физиологическую структуру периферических нервов [43–47].

В качестве основы кондуита в настоящей работе выбран материал на основе нановолокон из поли(L-лактида). В качестве наполнителя, обеспечивающего направленный рост аксонов, а также электрический контакт между концами поврежденного нерва, использовали волокна из хитозана, а также композиционные волокна на его основе, содержащие в качестве наполнителя нановолокна хитина.

Для получения хитозановых моно- и полифиламентных волокон, а также композиционных волокон использовали хитозан фирмы Biolog Herpe (Германия) с молекулярной массой 164.2 кДа и степенью деацетилирования 92.4%. Наполнителем композиционных волокон являлись нановолокна хитина фирмы SRL Mavi Sud (Италия),

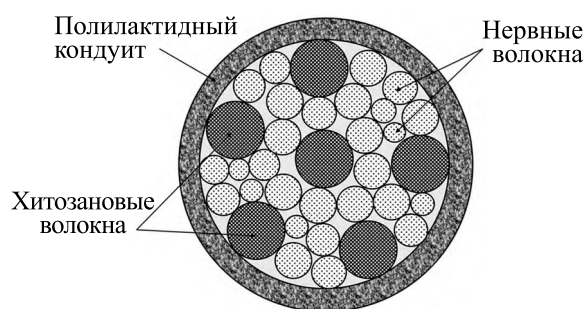


Рис. 3. Схема кондуита, наполненного хитозановыми моноволокнами.

структура которых описана в работе [57]. Способ получения волокон из хитозана описан в работах [58, 59].

Исследования *in vivo*. Эксперименты *in vivo* проводили на самцах белых крыс Wistar. Масса подопытных животных составляла 180–200 г, возраст — 3 месяца. Животных оперировали под общей анестезией (растворы Zoletil 100 — 0.1 мл и Rometarium 20 мг/мл — 0.0125 мл на 0.1 кг массы животного, интраперитонеально).

В экспериментах *in vivo* по регенерации седалищного нерва крысы использовали в качестве кондуитов трубки из нановолокон PLA, трубки, содержащие моноволокна хитозана, и композиционные моноволокна, содержащие 5–50 масс. % нановолокна хитина, а также полифиламентные нити, состоящие из моноволокон. Диаметр моноволокон составлял 45–50 мкм, в полифиламентных нитях диаметр одного волокна составлял 20–25 мкм. Количество волокон в пучке — 75–100 штук.

Количество волокон в конduit вводили в количестве, обеспечивающем 50% свободного объема во внутреннем канале кондуита. Свободный объем необходим для направленного роста шванновских клеток, транспорта белков, необходимых для регенерации аксонов. Исходя из геометрических размеров кондуита и наполнителя, в трубку с внутренним диаметром 1.2–1.5 мм и толщиной стенок 300–350 мкм вводили моноволокна диаметром 45–50 мкм или 20–25 мкм для полифиламентных нитей. На рис. 3 представлена модель, а на рис. 4 — фотография кондуита, наполненного хитозановыми моноволокнами.

Животных случайным образом разделяли на семь групп. В экспериментах по имплантации в каждой группе использовали аутоневральные вставки, PLA-кондуиты без волокон, PLA-кондуиты с наполнителями в виде полифиламентных хитозановых волокон (PChs), монофиламентных хитозановых волокон (MChs) и монофиламентных хитозановых волокон, наполненных нановолокнами хитина (Chs-ChNF) в количестве

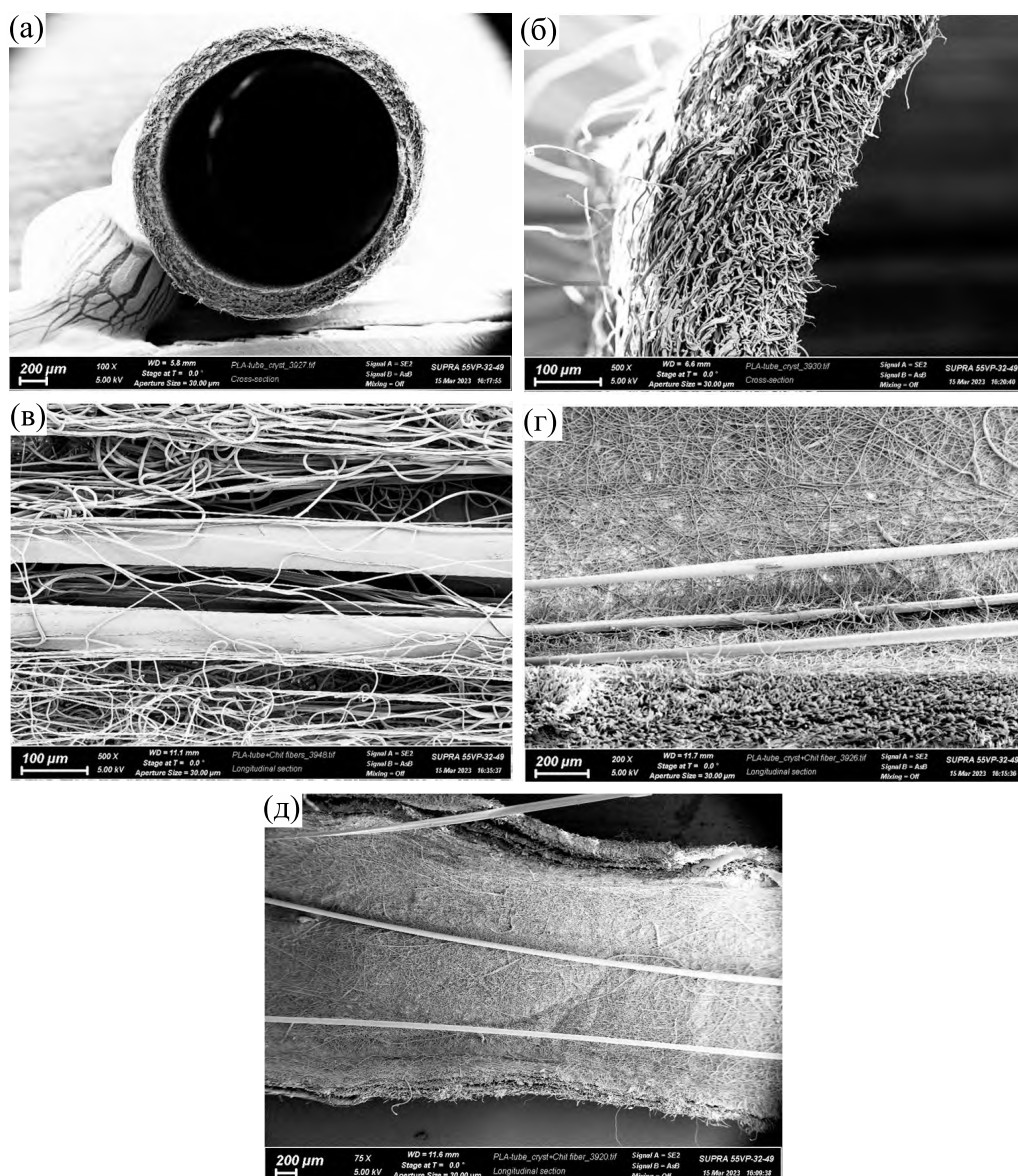


Рис. 4. Микрофотографии трубчатого кондуита на основе нановолокон поли(L-лактида) и моноволокон из хитозана: (а) и (б) — торец кондуита на основе поли(L-лактида); (в) — внутренняя структура кондуита с хитозановыми волокнами до кристаллизации; (г) и (д) — внутренняя структура кондуита с хитозановыми волокнами после кристаллизации.

0.5 масс. % (Chs-ChNF 0.5%), 30 масс.% (Chs-ChNF 30%) и 50 масс.% (Chs-ChNF 50%). В каждой группе было по 10 животных.

Схема имплантации кондуита в седалищный нерв крысы представлена на рис. 5. Животным под общей анестезией повреждали седалищный нерв и на уровне середины бедренной кости создавали диастаз размером 10 мм. В контрольной группе (с аутоновральными вставками) резецированный дистальный сегмент нерва подшивали к проксимальному концу нерва и наоборот. В остальных группах диастаз замещали кондуитами. На рис. 5 приведены фотографии операции

по имплантации аутоневральной вставки и кондуита на основе нановолокон из PLA, содержащего волокна из хитозана. После имплантации раны послойно ушивали асептическими иглами с нитью Prolen 4-0.

После проведения оперативного вмешательства животных содержали в специальных условиях в течение четырех месяцев со свободным доступом к воде и пище и возможностью свободно передвигаться. Все животные были активны, негативное влияние от имплантации материалов не выявлено, о чем свидетельствовали общее

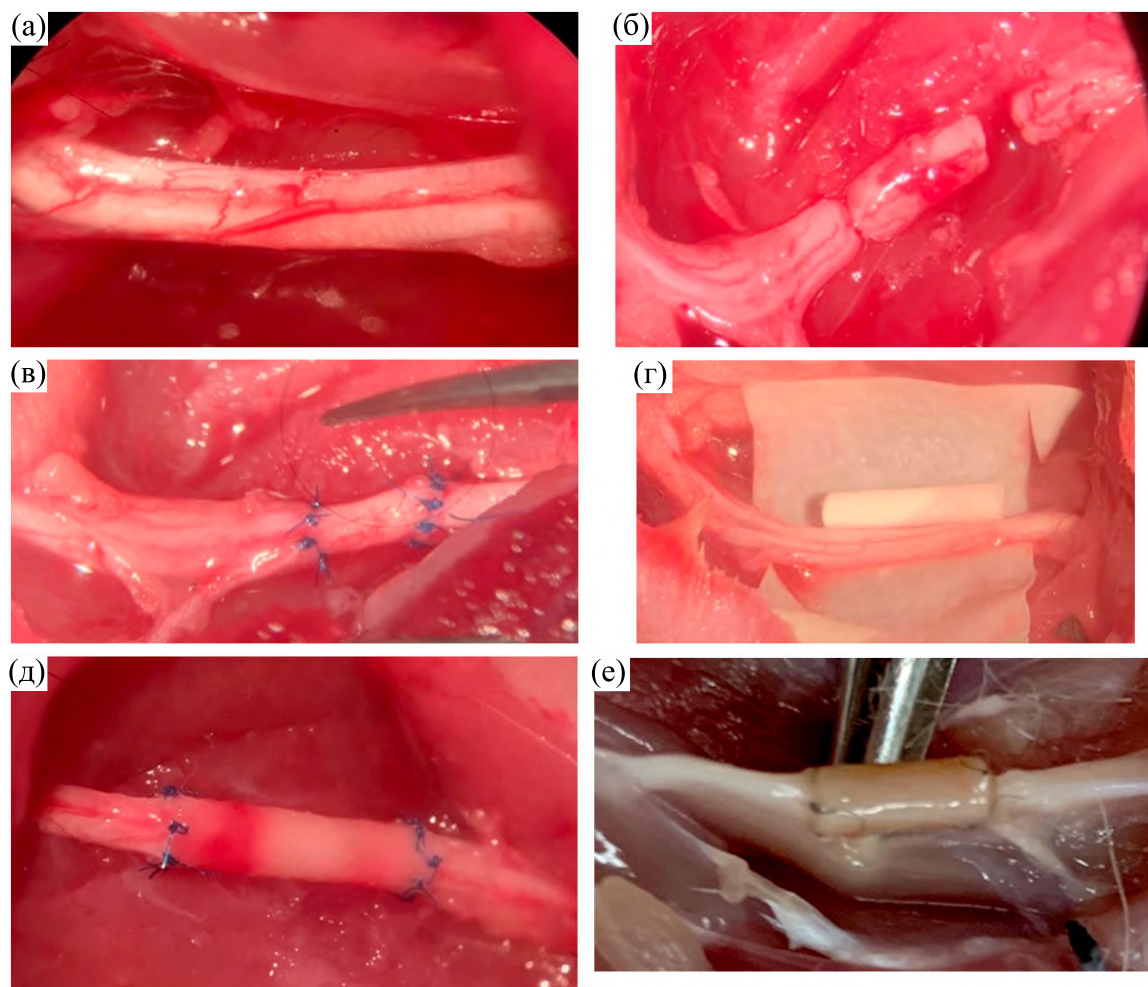


Рис. 5. (а) – Нативный седалищный нерв; (б) – седалищный нерв с диастазом 10 мм; (в) – дефект нерва, замещенный аутоневральной вставкой; (г) – трубчатый конduit на основе нановолокон из PLA; (д) – конduit, имплантированный в седалищный нерв; (е) – конduit через 4 месяца после имплантации.

поведение и отсутствие воспалительных процессов в зоне имплантации.

Оценка степени восстановления проводимости нервов. Наиболее объективным методом оценки функционального состояния периферических нервов является электронейромиография [60].

Электронейромиография – метод диагностики, основанный на регистрации и анализе биоэлектрических потенциалов мышц и периферических нервов. Процедура электронейромиографии заключается в воздействии низкоинтенсивных электрических импульсов и фиксации реакции мышцы, иннервируемой этим нервом. Поскольку исследуются сразу несколько двигательных единиц, входящих в состав одной мышцы, то оценивается суммарный потенциал действия всех двигательных единиц – М-ответ. Амплитуда М-ответа указывает на количество

двигательных единиц в данной мышце, ее снижение может говорить о снижении количества двигательных единиц.

Для проведения электронейромиографии животных иммобилизовали на манипуляционном столике, далее референтный и стимулирующий электроды вводили в *m. biceps femoris* (двуглавая мышца бедра), заземляющий электрод фиксировали на стопе.

Оценка восстановления двигательной функции после регенерации поврежденных седалищных нервов проведена путем определения функционального индекса (SFI). Для этого отпечатки задних лап фиксировали на предварительно подготовленных бумажных полосках, после чего животных отпускали с целью их передвижения по заданной траектории.

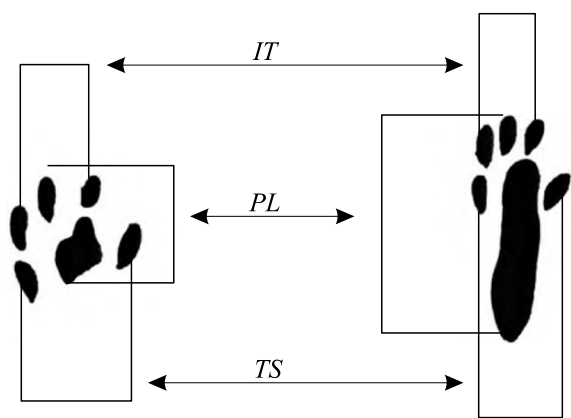


Рис. 6. Схема параметров измерения SFI.

Измеряемыми параметрами (как у нормальных (N), так и у экспериментальных (E) лап) являются длина отпечатка (PL), длина от кончика

самого длинного пальца до пятки (TS) и промежуточным разводом пальцев (IT) (рис. 6). Индекс SFI вычисляли по следующей формуле:

$$SFI = -38.3 \frac{PL_E - PL_N}{PL_N} + 109.5 \frac{TS_E - TS_N}{TS_N} + 13.3 \frac{IT_E - IT_N}{IT_N} - 8.8.$$

(1)

Согласно формуле, значение SFI равно нулю у интактной конечности, тогда как у животных с нефункционирующим нервом эта величина равна 100.

следования животных, у которых проводили реконструкцию седалищного нерва с использованием кондуитов на основе нановолокон из PLA, представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка восстановления проводимости нервов. Результаты электронейромиографического ис-

Из данных табл. 1 следует, что через четыре недели наблюдения у всех животных наблюдалось значительное снижении амплитуды М-ответа, что свидетельствует о существенном снижении

Таблица 1. Значения амплитуды М-ответа

Трубчатый кондуит/наполнитель	Значения амплитуды М-ответа, мВ		
	Интактный нерв	Через 4 недели	Через 16 недель
Аутоневральная вставка	26.6–31.2	4.8–8.1	12.7–16.7
	28.9 ± 3.3	6.8 ± 2.4	15.1 ± 5.2
PLA	24.5–30.1	4.0–6.1	7.1–10.3
	27.3 ± 3.8	5.1 ± 1.8	8.8 ± 3.9
PLA/MChs	24.3–29.7	4.1–6.9	12.5–15.1
	27.2 ± 3.6	5.5 ± 2.2	13.8 ± 3.2
PLA/PChs	27.4–29.3	3.0–4.5	5.1–8.7
	27.8 ± 2.1	3.9 ± 1.5	6.9 ± 4.7
PLA/Chs-ChNF 0.5%	28.1–32.5	2.9–5.1	10.1–14.8
	30.1 ± 3.1	4.3 ± 1.7	12.5 ± 5.8
PLA/Chs-ChNF 30%	25.8–30.9	3.7–6.0	11.2–14.2
	28.8 ± 3.7	4.9 ± 1.4	12.7 ± 3.7
PLA/Chs-ChNF 50%	25.6–28.9	4.9–5.8	12.2–15.9
	28.2 ± 2.5	5.3 ± 0.9	14.1 ± 4.6

нервно-мышечной проводимости задних конечностей по сравнению с интактными конечностями. Через 16 недель значения амплитуд М-ответа увеличиваются во всех случаях, кроме кондуитов, содержащих наполнитель в виде PChs. Более высокие значения амплитуды М-ответа наблюдали при заполнении внутреннего канала кондуита MChs, а также композиционными моноволокнами, содержащими 50 масс.% нановолокон хитина. Отметим, что значения М-ответа для таких конструкций кондуита существенно выше, чем аналогичные значения для кондуита из полый трубки и с наполнителем из полифиламентных нитей и близки к аналогичным значениям у животных, для регенерации нерва у которых использовали метод «золотого стандарта» — ауто-невральную вставку.

Это говорит о том, что наличие моноволокон из хитозана оказывает положительное влияние на скорость направленного роста аксонов, скорость регенерации и миелинизацию нервов. Это связано с двумя факторами: первый — за счет структурирования свободного объема трубки, образования межволоконного пространства в виде продольных каналов. Моноволокна хитозана обладают высоким модулем упругости, до 7.8 ГПа. Это придает жесткость образовавшейся внутри трубки структуры. Хорошая упорядоченность структуры наполнителя в продольном направлении, оптимальный размер пор и их ориентация вдоль оси трубки способствуют направленному росту шванновских клеток, формированию структуры нерва, близкой к нативной. Второй важной особенностью хитозана и волокон на его основе являются их электролитные свойства [61]. Наличие NH_3^+ -ионов в жидкой среде обеспечивает ионную проводимость и тем самым способствует коммуникации между концами нерва. Итак, наличие в кондуите волокон на основе хитозана способствует регенерации седалищного нерва крысы с диастазом 10 мм.

Оценка восстановления двигательной активности. Оценка восстановления двигательной функции после регенерации поврежденного седалищного нерва проведена методом определения SFI через 16 недель после имплантации (рис. 7).

Значение SFI равно нулю у интактного нерва, тогда как у нефункционирующего нерва величина SFI близка к 100.

Из данных, приведенных на рис. 7, следует, что через 16 недель после имплантации кондуитов с различными волоконными наполнителями или без них величина SFI меньше 100. Это свидетельствует о протекании процесса восстановле-

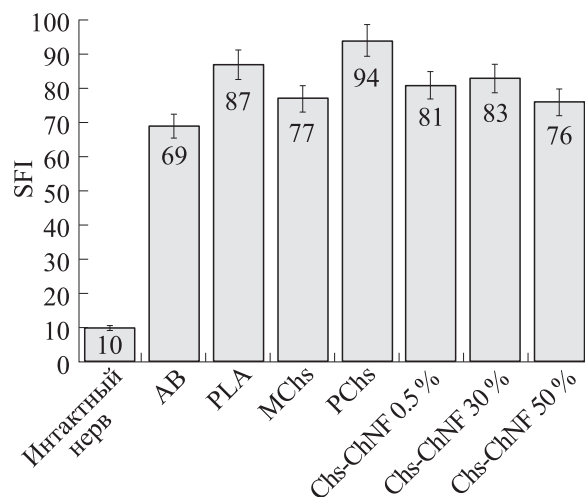


Рис. 7. Значения SFI через 16 недель после имплантации.

ния седалищного нерва. Наиболее интенсивно этот процесс наблюдается при наполнителе в виде моноволокна из хитозана и композиционного волокна, содержащего 50 масс.% нановолокон хитина. В случае отсутствия в трубке волоконного наполнителя процесс восстановления нерва происходит медленней. Это свидетельствует о положительном влиянии структуры внутреннего объема кондуита, каналов, которые формируются в межволоконном пространстве, что способствует направленному росту регенерирующих аксонов, влияет как на скорость, так и на их количество.

Следует отметить, что во всех случаях использования кондуитов из нановолокон величина SFI несколько выше, чем при использовании ауто-невральной вставки. Однако окончательный вывод о достоинствах кондуитов для восстановления седалищного нерва можно будет сделать после длительного наблюдения за животными, при использовании стимулирующих электрических и механических воздействий.

ВЫВОДЫ

Получены резорбируемые кондуиты для регенерации периферических нервов в виде трубок из нановолокон поли(L-лактида), в которых элементами для направленного роста аксонов являются волокна из хитозана, а также композиционные волокна, содержащие 0.5–50.0 масс.% нановолокон хитина.

Показано, что композиционные моноволокна на основе хитозана и нановолокон хитина с модулем упругости $E = 7.8$ ГПа способствуют направленному росту нейронов.

Высказано предположение, что ионная проводимость хитозана способствует коммуникации концов нейронов периферического нерва.

Исследования восстановления проводимости нерва, проведенные методом определения амплитуды М-ответа, показали, что наличие моноволокон хитозана в конструкции кондуита увеличивает значение амплитуды М-ответа.

Результаты исследования двигательной активности показали ускорение восстановления поврежденных нервов при наличии в кондуите наполнителей в виде моноволокон хитозана. Оценка SFI подтверждает наличие функционального восстановления седалищного нерва при наполнении кондуитов моноволокнами (SFI = 76–83).

В целом можно сделать вывод, что наличие в трубчатой конструкции кондуита на основе нановолокон из поли(L-лактида) моноволокон из хитозана положительно влияет на скорость и степень регенерации поврежденных периферических нервов. Содержание нанофибрилл хитина в композиционном волокне из хитозана повышает восстановление функций задних конечностей животного.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с крысами проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (принципы Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г., и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Houshyar Sh., Bhattacharyya A., and Shanks R. Peripheral nerve conduit: materials and structures. *ACS Chem. Neurosci.*, **10** (8), 3349–3365 (2019). DOI: 10.1021/acscchemneuro.9b00203
2. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg.*, **25A**, 391–414 (2000). DOI: 10.1053/jhsu.2000.4165
3. Meek M. F. and Coert J. H. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann. Plast. Surg.*, **60** (1), 110–116 (2008). DOI: 10.1097/SAP.0b013e31804d441c
4. Babu P., Behl A., Chakravarty B., Bhandari P., Bhatti T., and Maurya S. Entubulation techniques in peripheral nerve repair. *Ind. J. Neurotrauma*, **5**, 15–20 (2008). DOI: 10.1016/S0973-0508(08)80023-8
5. de Ruiter G. C. W., Malesy M. J. A., Yaszemski M. J., Windebank A. J., and Spinner R. J. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus.*, **26**, E5 (2009). DOI: 10.3171/FOC.2009.26.2.E5
6. Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir. Suppl.*, **100**, 37–38 (2007). DOI: 10.1007/978-3-211-72958-8_8
7. Hodgkin A. L. and Huxley A. F. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature*, **144**, 710–711 (1939). DOI: 10.1038/144710a0
8. Dahlin L. B. and Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **12**, 341–352 (2001). DOI: 10.1016/S1042-3680(18)30059-7
9. Hudson A. R., Morris J., Weddell G., and Drury A. Peripheral nerve autografts. *J. Surg. Res.*, **12**, 267–274 (1972). DOI: 10.1016/0022-4804(72)90021-2
10. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.*, **23**, 1–28 (1994). DOI: 10.1007/BF01189813
11. Huang W., Begum R., Barber T., Ibbva V., Tee N. C. H., Hussain M., Arastoo M., Yang Q., Robson L. G., Lesage S., Gheysens T., Skaer N. J. V., Knight D. P., and Priestley J. V. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials*, **33**, 59–71 (2012). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.030
12. Seddon H. J. Three types of nerve injury. *Brain*, **66**, 237–288 (1943). DOI: 10.1093/brain/66.4.237
13. Kehoe S., Zhang X. F., and Boyd D. FDA Approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*, **43**, 553–572 (2012). DOI: 10.1016/j.injury.2010.12.030
14. Wang X., Hu W., Cao Y., Yao J., Wu J., and Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/pga artificial nerve graft. *Brain*, **128**, 1897–1910 (2005). DOI: 10.1093/brain/awh517
15. Quigley A. F., Razal J. M., Thompson B. C., Moulton S. E., Kita M., Kennedy E. L., Clark G. M., Wallace G. G., and Kapsa R. M. I. A conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Adv. Mater.*, **21**, 4393–4397 (2009). DOI: 10.1002/adma.200901165
16. Jing W., Ao Q., Wang L., Huang Z., Cai Q., Chen G., Yang X., and Zhong W. Constructing conductive conduit with conductive fibrous infilling for peripheral nerve regeneration. *Chem. Eng. J.*, **345**, 566–577 (2018). DOI: 10.1016/j.cej.2018.04.044
17. Yoo J., Park J. H., Kwon Y. W., Chung J. J., Choi I. C., Nam J. J., Lee H. S., Jeon E. Y., Lee K., Kim S. H.,

- Jung Y., and Park J. W. Augmented peripheral nerve regeneration through elastic nerve guidance conduits prepared using a porous PLCL membrane with a 3D printed collagen hydrogel. *BioMater. Sci.*, **8**, 6261–6271 (2020). DOI: 10.1039/D0BM00847H
18. Quigley A. F., Razal J. M., Thompson B. C., Moulton S. E., Kita M., Kennedy E. L., Clark G. M., Wallace G. G., and Kapsa R. M. I. A Conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Adv. Mater.*, **21**, 4393–4397 (2009). DOI: 10.1002/adma.200901165
 19. Chew S. Y., Mi R., Hoke A., and Leong K. W. Aligned protein-polymer composite fibers enhance nerve regeneration: a potential tissue-engineering platform. *Adv. Funct. Mater.*, **17**, 1288–1296 (2007). DOI: 10.1002/adfm.200600441
 20. Newman K. D., McLaughlin C. R., Carlsson D., Li F., Liu Y., and Griffith M. Bioactive hydrogel-filament scaffolds for nerve repair and regeneration. *Int. J. Artif. Organs*, **29**, 1082–1091 (2006). DOI: 10.1177/039139880602901109
 21. Cai J., Peng X., Nelson K. D., Eberhart R., and Smith G. M. Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **75**, 374–386 (2005). DOI: 10.1002/jbm.a.30432
 22. Erturk A., Hellal F., Enes J., and Bradke F. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J. Neurosci.*, **27**, 9169–9180 (2007). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007
 23. Menorca R. M. G., Fussell T. S., and Elfar J. C. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.*, **29**, 317–330 (2013). DOI: 10.1016/j.hcl.2013.04.002
 24. Evans G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat. Rec.*, **263**, 396–404 (2001). DOI: 10.1002/ar.1120
 25. Johnson E. O., Zoubos A. B., and Soucacos P. N. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*, **36** (Suppl. S4), S24–S29 (2005). DOI: 10.1016/j.injury.2005.10.012
 26. Siemionow M. and Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int. Rev. Neurobiol.*, **87**, 141–172 (2009). DOI: 10.1016/S0074-7742(09)87008-6
 27. Jiang X., Lim S. H., Mao H.-Q., and Chew S. Y. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp. Neurol.*, **223**, 86–101 (2010). DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.09.009
 28. Ngo T.-T. B., Waggoner P. J., Romero A. A., Nelson K. D., Eberhart R. C., and Smith G. M. Poly(L-lactide) microfilaments enhance peripheral nerve regeneration across extended nerve lesions. *J. Neurosci. Res.*, **72**, 227–238 (2003). DOI: 10.1002/jnr.10570
 29. Saeki M., Tanaka K., Imatani J., Okamoto H., Watanabe K., Nakamura T., Gotani H., Ohi H., Nakamura R., and Hirata H. Efficacy and safety of novel collagen conduits filled with collagen filaments to treat patients with peripheral nerve injury: a multicenter, controlled, open-label clinical trial. *Injury*, **49**, 766–774 (2018). DOI: 10.1016/j.injury.2018.03.011
 30. Ceballos D., Navarro X., Dubey N., Wendelschafer-Crabb G., Kennedy W. R., and Tranquillo R. T. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.*, **158**, 290–300 (1999). DOI: 10.1006/exnr.1999.7111
 31. Navissano M., Malan F., Carnino R., and Battiston B. Neurotube for facial nerve repair. *Microsurgery*, **25**, 268–271 (2005). DOI: 10.1002/micr.20128
 32. Sundback C., Hadlock T., Cheney M., and Vacanti J. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials*, **24**, 819–830 (2003). DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00409-X
 33. Stang F., Fansa H., Wolf G., Reppin M., and Keilhoff G. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, **26**, 3083–3091 (2005). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.060
 34. Allodi I., Udina E., and Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.*, **98**, 16–37 (2012). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005
 35. Gámez E., Goto Y., Nagata K., Iwaki T., Sasaki T., and Matsuda T. Photofabricated gelatin-based nerve conduits: nerve tissue regeneration potentials. *Cell Transpl.*, **13**, 549–564 (2004). DOI: 10.3727/000000004783983639
 36. Xie F., Li Q. F., Gu B., Liu K., and Shen G. X. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a biodegradable chitosan–PLA composite peripheral nerve guide conduit material. *Microsurgery*, **28**, 471–479 (2008). DOI: 10.1002/micr.20514
 37. Radtke C., Allmeling C., Waldmann K.-H., Reimers K., Thies K., Schenk H. C., Hillmer A., Guggenheim M., Brandes G., and Vogt P. M. Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PLoS One*, **6** (2), e16990 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0016990
 38. Yang Y., Ding F., Wu J., Hu W., Liu W., Liu J., and Gu X. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, **28** (36), 5526–5535 (2007). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.001
 39. Wang C., Jia Y., Yang W., Zhang C., Zhang K., and Chai Y. Silk fibroin enhances peripheral nerve regeneration by improving vascularization within nerve conduits. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **106**, 2070–2077 (2018). DOI: 10.1002/jbm.a.36390
 40. Ito T., Nakamura T., Suzuki K., Takagi T., Toba T., Hagiwara A., Kihara K., Miki T., Yamagishi H., and Shimizu Y. Regeneration of hypogastric nerve using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge proved electrophysiologically in a canine model. *Int. J. Artif. Organs*, **26** (3), 245–251 (2003). DOI: 10.1177/039139880302600311

41. Matsumoto K., Ohnishi K., Kiyotani T., Sekine T., Ueda H., Nakamura T., Endo K., and Shimizu Y. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.*, **868** (2), 315–328 (2000). DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02207-1
42. Kiyotani T., Teramachi M., Takimoto Y., Nakamura T., Shimizu Y., and Endo K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.*, **740** (1–2), 66–74 (1996). DOI: 10.1016/S0006-8993(96)00848-7
43. Yuan Y., Zhang P., Yang Y., Wang X., and Gu X. The interaction of schwann. cells with chitosan membranes and fibers *in vitro*. *Biomaterials*, **25**, 4273–4278 (2004). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.029
44. Simões M. J., Gärtner A., Shirosaki Y., Gil da Costa R. M., Cortez P. P., Gartnär F., Santos J. D., Lopes M. A., Geuna S., Varejão A. S. P., and Maurício A. C. *In vitro* and *in vivo* chitosan membranes testing for peripheral nerve reconstruction. *Acta Med. Port.*, **24** (1), 43–52 (2011). DOI: 10.20344/amp.344
45. Meyer C., Stenberg L., Gonzalez-Perez F., Wrobel S., Ronchi G., Udina E., Sukanuma S., Geuna S., Navarro X., Dahlin L. B., Grothe C., and Haastert-Talini K. Chitosan-film enhanced chitosan nerve guides for long-distance regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, **76**, 33–51 (2016). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.040
46. Stenberg L., Kodama A., Lindwall-Blom C., and Dahlin L. B. Nerve regeneration in chitosan conduits and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Neurosci.*, **43**, 463–473 (2016). DOI: 10.1111/ejn.13068
47. Neubrech F., Sauerbier M., Moll W., Seegmüller J., Heider S., Harhaus L., Bickert B., Kneser U., and Kremer T. Enhancing the outcome of traumatic sensory nerve lesions of the hand by additional use of a chitosan nerve tube in primary nerve repair. *Plast. Reconstr. Surg.*, **142**, 415–424 (2018). DOI: 10.1097/PRS.00000000000004574
48. Boecker A., Daeschler S. C., Kneser U., and Harhaus L. Relevance and recent developments of chitosan in peripheral nerve surgery. *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 104 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00104
49. Huang H.-C., Hong L., Chang P., Zhang J., Lu S.-Y., Zheng B.-W., and Jiang Z.-F. Chitoooligosaccharides attenuate Cu²⁺-induced cellular oxidative damage and cell apoptosis involving Nrf2 activation. *Neurotox. Res.*, **27**, 411–420 (2015). DOI: 10.1007/s12640-014-9512-x
50. Wang Y., Zhao Y., Sun C., Hu W., Zhao J., Li G., Zhang L., Liu M., Liu Y., Ding F., Yang Y., and Gu X. Chitosan degradation products promote nerve regeneration by stimulating schwann. cell proliferation via MiR-27a/FOXO1 Axis. *Mol. Neurobiol.*, **53**, 28–39 (2016). DOI: 10.1007/s12035-014-8968-2
51. Duffy P., McMahon S., Wang X., Keaveney S., O’Cearbhaill E. D., Quintana I., Rodríguez F. J., and Wang W. Synthetic bioresorbable poly- α -hydroxyesters as peripheral nerve guidance conduits; a review of material properties, design strategies and their efficacy to date. *Biomater. Sci.*, **7**, 4912–4943 (2019). DOI: 10.1039/C9BM00246D
52. Chrzyszcz P., Derbisz K., Suszyński K., Miodoński J., Trybalski R., Lewin-Kowalik J., and Marcol W. Application of peripheral nerve conduits in clinical practice: A literature review. *Neurol. Neurochir. Pol.*, **52**, 427–435 (2018). DOI: 10.1016/j.pjnns.2018.06.003
53. Lu M. C., Huang Y. T., Lin J. H., Yao C. H., Lou C. W., Tsai C. C., and Chen Y. S. Evaluation of a multi-layer microbraided polylactic acid fiber-reinforced conduit for peripheral nerve regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **20** (5), 1175–1180 (2009). DOI: 10.1007/s10856-008-3646-4
54. Goulart C. O., Lopes F. R. P., Monte Z. O., Dantas S. V., Souto A., Oliveira J. T., Almeida F. M., Tonda-Turo C., Pereira C. C., and Borges C. P. Evaluation of biodegradable polymer conduits—poly (l-lactic acid)—for guiding sciatic nerve regeneration in mice. *Methods*, **99**, 28–36 (2016). DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.008
55. Matsumine H., Sasaki R., Yamato M., Okano T., and Sakurai H. A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **8** (6), 454–462 (2014). DOI: 10.1002/term.1540
56. Binan L., Tendey C., De Crescenzo G., El Ayoubi R., Aji A., and Jolicœur M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-L-lactic acid/gelatin scaffold. *Biomaterials*, **35** (2), 664–674 (2014). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.097
57. Dobrovol’skaya I. P., Kasatkin I. A., Yudin V. E., Ivan’kova E. M., and Elokhovskii V. Y. Supramolecular structure of chitin nanofibrils. *Polym. Sci. Ser. A*, **57**, 52–57 (2015). DOI: 10.1134/S0965545X15010022
58. Yudin V. E., Dobrovol’skaya I. P., Neelov I. M., Dresvyanina E. N., Popryadukhin P. V., Ivan’kova E. M., Elokhovskii V. Y., Kasatkin I. A., Okrugin B. M., and Morganti P. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils. *Carbohydr. Polym.*, **108**, 176–182 (2014). DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.02.090
59. Dresvyanina E., Yudenko A., Yevlampieva N., Maevskaya E., Yudin V., Gubarev A., Slyusarenko M., and Heppe K. The molecular mass effect on mechanical properties of chitosan fibers. *FibRes. Text.*, **25**, 27–31 (2018).
60. Pavot A., Ignacio D., and Tchou S. Thermography in peripheral nerve injury and its relationship to electroneuromyography. *Adv. Tech. Clin. Appl. Biomed. Thermol.*, **255**, 255–280 (1994).
61. Zhang M., Zhang F., Li C., An H., Wan T., and Zhang P. Application of chitosan and its derivative polymers in clinical medicine and agriculture. *Polymers*, **14**, 958 (2022). DOI: 10.3390/polym14050958

Properties of Resorbable Conduits Based on Poly(L-lactide) Nanofibers and Chitosan Fibers for Peripheral Nerve Regeneration

N.A. Tagandurdyeva*, M.A. Trube**, I.O. Shemyakin***, D.N. Solomitskiy***, G.V. Medvedev***, E.M. Ivan'kova*, I.P. Dobrovolskaya*, ****, and V.Ye. Yudin*, ****

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya ul. 29, Saint Petersburg, 195251 Russia

**Peoples' Friendship University of Russia, ul. Mikluho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

***Pavlov First State Medical University of St. Petersburg, ul. Lva Tolstogo 6-8, Saint Petersburg, 197022 Russia

****Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoi prosp. 31, Saint Petersburg, 199004 Russia

Tubular conduits have been developed to regenerate peripheral nerves and repair defects with a diastase more than 3 cm. An optimal design of a conduit consists of a tube based on poly(L-lactide) nanofibers and chitosan composite fibers with chitin nanofibrils. In the study performed with *in vivo* model for motor dysfunction, nerve functional status has been assessed by means of the sciatic functional index. It has been shown that chitosan monofibers and chitosan composite fibers with chitin nanofibrils in the design of conduits can increase the regeneration rate of the sciatic nerve, the sciatic functional index is 76–83. The degree of nerve conduction recovery, determined by measuring the amplitude of the M response, is 46%. The developed conduit design imitates the oriented architecture of the nerve, facilitates electrical communication between the ends of the damaged nerve, and promotes increased rate of nerve regeneration and the direction of nerve growth.

Keywords: chitosan fibers, chitin nanofibrils, poly(L-lactide), conduit, peripheral nerve fibers, regeneration