

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

13.04. 2012 г.

Регистрационный № 019-0212

МЕТОД ПЛАСТИКИ ОБШИРНЫХ ДЕФЕКТОВ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ТРАНСПЛАНТАТА С АУТОЛОГИЧНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Канд. мед. наук, доц. Богдан В.Г., д-р мед. наук, проф. Гаин Ю.М.,
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси Демидчик Ю.Е.,
канд. мед. наук, доц. Зафранская М.М., канд. мед. наук, доц. Шахрай С.В.,
канд. мед. наук, доц. Шелкович С.Е., Багатка С.С., Юркевич М.Ю.

Минск 2012

В настоящей инструкции представлен метод повышения эффективности лечения пациентов с послеоперационными грыжами больших и гигантских размеров за счёт образования в зоне пластики дефекта полноценной соединительной ткани с достаточной прочностью, а так же снижения риска развития специфических послеоперационных раневых осложнений, обусловленных патологическим влиянием сетчатого имплантата на окружающие ткани, уменьшения количества рецидивов заболевания и улучшения качества жизни пациентов.

Инструкция содержит клинические рекомендации по лечению пациентов с обширными дефектами брюшной стенки при послеоперационных грыжах с использованием многокомпонентного биологического трансплантата с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани (МСК ЖТ), дифференцированными в фибробластном направлении.

Рекомендации включают алгоритм отбора пациентов, выполнение забора биологического материала, лабораторные протоколы выделения, культивирования, предтрансплантационной подготовки и дифференцировки МСК ЖТ в фибробластном направлении, бактериологический контроль стерильности полученной культуры, подсчет количества клеток с оценкой их жизнеспособности и контролем фенотипа, методику получения многокомпонентного биологического трансплантата с культурой аутологичных МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, непосредственно варианты пластики дефекта передней брюшной стенки с использованием многокомпонентного биологического трансплантата.

Инструкция предназначена для хирургов и трансплантологов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Набор хирургических инструментов (скальпель, пинцеты, зажимы, цапки для белья, ножницы хирургические [Матье, Купера, сосудистые], иглодержатель, корнцанг, крючки лапаротомные).
2. Шовный хирургический материал (нить полипропиленовая, рассасывающиеся и нерассасывающиеся нити).
3. Ламинарный бокс 2 класса защиты.
4. CO₂-инкубатор.
5. Автоматические дозаторы переменного объема 2-5000 мкл.
6. Центрифуга с охлаждением (1500 об/мин).
7. Микроскоп инвертированный.
8. Стерильные чашки Петри диаметром 60 мм с поверхностью для адгезивных культур.
9. Термостат.
10. Камера Горяева.
11. Проточный цитофлуориметр.
12. Автоклав.
13. Стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл.
14. Стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл.

15. Пробирки для проточной цитофлуориметрии объемом 4 мл.
16. Сетка хирургическая полипропиленовая.
17. Стерильные наконечники для дозаторов.

РЕАКТИВЫ

1. Гепарин (5000 Ед/мл).
2. Фосфатный буферный раствор (PBS).
3. Культуральная среда DMEM-LG с 25мМ HEPES.
4. Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), инактивированная (30 мин при 56°С).
5. Раствор антибиотиков для антимикотической защиты клеточной культуры (5 мг/мл пенициллина, 5 мг/мл стрептомицина, 10 мг/мл неомицина).
6. Раствор 200 мМ L-глутамина.
7. Раствор 0,25% трипсин-ЭДТА.
8. Раствор 0,075% коллагеназы
9. Диметилсульфоксид (DMSO).
10. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК – CD90, CD105, CD44, CD119, CD45, CD34, CD31, CD14.
11. Среды для микробиологического контроля.
12. Ростовые факторы: 10 нг/мл FGFβ, 10 нг/мл EGF, 10 нг/мл TGFβ1, 5нг/мл TGFβ3.
13. 10% раствор желатина.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Послеоперационные грыжи больших размеров (грыжевое выпячивание от 15 до 25 см полностью занимает одну анатомическую область передней брюшной стенки, деформирует живот пациента, размер дефекта передней брюшной стенки [грыжевых ворот] от 10 до 15 см) и гигантских размеров (грыжевое выпячивание свыше 25 см занимает более одной анатомической области передней брюшной стенки, резко деформирует живот, мешает пациенту ходить, размер грыжевых ворот более 15 см) любой локализации.

Информированное согласие пациента на забор ткани и выполнение трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани, утвержденное этическим комитетом учреждения здравоохранения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Беременность, кормление грудью.
2. Тяжелые сопутствующие заболевания (застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, пневмония, сепсис, кровотечение, декомпенсированный сахарный диабет, перенесенные ранее тромбозэмболические осложнения, физическая несостоятельность, кахексия).
3. Тяжелые психические нарушения.
4. Сопутствующие онкологические заболевания.
5. Наличие острого либо обострение хронического воспалительного процесса.

Описание технологии использования метода пластики обширных дефектов передней брюшной стенки при послеоперационных грыжах с использованием многокомпонентного биологического трансплантата с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани дифференцированными в фибробластном направлении

Забор биологического материала

Забор биологического материала у пациента с послеоперационной грыжей выполняют под местной инфильтрационной или комбинированной анестезией инцизионным способом с помещением фрагмента подкожной жировой клетчатки в объеме до 10 см³ в герметичный контейнер с транспортной средой и последующей его доставкой в течение ближайших 2 ч в лабораторию для выделения и культивирования МСК ЖТ.

Приготовление рабочих растворов и сред

Полная питательная среда для культивирования клеток: среда DMEM-LG, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, антибиотика (50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина).

Среда для предтрансплантационной подготовки: среда DMEM-LG, 20% обогащенной тромбоцитами плазмы, 2 mM L-глутамина, антибиотика (50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина).

Среда для дифференцировки МСК в фибробластном направлении: среда DMEM-LG, 0,9% человеческой сыворотки, 10 нг/мл FGFβ, 10 нг/мл EGF, 10 нг/мл TGFβ1, 5 нг/мл TGFβ3, 2 mM L-глутамина, антибиотика (50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина).

Выделение МСК ЖТ

1. Жировую ткань промывают фосфатным буферным раствором, гомогенизируют с использованием стерильных ножниц (при необходимости) и инкубируют с 0,075% раствором коллагеназы I типа в объемном соотношении 1:1 в фосфатном буферном растворе при 37 °C в течение 45 мин.

2. Нейтрализацию фермента проводят равным объемом фосфатного буферного раствора, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

3. Полученную в результате обработки коллагеназой суспензию клеток отмывают 2 раза центрифугированием при 400g (1500 об/мин).

4. Клеточный осадок, содержащий стромальные клетки, ресуспендируют в полной питательной среде и производят подсчет клеток при помощи камеры Горяева.

5. Полученную суспензию клеток в полной питательной среде помещают в культуральные чашки, диаметром 60 мм в концентрации 5×10^4 клеток на 1 см².

6. Клетки инкубируют при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч для адгезии МСК.

7. Через 24 ч удаляют среду с не прикрепившимися клетками и добавляют 4 мл новой полной питательной среды.

8. МСК культивируют, проводя полную замену питательной среды на аналогичную каждые третьи сутки, при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ до достижения культурами 80-90% конfluence (в среднем, 15 сут). Контроль морфологической гомогенности культур МСК производят по достижении культурами 80-90% конfluence при помощи инвертированного микроскопа.

Пролиферативный этап. Предтрансплантационная подготовка МСК ЖТ для ауотрансплантации

1. По достижении культурами 80-90% конfluence клетки пересевают. Для посева удаляют из чашек питательную среду, один раз аккуратно промывают чашки 3 мл фосфатного буферного раствора и добавляют 0,25%-й раствор трипсин/ЭДТА по 1 мл на чашку. Инкубируют в течение 10 мин при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Открепление клеток от поверхности пластика контролируют с помощью инвертированного микроскопа.

2. В чашки добавляют по 3 мл фосфатного буферного раствора, содержащего 10% фетальной бычьей сыворотки, суспензию клеток переносят в пробирки и центрифугируют 10 минут при 400g (1500 об/мин). После центрифугирования супернатант удаляют дозатором, а клеточный осадок суспендируют в фосфатном буферном растворе и повторно центрифугируют при 400g (1500 об/мин).

3. МСК ресуспендируют в 1 мл полной питательной среды. Производят подсчет клеток при помощи камеры Горяева и оценивают их жизнеспособность методом исключения красителя. Жизнеспособность должна быть не менее 98%.

4. Взвесь МСК в полной питательной среде объемом 4 мл помещают в культуральные чашки с диаметром дна 60 мм, в концентрации 1×10^4 клеток на см² и культивируют при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ до достижения культурами около 50% конfluence, проводя полную замену питательной среды на аналогичную на 3-и сут. Через 1 сут после посева из каждой чашки забирается по 600 мкл культуральных супернатантов для посева на питательные среды с целью контроля стерильности. Все собранные супернатанты объединяются (общий объем собранного супернатанта для посева с целью контроля стерильности должен составлять 3 мл).

5. По достижении культурами около 50% конfluence дозатором удаляют полную питательную среду из чашек. В чашки добавляют по 3 мл среды для предтрансплантационной подготовки. Обогащенную тромбоцитами плазму получают из периферической аутокрови человека (30 мл), взятой с антикоагулянтом – гепарином в соотношении 20 МЕ на 1 мл. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы, периферическую кровь центрифугируют при 1300 об/мин в течение 10 минут. Супернатант, содержащий плазму и тромбоциты, отбирают и повторно центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Бедную тромбоцитами плазму отбирают в пробирку, после чего

осадок, содержащий тромбоциты и незначительную примесь эритроцитов и лейкоцитов, разводят в 1 мл полученной плазмы. После подсчета количества тромбоцитов в полученной суспензии оставшиеся тромбоциты ресуспендируют в бедной тромбоцитами плазме в концентрации 1×10^9 /мл. Полученную обогащенную тромбоцитами плазму используют для приготовления среды с целью предтрансплантационной подготовки.

6. МСК культивируют в среде для предтрансплантационной подготовки, проводя полную замену среды на аналогичную на третьи сутки, при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 до достижения культурами 80-90% конфлюэнтности.

Дифференцировочный этап. Получение МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении

1. По достижении культурами около 50% конфлюэнтности дозатором удаляют полную питательную среду из чашек. В чашки добавляют по 3 мл среды для дифференцировки в фибробластном направлении.

2. МСК культивируют в среде для дифференцировки в фибробластном направлении, проводя полную замену среды на аналогичную на 3-и сут, при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 до достижения культурами 80-90% конфлюэнтности.

Бактериологический контроль стерильности культуры МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении

Микробиологический контроль проводят в специализированной микробиологической лаборатории, аттестованной для проведения исследований медико-биологических препаратов.

1. Контроль культуры на бактериальные и микотические загрязнения проводят путём посева по 1000 мкл культурального супернатанта от МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, в пробирки со средой Сабура, тиогликолевой средой и питательным бульоном (по 1 пробирке с каждой средой).

2. Посевы на тиогликолевую среду и питательный бульон инкубируют при $30-35^\circ\text{C}$, а посевы на среду Сабура – при температуре $20-25^\circ\text{C}$ в течение 14 сут.

3. Просматривают чашки Петри и пробирки при хорошем освещении с целью выявления колоний микроорганизмов. При отсутствии роста микроорганизмов культура считается прошедшей контроль стерильности.

Подсчет количества МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, и оценка их жизнеспособности

1. Среду для дифференцировки в фибробластном направлении из чашек удаляют дозатором, в чашки добавляют по 1 мл раствора трипсина/ЭДТА и инкубируют в течение 10 мин при 37°C , открепление клеток от поверхности пластика контролируют с помощью инвертированного микроскопа. В чашки вносят по 3 мл фосфатного буферного раствора, содержащего 0,9%

человеческой сыворотки, суспензию клеток переносят в пробирки и центрифугируют 10 мин при 400g (1500 об/мин). После центрифугирования супернатант удаляют дозатором, а клеточный осадок суспендируют в фосфатном буферном растворе, содержащем 0,9% человеческой сыворотки, и повторно центрифугируют при 400g (1500 об/мин).

2. Полученный осадок МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, суспендируют в 1 мл фосфатного буферного раствора. В 0,5 мл пробирку вносят 10 мкл суспензии клеток и 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего, тщательно смешивают содержимое пробирки и заполняют камеру Горяева 10 мкл полученной взвеси. При помощи светового микроскопа визуально подсчитывают в больших квадратах сетки Горяева окрашенные (мертвые) и неокрашенные (живые) МСК ЖТ, дифференцированные в фибробластном направлении, в количестве не менее 200 клеток.

3. Рассчитывают коэффициент жизнеспособности делением числа живых ЭПК на сумму всех подсчитанных МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении. Жизнеспособность МСК ЖТ в культуре не должна быть ниже 98%.

4. Рассчитывают число МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении в 1 мл.

Контроль фенотипа МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении

Оценку фенотипа клеток проводят путем исследования экспрессии поверхностных маркеров на проточном цитофлуориметре.

МСК ЖТ, дифференцированные в фибробластном направлении, характеризуются отсутствием антигенов CD31, CD34 и CD45 и наличием экспрессии молекул CD90, CD105, CD44, которые являются характерными маркерами клеток мезенхимального происхождения.

Культура МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, считается прошедшей фенотипический контроль при наличии относительного числа клеток, экспрессирующих маркер CD90, менее 10%, CD105 – не более 90%, CD44 – не более 90%, CD31, CD34 и CD45 – менее 5%.

Получение многокомпонентного биологического трансплантата с культурой аутологичных МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении

К 10% раствору желатина, нагретому на водяной бане при 37 °С до полного растворения, добавляют физиологический раствор в равном объеме. Осадок снятых с поверхности культурального пластика дифференцированных в фибробластном направлении МСК ЖТ разводят обогащенной тромбоцитами аутоплазмой в объеме, составляющем 20% от конечного объема геля, и добавляют к 5% раствору желатина. Полученный гель разводят физиологическим раствором до концентрации желатина 2,5% (по объему). Концентрация клеток в геле составляет не менее $1,5 \times 10^5$ /мл. Полученный многокомпонентный биологический трансплантат с культурой аутологичных

МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении (гель с трехмерной структурой), переносят в транспортный контейнер с проведением трансплантации в течение ближайших 2 ч.

Пластика дефекта передней брюшной стенки с использованием многокомпонентного биологического трансплантата с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, дифференцированными в фибробластном направлении (вариант 1)

Выполняют кожный разрез, выделяют грыжевой мешок и грыжевые ворота. Вскрывают влагалища прямых мышц живота по их медиальным краям в непосредственной близости от зоны смыкания переднего и заднего листков с последующей мобилизацией задних листков влагалищ прямых мышц с обеих сторон и сшиванием противоположных апоневротических листков между собой непрерывным обвивным швом, с образованием единой апоневротической структуры. Дополнительно накладывают ряд швов с захватом латерального края заднего листка влагалища прямых мышц живота. Затем размещают под прямыми мышцами многокомпонентный биологический трансплантат с культурой аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани из расчета не менее $1,5 \times 10^5$ клеток/мл 2,5% желатинового геля, содержащего 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмы. Послойный шов операционной раны с дренированием подкожной клетчатки.

Пластика дефекта передней брюшной стенки с использованием многокомпонентного биологического трансплантата с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, дифференцированными в фибробластном направлении (вариант 2)

Выполняют иссечение старого послеоперационного рубца, выделение и вскрытие грыжевого мешка. Стенки грыжевого мешка иссекают. Висцеролиз. Выделение краев грыжевого дефекта. Производят пластику дефекта передней брюшной стенки с использованием сетчатого имплантата с расположением его под мышечно-апоневротическим слоем передней брюшной стенки и отграничением от органов брюшной полости большим сальником или брюшиной. Выполняют дополнительное покрытие сетчатого имплантата многокомпонентным биологическим трансплантатом (2,5% желатиновым гелем, содержащим культуру аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани из расчета не менее $1,5 \times 10^5$ клеток/мл и 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмы). Затем осуществляют сшивание краев дефекта непрерывным швом. Вторым рядом непрерывного шва герметизируют зону пластики. Послойный шов операционной раны с дренированием подкожной клетчатки.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

Формирование подкожной гематомы, серомы, нагноение операционной раны.

Пути устранения: тщательный гемостаз, антибактериальная периоперационная профилактика, дренирование подкожной клетчатки вакуумным дренажом Редона.