

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневич
«*Пиневич*» 2015г.

20
Регистрационный № 144-1214

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ БИОТРАНСПЛАНТАТОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор С.А. Алексеев, д.м.н., профессор М.П. Потапнев,
к.м.н. доцент В.С. Деркачев, к.м.н. доцент С.М. Космачева,
Н.Н. Данилкович

Менск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.01.2015
Регистрационный № 144-1214

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ БИОТРАНСПЛАНТАТОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.А. Алексеев, д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнев, канд. мед. наук, доц. В.С. Деркачев, канд. мед. наук, доц. С.М. Космачева, Н.Н. Данилкович

Минск 2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α -МЕМ — культуральная среда

ЖСП — жизнеспособность

КМ — костный мозг

КОЕ-Ф — колониеобразующие единицы фибробластов

МНК — моноклеарные клетки

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

ОХРПК — отделение хранения и распределения продуктов крови

ПКМ — пунктат костного мозга

ППС — полная питательная среда

РФТ — растворимые факторы тромбоцитов

ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор

ЯСК — ядродержащие клетки

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод биотрансплантации на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, растворимых факторов тромбоцитов, фибринового клея и материала-носителя (скаффолда) для замещения костных дефектов.

Инструкция предназначена для врачей-травматологов-ортопедов, врачей-хирургов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с последствиями повреждений костно-суставного аппарата в стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Инструменты и расходные материалы для забора костного мозга:

- внутрикостные иглы;
- стерильные пробирки;
- раствор гепарина 5000 ед./мл.

2) Инструменты и расходные материалы для подготовки составляющих биотрансплантата:

- ламинарный шкаф с потоком воздуха II класса защиты;
- центрифуга (1500–3000 об./мин);
- холодильник;
- морозильник;
- проточный цитофлюориметр;
- CO₂-инкубатор (5% CO₂, 37°C);
- микроскоп инвертированный;
- микроскоп световой бинокулярный;
- счетчик клеточных элементов;
- камера Горяева;
- флаконы для культуры клеток T175 и T75;
- серологические пипетки разного объема, однократного применения;
- пробирки центрифужные на 50 и 15 мл, однократного применения;
- чашки Петри (диаметром 100 мм);
- микропробирки «эппендорф»;
- пробирки стерильные полипропиленовые на 5 мл;
- криопробирки;
- пипеточные дозаторы;
- стерильные наконечники для дозаторов (100–1000 и 20–200 мкл);
- системы фильтрации 0,45 и 0,2 мкм, однократного применения.

3. Необходимые реагенты:

- среда для культур клеток α -MEM с рибонуклеозидами и глутамаксом;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния;
- трипсин-ЭДТА 0,25% раствор;
- сыворотка АВ(IV), инактивированная при +56°C в течение 30 мин;
- β -глицерофосфат (10 мМ/мл);
- L-аскорбиновая кислота (50 мкг/мл);
- дексаметазон (0,1 μ М/мл);
- гистопак (1077 г/л);

- раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий;
- бензилпенициллина натриевая соль;
- стрептомицина сульфат;
- 0,4% раствор трипанового синего с 0,1% азиды натрия;
- 3% уксусная кислота;
- 1% раствор оксалата аммония;
- диметилсульфоксид (ДМСО);
- моноклональные антитела к CD90, CD105, CD45, CD34 человека.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- переломы костей различных локализаций в стадии замедленной консолидации, сопровождающиеся недостатком костной ткани;
- посттравматический остеомиелит длинных трубчатых костей в стадии ремиссии с краевым дефектом;
- дефекты костей в результате многооскольчатых переломов, замедленной консолидации, ложных суставов и др.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

- возраст до 18 и старше 60 лет;
- серопозитивная реакция по анти-ВГС, HBsAg и ВИЧ (основание — инструкция «О порядке предоперационной заготовки аутологичной крови и ее компонентов», утвержденная приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 03.09.2012 № 981).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Приготовление культуральной среды и реагентов

Культуральная среда (полная питательная среда, ППС):

- α -МЕМ с рибонуклеозидами и глутамаксом;
- 100 Ед/мл бензилпенициллина натриевой соли;
- 100 мг/мл стрептомицина сульфата;
- 10% АВ (IV)-сыворотки.

Приготовление остеогенной среды

- ППС;
- 10 мМ/мл β -глицерофосфата;
- 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты;
- 0,1 μ М/мл дексаметазона.

Получение АВ (IV) сыворотки

Сыворотку получают после свертывания свежей крови, заготовленной в соответствии с «Инструкцией о порядке осуществления организациями переливания крови заготовки, переработки, хранения, реализации крови и ее компонентов на территории Республики Беларусь», утвержденной постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2011 № 38.

После образования сгустка емкость с кровью помещают в центрифугу и отжимают сгусток в режиме 2000 об./мин при 4°C в течение 20 мин. Пипеткой отбирают сыворотку крови в пропиленовые пробирки и центрифугируют в режиме 3000 об./мин 20 мин. После этого проводят визуальный контроль сыворотки на

наличие гемолиза и хилеза: образцы с данными признаками выбраковывают. Для получения объединенной пробы (пула) все образцы сыворотки переносят в общую емкость и центрифугируют в режиме 3000 об./мин в течение 20 мин при +4°C. Сначала сыворотку фильтруют через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм для освобождения сыворотки от всех микроорганизмов. Проводят контроль стерильности. Перед использованием АВ (IV) сыворотку инактивируют при 56°C 30 мин.

Сыворотка АВ (IV) является добавкой к питательной среде для культивируемых *in vitro* культур клеток как источник ростовых факторов, белков, липидов, солей, витаминов, микроэлементов, аминокислот и других компонентов. Продукт стерилен и протестирован на отсутствие маркеров инфекционных заболеваний (вирусы гепатита В и С, иммунодефицита человека).

Получение аутологичной сыворотки

В пробирку без антикоагулянта забирают 20–25 мл крови пациента. Сыворотку получают после свертывания крови: пробирки с образовавшимся сгустком центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об./мин и отбирают сыворотку в чистую пробирку. Затем следует повторить центрифугирование в указанном выше режиме для удаления форменных элементов. Полученную сыворотку фильтруют через фильтры с размером пор 0,45 и 0,2 мкм, маркируют с указанием ФИО пациента и хранят до применения при -20°C. Перед применением сыворотку размораживают. В случае выпадения криопреципитатов рекомендовано повторно фильтровать сыворотку через фильтры с размером пор 0,2 мкм.

Технология создания остеогенного биотрансплантата на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

1. Получение клеточного компонента биотрансплантата

1.1. Забор костного мозга

Общепринятыми методами осуществить забор костного мозга из крыла подвздошной кости пациента объемом 30–40 мл в стерильные пробирки с гепарином из расчета 50 единиц гепарина на 1 мл костного мозга.

1.2. Выделение и наращивание МСК

Провести подсчет ядродержащих клеток в пунктате костного мозга.

ПКМ развести фосфатно-буферным раствором Дульбекко в соотношении 1:1 и аккуратно перемешать.

Разведенный ПКМ наложить на градиент плотности фиколл-пак ($\rho = 1077$ г/л) в соотношении 1 часть градиента: 2 части ПКМ. Пробирки центрифугировать в течение 30 мин при 400g (1500 об./мин) при комнатной температуре.

Стерильной пипеткой отобрать фракцию моноклеарных клеток и перенести ее в чистую пробирку; аккуратно ресуспендировать в 10 мл фосфатного буферного раствора с 1% сыворотки АВ (IV) и центрифугировать в течение 10 мин при 400g (1500 об./мин) для отмывки от остатков градиента. Процесс отмывки повторить 2 раза.

Полученный осадок МНК фракции ресуспендировать в 10 мл полной питательной среды.

Произвести подсчет клеток при помощи гемоцитометра.

Для определения числа колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф тест) отобрать суспензию клеток, содержащую $1,0 \times 10^6$ и $0,5 \times 10^6$ клеток,

ресуспендировать их в 10 мл полной питательной среды, высеять в чашки (диаметром 100 мм) и культивировать в CO₂-инкубаторе в течение 9–14 дней без смены среды до стадии образования развитых колоний.

Провести учет колоний. Для этого из чашек удалить среду, промыть адгезионную поверхность 15 мл ФСБ и внести 15 мл этанола на 15 мин. Удалить этанол, подсушить чашки на воздухе при комнатной температуре и под инвертированным микроскопом подсчитать колонии. Учету подлежат колонии, содержащие не менее 50 клеток. Для каждой чашки рассчитать количество колоний на 100 тыс. МНК, внесенных для культивирования. По результатам подсчета колоний в обеих чашках вычислить среднюю величину — значение КОЕ-Ф теста. Его используют для анализа качества ПКМ, оценки пролиферативной активности МСК, эффективности наращивания культуры.

Оставшиеся МНК рассеять во флаконы Т175 в посевной концентрации 0,3–0,6×10⁶/см² в 30 мл ППС для получения культуры МСК.

Клетки инкубировать при +37°C в инкубаторе CO₂ в течение 48 ч. Из флаконов отобрать супернанант, отмыть ростовую поверхность ФСБ для удаления неприкрепившихся клеток.

Внести 30 мл свежей ППС, добавить 1–2,5% растворимых факторов тромбоцитов, полученных методом активации тромбином, и продолжить культивирование со сменой среды каждые 3 дня. При достижении клетками 80–90% конфлюентности клетки снять с пластика 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (4 мл на флакон Т175) в течение 5–7 мин при +37°C после предварительной промывки клеточной культуры ФСБ. Инактивировать действие трипсина добавлением 2 мл АВ (IV) сыворотки и 6 мл ФСБ.

Клетки ресуспендировать, отмыть ФСБ центрифугированием при 400g в течение 10 мин, пересеять в новые флаконы Т175 в количестве 2,5–3 тыс. клеток/см² в ППС с добавлением 1–2,5% РФТ для наращивания достаточного количества клеток.

Культивировать МСК в течение 2–3 пассажей для получения необходимой клеточной массы.

После каждого посева клеток проводится бактериологический контроль стерильности клеток и сред. Клетки 2–3-го пассажей при достижении ими 80–90% конфлюентности переводятся на остеогенную среду. Среду готовить непосредственно перед употреблением.

Культуральные флаконы поместить в CO₂-инкубатор при 37°C на 3 сут для индукции МСК в остеогенном направлении.

По истечении времени остеогенной индукции клетки во флаконах отмыть от питательной среды физиологическим раствором 0,9% для инъекций, снять 0,25% раствором трипсин-ЭДТА. Клетки дважды отмыть физиологическим раствором с 1% аутологичной сывороткой в режиме центрифугирования при 400 g в течение 10 мин. Ресуспендировать МСК в физиологическом растворе с 5% аутологичной сывороткой из расчета 3–8×10⁶ МСК на 1 см³ костного дефекта.

1.3. Контроль качества полученного клеточного материала

Показатели	Предъявляемые требования
Содержание клеток	Не менее 40×10 ⁶ МСК
Жизнеспособность клеток	Не менее 95%

Иммунофенотип CD90, CD105, CD45, CD34	CD 90 ⁺ >95%, CD 105 ⁺ >95%, CD 34 ⁺ <5%, CD 45 ⁺ <5%.
Стерильности	Стерильно
Срок хранения	Не более 4 ч

Часть клеток заморозить при -196°C (в жидком азоте) и хранить в качестве контрольного образца в течение 1 года.

Возможно использование готового клеточного продукта с содержанием не менее 40×10^6 мезенхимальных стволовых клеток.

2. Получение растворимых факторов тромбоцитов

Концентрат тромбоцитов получают из обогащенной тромбоцитами плазмы донора, заготовленной из дозы консервированной крови в контейнерах полимерных строенных для заготовки крови дозой в 50 или 200 мл. Содержимое контейнера тщательно перемешать и отобрать образец концентрата тромбоцитов для подсчета клеток.

Подсчет тромбоцитов: в центрифужную пробирку внести 4 мл 1% оксалата аммония и 20 мкл концентрата тромбоцитов, оставить при комнатной температуре на 20 мин, затем заполнить камеру Горяева. При помощи светового микроскопа визуально подсчитать в 25 малых квадратах сетки камеры Горяева тромбоциты. Рассчитать число клеток в 1 мкл взвеси концентрата. Концентрацию тромбоцитов можно подсчитать с помощью автоматического гемоцитометра. Затем рассчитать общее количество клеток, содержащееся в дозе тромбоцитов (50 или 200 мл).

Концентрат тромбоцитов разлить в центрифужные пробирки объемом 50 мл и осадить клетки при режиме центрифугирования 3500g в течение 20 мин.

2.1. Получение РФТ методом шоковой заморозки

Использовать концентрат тромбоцитов, полученный из дозы донорской крови группы АВ (IV) или совместимой по группе АВО пациента. Осадок тромбоцитов ресуспендируют в 40 мл ФСБ для отмывки тромбоцитов от остаточных количеств плазмы крови. Изготавливают суспензию тромбоцитов на изотоническом растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий до конечной концентрации клеток 5×10^{10} /мл. Суспензию с клетками подвергают замораживанию при -80°C. При очистке супернатанта РФТ необходимо поместить пробирки в термостат при +37°C для полного размораживания. Провести центрифугирование в режиме 3500g 3–4 раза, а затем однократно при 12000g в течение 20 мин. для полной очистки супернатанта от стромы тромбоцитов. Полученный раствор РФТ профильтровать через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм. Супернатант РФТ расфасовать в объеме 5 и 10 мл в пробирки, асептически их укупорить, наклеить этикетки и хранить при -80°C до применения. РФТ, полученные данным способом, используются в качестве компонента биотрансплантата.

Контроль стерильности приготовленных реагентов проводится согласно требованиям, описанным в технологии получения аутологичных МСК. За 2 ч до использования РФТ разморозить при температуре от +4 до +10°C до полного исчезновения кристаллов льда.

2.2. Получение РФТ методом активации тромбином

Концентрат тромбоцитов, полученный из дозы донорской крови, после осаждения в «жестком» режиме центрифугирования ресуспендировать в

изотоническом растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий до конечной концентрации клеток 5×10^{10} /мл. Затем добавить раствор тромбина из расчета 1 ед./мл и инкубировать 20 мин при комнатной температуре. Отжать сформированный сгусток и дважды очистить супернатант РФТ от форменных элементов в режиме центрифугирования 3500 g в течение 20 мин. Для получения пула пробирки с раствором РФТ, полученными от 8–10 обследованных доноров методом активации тромбином, перенести в ламинарный шкаф. Все пробы объединить в общей емкости, перемешать и центрифугировать дважды в режиме 3500g в течение 20 мин для удаления клеточных элементов. Супернатант отобрать в стерильные бутылки для предварительной очистки (фильтрации). Конечный раствор РФТ профильтровать через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм. Раствор РФТ расфасовать в объеме 4,5 мл в пробирки, асептически закупорить, снабдить этикетками с датой изготовления, номером серии; хранить при температуре -80°C до применения.

РФТ, полученные данным методом, используются как добавка к ППС при культивировании МСК с низкой пролиферативной активностью или при необходимости сокращения сроков культивирования.

Контроль стерильности РФТ: растворы РФТ объемом 10 мл передаются в бактериологическую лабораторию.

3. Фибриновый клей

Фибриновый клей изготавливается на основе фибриногена и тромбина в соответствии с инструкцией производителя. Оказывает местное гемостатическое действие, наступающее в течение минуты после нанесения, обеспечивает формирование и организацию фибринового сгустка (геля), который плотно фиксируется на раневой поверхности.

Фибриновый клей используется в составе биотрансплантата для его фиксации в месте нанесения, создания внешней защитной оболочки, формирования костной ткани и ремоделирования окружающих тканей благодаря наличию в нем биологических активных веществ.

4. Остеопластические материалы (скаффолды)

В составе биотрансплантата используют доступные остеопластические материалы, такие как:

- искусственный и натуральный гидроксиапатит (ГА);
- β -трикальциевые фосфаты и коллаген;
- другие материалы, обладающие свойствами остеокондукции, остеоиндукции и биодеградации.

5. Введение биотрансплантата

Введение биотрансплантата проводят в условиях операционной, соблюдая следующую последовательность:

1) приготовить разведения фибриногена и тромбина согласно инструкции производителя;

2) отобрать в шприц из пробирки ростовые факторы тромбоцитов (до 3 мл) и обильно обработать раневое ложе дефекта кости половиной объема раствора — до 1,5 мл;

3) аккуратно отобрать в шприц суспензию, содержащую не менее 40×10^6 мезенхимальных стволовых клеток;

- 4) внести половину от объема клеточной суспензии непосредственно в область костного дефекта;
- 5) заполнить дефект остеопластическим материалом (скаффолдом);
- 6) нанести вторично из шприца по всей поверхности материала оставшийся раствор РФТ;
- 7) медленно распределить в месте дефекта оставшуюся половину клеточной суспензии из шприца;
- 8) зафиксировать биотрансплантат фибриновым клеем;
- 9) рану послойно ушить общепринятыми методами.

6. Определение эффективности применения биотрансплантата

Критерием эффективности применяемого биотрансплантата является положительная клинко-рентгенологическая картина. Периодичность контрольных осмотров — через 1 мес., затем каждые 3 мес. после трансплантации.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Этапы трансплантации	Осложнения и ошибки при выполнении	Пути устранения
Подбор пациентов для трансплантации	Терапия пациентов с противопоказаниями, перечисленными в п. 2	Соблюдение правил подбора пациентов, установленных настоящей инструкцией
Забор крови/костного мозга	Нарушение правил забора	Соблюдать установленные инструкции
	Нестерильные пробирки для забора крови/костного мозга. Использование неподходящего антикоагулянта	В качестве антикоагулянта допускается использование только гепарина
	Нарушение сроков хранения биоматериала	Срок хранения костного мозга не более 5 ч
Подготовка мезенхимальных стволовых клеток и контроль их качества	Контаминация микроорганизмами	Соблюдения правил асептической работы с культурами клеток
	Низкая пролиферативная активность клеток	Контроль качества питательной среды, добавление в питательную среду растворимых факторов тромбоцитов