

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

18.11. 2011 г.

Регистрационный № 093-0911

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ  
У ПАЦИЕНТОВ С ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Авторы:

д-р мед. наук, проф. С.И. Третьяк, канд. мед. наук, доц. Е.В. Баранов,

д-р биол. наук, акад. И.Д. Волотовский, канд. биол. наук Е.С. Лобанок,

И.Б. Василевич

Минск 2011

Инструкция содержит клинические рекомендации по лечению пациентов с трофическими язвами с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани. Клинические рекомендации включают алгоритм отбора пациентов, взятие жировой ткани хирургическим способом, выделение МСК из жировой ткани, их культивирование *in vitro*, накопление клеточной биомассы, подготовку клеточного трансплантата, микробиологический контроль биоматериала на контаминацию микроорганизмами, программу предтрансплантационной терапии трофических язв, выполнение непосредственно метода локальной трансплантации МСК с использованием предложенной технологии, мониторинг состояния раневого процесса в посттрансплантационном периоде.

Аутоотрансплантация накапливаемых в условиях культуры МСК из жировой ткани является новым методом лечения длительно незаживающих ран и трофических язв. Необходимость пересадки собственных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, в ряде случаев обусловлена недостаточной клинической эффективностью традиционных методов лечения, а также длительностью промежутков времени, на протяжении которого язвенный дефект не закрывается (неэффективный период лечения). Длительно незаживающая трофическая язва часто сочетается с различными поражениями кожи (рожистое воспаление, дерматит, пиодермия, экзема). Проникновение инфекции вглубь лежащих тканей может способствовать тяжелому поражению мышц, сухожилий, надкостницы, костей и суставов. Вспышки местной инфекции осложняют течение воспалительного процесса и приводят к необратимым изменениям лимфатического аппарата, и как следствие — к развитию лимфедемы (слоновости). Грозным осложнением данного заболевания является злокачественное перерождение язвы.

Одно из перспективных направлений современной медицины в последнее десятилетие — использование клеточных технологий. Аутологичные мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани могут выступать в качестве эффективного и безопасного регенерирующего агента для лечения трофических язв.

Внедрение в практическое здравоохранение разработанной методики локальной аутоотрансплантации МСК ускорит получение положительного эффекта лечения, снизит его себестоимость, обеспечит значительное повышение уровня оказания специализированной медицинской помощи и качества жизни пациентов, страдающих трофическими язвами различной этиологии.

### **УРОВЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ**

Учреждения здравоохранения областного уровня, оказывающие специализированную хирургическую помощь пациентам с трофическими язвами нижних конечностей в условиях профильных отделений стационара.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Подбор пациентов к аутотрансплантации и/или отказ от ее проведения определяются показаниями и противопоказаниями к трансплантации стволовых клеток.

### **Критерии включения:**

1. Длительность существования язвенного дефекта более 2 мес.
2. Множественность поражения.
3. Неэффективность стационарного лечения в течение 6 мес.
4. Рецидив язвы более 1 раза в год.

### **Критерии исключения:**

1. Возраст пациента более 70 лет с учетом сопутствующих заболеваний с наличием высокого риска оперативного вмешательства.
2. Липодермосклероз II–III степени.
3. Беременность.
4. Онкологические заболевания.
5. Системные заболевания соединительной ткани.
6. Наличие грыж, рубцов, дефектов кожи и подлежащих тканей в области забора донорского биоматериала.
7. Наличие психических заболеваний или деменции.

При принятии решения о трансплантации стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ) пациент включается в лист ожидания, оформляется медицинское заключение о необходимости трансплантации в соответствии с разработанным протоколом.

Локальная аутотрансплантация МСК показана при наличии трофических язв нижних конечностей (площадью до 50 см<sup>2</sup>) в связи с высокой толерантностью язв к традиционным методам консервативного лечения. Данная методика может применяться как самостоятельная процедура для ускорения процессов регенерации и являться окончательным методом лечения, так и в сочетании с операциями, направленными на коррекцию этиопатогенетических факторов, которые послужили причиной образования язвенного дефекта.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

- Ультрасонографический аппарат для выполнения стандартного дуплексного исследования сосудов ног.
- Комплект хирургического инструментария, необходимого для выполнения операций при взятии жировой ткани.
- СО<sub>2</sub>-инкубатор.
- Ламинарный бокс.
- Микроскоп инвертированный световой.
- Центрифуга лабораторная.
- Проточный цитофлуориметр.

- Термостат.
- Камера Горяева.
- Культурные среды.
- Раствор Версена.
- Трипановый синий.
- Моноклональные антитела.
- Клеточный биоптат — культура МСК из жировой ткани.
- Антисептики, антибиотики.
- Современные раневые покрытия.
- Эластичные бинты для проведения компрессионной терапии.
- Инсулиновые шприцы со съемной иглой.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Задачей применения предлагаемого метода является локальная трансплантация аутологичных МСК из жировой ткани с целью полного и стойкого заживления раневого дефекта, улучшение качества жизни пациентов. В основу метода положена способность СКЖТ стимулировать процессы регенерации, в т. ч. путем выработки цитокинов и ростовых факторов.

### **Технология применения методики локальной трансплантации аутологичных мск из жировой ткани больным с трофическими язвами**

Метод лечения с применением аутологичной пересадки МСК из жировой ткани пациентам с трофическими язвами нижних конечностей состоит из нескольких этапов:

– взятие жировой ткани у пациента хирургическим способом — липоэктомия (иссечение участка жировой ткани);

– выделение МСК жировой ткани, культивирование МСК из жировой ткани, накопление клеточной биомассы *in vitro*, получение клеток 2–3 пассажей, характеристика морфологии клеточной культуры, подсчет количества и оценка жизнеспособности МСК, фенотипический контроль с использованием моноклональных антител, микробиологический контроль культуры МСК (2–4 неделя);

– подготовка трофической язвы реципиента к клеточной трансплантации;

– выполнение локальной трансплантации биоптата аутологичных МСК из жировой ткани;

– посттрансплантационное динамическое наблюдение за течением раневого процесса.

Клинической трансплантации в обязательном порядке должно предшествовать микробиологическое, вирусологическое и типологическое тестирование трансплантата.

Все этапы предлагаемого метода выполняются после полного объяснения пациенту цели оперативного вмешательства и возможных

осложнений (информация для пациента и подписание информированного согласия).

Оперативное вмешательство по взятию жировой ткани проводится под местной анестезией и/или с применением внутривенной анестезии из разреза 1–1,5 см в околопупочной области или по внутренней поверхности верхней трети бедра путем липэктомии (иссечения) участка подкожной жировой клетчатки объемом 5–10 мл в условиях операционной с соблюдением всех правил антисептики.

Доставка биоматериала в лабораторию для последующего получения стволовых клеток осуществляется в стерильных транспортных закрытых флаконах с культуральной средой или забуференным фосфатами физиологическим раствором в специальном контейнере, поддерживающем температуру не ниже 4 °С с учетом временных параметров (не более 2 ч от времени забора). Проводят маркировку флакона для жировой ткани с учетом даты, серии и номера образца, строго соблюдая процедуру маркировки контейнера с учетом международных требований GTP (Good Tissue Practice). Производят запись в лабораторном журнале.

Подготовка трофической язвы реципиента к клеточной трансплантации зависит от фазы раневого процесса у данного конкретного пациента на время взятия биоматериала. В этот период используются традиционные методики местного лечения. Они включают физическое (лаваж, сорбционные покрытия, лазеротерапия и др.), ферментативное и аутолитическое воздействие, направленное на купирование явлений острого воспаления язвенного дефекта с целью уменьшения микробного обсеменения, переход из фазы воспаления в грануляционную фазу с активной клеточной пролиферацией, и затем в фазу ремоделирования (эпителизации).

Пересадка СКЖТ осуществляется при грануляционной фазе раневого процесса. Клиническими критериями готовности трофических язв к пересадке клеточного материала являются:

- отсутствие налета фибрина, гноя, отделяемого, кровотечения и экссудации;
- уменьшение бактериальной обсемененности язвы до уровня менее  $10^4$  микроорганизмов на  $1 \text{ мм}^3$  ткани;
- активация репаративных процессов в тканях и зоне язвы.

Выполнение операции по трансплантации биоматериала заключается в локальной пересадке аутологичных СКЖТ в область трофического дефекта в виде клеточной суспензии или клеток на пленочном перевязочном материале.

### **Методика подготовки стволовых клеток жировой ткани для трансплантации**

Извлеченную из контейнера для перевозки жировую ткань гомогенизируют в слабо притертом гомогенизаторе и в течение 30–60 мин при 37 °С проводят ферментативную обработку в растворах коллагеназы и/или диспазы. Полученную клеточную суспензию фильтруют через капроновый фильтр (100 мкм), центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. После удаления супернатанта осадок заливают полной питательной средой,

содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 0,001 мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотина. Клетки высевают в количестве  $8 \times 10^4$  кл/мл на адгезионные пластиковые чашки Петри. Культивирование образцов производят в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере при постоянном давлении 5% CO<sub>2</sub>. Полную смену ростовой среды проводят каждые 72 ч.

Качество клеточного монослоя оценивают методом фазово-контрастного микроскопирования при увеличении микроскопа в 100 и более раз. При хорошем состоянии культуры между клетками четко различаются границы, а сами клетки имеют типичную морфологию (колонии округлой или полугональной формы клеток).

После накопления клеточной биомассы на 3–4 пассажном уровне клеточный монослой снимают со дна культурального флакона и переводят в суспензию. Клетки смывают со стенок сосуда легким пипетированием, что способствует образованию гомогенной клеточной взвеси. Для оценки выхода жизнеспособных клеток используют тест на исключение красителя. Количество живых и мертвых клеток подсчитывают в камере Горяева. Контроль стерильности клеточной суспензии на отсутствие бактерий, грибов и микоплазм проводят с применением микробиологических питательных сред в стерильных условиях. Суспензия клеток считается стерильной, если ни в одной из засеянных пробирок не наблюдается роста. При обнаружении хотя бы в одной пробирке микрофлоры независимо от ее характера суспензию признают нестерильной и отбраковывают. Для выявления грибов используют плотную питательную среду Сабуро, для выявления микоплазменной контаминации используют микоплазменный агар с добавками или готовую среду Хейфлика, плотную питательную среду Хоттингера. Наличие прозрачных колоний в виде яичницы-глазуньи, видимых под световым микроскопом, свидетельствует о контаминации исследуемой культуры микоплазмами. Для выявления папилломавирусной контаминации используют коммерческие ПЦР-наборы для идентификации высокоонкогенных типов вируса (HPV 6,11).

Для того чтобы установить принадлежность клеточной популяции к стволовым и прогениторным клеткам, ее гомогенность и выявить процент примеси иных клеточных типов, проводят оценку фенотипического состава клеточной культуры с использованием моноклональных антител, меченных флюорохромами. Моноклональные антитела (к CD90, CD44, CD45, меченные FITC или PE и др.) разводятся до нужной рабочей концентрации, наносятся на фиксированные клетки на 30–60 мин, затем три раза промываются фосфатным буфером и анализируются на проточном цитофлуориметре или флуоресцентном микроскопе.

Готовую продукцию разливают в стерильные пенициллиновые флаконы и маркируют. Для маркировки используется типовая этикетка с указанием донора МСК, названия продукции, характеристики продукции (посевная доза), даты изготовления, условий хранения и срока годности. В специальном контейнере, поддерживающем температуру 25–37 °С, клеточную биомассу

транспортируют в специализированную клинику для проведения трансплантации.

### **Методика клеточной трансплантации**

Пересадку клеточного материала проводят в условиях операционной без анестезиологического сопровождения после предварительной обработки трофической язвы 3%-м раствором перекиси водорода и тщательным струйным промыванием дна раны физиологическим раствором. Пересадку МСК, полученных из жировой ткани, выполняют путем непосредственного нанесения клеточной культуры в виде суспензии на подготовленную поверхность раны. Суспензию наносят на центральную поверхность раны с помощью инсулинового шприца или микропипетки. С целью фиксации стволовых клеток ко дну раны осуществляют экспозицию по времени в течение 10 мин. Затем выполняют второй этап: интрадермальное введение клеточного материала на глубину 2–4 мм по периферии раневой поверхности (на 3, 6, 9, 12 часах). Лечебная доза составляет от 1 до 10 млн клеток в 4 мл культуральной среды и физиологического раствора.

Кратность пересадок определяется размером раневого дефекта, пролиферативной активностью МСК конкретного пациента и потенциальной возможностью накопления на 4–5 пассажах, а также положительным (хорошим) ответом на применяемую методику.

Для того чтобы исключить потерю клеточного материала при контакте с повязкой после трансплантации применяют специальный ограничительный каркасный пилот (валик вокруг дефекта). Целесообразным является применение современных раневых пленочных повязок, которые обладают следующими важными свойствами: обеспечивают адекватный влаго- и газообмен раневой поверхности и в то же время являются непроницаемыми для бактерий и вирусов. Прозрачность таких покрытий позволяет визуально наблюдать за динамикой течения раневого процесса в ранний период после трансплантации МСК.

Первые 3–5 сут. после трансплантации МСК перевязки не делают. В дальнейшем перевязки осуществляют в максимально щадящем для язвенного дефекта режиме, без дополнительного применения лекарственных препаратов.

### **Послеоперационный период**

В комплексном лечении применяется системная лекарственная терапия, направленная на улучшение микроциркуляции, реологических свойств крови и тканевого обмена. Пациентам подбирается адекватная компрессионная терапия.

Для анализа эффективности нового метода лечения проводят оценку динамики состояния язвенного дефекта в течение 1–2 мес. после трансплантации МСК. В оценке состояния трофической язвы учитывают характер грануляционной ткани поверхности язвы. Площадь трофического дефекта определяют различными методами планиметрии (измерение линейкой и цифровая фотография с последующей компьютерной планиметрией с использованием краевой видеометрии). Кроме оценки

непосредственно дефекта учитывают состояние окружающих тканей (отек, гиперемия, мацерация). Основными критериями заживления являются сроки и скорость эпителизации раны.

В течение всего срока лечения мезенхимальными стволовыми клетками каких-либо воздействий медикаментозного и физиотерапевтического характера не проводят.

### **ПРЕИМУЩЕСТВА РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ**

Использование для целей восстановительной терапии аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, полученных у самого пациента с трофической язвой, имеет значительное преимущество перед всеми остальными методами трансплантации, в т.ч. и алогенных стволовых клеток или тканей, поскольку отпадает проблема иммунологической несовместимости.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Во время и после операции по забору жировой ткани возможно развитие общехирургических осложнений: кровотечение, образование гематом, нагноение раны.

1. Образование гематом в послеоперационном периоде.

Профилактически выполняют тщательные гемостаз по ходу хирургического вмешательства, дренируют рану резиновым выпускником.

2. Нагноение послеоперационной раны.

Всем пациентам за 30 мин до операции парентерально вводят двойную разовую дозу антибиотика широкого спектра действия (цефтриаксон), выполняют перевязки с контролем состояния мягких тканей в зоне операции. В случае гиперемии в области раны и значительного увеличения отека применяют повязки с 25%-м раствором димексида или водорастворимыми мазями с антибиотиком (левомеколь, процелан), продолжают парентеральную антибиотикотерапию.

3. Некроз краев послеоперационных ран.

Максимальная атравматичность хирургической техники позволяет избежать данного осложнения.

Очень редко возможно развитие осложнений, связанных непосредственно с трансплантацией МСК:

– снижение функциональной активности пересаженных клеток или их гибель;

– аллергические реакции.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

- общесоматические противопоказания к оперативному лечению;
- не купированные явления острого воспаления язвенного дефекта;
- выраженные воспалительные явления околоязвенных тканей;
- нарушение стерильности трансплантата МСК;
- отсутствие необходимого технического оснащения;

– отсутствие подготовленных специалистов.

Критерием признания неэффективности метода лечения трофических язв с использованием аутологичных МСК жировой ткани при конкретном язвенном дефекте кожных покровов служит отсутствие уменьшения максимального размера раны в течение двух недель.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Разработанная методика локальной ауотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани является новым альтернативным методом лечения незаживающих трофических язв, способствует полному закрытию ран и восстановлению кожных покровов, эффективна не только при отсутствии положительных результатов после проведения традиционной терапии, использования биоинженерных покрытий, но и после пересадки аутологичных участков кожи этой категории пациентов.