

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 30 » июля 2016 г.

Регистрационный № 218-1213

**МЕТОД ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С
ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ НА ОСНОВЕ
КОМБИНИРОВАННОГО ГРАФТА С ИМПЛАНТАЦИЕЙ
АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НЕЙРАЛЬНОЙ
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,

Учреждение здравоохранения «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница»

АВТОРЫ:

Д.Ю. Петрова, д.м.н., профессор В.Н. Подгайский, к.м.н., доцент М.М. Зафранская, д.м.н., профессор Ю.М. Гаин, д.м.н., профессор Ю.Б. Демидчик, Е.Б. Рудаковская, к.м.н. С.Ю. Мечковский

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

30.06.2016

Регистрационный № 218-1213

**МЕТОД ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ
С ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ
НА ОСНОВЕ КОМБИНИРОВАННОГО ГРАФТА
С ИНСТАЛЛЯЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НЕЙРАЛЬНОЙ
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УЗ «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница»

АВТОРЫ: Д.Ю. Петрова, д-р мед. наук, проф. В.Н. Подгайский, канд. мед. наук, доц. М.М. Зафранская, д-р мед. наук, проф. Ю.М. Гаин, д-р мед. наук, проф. Ю.Е. Демидчик, Е.Б. Рудаковская, канд. мед. наук С.Ю. Мечковский

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) содержит описание хирургического метода лечения пациентов с повреждением периферических нервов на основе комбинированного графта с инсталляцией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в условиях нейральной трансдифференцировки, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение указанной патологии.

Инструкция предназначена для врачей-хирургов, врачей-нейрохирургов, врачей-неврологов, врачей-трансплантологов, врачей-лаборантов.

Метод восстановления периферического нерва заключается в том, что область реконструкции нервного ствола путем наложения эпинеурального шва между дистальным и проксимальным концами нерва помещается в трубчатую конструкцию из политетрафторэтилена (ПТФЭ) и сопровождается субэпинеуральным и перинеуральным введением в проксимальный и дистальный концы нерва, а также в область швов нерва композиции мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ), трансдифференцированных в нейральном направлении, в составе геля гиалуроновой кислоты.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинские изделия

1. Ламинарный бокс 2-го класса защиты.
2. Центрифуга (1000–4000 об./мин; ротор для пробирок 15 мл).
3. Инкубатор углекислотный (автоматическое поддержание температуры +37°C и концентрации углекислого газа 5%).
4. Проточный цитофлуориметр.
5. Инвертированный микроскоп увеличение x100 и x400, фазовый контраст.
6. Холодильник +4°C (от +3 до +5°C).
7. Морозильная камера — от -70 до -75°C.
8. Набор автоматических дозаторов переменного объема (1–1000 мкл).
9. Стерильные полипропиленовые пробирки с крышками объемом 50 мл.
10. Стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки с крышками объемом 15 мл.
11. Стерильные полистирольные чашки Петри диаметром 60 мм с поверхностью для адгезивных культур.
12. Стерильные полистирольные 24-луночные планшеты.
13. Стерильные наконечники с фильтром для дозаторов 1–5 мл и 0,5–1000 мкл.
14. Стерильные Пастеровские пипетки.
15. Термостат от +32 до +42°C.

Реактивы, лекарственные средства

1. Коллагеназа I типа.
2. Антибактериальные лекарственные средства (бензилпенициллина натриевая соль, стрептомицина сульфат, неомицина сульфат).
3. Фосфатный буферный раствор Дульбекко (концентрат без кальция и магния, стерильный).

4. Питательная среда DMEM с содержанием глюкозы 1 г/л (жидкая, стерильная).
5. Раствор 200 мМ L-глутамина.
6. Фетальная бычья сыворотка (ФБС).
7. Стерильный раствор трипсин-ЭДТА.
8. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК — CD90, CD105, CD44, CD73, CD54, CD116, CD13, CD117, CD45, CD34, CD31, CD14, CD271.
9. Моноклональные антитела к внутриклеточным маркерам — нестин, S100B.
10. Гель нестабилизированной гиалуроновой кислоты.
11. Фактор роста фибробластов- β (FGF β).
12. Форсколин.
13. Набор для иммуноцитохимического исследования.
14. Раствор адреналина 0,18%.
15. Лидокаина гидрохлорид.

Хирургическое оборудование (для операционной)

1. Стандартный хирургический и микрохирургический набор инструментария.
2. Операционный микроскоп с кратностью увеличения до 24–32 или лупа с кратностью увеличения до 4–6.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Демиелинизирующее повреждение периферического нерва (ушиб нерва, сдавление нерва (отек, гематома) (класс МКБ-10 S00–T98).
2. Аксональное повреждение периферического нерва (невротмезис, аксонотмезис) (класс МКБ-10 S00–T98).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации.
2. Беременность и кормление грудью.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Забор и подготовка биологического материала

Забор жировой ткани осуществляется путем липоаспирации, выполняемой в условиях операционной. Перед процедурой определяют область вмешательства в местах наиболее выраженных жировых отложений, избегая открытых участков тела. Выполняется инфильтрация области липосакции 100,0–200,0 мл раствора 0,5–1%-го лидокаина гидрохлорида с раствором адреналина 0,18% 1:100000. Из отдельных разрезов, выполненных скальпелем № 11, при помощи канюли для липосакции диаметром 2 мм и шприца 20,0 мл выполняют забор жировой ткани. Пробирку с биоматериалом в течение 20 мин доставляют в лабораторию.

2.1. Выделение и получение МСК ЖТ в лабораторных условиях

Для выделения МСК из жировой ткани используется сочетание механической и ферментативной дезагрегации. Для этого липоаспирируют

промывают фосфатным буферным раствором с содержанием антибиотика (50 ед./мл бензилпенициллина натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата, 100 мкг/мл неомицина сульфата), тщательно измельчают и инкубируют в 0,075% растворе коллагеназы I типа в объемном соотношении 1:1 в 0,01 М ФБР в течение 45 мин при 37°C. Инактивацию фермента осуществляют путем добавления равного объема ФБР, содержащего 5% фетальной бычьей сыворотки. Полученную клеточную суспензию отмывают дважды методом центрифугирования при 1500 об./мин в течение 10 мин.

Клеточный осадок ресуспендируют в полной питательной среде DMEM, содержащей 10% ФБС, 2 мМ L-глутамина, 50 ед./мл бензилпенициллина натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата, 100 мкг/мл неомицина сульфата и подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Клеточную суспензию в полной питательной среде высевают в адгезивные культуральные чашки в концентрации 5×10^4 клеток/см². Клетки инкубируют при 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-м CO₂ в течение 24 ч для адгезии. Через 24 ч осуществляют замену полной питательной среды. В дальнейшем замену питательной среды осуществляют каждые 3–4 сут до достижения культурами 80–90% конфлюэнтности.

Для снятия клеточной культуры с чашек Петри удаляют полную питательную среду, промывают раствором ФБР, добавляют 0,25%-й раствор трипсин-ЭДТА и инкубируют 5 мин при 37°C. Реакцию трипсинизации останавливают добавлением ФБР, содержащего 10% ФБС. Суспензию клеток отмывают двукратно в ФБР, содержащем 5% ФБС. Клеточный осадок разводят в физиологическом растворе до рабочей концентрации с учетом минимального количества клеток для аутооттрансплантации при повреждении одного нерва — 1×10^6 клеток.

2.2. Дифференцировка МСК ЖТ в нейральном направлении

Для трансдифференцировки МСК ЖТ пересаживают на 4-й пассаж в концентрации 5×10^4 клеток/мл для культивирования в полной питательной среде в течение 1 сут. Затем среду удаляют и добавляют новую полную питательную среду с содержанием 2%-й ФБС и 100 нг/мл фактора роста фибробластов-β. МСК культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-м CO₂ в течение 14 сут с заменой питательной среды на аналогичную каждые 3–4 сут. После этого питательную среду удаляют и добавляют новую полную питательную среду с содержанием 2%-й ФБС и 10 мкМ форсколина. В качестве контроля используют МСК, культивируемые в полной питательной среде с содержанием 10%-й ФБС. Морфологические изменения в культуре МСК оценивают с помощью инвертированного микроскопа.

Результаты дифференцировки оценивают иммунофенотипически и иммуноцитохимически.

2.3. Иммунофенотипическое исследование МСК ЖТ и МСК ЖТ, трансдифференцированных в нейральном направлении

Оценку фенотипа МСК в концентрации 1×10^5 клеток на пробу проводят путем исследования экспрессии поверхностных маркеров методом проточной цитофлуориметрии.

Трансдифференцированные и контрольные культуры клеток снимают с поверхности культурального пластика 0,25%-м раствором трипсина/ЭДТА. Через 5 мин инкубации при 37°C в условиях 5%-го CO₂ активность трипсина блокируют 0,01 М ФБР, содержащем 5% ФБС. Полученную клеточную суспензию осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об./мин. Процедуру отмывания повторяют дважды. Клеточные культуры окрашивают моноклональными антителами, инкубируют в темноте в течение 30 мин и измеряют на проточном цитометре.

Культура МСК ЖТ считается прошедшей фенотипический контроль при наличии относительного числа клеток, экспрессирующих маркер CD 44, более 90%, CD 90 — более 90%, CD 105 — более 90%, CD73 — более 90%, CD 54 — более 90%, CD 116 — более 90%, CD 13 — более 90%; CD 31 — менее 5%, CD 34 — менее 5% и CD 45 — менее 5%, CD 117 — менее 5%, CD 14 — менее 5%.

Трансдифференцированная культура МСК характеризуется увеличением уровня экспрессии поверхностных молекул клеточной адгезии CD44 более 11%, рецептора CD271 к фактору роста нервов NGF — более 30% и снижением ко-стимулирующей молекулы CD90 на 18,4% по сравнению с таковыми в контрольной культуре МСК ЖТ.

2.4. Иммуноцитохимическое исследование МСК ЖТ, трансдифференцированных в нейральном направлении

Клеточные культуры промывают ФБР для удаления остатков среды и сыворотки. После этого в лунки добавляют 4%-й раствор параформальдегида и инкубируют в течение 15 мин для фиксации клеток на пластике. Лунки промывают раствором ФБР дважды, после чего в экспериментальную и контрольную лунки добавляют 10 мкг/мл первичных антител S-100 и 5 мкг/мл нестина. В лунку с негативным контролем вместо специфических антител добавляют 0,9%-й физиологический раствор. Инкубируют 30 мин, промывают раствором ФБР дважды и добавляют во все исследуемые лунки вторичные антитела из набора иммуноцитохимического исследования. Инкубируют в течение 20 мин. Лунки снова промывают раствором ФБР, после чего добавляют стрептавидин и инкубируют 20 мин. Промывают раствором ФБР и добавляют субстрат-хромогенную смесь. Инкубируют 30 мин. По окончании времени инкубации лунки с клетками промывают трижды раствором ФБР. Результаты визуализируют с помощью микроскопа.

3. Общая техника хирургических операций

Для реализации метода, предложенного в инструкции, может быть использован биомедицинский клеточный продукт, аналогичный по своему клеточному составу таковому, указанному в ч. 2.3.

В стерильных условиях полученную клеточную суспензию трансдифференцированных МСК в концентрации 1×10^6 смешивают с гелем гиалуроновой кислоты в соотношении 1:2 для последующей аутоотрансплантации в поврежденный нерв в объеме 1 мл.

Хирургическая операция выполняется под общей анестезией.

3.1. Аутотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпиневральное и периневральное введение)

При повреждении периферического нерва без нарушения целостности нервного ствола (ушиб нерва, сдавление нерва (отек, гематома), перерастяжение) выполняется ревизия нерва, невролиз (при необходимости) и аутотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпиневральное и периневральное введение). В зависимости от локализации повреждения делают разметку линии доступа в проекции периферического нерва. Выполняют выделение нерва из окружающих тканей. При наличии выраженного рубцового процесса используют микрохирургическую технику и операционный микроскоп для безопасности манипуляций. Выполняют невролиз с иссечением экстра- и интраневральных рубцов. Затем стерильным шприцем с креплением Луер-Лок («Luer-lock») объемом 1,0 мл иглой 18G набирают взвесь стволовых клеток и геля гиалуроновой кислоты из пробирки. Выполняют смену иглы на 30G. Под углом 45° вводят взвесь из расчета 1×10^6 клеток (1 мл взвеси) субэпиневрально и периневрально в дистальном и проксимальном направлениях в области повреждения. После выполнения гемостаза на рану накладывают швы.

3.2. Шов нерва, аутотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпиневральное и периневральное введение)

При частичном и полном пересечении нервного ствола выполняется наложение эпиневрального шва нерва и аутотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпиневральное и периневральное введение в области шва нерва). Подготовительный этап хирургической операции производят по описанной выше методике. Выполняют выделение дистального и проксимального концов нерва из окружающих тканей, отделяют их на протяжении 10–15 мм. Найденные концы нервов можно маркировать с помощью сосудистых клемм. Хирургическая обработка нервов заключается в очень экономном иссечении рубцов (с помощью микрохирургических ножниц или скальпеля) до появления жизнеспособных пучков нерва. После освежения концов нерва на один из них помещают изолирующую муфту, представляющую собой сосудистый протез из ПТФЭ на 2 мм больше диаметра восстанавливаемого нерва. Сопоставив дистальный и проксимальный концы нерва, накладывают эпиневральный шов монофиламентной нерассасывающейся нитью 6/0-7/0.

Затем стерильным шприцем с креплением Луер-Лок («Luer-lock») объемом 1,0 мл иглой 18G набирают взвесь стволовых клеток и геля гиалуроновой кислоты из пробирки. Выполняют смену иглы на 30G. Под углом 45° вводят взвесь из расчета 1×10^6 клеток (1 мл взвеси) субэпиневрально и периневрально в области шва нерва в дистальном и проксимальном направлениях. После этого область анастомоза закрывают изолирующей муфтой, перемещая последнюю по ходу нерва. Муфту фиксируют отдельными швами за эпиневральной нитью 6/0-7/0 (рисунок 1). После выполнения гемостаза на рану накладывают швы.

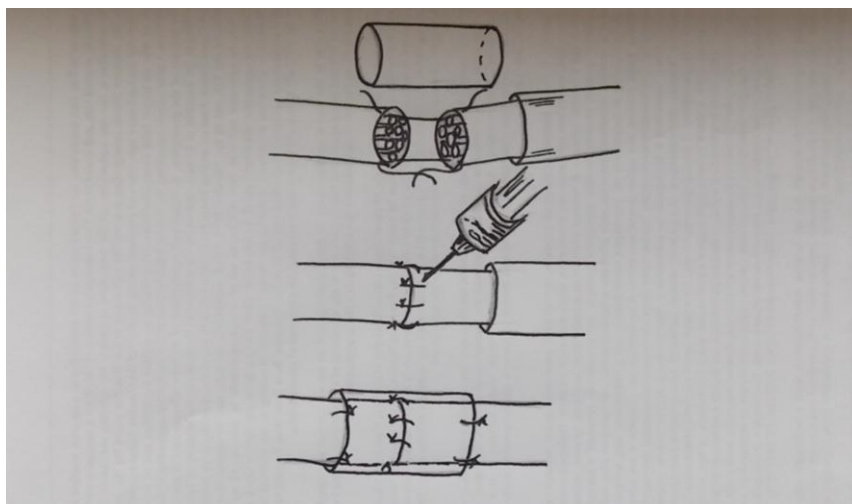


Рисунок 1. — Эпинеуральный шов. Трансплантация взвеси МСК

3.3. Восстановление целостности нерва с использованием нервного аутоотрансплатата, аутоотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпинеуральное и перинеуральное введение)

При полном пересечении нерва и значительном дефекте (более 5 см) выполняется восстановление нервного ствола путем аутонейропластики с использованием сосудистого протеза из ПТФЭ и аутоотрансплантация МСК ЖТ в условиях нейральной трансдифференцировки (субэпинеуральное и перинеуральное введение в области швов нерва).

Подготовительный этап хирургической операции производят по описанной выше методике. Выполняют выделение дистального и проксимального концов нерва из окружающих тканей, отделяют их на протяжении 10–15 мм. Найденные концы нервов можно маркировать с помощью сосудистых клемм. Хирургическая обработка нервов заключается в очень экономном иссечении их (с помощью микрохирургических ножниц или скальпеля) до появления пучков.

Из отдельных разрезов на голени выделяют и иссекают икроножный нерв. Полученный нервный аутоотрансплантат рассекают на несколько частей, длина каждой из которых соответствует протяженности дефекта. Между проксимальным отрезком и нервными аутоотрансплантатами накладывают эпинеуральные и частично эпиперинеуральные швы нерва конец в конец монофиламентной нерассасывающейся нитью 6/0-7/0. После наложения швов нерва фиксированный аутоотрансплантат погружают в изолирующую муфту, длиной и диаметром соответствующими восстанавливаемому нерву, и аккуратно перемещают последнюю, постепенно надвигая на проксимальный конец. Затем накладывают швы между дистальным отрезком нерва и трансплантатами аналогично предыдущему. После наложения швов муфту сдвигают таким образом, чтобы она закрывала области швов нерва. Далее стерильным шприцем с креплением Луер-Лок («Luer-lock») объемом 1,0 мл иглой 18G набирают взвесь стволовых клеток и геля гиалуроновой кислоты из пробирки. Выполняют смену иглы на 30G. Под углом 45° вводят взвесь из расчета 1×10^6 клеток (1 мл взвеси) субэпинеурально и перинеурально в области швов нерва в дистальном

и проксимальном направлениях. После этого области швов нерва закрывают изолирующей муфтой, перемещая последнюю по ходу нерва. Муфту фиксируют отдельными швами за эпиневрив нитью 6/0-7/0 (рисунок 2). После выполнения гемостаза на рану накладывают швы.

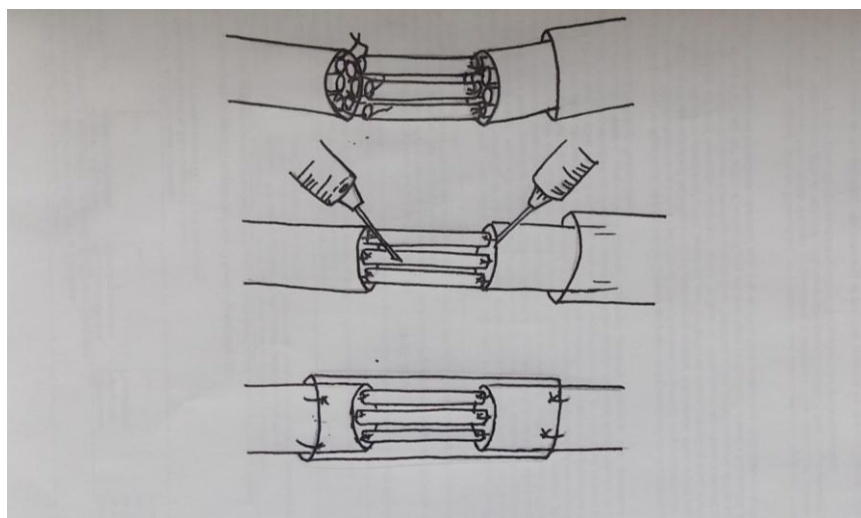


Рисунок 2. — Восстановление целостности нерва с использованием нервного аутографтата. Трансплантация взвеси МСК

3.4. Ведение послеоперационного периода

В раннем послеоперационном периоде пациентам показаны антибактериальная терапия, средства, направленные на стимуляцию восстановления нервов, физиотерапевтическое лечение, которые осуществляются общепринятыми методами.

Пассивную разработку движений рекомендуем начинать через 5–7 дней после хирургической операции, активную — через 3 недели. Электронейромиографическое исследование выполняют в сроки 3; 6; 12 мес. после хирургического вмешательства.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Причинами несостоятельности швов нерва при формировании анастомозов являются в подавляющем большинстве технические ошибки, допущенные хирургом при его наложении.

Для получения функционального результата восстановления нервов необходимо строгое соблюдение следующих условий:

- все нервные пучки, входящие в состав нервного ствола, должны иметь ровную линию среза;
- при сопоставлении сшиваемых концов нерва необходимо добиться сопоставления друг напротив друга пучков одной величины;
- необходимо полностью исключить попадание в пространство между сшиваемыми концами нерва любых посторонних субстанций (крови, прядей эпиневрив, фрагментов ткани соседних структур);

- шов нерва должен быть без натяжения и обеспечивать достаточно прочное соединение сшиваемых концов нерва (с учетом дополнительного натяжения, возникающего при разгибании в суставах кисти и пальцев).