МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

МЕТОД ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ НА ОСНОВЕ КОМБИНИРОВАННОГО ГРАФТА С ИНСТАЛЛЯЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Петрова Д.Ю., Подгайский В.Н., Зафранская М.М., Мечковский С.Ю.

Программа Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток»

(шифр «Стволовые клетки»)

АКТУАЛЬНОСТЬ

Значительные достижения в хирургии периферических нервов с применением микрохирургической техники, к сожалению не сопровождаются аналогичными результатами улучшения регенерации нерва и как следствие восстановлением функций конечностей в полном объеме.

Положительные результаты экспериментальных исследований с использованием клеточных технологий в хирургии периферических нервов легли в основу нового взгляда в клинической медицине. Интерес к этому направлению неуклонно растет, о чем свидетельствует большое количество ежегодно появляющихся научных исследований в мировом сообществе.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

РАЗРАБОТАТЬ И ВНЕДРИТЬ МЕТОД ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ НА ОСНОВЕ КОМБИНИРОВАННОГО ГРАФТА С ИНСТАЛЛЯЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НЕЙРАЛЬНОЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ.

МАТЕРИАЛЫ

Жировая ткань человека, забор осуществлялся путем липоаспирации, выполняемой под местной инфильтрационной анестезией, в условиях операционной.

Жировая ткань лабораторных животных, в стерильных условиях под внутрибрюшным тиопенталовым наркозом забор жира производили из внутрибрюшинного пространства.

Гель стабилизированной (Juvederm Ultra) и нестабилизированной (Juvederm Hydrate) **гиалуроновой кислоты** производства компании Allergan (Франция)

МЕТОДЫ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА У ЛАБОРАТОРНОГО ЖИВОТНОГО

1-я группа (n = 10): 0,9% раствор хлорида натрия без клеток

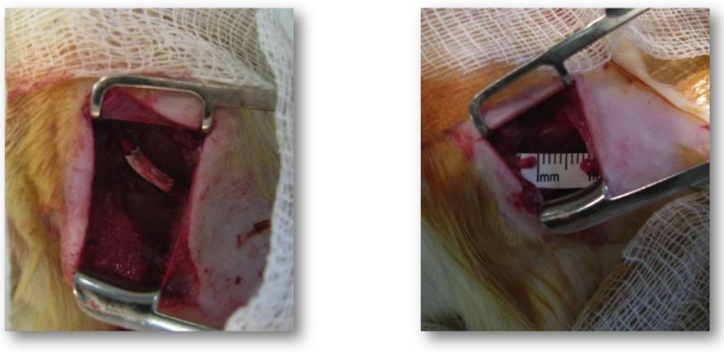
2-я группа (n = 10): взвесь МСК ЖТ в количестве $1x10^6$/мл.

3-я группа (n = 10): взвесь МСК ЖТ в количестве $1x10^6$/мл в геле гиалуроновой кислоты, в соотношении 2:1 (среда : гель)

4-я группа (n = 10): взвесь МСК трансдиференцированных в нейральном направлении в количестве $1x10^6$/мл в геле гиалуроновой кислоты, в соотношении 2:1 (среда : гель)

Модель повреждения седалищного нерва крысы

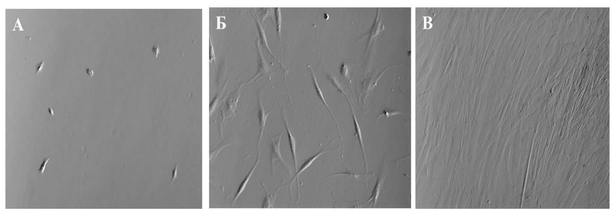
Способ восстановления периферического нерва у животного: приоритетная справка на выдачу патента РБ № a 20120832 от 28.05.2012г.



- Культурально-цитологические методы исследования
- Иммуноцитохимический метод
- Метод проточной цитофлуориметрии
- Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени
- Гистологическиое исследование
- Метод регистрации вызванных потенциалов мышцы – н- и м-ответов.

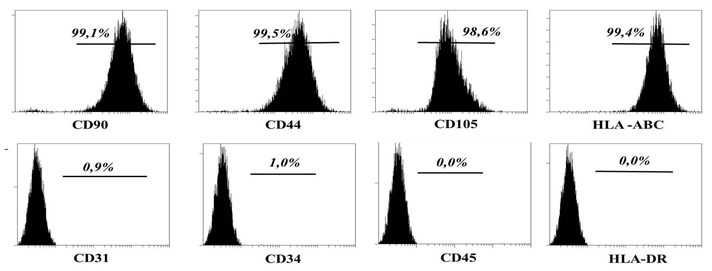
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфо-фенотипическая характеристика культур МСК жировой ткани человека

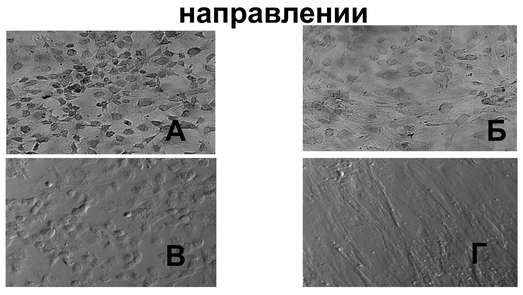


А – 1-ый день культивирования
Б – 6-ой день культивирования
В – 18-ый день культивирования

Фенотипическая характеристика первичной культуры МСК жировой ткани человека

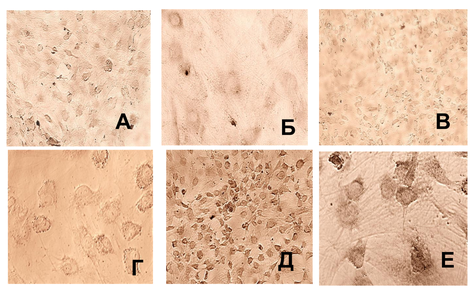


Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в нейральном направлении



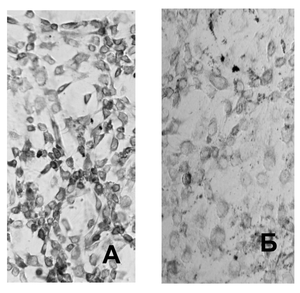
А - дифференцированные МСК жировой ткани (ув.100),
Б - дифференцированные МСК жировой ткани (ув. 100),
В - контрольная культура МСК жировой ткани(ув.100),
Г - контрольная культура МСК жировой ткани(ув.100).

Экспрессия внутриклеточного белка S-100



А,Б - контрольная культура МСК (ув. 100)
В,Г - отрицательный контроль (ув.100,ув.400)
Д,Е - дифференцированные МСК в нейральном направлении (ув.100,ув.400)

Экспрессия нестина

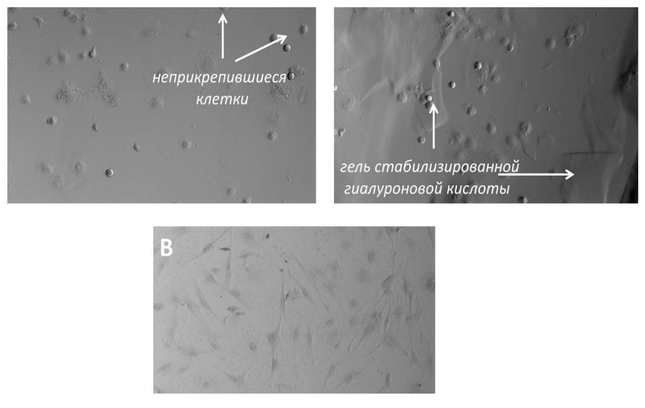


А – дифференцированные МСК (ув.100)
Б – контрольная культура МСК (ув. 100)

Способ дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека в Шванновские клетки: приоритетная справка на выдачу патента РБ № a 20121808 от 21.12.2012г.

Лабораторный регламент на производство культуры аутологичных леммоцит-подобных клеток от 12.10.2012г.

Адгезивные и морфологические особенности МСК ЖТ культивируемых в присутствии геля гиалуроновой кислоты



КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Республиканский центр пластической хирургии и микрохирургии УЗ «Минская областная клиническая больница».

Забор материала и выполнение трансплантации МСК ЖТ выполнялись на базе отделения микрохирургии УЗ МОКБ.

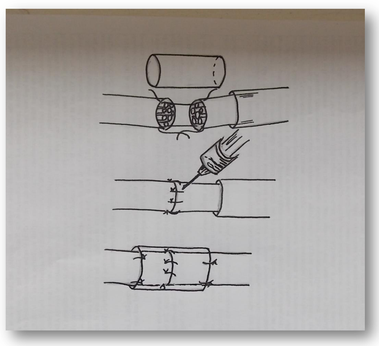
Получение, культивирование и направленная нейральная дифференцировка МСК ЖТ выполнялись сотрудниками иммунологической группы «Стволовая клетка» НИЛ БелМАПО.

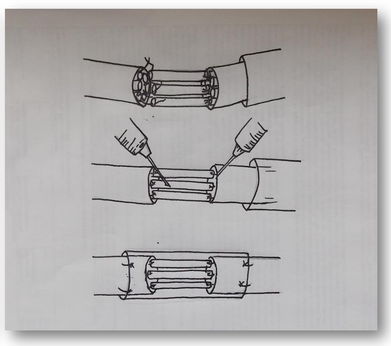
Основная группа исследования – 6 пациентов с повреждением периферических нервов:
n=3 – трансплантация МСК ЖТ,
n=3 - трансплантация МСК ЖТ трансдифференцированных в нейральном направлении.

Характер повреждения периферического нерва	Тактика лечения
Нейропраксия	Оперативное лечение не показано
Аксонотмезис	Оперативное лечение: - ревизия нерва, невролиз + трансплантация МСК в область повреждения (субэпиневральное и перineвральное введение); -ревизия нерва, иссечение травматической невромы, шов нерва + трансплантация МСК (субэпиневральное и перineвральное введение)
Невротмезис	Оперативное лечение: - ревизия нерва, иссечение невромы, шов нерва +трансплантация МСК (субэпиневральное и перineвральное введение); - ревизия нерва, восстановление целостности нерва с использованием комбинированного графта с инсталляцией МСК (аутонейротрансплатация + трансплантация МСК (субэпиневральное и перineвральное введение)

Эпиневральный шов. Аутотрансплантация Клеточной биокомпозиции

Интерфасцикулярная аутонейропластика с использованием изолирующей муфтой из ПТФЭ и аутотрансплантацией клеточной биокомпозиции





ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«Метод хирургического лечения пациентов с повреждением периферических нервов на основе комбинированного графта, представляющего собой трубчатую конструкцию из ПТФЭ, заполненную матриксом с инсталляцией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в условиях нейральной трансдифференцировки»

утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 05.12.2013г.