

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель начальника по
науке Главного управления
кадровой политики, учебных
заведений и науки

Н.И. Доста



19 октября 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М. Ореховский



19 октября 2000 г.
Регистрационный № 60-0005

ЗАГОТОВКА, КОНСЕРВАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ В ЖИДКИХ СРЕДАХ

Гродно 2000

Учреждение-разработчик:

Гродненский государственный медицинский университет

Авторы: д-р мед. наук, проф. С.И. Болтрукевич, канд. мед. наук И.П. Богданович, канд. мед. наук А.В. Калугин, канд. мед. наук А.В. Першукевич, С.Л. Чешик

Рецензенты: д-р мед. наук, проф. И.Р. Воронович, д-р мед. наук, проф. Н.И. Батвинков

Целью методических рекомендаций является ознакомление травматологов-ортопедов, нейрохирургов, стоматологов, отоларингологов, офтальмологов и комбустиологов с методиками заготовки, обработки, консервации и хранения биологических тканей для трансплантации. В них изложено обоснование метода, вопросы заготовки, обработки, консервации и хранения пластического материала в жидких средах на основе слабых растворов альдегидов. Метод разработан на кафедре травматологии, ортопедии и ВПХ Гродненского государственного медицинского университета и с успехом применяется в ГКО СМП г. Гродно (главный врач В.В. Сазонов), Гродненской областной клинической больнице (главный врач В.А. Рожко).

Информация об этой методике будет полезна для врачей травматологов-ортопедов, нейрохирургов, стоматологов, отоларингологов, офтальмологов и комбустиологов, выполняющих костно-пластические и реконструктивно-восстановительные хирургические вмешательства.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Проблема восстановления анатомической целостности и функции биологических тканей, и прежде всего костной, до сих пор остается весьма актуальной. Образовавшиеся после травм, оперативных вмешательств, гнойных поражений, опухолей костные дефекты, а также осложнения переломов в виде нарушения остеорегенерации (замедленная консолидация, несращение костей, ложные суставы) требуют применения полноценных пластических материалов.

В последние десятилетия практическая медицина все более остро ощущает дефицит биопластического материала. Это обусловлено как ростом количества и тяжести травм и неблагоприятными экологическими факторами, приводящими к учащению несращений переломов костей, образованию ложных суставов, нагноительных процессов (8,6–15,5%), так и широким внедрением в практику новых технологий, увеличением и усложнением техники и объема реконструктивно-восстановительных вмешательств, выполняемых на опорно-двигательной системе (ОДС). При этом длительность лечения пациентов и их нетрудоспособность колеблется от 6–8 мес. до 2–3 лет, а в 6–8% заканчивается стойкой инвалидностью, что влечет за собой существенные экономические затраты. Следовательно, данная проблема имеет не только важную медицинскую, но и социально-государственную значимость.

Существующие способы лечения (гипсовая повязка, скелетное вытяжение, КДО, эксплантаты и др.), к сожалению, особенно при осложненных переломах, малоэффективны.

Применение аутокости (реплантация или аутоотрансплантация) по известным причинам (инфицированные раны, детский возраст, сопутствующие заболевания и др.) не всегда приемлемы.

Использование замороженных и лиофилизированных аллотканей также не решает проблемы из-за их чувствительности к инфекции (28%), дороговизны обработки и стерилизации, слабой трансформации и пластичности тканей.

В то же время общеизвестно, что к используемому пластическому материалу предъявляются определенные требования: простота и надежность заготовки, консервации и хранения, а также сохранение высоких стимулирующих и репаративных свойств, устойчивости к инфекции, снижение антигенности, экономичность.

Учитывая 20-летний опыт научных поисков, проводимых на кафедре травматологии, ортопедии и ВПХ Гродненского государственного медицинского университета по проблеме заготовки, консервации и клиническому применению аллогенных тканей, консервированных в жидких средах, и продолжая начатые ранее исследования, мы пришли к разработке нового метода консервации, хранения и клинического применения аллотканей в жидких средах, отличающегося, на наш взгляд, целесообразностью, простотой, экономичностью, возможностью заготавливать ткани в нестерильных условиях с одновременной их консервацией и стерилизацией.

Этим требованиям, по нашему мнению, отвечают жидкие среды, содержащие формальдегид в смеси с глутаровым альдегидом. При использовании нового метода консервации биологических тканей крайне важно было еще более детально уточнить наиболее оптимальные концентрации смесей альдегидов, их бактериостатическое действие, эмбриотоксичность и тератогенность, стабилизацию альдегидов в тканях, морфологические проявления, их трансформацию в организме реципиента.

В ряде научных центров активно ведутся работы по совершенствованию способов консервации и клинического применения тканей в растворах формолового альдегида. Однако, как правило, для этих целей используются растворы формальдегида высоких концентраций (0,5–4%), что в значительной мере ведет к необратимому связыванию белков (фиксации) в трансплантате и, тем самым, к резкому снижению его биопластических свойств. Наряду с этим, не существует единого подхода в расчете концентрации растворов, возможностей потенцирования их стимулирующих свойств. Отсутствуют данные по изучению токсичности консервирующих смесей, иммуотропного, эмбриотоксического, тератогенного воздействия на организм, их стабильности в динамике и степени насыщения тканей составляющими компонентами смесей. Нуждаются также в уточнении данные по стерилизующим свойствам смесей альдегидов.

Основываясь на задании Министерства здравоохранения РБ по выполнению программы ОНТП № 9/98 по проблеме: «Разработать и внедрить комплексную систему заготовки, стерилизации, консервации и хранения аллогенных тканей опорно-двигательного аппарата в жидких средах для трансплантации», нами в клинике травматологии, ортопедии и ВПХ Гродненского государственного медицинского университета проведен целый ряд комплексных исследований для решения данной проблемы.

Все исследования выполнены согласно «Временному положению о порядке разрешения к медицинскому применению и промышленному производству новых лекарственных средств» (Минск, 1993), и «Требованиям к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ» (Москва, 1985).

Проведенными нами исследованиями установлено выраженное бактерицидное действие растворов альдегидов на микрофлору ран. При этом смесь этих веществ усиливает их бактерицидный эффект. Выявленный нами синергизм действия смеси растворов формолового и глутарового альдегидов на микрофлору позволяет надежно стерилизовать заготовленные биологические ткани без строгого соблюдения правил асептики и антисептики и обеспечивает их стерильность через 12–72 ч и устойчивость к инфекции после трансплантации в организм реципиента.

Отмечена сохранность органных структур кости в процессе консервации и возможность обратимости процессов блокирования белков альдегидами при сохранении ими прочностных характеристик.

Установлено, что альдегиды в определенных концентрациях постоянно присутствуют в организме и активно участвуют в процессах метаболизма. Однако ни растворы альдегидов в слабых концентрациях, ни консервированные в них трансплантаты не оказывают на ткани организма заметного токсического, раздражающего, местного и общерезорбтивного действия, а равно эмбриотоксического и тератогенного.

Общеизвестно, что при консервации биологических тканей крайне важно иметь конкретное представление о стабильности используемой смеси альдегидов, времени накопления и убыли их в пластическом материале, сроках отмывки их до трансплантации и замены консервирующих сред.

Определено максимальное накопление альдегидов в сроки до 3–7 дней с незначительной убылью в течение последующих 30–60 дней. Отсюда следует, что замену консервирующих сред необходимо осуществлять через 1–2 мес. Такие концентрации альдегидов после трансплантации эквивалентны 0,01–0,07 г, введенным в организм

в промежутки от нескольких часов до 2–3 сут (время высвобождения альдегидов). Кроме этого, основная часть альдегидов, содержащаяся в мягких тканях, может быть удалена перед операцией путем отмывки в изотоническом растворе хлорида натрия. В связи с этим остаточное количество консервирующего вещества, вводимое в организм реципиента при трансплантации, следует считать безопасным, не превышающим эндогенного содержания альдегидов. Вместе с тем, для уменьшения вероятности проявления местного действия альдегидов целесообразно осуществлять отмывку трансплантатов мягких тканей непосредственно перед пластической операцией в течение 20–30 мин.

Морфологические исследования позволили заключить, что пластические операции с использованием консервированных аллотрансплантатов приводят к положительным результатам с отсутствием реакции отторжения.

Простота заготовки, надежность хранения и стерилизации, полноценные пластические свойства биоматериалов дают возможность рекомендовать их для клинического применения не только в условиях областных центров, но и в районных больницах.

ЗАГОТОВКА ТКАНЕЙ

Забор трупных тканей осуществляется в соответствии с положениями Закона Республики Беларусь «О трансплантации органов и тканей», Минск, 1997 г.

Заготовка аллогенных тканей производится в секционных залах морга с разрешения судебно-медицинского эксперта или патологоанатома от трупов людей не старше 40 лет. Пригодными для получения материала считаются трупы скоропостижно скончавшихся в результате травм, сердечно-сосудистых заболеваний, острой кровопотери, механической асфиксии, заболеваний неинфекционной этиологии. Исключается заготовка тканей у умерших от туберкулеза, инфекционных, онкологических и венерических болезней, СПИДа, гнойных и септических процессов, отравлений ядами и не установленными веществами.

Забор материала осуществляется в первые 12 ч после наступления смерти при условии хранения трупа в холодильной установке.

Перед изъятием пластического материала механическим путем удаляется волосяной покров, обрабатываются кожные покровы и затем высушиваются.

Изъятие тканей производится без соблюдения правил асептики и антисептики, что значительно ускоряет и упрощает процесс заготовки, и может быть поручено обученному среднему медицинскому персоналу.

Заготовка костной ткани в зависимости от формы, состава, размера осуществляется на различных сегментах. Изъятые фрагменты кости замещают протезом из гипса, чтобы не обезобразивать труп. Фрагменты кости тщательно очищают от остатков мягких тканей, надкостницы; особо тщательно удаляется костный мозг. Затем костные фрагменты промывают проточной водой. При заготовке хрящевой ткани используют реберные и грудные хрящи, которые

забирают после проведенной торакотомии.

Забор сухожилий должен производиться через небольшие разрезы с минимальным повреждением мягких тканей. Забору подлежат сухожилия сгибателей и разгибателей кисти, малоберцовых мышц, разгибателей стопы и ахилловые сухожилия.

Сухожилия сгибателей кисти извлекаются из продольного разреза по ладонной поверхности предплечья и поперечного разреза вдоль дистальной межфаланговой складки пальцев кисти. Освобожденные сухожилия подтягивают и иссекают. Таким образом возможно получить пластический материал длиной до 150 мм.

Сухожилия разгибателей кисти заготавливают из линейного разреза по краю тыла нижней трети предплечья и кисти.

Забор сухожилий длинной и короткой малоберцовых мышц, ахиллова сухожилия, разгибателей пальцев стопы осуществляется из передненаружного разреза голени, начиная от ее средней трети до латеральной лодыжки с переходом на тыл стопы.

Забор твердой мозговой оболочки (ТМО) производится после вскрытия черепной коробки. Необходимо тщательно отмыть ТМО проточной водой от крови.

Полученный материал погружается в физиологический раствор и доставляется в лабораторию по консервации биологических тканей в лечебное учреждение.

Параллельно с заготовкой пластического материала производится забор крови на исследование маркеров гепатита, RW и СПИДа с отправкой в соответствующие лаборатории.

МЕТОДИКА КОНСЕРВАЦИИ

В лаборатории заготовки и консервации либо банке тканей из заготовленной костной и хрящевой ткани при помощи аппарата для обработки костей формируют пластический материал необходимой формы, длины. Отбирают отдельно костную ткань для деминерализации.

Сухожилия освобождают от окружающих тканей, сохраняя перитенон. Их группируют по длине и поперечным размерам. Твердая мозговая оболочка разрезается на полосы. Заготовленный материал промывается физиологическим раствором и помещается на чистое сухое полотенце, простыню, салфетку. Затем пластический материал погружают в банки с консервантом. Из концентрированного раствора нейтрального формалина (ФА) (37% раствор формальдегида) и 25%, 50% или 75% глутарового альдегида (ГА) готовят растворы 0,4% ФА и 0,1% ГА. В качестве растворителя используют стерильные изотонические растворы хлорида натрия или Рингера — Локка. Затем рабочие растворы смешивают в соотношении 1:1 и pH среды доводят до 7,0–7,4. Для этого применяют фосфатный буфер из расчета 10–30 мл на каждый литр консервирующей смеси. Нейтрализация формалина осуществляется до приготовления консервирующей смеси в течение суток путем добавления к нему толченого мела из расчета 100 г мела на каждый литр ФА.

Костную ткань хранят в смеси 0,4% ФА и 0,1% ГА. Растворы указанной концентрации получают следующим

образом. К 996 мл физиологического раствора доливают 4 мл 100% нейтрального ФА и тщательно размешивают. Затем к 998 мл физиологического раствора доливают 2 мл 50% ГА и тщательно размешивают. Полученные растворы смешивают 1:1.

Для улучшения адаптации трансплантата к тканям реципиента и повышения его устойчивости к инфекции рекомендуется в консервирующие растворы вводить биологически активные вещества: 30 мг/л никотиновой кислоты, 450 мг/л кальция пантатената и 10 мг/л димексида, которые способствуют более глубокому проникновению в консервируемые ткани компонентов консерванта и обеспечивают адаптацию и энергетическую основу пластического материала.

Сухожилия, ТМО, хрящи хранят в смеси 0,2% раствора ФА и 0,05% раствора ГА с добавлением глицерина в соотношении 1:4, что способствует сохранению пластических свойств тканей, особенно предназначенных для операций на кисти.

В лаборатории консервации заводятся журналы регистрации забора трупных тканей (табл. 1), учета результатов применения трансплантатов (табл. 2), регистрации выдачи тканей (табл. 3).

Таблица 1

Журнал регистрации забора трупных тканей

| | | | |
|---|--|--|--|
| № п/п, серия | | | |
| Дата забора тканей (число, месяц, год, время) | | | |
| Время с момента смерти до момента забора | | | |
| Ф.И.О. донора (возраст, адрес, пол) | | | |
| Диагноз | | | |
| Наименование и количество заготовленных тканей | | | |
| Группа крови и резус фактор | | | |
| ВИЧ | | | |
| RW | | | |
| Гепатит | | | |
| Бактериальный контроль | | | |
| Подпись | | | |
| Примечания | | | |

Таблица 2

*Журнал учета результатов применения
трансплантатов*

| | | | |
|---|----------------------------------|--|--|
| № п/п | | | |
| Ф.И.О. реципиента, домашний адрес | | | |
| № истории болезни, название медицинского учреждения | | | |
| Ф.И.О. донора. Время заготовки и использованный трансплантат | | | |
| Название операции. № и дата | | | |
| Результаты вмешательства | послеоперационное течение | | |
| | 1–3 мес. | | |
| | 6–12 мес. | | |
| | после 18 мес. | | |
| | Примечания | | |

Таблица 3

Журнал регистрации выдачи тканей

| | | | |
|---|--|--|--|
| № п/п | | | |
| Серия ткани (№ в журнале заготовки тканей) | | | |
| Дата выдачи тканей | | | |
| Наименование и количество выданного материала | | | |
| Дата забора тканей | | | |
| Реквизиты получателя (название клиники, адрес, №№ счетов и т.д.) | | | |
| Подпись и Ф.И.О. получателя | | | |
| Подпись и Ф.И.О. выдавшего материал | | | |
| Примечания | | | |

Стекланные емкости (банки, эксикаторы и т.п.) заполняют консервантом, чтобы он полностью покрыл трансплантаты (приблизительно 1 часть материала на 6–8 частей консервирующего раствора), закрывают плотно прилегающими крышками, помещают в бытовой холодильник с температурным режимом +2–+4°C. Консервант следует менять в течение первого месяца хранения один раз в неделю, а в дальнейшем — один раз в 1–2 мес.

Пластический материал пригоден к клиническому применению со сроком консервации не менее 20 дней, предельный срок хранения 12–18 мес. В процессе хранения производится бактериологический контроль 1 раз в месяц, определение стабилизации растворов, их концентраций.

За 20–30 мин до операции трансплантаты извлекают из банки стерильным инструментом и помещают в избыточное количество теплого (37°C) стерильного физиологического раствора.

Транспортировать пластический материал в другие лечебные учреждения следует в банках с консервантом, помещенных в контейнеры со льдом.

ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Деминерализация подготовленной ранее костной ткани осуществляется в 2,4 Н растворе соляной кислоты. Для приготовления этого раствора берут 450 г (приблизительно 378 мл) 38% соляной кислоты, принимаемой при расчетах за 100%, и 1450 мл физиологического раствора. Температурный режим деминерализации +2–+4°C. Время обработки зависит от концентрации кислоты и может быть от 8–12 ч до 1–2 сут. Для ускорения процесса деминерализации увеличивают концентрацию соляной кислоты. В начале кости погружают в 4,8–5,2 Н раствор соляной кислоты с экспозицией 8–12 ч и последующим погружением в 2,4 Н раствор этой же кислоты. После деминерализации (контроль-проба иглой, сгибание, скручивание по оси) костный матрикс промывают водой в течение 2 ч. Затем остатки соляной кислоты нейтрализуют 5% или 10% раствором тиосульфата натрия. Показателем полного погашения соляной кислоты является прекращение помутнения раствора тиосульфата натрия. Костный матрикс в дальнейшем промывают физиологическим раствором и помещают в консервант.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЛОГЕННОЙ ТКАНИ

Пересадка биологических тканей в клинической практике осуществляется при:

- пластике дефектов костей позвоночника и свода черепа;
- лечении открытых оскольчатых переломов и ложных суставов с дефектом кости;
- лечении посттравматических и гематогенных остеомиелитов;
- реконструкции костей и суставов;
- восстановлении поврежденных связок и сухожилий.

Костный трансплантат помещают в костное ложе. Он должен быть тщательно подогнан по форме и размерам костного дефекта. Концы костного дефекта освежаются в пределах неизменной кости. В случаях возникновения диастаза места стыка трансплантата с ложем реципиента плотно пломбируют костной крошкой донора или

реципиента. Обязательным условием трансплантации биологических тканей является надежная фиксация костного фрагмента, правильное ведение послеоперационного периода, диспансерное наблюдение и реабилитация больных.

Для улучшения реваскуляризации и последующей перестройки крупных аллотрансплантатов (12–20 см) производят сквозную перфорацию их с помощью сверла диаметром 2–3 мм. Отверстия наносят в шахматном порядке по окружности кости на расстоянии 10–15 мм друг от друга. Процессы «рассасывания–замещения» в этих трансплантатах протекают активнее и более равномерно, что улучшает конечные результаты восстановительного лечения.

Деминерализованный костный матрикс, обладая уникальной способностью индуцировать остеогенез, применяется у больных с наличием ложных суставов, несращений, замедленной консолидацией, развившихся в результате нарушения процессов репаративной регенерации костной ткани, а также посттравматических и пострезекционных дефектов. Выкраивание и подгонка трансплантатов по форме и размерам соответственно замещаемому дефекту, а также расщепление трансплантатов на пластины выполняется сразу после резекции очага и подготовки костного ложа при помощи скальпеля и ножниц, что обеспечивается пластичностью и легкостью обработки данного вида материала.

Консервированная в альдегидах аллокость и деминерализованный костный матрикс резистентны к суперинфекции в момент пересадки, не обладают выраженной антигенной активностью и тем самым имеют преимущества перед ауотрансплантатами при пластике в условиях инфицированной раны.

Консервированные сухожильные аллотрансплантаты могут быть использованы для пластики сухожилий сгибателей и разгибателей пальцев кисти, ахиллова сухожилия, при повреждении сухожилия длинной головки двухглавой мышцы плеча, четырехглавой мышцы бедра, сопровождающихся ретракцией концов и развитием в них деструктивно-дегенеративных процессов, а также при восстановлении крестообразных и боковых связок коленного сустава, разгибательного аппарата голени, фиксации при вправлениях привычного вывиха плеча, тенодезе.

При выполнении пластических операций на сухожилиях сгибателей кисти рекомендуется использовать аллотрансплантаты, соответствующие поперечным размерам сухожилия реципиента.

ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ЗАГОТОВКЕ, КОНСЕРВАЦИИ И ХРАНЕНИИ ПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

1. Ошибки возможны при несоблюдении положений «Закона о трансплантации органов и тканей» Республики Беларусь, а так же при неточном выполнении соответствующего приказа Министерства здравоохранения, детально регламентирующих юридические аспекты забора органов и тканей у донора, что может привести к нарушению прав родственников либо волеизъявления самого донора.

2. Необходимо в точности соблюдать временный фактор, то есть забор тканей возможен лишь у доноров не старше 40 лет, не позднее 12 ч с момента наступления смерти.

В случае хранения трупа в холодильной установке это время удлиняется до 24 ч. Забор тканей у лиц старше 40 лет либо в сроки позднее 12–24 ч с момента смерти нецелесообразен ввиду резкого снижения биопластических свойств материала, использование которого приведет к резкому увеличению отрицательных результатов.

3. Серьезной ошибкой следует считать невыполнение исследований тканей донора по выявлению заболеваний гепатитом, СПИДом, инфекционными, венерическими заболеваниями, отравлениями неустановленными химическими препаратами либо ядами.

4. Следует соблюдать особую тщательность при обработке тканей, их консервации и хранении, так как несоблюдение температурного режима, неверные концентрации консервирующих смесей, соляной кислоты, нарушение pH среды, несоблюдение сроков заливки материала приводит к резкому снижению его биопластических свойств и таким образом к резкому повышению процента послеоперационных осложнений.

5. Ошибкой будет и разрешение к использованию консервированных тканей без выполнения 3-кратного бактериального посева с отрицательными результатами.

Считаем необходимым указать, что во избежание вышеперечисленных ошибок необходимо точное выполнение данных методических рекомендаций.