МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
_____ 2019 г.
Регистрационный № 054–0419

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ОСТЕОНЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: к.м.н. А.Э.Мурзич, д.м.н. О.Л.Эйсмонт, к.б.н. Я.И.Исайкина, А.А.Жерносеченко

Минск, 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич
17.05.2019
Регистрационный № 054-0419

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ОСТЕОНЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук А. Э. Мурзич, д-р мед. наук О. Л. Эйсмонт, канд. биол. наук Я. И. Исайкина, А. А. Жерносеченко

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод лечения остеонекроза головки бедренной кости у взрослых на ранних стадиях заболевания путем выполнения хирургической декомпрессии очага некроза и внутрикостного введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей – травматологов-ортопедов организаций здравоохранения, оказывающих помощь пациентам с заболеваниями тазобедренного сустава в стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Иглы для костномозговой пункции G14-G17.
2. Шприцы 20–60 мл.
3. Пробирки гепаринизированные на 10 мл.
4. Проточный цитофлуориметр.
5. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD105, CD90, CD73, CD45, CD14, CD34.
6. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты для культуральных работ по получению биомедицинского клеточного продукта МСК.
7. CO_2-инкубатор для роста культуры МСК.
8. Центрифуга.
9. Микроскоп инвертированный.
10. Культуральные флаконы на 175 $см^2$ для роста МСК.
11. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
12. Камера Горяева.
13. Среда Дульбекко в модификации Искова (IMDM).
14. Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС).
15. Раствор трипанового синего 0,2 %.
16. Гистопак-1077.
17. 0,25 % трипсина-ЭДТА.
18. Раствор NaCl 0,9 %.
19. Тромбин, фибриноген из плазмы человека.
20. Апротинин (>3500 ЕД/мл).
21. Альбумин человека 5 %.
22. Глицерол-2-фосфат.
23. L-аскорбиновая кислота.
24. Дексаметазон.
25. Рентгенопрозрачный ортопедический стол со специальными ножными секциями для фиксации нижних конечностей.
26. Электронно-оптический преобразователь (ЭОП).
27. Общехирургический/ортопедический инструментарий.
28. Растворы для обработки операционного поля.
29. Стерильное белье.
30. Фрезы канюлированные, диаметр головки 9–12 мм, длина 180 мм.
31. Фрезы полые канюлированные, диаметр 9–12 мм, длина 180 мм.

32. Лекарственные средства для выполнения общей сбалансированной эндотрахеальной или спинальной анестезии.

33. Низкомолекулярные гепарины.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Остеонекроз головки бедра у взрослых пациентов при I, II A, II B стадиях (согласно классификации Association Research Circulation Osseous).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Остеонекроз головки бедра при II C, III–IV стадиях (согласно классификации Association Research Circulation Osseous).
2. Воспалительные заболевания кожи бедра.
3. Острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этапы реализации метода

Этап 1. Получение биомедицинского клеточного продукта «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ BY 600395123.001-2014», регистрационный номер БК-7.4-1508 или аналогичного по характеристикам биомедицинского клеточного продукта

1.1. Эксфузия костного мозга в объеме 40–60 мл у пациента посредством костномозговой пункции крыла подвздошной кости под региональной анестезией за 20–30 сут до введения МСК пациенту.

1.2. Транспортировка костного мозга пациента в специализированную лабораторию клеточной биотехнологии (срок доставки — не более 3 ч после пункции костного мозга).

1.3. Изготовление биомедицинского клеточного продукта:

выделение фракции мононуклеарных клеток из костного мозга в градиенте плотности раствора Гистопак-1077 путем наслоения костного мозга на Гистопак-1077 (соотношение 3:1) и последующего центрифугирования при 200 g в течение 30 мин;

отмывка выделенных мононуклеарных клеток в среде IMDM с последующим центрифугированием при 400 g в течение 10 мин;

культивирование мононуклеарных клеток в полной среде IMDM с добавлением 10 % ЭТС в концентрации 3×10^6/мл во флаконах для культивирования при 37 ºС и 5 % CO_2 во влажной атмосфере;

при достижении прикрепленными клетками 80–90 % покрытия поверхности флакона – выделение популяции МСК путем обработки клеток 0,25 % трипсина-ЭДТА в течение 5 мин с последующим переносом в среду IMDM с добавлением 10 % ЭТС;

подсчет выделенных МСК в камере Горяева и пересев клеток в количестве 1×10^6 в новые культуральные флаконы 175 $см^2$ (I пассаж);

культивирование МСК с проведением II–III пассажей (пересевов) при получении 80–90 % конфлюэнтного слоя клеток в среде IMDM с добавлением 10 % ЭТС при 37 ºС и 5 % CO_2 во влажной атмосфере до достижения

суммарного количества МСК не менее 20×10^6 с проведением контроля отсутствия бактериальной контаминации для клеток каждого пассажа;

двукратная отмывка МСК в 0,9 %-м растворе NaCl с последующим центрифугированием при 400 g в течение 5 мин и удалением надосадочной жидкости;

добавление к клеточному осадку 0,9 %-го раствора NaCl для получения 1 мл суспензии;

идентификация полученных в культуре МСК на подлинность методом проточной цитофлуориметрии путем определения поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD45, CD14, CD34;

анализ количества МСК и их жизнеспособности путем подсчета в камере Горяева с использованием 0,2 %-го раствора трипанового синего.

Мероприятия п. 1.3. этапа 1 осуществляются общепринятыми методиками.

Для дальнейшего применения используется биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ BY 600395123.001-2014» или аналогичный биомедицинский клеточный продукт, полученный согласно настоящей инструкции, и отвечающий следующим органолептическим, цитологическим параметрам и показателям микробиологической чистоты:

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Однородная суспензия беловатого цвета без посторонних включений
Количество клеток, клеток/мл, не менее	20×10^6
Количество жизнеспособных клеток, %, не менее	90
Подлинность клеток (иммунофенотип клеток)	CD90, CD105, CD73 >90 % CD34, CD45, CD14 <2 %
Стерильность	Стерильно

Этап 2. Получение композита МСК в фибриновом геле

2.1. Подготовка фибринового геля (для получения фибринового геля могут применяться коммерческие наборы) путем смешивания 40 U тромбина с 50 мг/мл разведенного в 0,9 %-м растворе NaCl фибриногена и 1,0 TIU раствора апротенина.

2.2. Внесение 1 мл МСК в фибриновый гель и перемешивание.

2.3. Помещение композита МСК в фибриновом геле в среду IMDM, содержащую 5 % альбумин человека, 10 mM глицерол-2-фосфат, 50 μM L-аскорбиновой кислоты, 100 nM дексаметазона и культивирование клеток при 37 ºС и 5 % CO_2 во влажной атмосфере в течение 4–5 дней.

Этап 3. Введение композита МСК в фибриновом геле в область некроза головки бедренной кости (для введения пациенту композита МСК в фибриновом геле извлекается из среды для культивирования непосредственно во время операции)

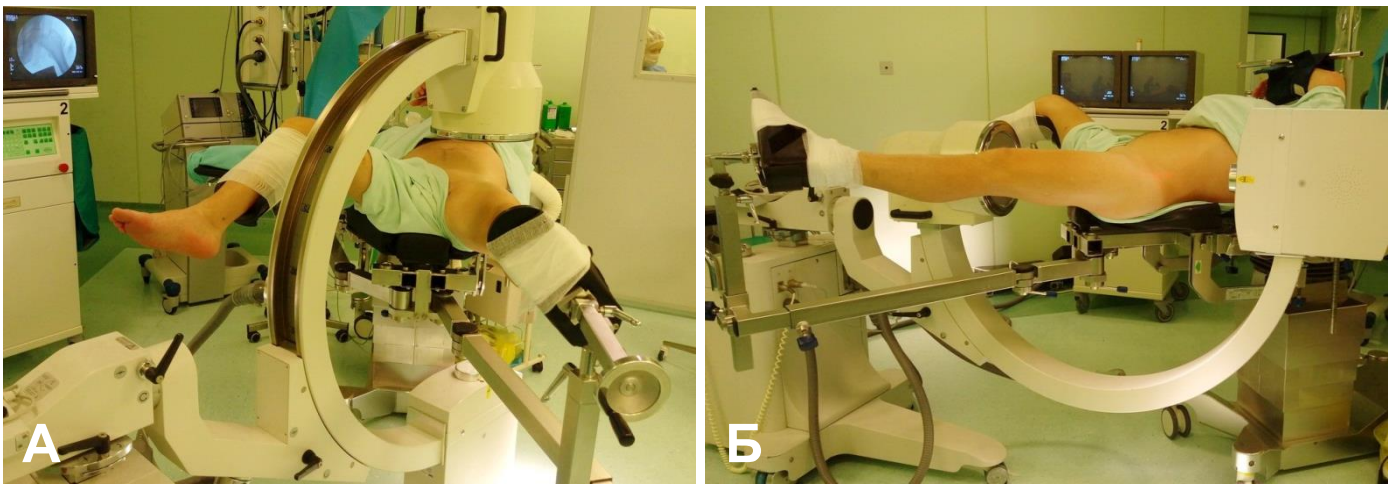
3.1. Подготовка к хирургическому вмешательству:

тромбопрофилактика: низкомолекулярные гепарины в профилактических дозах за 12 ч до операции;

транспортировка композита МСК в фибриновом геле из лаборатории клеточной биотехнологии (срок доставки — не более 2 ч после извлечения из CO_2-инкубатора);

анестезия: общая сбалансированная эндотрахеальная или спинальная;

укладка пациента: оперируемая конечность пациента фиксируется с помощью ортопедической приставки к хирургическому столу в положении внутренней ротации 10º, противоположная конечность отводится кнаружи на подставке. На всех этапах хирургической операции выполняется рентгенологическое исследование тазобедренного сустава с помощью ЭОП в прямой и боковой проекциях для оценки корректности манипуляций (рисунок 1).



положение пациента на спине
А — рентгенография тазобедренного сустава с помощью ЭОП в прямой проекции;
Б — рентгенография тазобедренного сустава с помощью ЭОП в боковой проекции

Рисунок 1. — Укладка пациента и рентгенологическое исследование

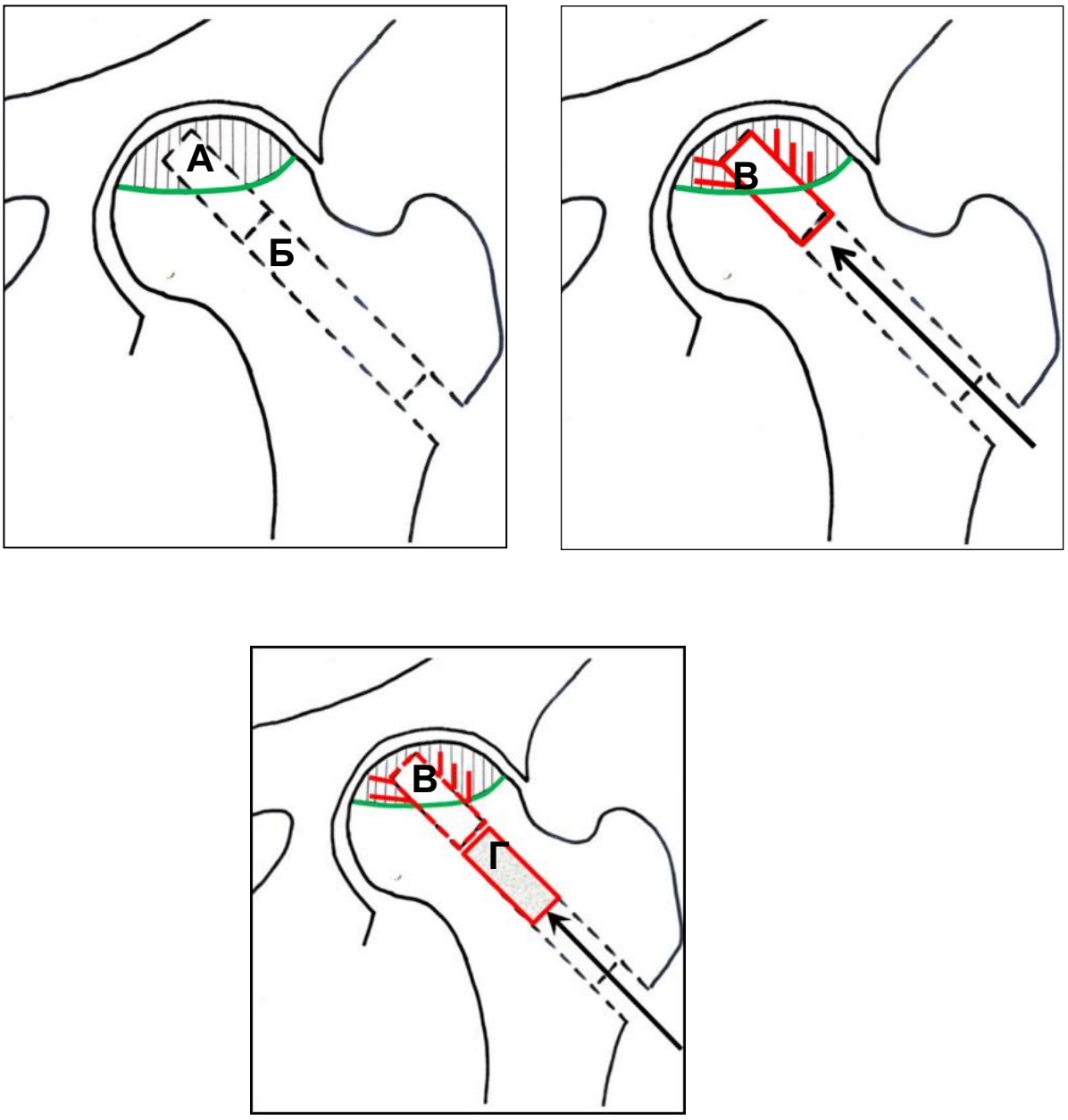
3.2. Хирургическая декомпрессия очага некроза головки бедра

После укладки пациента и обработки операционного поля в очаг некроза головки бедра по оси шейки бедра вводится спица аппарата Илизарова на глубину 5–10 мм до субхондрального слоя. В месте расположения спицы выполняется разрез кожи 2 см. По спице с помощью полой канюлированной фрезы сверлится канал в шейке бедра на глубину 4–5 см, осуществляется забор губчатой кости цилиндрической формы. Устанавливается канюлированная фреза с головкой и производится сверление очага некроза на глубину,

не доходя 5–10 мм до субхондрального слоя. С помощью изогнутого шила осуществляется внутрикостная остеоперфорация некротизированной кости.

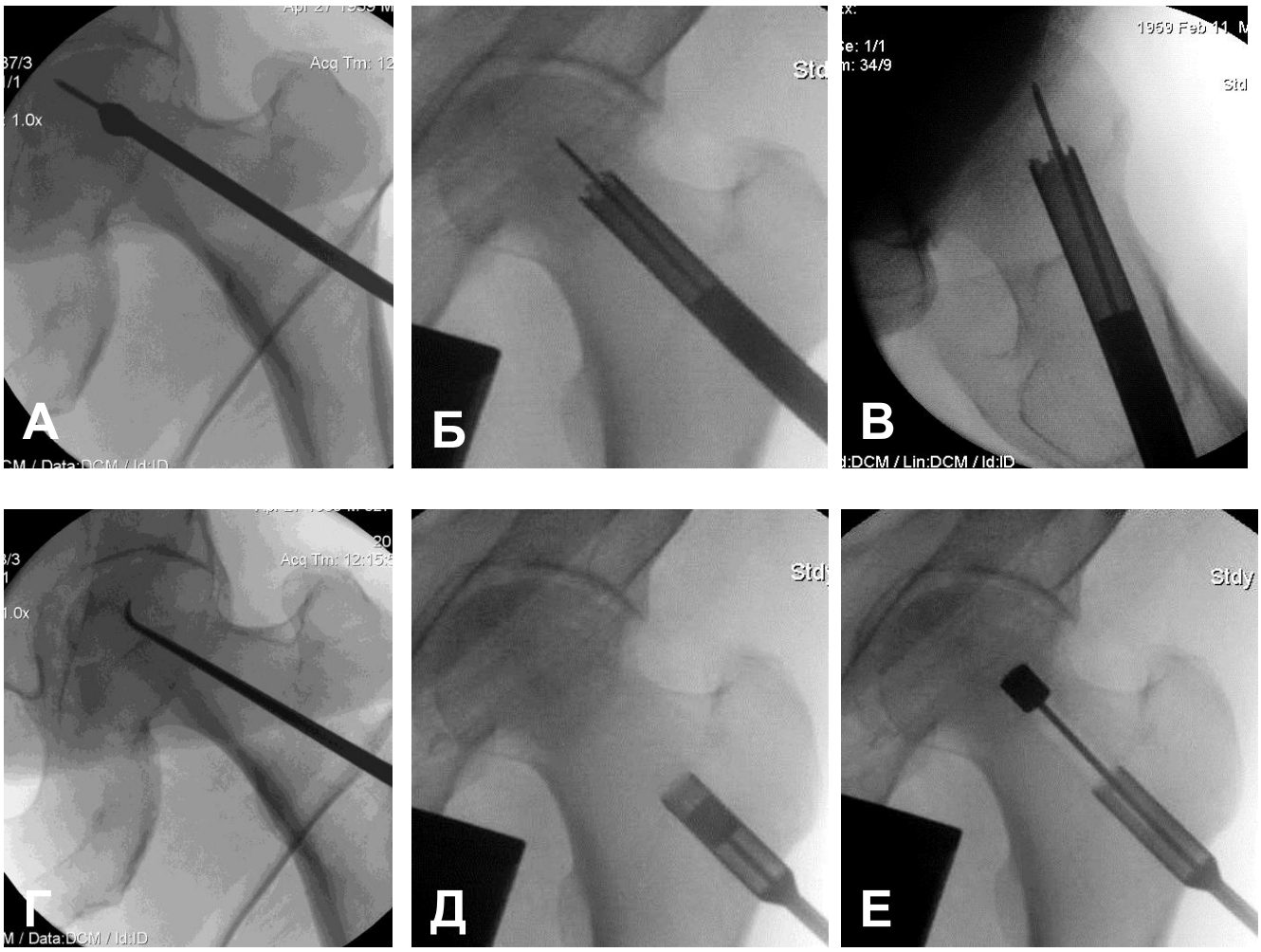
3.3. Введение композита МСК в фибриновом геле

С помощью вакуумного аспиратора эвакуируется кровь из костного канала шейки бедра. В очаг некроза с помощью хирургических инструментов вводится композит МСК в фибриновом геле. Губчатая кость цилиндрической формы, извлеченная ранее из полой фрезы, вводится в наружную часть костного канала с целью гемостаза и предотвращения вытекания композита МСК (рисунки 2, 3). Рана ушивается.



А — зона некроза головки бедра; Б — внутрикостный канал;
В — композит МСК в фибриновом геле; Г — губчатая аутокость

Рисунок 2. — Схематическое изображение этапов введения МСК в очаг некроза головки бедренной кости



А — декомпрессия очага некроза; Б, В — забор губчатой аутокости полой фрезой;
Г — внутрикостная остеоперфорация шилом;
Д, Е — введение композита МСК в фибриновом геле

Рисунок 3. — Интраоперационные рентгенограммы.
Введение композита МСК в очаг некроза головки бедренной кости

Послеоперационный режим

Постельный режим в течение одних суток после хирургической операции. Со вторых суток после хирургической операции в течение 6 недель пациенты передвигаются с помощью костылей с нагрузкой на оперированную конечность до 10 % веса тела, затем нагрузка постепенно увеличивается до полной в течение 2 недель. Полная нагрузка на оперированную конечность разрешается через 8 недель после операции. В течение послеоперационного периода назначается ЛФК и ФТЛ. В послеоперационном периоде противопоказаны бег и прыжки.

Динамическое наблюдение

Рентгенография тазобедренного сустава выполняется через 3, 6, 12 мес. после хирургического вмешательства и далее ежегодно. Клиническая оценка производится на основании шкалы Харриса, визуально-аналоговой шкалы.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Некорректная укладка пациента на ортопедическом столе может привести к техническим сложностям при выполнении рентгенологического контроля и этапов операции.
2. Избыточное усилие при сверлении очага некроза может привести к перфорации остеохондральной пластинки головки бедренной кости и проникновении в полость сустава.
3. Отклонение канюлированных фрез от оси направляющей спицы при сверлении может привести к повреждению направляющей спицы.
4. Неосторожное обращение с биомедицинским клеточным продуктом при введении может привести к потере клеток, непопаданию клеточного продукта в зону некроза головки бедренной кости.
5. При четком соблюдении этапов хирургического вмешательства ошибки и осложнения отсутствуют.