

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц
«27» октября 2016 г.

Регистрационный № 053-0916

**МЕТОД ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ ТРАХЕИ И
ГЛАВНЫХ БРОНХОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОРАЖЕНИЕМ
ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ИЛИ
РУБЦОВОЙ ЭТИОЛОГИИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор В.В. Жарков, Е.Ю. Демидчик, С.А. Еськов, Я.И. Исайкина.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

28.10.2016

Регистрационный № 053-0916

**МЕТОД ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ ТРАХЕИ
И ГЛАВНЫХ БРОНХОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОРАЖЕНИЕМ ВЕРХНИХ
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ИЛИ РУБЦОВОЙ ЭТИОЛОГИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.В. Жарков, Е.Ю. Демидчик, С.А. Еськов, Я.И. Исайкина

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод хирургического лечения пациентов с поражением верхних дыхательных путей опухолевой или рубцовой этиологии, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов, страдающих данной патологией.

Инструкция предназначена для врачей — торакальных хирургов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим заболеваниями верхних дыхательных путей опухолевой или рубцовой этиологии.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. CO₂-инкубатор для культивирования стволовых клеток.
2. Микроскоп, инвертированный универсальный.
3. Ламинарный бокс 2-й степени защиты с вертикальным потоком воздуха.
4. Центрифуга.
5. Проточный цитофлуориметр.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (объем дозирования 10–100 и 100–1000 мкл, 5–50 мл).
7. Автоклав (температура 132±5°C).
8. Термостат (температура от 20 до 40°C).
9. Холодильник бытовой с морозильной и холодильной камерами (температура в холодильной камере от -2 до -8°C; в морозильной от -20 до -25°C).
10. Холодильник с морозильной камерой (температура в морозильной камере -70±3°C).
11. Камера Горяева.
12. Стерильный 9 % раствор хлорида натрия.
13. Деионизированная вода.
14. 1 % раствор детергента TritonX-100.
15. 1 % раствор детергента SDS.
16. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам мезенхимальных стволовых клеток (МСК): CD105, CD90, CD73, CD54, CD116, CD13, CD45, CD44, CD34, CD31, CD14, CD117.
17. Питательная среда DMEM с содержанием глюкозы 1г/л (жидкая, стерильная).
18. Трипановый синий (0,4 % раствор).
19. Трипсин ЭДТА (стерильный раствор).
20. Фетальная бычья сыворотка (ФБС).
21. Флаконы для клеточных культур с фильтром.
22. Фосфатный буферный раствор Дульбекко (концентрат, без кальция и магния, стерильный).
23. L-глутамин.
24. Гистопак-1077.
25. Стерильные наконечники с фильтром для дозаторов 5; 10; 50 мл.

26. Стерильные наконечники без фильтра для дозаторов 10–200 и 100–1000 мкл.

27. Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышками (объем 50 мл), стерильные.

28. Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышками (объем 15 мл), стерильные.

29. Изделия медицинского назначения и лекарственные средства необходимые для проведения хирургического вмешательства.

30. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК, дифференцированных в хондрогенном направлении; CD29, CD44, CD90, CD105.

31. IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста.

32. TGF- β 1 — трансформирующий фактор роста.

33. Дексаметазон.

34. Витамин С.

35. Пролин.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Протяженный стеноз с поражением трахеи опухолевой или рубцовой этиологии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Первично-множественный синхронный и метакронный рак обоих легких или сочетание рака легкого и опухолей других локализаций, за исключением рака шейки матки, эндометрия, кожи и нижней губы, щитовидной железы, слюнной железы, молочной железы, прямой и ободочной кишки, которые были радикально излечены не менее трех лет назад и не имеющие признаков прогрессирования.

2. Множественные отдаленные метастазы.

3. Легочное кровотечение.

4. Активный туберкулез.

5. Застойная сердечная недостаточность класса Н2Б или Н3, не связанная с опухолевым процессом.

6. Неконтролируемая тяжелая гипертензия или гипертензия с систолическим давлением >180 мм рт. ст., и/или с диастолическим давлением >110 мм рт. ст. либо ортостатическая гипотензия.

7. Прорастание опухоли в слизистую оболочку пищевода.

8. Выраженное нарушение функции печени — уровни АСТ или АЛТ превышают верхнюю границу нормы в 3 раза и более.

9. Выраженное нарушение функции почек — клиренс креатинина <50 мл/мин, рассчитанный по формуле Cockcroft и Gault.

10. Судромутизм, шизофрения, маниакально-депрессивные состояния, хронический алкоголизм и когнитивные нарушения.

11. Инсулинозависимый сахарный диабет средней степени тяжести.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

У пациентов с изолированными поражениями трахеи, а также и главных бронхов со значительным переходом на трахею (длина резецируемого участка более 6 см) выполняется длительная предоперационная подготовка, которая включает этапы:

Забор подходящего по анатомическим признакам (длина, диаметр) донорского органа (трахеи)

Донорская трахея может быть получена у доноров с умершим головным мозгом и бьющимся сердцем после диагностики смерти головного мозга на основании «Инструкции о порядке констатации биологической смерти и прекращения мер по искусственному поддержанию жизни пациента» № 228 от 20.12.2008. Консервированный в среде для деконтаминации орган доставляется в лабораторию, где в условиях ламинарного потока воздуха выполняется механическая очистка от жировой ткани и претрахеальной фасции, осуществляется контроль на стерильность согласно инструкции по применению № 075-0210 от 12.02.2010. «Микробиологические методы исследования биологического материала» и инструкции по применению № 226-1200 от 2008 г. «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Децеллюляризация донорской трахеи

Децеллюляризация донорской трахеи осуществляется ферментно-детергентным методом в течение 14 сут. Метод выполняется попеременной перфузией трахеи при постоянном помешивании в термошейкере при 200 об./мин. Объем раствора зависит от размера органа.

1. На первом этапе производится отмывание донорской трахеи в смеси растворов антибиотиков и антимикотиков (цефатаксим и флюконазол соответственно).

2. На втором этапе донорская трахея отмывается в 1 %-м растворе детергента TritonX-100 и деионизированной воде, смена растворов осуществляется каждые 2 ч.

3. На третьем этапе донорская трахея отмывается в 1 %-м растворе детергента SDS и деионизированной воде, смена растворов осуществляется каждые 2 ч.

4. На четвертом этапе децеллюляризация осуществляется с использованием стерильного 9 %-го раствора натрия хлорида и деионизированной воды, смена растворов производится каждые 2 ч.

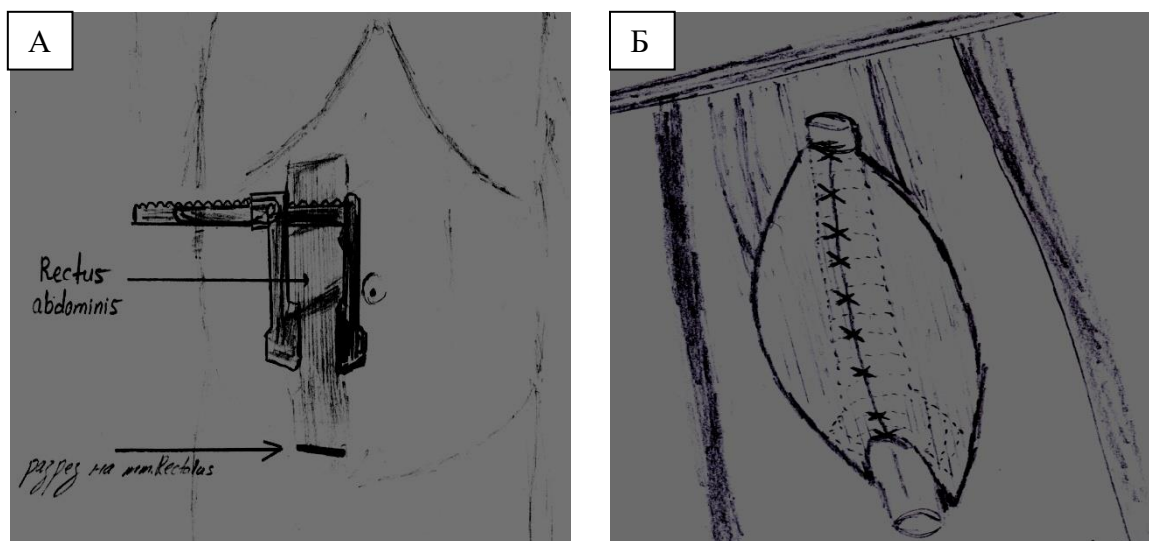
После указанных выше этапов производится контроль стерильности донорской трахеи по стандартной методике.

Указанные этапы повторяются 4 раза, после чего донорская трахея отмывается в растворе ДНКазы. По окончании производится проба на стерильность, наличие остаточной ДНК, гистологическое исследование по стандартным методикам.

Имплантация децеллюляризированной трахеи в прямую мышцу живота.

Параректальный разрез кожи, подкожно-жировой клетчатки. Выделение прямой мышцы живота с питающими сосудами, пересечение апоневроза.

Имплантация децеллюляризированной донорской трахеи в мышцу, циркулярное укрытие мышцей с формированием двух стомических отверстий, через которые вводится полая, перфорированная силиконовая трубка, совпадающая по размерам с наименьшим диаметром протеза.



а — выделение прямой мышцы живота; б — укрытие децеллюляризированной трахеи прямой мышцей живота

Рисунок 1. — Этапы имплантации децеллюляризированной трахеи в прямую мышцу живота

Забор костного мозга пациента

Забор костного мозга пациента осуществляется в момент выполнения хирургического вмешательства по имплантации децеллюляризированной трахеи в прямую мышцу живота реципиента. При помощи иглы с мандреном выполняется пункция гребня подвздошной кости или грудины. Объем для забора костного мозга 60 мл.

Выделение и наращивание мезенхимальных стволовых клеток, преддифференцировка в хондрогенном направлении

Пунктат костного мозга разводится в 2 раза фосфатно-солевым буфером (PBS) или стерильным 9 %-м раствором натрия хлорида, наслаивается на градиент плотности Гистопак-1077 ($\rho = 1,077$) в соотношении 3:1 соответственно. Пробирки с образцом центрифугируются 20 мин при 1500 об./мин. В чистые пробирки отбирается фракция моонуклеарных клеток. К полученным клеткам добавляется PBS или стерильный 9 %-й раствор натрия хлорида. Пробирки центрифугируются 10 мин при 1500 об./мин. Процедура отмывки повторяется дважды. Проводится подсчет клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Клетки ресуспензируются в питательной среде (среда DMEM с низким содержанием глюкозы, 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 0,001 мл базового раствора комплексного антибиотика и антимикотика) и высеваются в культуральные флаконы

в концентрации $0,4 \times 10^6 / \text{см}^2$. Флаконы помещаются в CO_2 -инкубатор при 37°C и 5 %-м CO_2 на 24 ч.

После просмотра культуральных флаконов под микроскопом производится смена полной питательной среды. Флаконы с культурой клеток помещаются в CO_2 -инкубатор. Смена среды осуществляется каждые 3–4 дня. По достижении монослоем 80–90 % площади культурального флакона производится снятие клеток 0,25% раствором трипсин-ЭДТА и пассажирование в новые культуральные флаконы.

Преддифференцировка клеток в хондрогенном направлении проводится после накопления достаточного количества клеток (1×10^6 на каждое хрящевое полукольцо) в течение 7 дней с добавлением в питательную среду факторов роста.

Клетки однократно отмываются D-PBS и ресуспендируются в 1 мл полной культуральной среды для подсчета концентрации в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Клетки ресуспензируются в питательной среде с добавлением факторов роста (дексаметазон, витамин С, пролин, TGF- β , IGF-1 и высеваются в культуральные флаконы в концентрации $0,4 \times 10^6 / \text{см}^2$. Флаконы помещаются в CO_2 -инкубатор при 37°C и 5 %-й CO_2 с 95 % влажностью. Замена среды с добавлением свежеприготовленного TGF- β 3 производится каждые 3 дня.

Проточная цитофлуориметрия

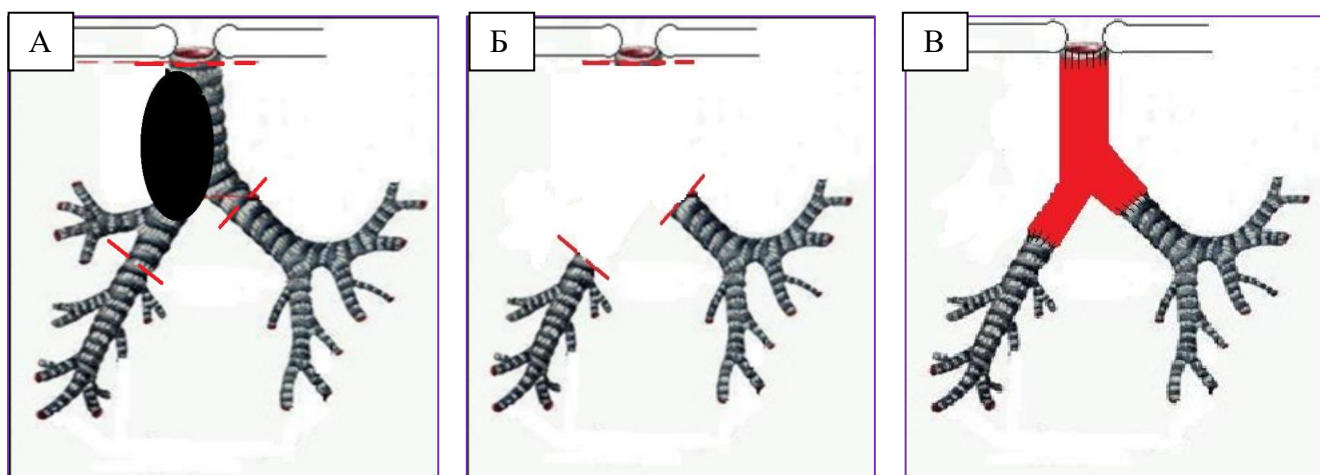
Исследование выполняется с использованием проточного цитофлуориметра FC 500. Клетки снимаются с культуральных флаконов 0,25 % трипсином с ЭДТА, промываются в буфере для проточной цитофлуориметрии (ФСБ, 2 % FBS, 0,2 % Tween 20), затем инкубируются в течение 30 мин в буферном растворе для проточной цитофлуориметрии с добавлением FITC-конъюгированных к следующим CD-маркерам: 29, 44, 90 и TRITC-конъюгированных моноклональных антител к CD105 (Beckman Coulter).

Введение аутологичных преддифференцированных мезенхимальных стволовых клеток в ревааскуляризованный протез, имплантированный в прямую мышцу живота

Имплантация аутологичных преддифференцированных мезенхимальных стволовых клеток осуществляется при помощи микрошприца путем обкалывания перихондральных пространств каждого из хрящевых полуколец децеллюляризированной, ревааскуляризированной трахеи (суспензия клеток, приготовленная на 0,9 %-м растворе NaCl должна содержать 6 млн мезенхимальных стволовых клеток в 1 мл).

Хирургическое вмешательство, предполагающее резекцию трахеи с протезированием тканеинженерным протезом на сосудисто-мышечной ножке

Этап осуществляется следующим образом: выделение пораженной части органа или органа целиком, перевязка и пересечение сосудов легкого или доли легкого, выделение прямой мышцы живота на всем протяжении вместе с тканеинженерным протезом, формирование «окна» в реберной дуге (резекция хрящевых отрезков 5–7 ребер на стороне поражения), удаление препарата (резекция трахеи), восстановление целостности трахеи при помощи тканеинженерного протеза.



а — опухоль с поражением трахеи; б — резекция трахеи;
в — протезирование дефекта трахеи тканеинженерным протезом на сосудисто-мышечной ножке

Рисунок 2 — Этапы хирургического вмешательства, предполагающие резекцию трахеи с протезированием тканеинженерным протезом на сосудисто-мышечной ножке

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Метод трансплантации тканеинженерного протеза включает в себя большое количество этапов, на каждом из которых возможно появление каких-либо осложнений или ошибок.

1. Забор подходящего по анатомическим признакам донорского органа (трахеи)

Несмотря на тщательный подбор донора и мер по санации органа могут возникать ситуации, сопровождающиеся значительной контаминацией полирезистентными штаммами болезнетворных микроорганизмов; в случае выявления такой контаминации следует отказаться от донорской трахеи.

При выполнении мультиорганного забора орган берется с окружающими тканями, что требует механической очистки трахеи от окружающих тканей. На этом этапе орган может быть поврежден. В зависимости от характера повреждения и планируемого объема хирургического вмешательства донорская трахея может быть выбракована или оставлена для дальнейшего этапа по решению хирурга.

2. Децеллюляризация донорской трахеи

По окончании процесса децеллюляризации производится проба на стерильность, наличие остаточной ДНК, гистологическое исследование. При несоответствии проб планируемым протез следует выбраковать.

3. Имплантация децеллюляризированной трахеи в прямую мышцу живота

Данный этап необходим для реваскуляризации децеллюляризированного протеза.

В случае некроза или отторжения протеза, его следует удалить, отправить для гистологического исследования.

4. Забор костного мозга пациента

Объем для забора костного мозга — 60 мл. При невозможности получения необходимого объема костного мозга из одной точки следует выполнить повторную пункцию из противоположного гребня подвздошной кости или стерильную пункцию. В случае контаминации костного мозга следует повторить процедуру.

На оставшихся этапах каких-либо осложнений или ошибок не ожидается.