

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2017 г.

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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-р мед. наук, чл.-корр. НАН Беларуси С.И. Третьяк, канд. мед. наук, доц. Е.В. Баранов, канд. мед. наук А.В. Буравский, д-р биол. наук, акад. НАН Беларуси И.Д. Волоотовский, канд. биол. наук 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, эксплантацию кожного лоскута, кондиционирование клеточного материала, программу предтрансплантационной подготовки длительно незаживающих раневых дефектов с использованием локальной светодиодной фототерапии, выполнение локальной пересадки аутологичных культивируемых фибробластов кожи (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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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

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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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

Первый этап. Иссечение участка кожи хирургическим способом. Оперативное вмешательство по забору кожного лоскута заключается в иссечении участка кожи размерами от 2,0×0,2 до 3,0×0,3 см в параумбиликальной области или в верхней трети бедра в условиях операционной. Доставка эксплантационного 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). 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 %-й 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 °С. Морфологию и фенотип клеток оценивают на 4–7-е сут культивирования. Для накопления биомассы КФК проводится субпассирование путем посева 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 сут. Для получения суспензии клеток монослой обрабатывают 0,25 %-м раствором трипсина с 0,02 %-м 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 ко 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 определение количественного содержания клеток (не менее 1,0×10⁶ 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 АФДТ и локальной 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 (далее — ФС) в форме мази (из расчета 0,3 мл на 1 см²). Экспозиция ФС должна составлять не менее 30 мин. Затем проводится облучение раневого дефекта неполяризованным светодиодным излучением (далее — НСИ) с параметрами воздействия: длина волны НСИ $\lambda_1 = 0,405 \pm 0,02$ мкм, плотность энергии облучения (далее — 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 (далее — 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 налетов фибрина, уменьшение общего микробного числа до уровня менее 10^3 КОЕ/мл, начало активации репаративных процессов по периметру раневого дефекта.

Четвертый 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 (внутри- 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 сут. 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 сут после выполнения пересадки КФК перевязки не делают. В дальнейшем их осуществляют в максимально щадящем для раны режиме без дополнительного локального медикаментозного воздействия. Результаты лечения оценивают в течение 1 мес. после трансплантации КФК по динамике состояния раневого дефекта и окружающих тканей (отек, 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Во время и после оперативного вмешательства по забору кожного лоскута возможны общехирургические осложнения: 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).