

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

17.02.2017

Регистрационный № 066-1016

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С
ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИМИ РАНАМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ЛОКАЛЬНОЙ СВЕТОДИОДНОЙ ФОТОТЕРАПИИ И
АУТОЛОГИЧНЫХ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ**

инструкция по применению

Учреждения разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Авторы:

д.м.н., член-корреспондент НАН Беларуси С.И. Третьяк, к.м.н., доцент
Е.В. Баранов, к.м.н. А.В. Буравский, д.б.н., академик НАН Беларуси
И.Д. Волотовский, к.б.н. З.Б. Квачева, И.Б. Василевич

Минск, 2016

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) содержит метод лечения пациентов с длительно незаживающими раневыми дефектами кожи различной этиологии, предусматривающий: алгоритм отбора пациентов, выполнение эксплантации кожного лоскута, кондиционирование клеточного материала, программу предтрансплантационной подготовки длительно незаживающих раневых дефектов с использованием локальной светодиодной фототерапии, проведение локальной пересадки аутологичных культивируемых фибробластов кожи (далее – КФК), мониторинг раневого дефекта в посттрансплантационном периоде.

Использование изложенного в настоящей инструкции метода позволяет устранить микробную колонизацию хронической раны (применение антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ)) и стимулировать репаративные процессы (применение фоторегуляторной светотерапии (ФРТ) и локальной пересадки аутологичных КФК) с целью стойкого заживления раневого дефекта и улучшения качества жизни пациента.

Инструкция предназначена для врачей-хирургов, врачей-трансплантологов и иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с трофическими язвами (ТЯ) и гнойно-воспалительными процессами кожи и мягких тканей различной этиологии.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Трофические язвы нижних конечностей, резистентные к традиционным лечебным мероприятиям.
2. Длительно незаживающие раневые дефекты кожи и мягких тканей различной локализации и этиологии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Беременность.
2. Онкологические заболевания.
3. Системные заболевания соединительной ткани, ВИЧ.
4. Психические заболевания, алкогольная либо наркотическая зависимость.
5. Фотодерматозы.
6. Острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И Т.Д.

1. Комплект хирургического инструментария, необходимого для выполнения эксцизии кожного лоскута.
2. Комплекс фототерапевтический светодиодный.
3. Фотосенсибилизатор в форме мази.
4. Биомедицинский клеточный продукт: аутологичные КФК.
5. Антисептики, антибиотики.
6. Современные раневые покрытия.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод лечения, включающий локальное применение аутологичных КФК пациентам с ТЯ и изложенный в настоящей инструкции, состоит из пяти этапов и выполняется после объяснения пациенту особенностей лечения, ожидаемых результатов и возможных осложнений.

Первый этап. Выполнение иссечения участка кожи хирургическим способом. Оперативное вмешательство по забору кожного лоскута заключается в иссечении участка кожи размерами от

2,0×0,2 см до 3,0×0,3 см в параумбиликальной области или в верхней трети бедра в условиях операционной. Доставка эксплантированного лоскута кожи в лабораторию для последующего получения биомедицинского клеточного продукта (БМКП) осуществляется в герметичных стерильных транспортных флаконах в специальном контейнере стандартным методом.

Второй этап. Выделение дермальных фибробластов, приготовление культуры КФК и накопление биомассы клеток.

Подготовка БМКП. Культуру дермальных фибробластов кожи готовят по разработанной методике, основой которой является модифицированный метод эксплантов (Блинова М.И., 2008 г.). Полученный эксплант кожи измельчается до небольших фрагментов (0,2-0,3 см), которые помещаются в стерильные пластиковые чашки Петри (Greiner), вносится ростовая среда (DMEM с добавлением 10%-ов сыворотки плодов коров (HyClone), содержащая раствор гентамицина сульфата в концентрации 100 мкг/мл), проводится инкубация в термостате с 5%-м содержанием CO₂ при температуре +37°C. Морфологию и фенотип клеток оценивают на 4-7 сутки культивирования. Для накопления биомассы КФК проводится субпассирование путем пересева клеток в культуральные пластиковые флаконы (25 см², затем 75 см²) в концентрации (1,5-2,0)×10⁵/мл. среды. Монослой фибробластоподобных клеток формируется в течение 10-12 суток. Для получения суспензии клеток монослой обрабатывают 0,25% раствором трипсина с 0,02% раствором Версена (1:2) и затем снимают со дна культурального флакона. Получают гомогенную клеточную взвесь, которую разводят питательной средой до необходимого состояния. Готовят и используют суспензию БМКП с концентрацией КФК (1,0-6,0)×10⁶/мл. Сроки наращивания биомассы клеток – не менее 3 недель.

Локальному применению аутологичных КФК должны предшествовать: оценка подлинности и жизнеспособности клеток (выявление клеток в суспензии округлой формы, которые при посеве прикрепляются к дну культурального флакона и образуют монослой веретеновидных пролиферативно-активных, жизнеспособных клеток, не менее 90%), микробиологическое исследование (отсутствие контаминации бактериями, грибами, микоплазмами, цитопатогенными вирусами), фенотипирование (CD90+ более 80%, CD44 более 80%, CD73 более 80%, CD34 менее 5%, виментин не менее 25%) и количественное содержание клеток (не менее $1,0 \times 10^6$ клеток, при относительном числе КФК в культуре не менее 95%).

Третий этап. Подготовка трофической язвы реципиента к применению БМКП (сроки подготовки зависят от стадии раневого процесса у конкретного пациента). Подготовка раневого дефекта осуществляется с использованием локальной антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) и локальной фоторегуляторной терапии (ФРТ), которые применяются последовательно – с учетом фазы раневого процесса (инструкция по применению №143-1211 от 16.02.2012).

Проведение локальной АФДТ. На раневую поверхность наносится фотосенсибилизатор (ФС) в форме мази (из расчета 0,3 мл на 1 см²). Экспозиция ФС должна составлять не менее 30 минут. Затем проводится облучение раневого дефекта неполяризованным светодиодным излучением (НСИ) с параметрами воздействия: длина волны НСИ $\lambda_1 = (0,405 \pm 0,02)$ мкм, плотность энергии облучения (ПЭО) за один сеанс 20 ± 5 Дж/см². После этого рана укрывается асептической повязкой. Курс лечения предусматривает 5-7 сеансов (1 процедура в день).

Проведение локальной ФРТ. После обработки растворами антисептиков проводится облучение раневой поверхности

поляризованным светодиодным излучением (ПСИ) с параметрами: длина волны ПСИ $\lambda_2 = (0,630 \pm 0,03)$ мкм, ПЭО за один сеанс 10 ± 5 Дж/см². ФС не используется. Рана укрывается асептической повязкой. Процедура ФРТ проводится 1 раз в день. Курс лечения обычно составляет 5-7 дней.

Клиническими критериями готовности ТЯ к выполнению локального применения КФК являются признаки завершения фазы воспаления: отсутствие налётов фибрина, уменьшение общего микробного числа до уровня менее 10^3 КОЕ/мл, начало активации репаративных процессов по периметру раневого дефекта.

Четвёртый этап. Локальное применение аутологичных КФК.

Локальная трансплантация аутологичных КФК осуществляется после окончания фазы воспаления – во второй и третьей фазах раневого процесса. В асептических условиях выполняется введение аутологичных КФК в область раневого дефекта в виде суспензии и/или в составе биоповязок с содержанием различного количества клеток – в зависимости от площади ТЯ. БМКП может вводиться инъекционно по периферии (внутрикожно или подкожно из нескольких точек на расстоянии 1 см от края раны), а также инъекционно или аппликационно в центральную часть раневого дефекта. Лечебная доза составляет не менее 1×10^5 КФК на 1 см² раневой поверхности. После выполнения клеточной пересадки накладывается смоделированная по ране асептическая каркасная повязка, которая обеспечивает адекватный влаго- и газообмен, является непроницаемой для бактерий и позволяет проводить визуальную оценку динамики раневого процесса.

Локальная клеточная трансплантация может выполняться повторно с интервалом 7-10 суток. Кратность применения БМКП определяется размером раневого дефекта, пролиферативной активностью КФК

конкретного пациента и потенциальной возможностью накопления необходимой клеточной биомассы.

Пятый этап. Посттрансплантационное наблюдение и ведение пациента.

Первые 3-5 суток после выполнения пересадки КФК перевязки не проводят. В дальнейшем перевязки осуществляют в максимально щадящем для раны режиме, без дополнительного локального медикаментозного воздействия. Результаты лечения оценивают в течение 1 месяца после трансплантации КФК по динамике состояния раневого дефекта и окружающих тканей (отёк, гиперемия, мацерация). Главным критерием эффективности изложенного в настоящей инструкции метода лечения являются скорость и сроки эпителизации раны.

По показаниям в комплексном лечении применяется системная терапия, направленная на улучшение реологических свойств крови, микроциркуляции и тканевого обмена. При необходимости назначается адекватная компрессионная терапия.

Возможные осложнения и методы их устранения

Во время и после оперативного вмешательства по забору кожного лоскута возможно развитие общехирургических осложнений – таких, как кровотечение, нагноение и некроз края раны. Соблюдение правил асептики и антисептики, минимальная травматичность хирургической техники и тщательный гемостаз по ходу выполнения операции позволяют исключить развитие указанных осложнений.

Возможно развитие осложнений, связанных непосредственно с биомедицинским клеточным продуктом – снижение функциональной активности пересаженных клеток или их гибель (частичная или полная).