УДК 576.3/.4:616-001.17

ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ БИОМЕДИЦИНСКИХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛООБОЖЖЕННЫХ, ОСНОВАННЫХ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

(методические рекомендации)

Аннотация

Метод рекомендован для применения в Ожоговых центрах и специализированных ожоговых отделениях больниц для лечения глубоких и обширных ожогов у пациентов с дефицитом донорских ресурсов кожи при малой обсемененности раневой поверхности.

Данная методика особенно эффективна после раннего (в первые 2–5 суток) иссечения ожогового струпа до жизнеспособных тканей.

Описание метода

Формула метода

Способ лечения обширных глубоких ожогов включает трансплантацию аллофибробластов (в дальнейшем – АФБ) на ожоговые раны после раннего (на 2–5 сутки) иссечения некротических тканей до жизнеспособных слоев (глубокие слои дермы, подкожная жировая клетчатка, поверхностная фасция) на площади поражения более 10% поверхности тела или на обширные гранулирующие раны с последующей аутодермопластикой расщепленным (0,2 мм) кожным сетчатым лоскутом, с коэффициентом перфорации 1:2, 1:4, 1:6. Метод рекомендован к применению также при дермальных ожогах для ускорения репаративных процессов и с целью улучшения косметических результатов.

Название изобретения и номер патента: «Штамм диплоидных клеток ЛЭЧ-4(81)» А.С. № 1147748, приоритет изобретения от 27.01.1983; «Клеточная культура ЛЭЧ-4(81) для заместительной терапии» (положительное решение по заявке № 2002116080/13 с приоритетом от 18.06.2002).

Материальное обеспечение метода

Культивирование аллофибробластов – сложный технологический процесс, осуществление которого возможно только в условиях специализированной лаборатории, с соблюдением режима стабильного поддержания культуры и криоконсервации.

Контактные адреса:

1. ООО «Компания МБТ»: г. Екатеринбург, ул. Репина, 103, Тел.: 214-08-73, 214-08-74.

2. Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций: 620030, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23, Тел.: 261-99-60, факс: 261-99-47.

Для работы используют диплоидную культуру аллофибробластов (АФБ) человека клеток ЛЕЧ-4 (81) – фибробласты нормальной ткани человека, полученную в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ. Применяется 3–4 суточная культура клеток 5–17 пассажа в виде взвеси клеток в концентрации 100–120 тыс. кл./мл, либо АФБ, трансплантированные на покрытие (Фолидерм) из расчета 50 тыс. клеток на 1 см^2 покрытия. Культура исследована на отсутствие вирусных (ВИЧ, гепатиты и герпесвирусы и др.) и бактериальных контаминантов, микоплазм, отсутствие онкогенной потенции.

Трансплантация культуры аллофибробластов осуществляется в условиях операционной. Оценка готовности раны для трансплантации осуществляется визуально и бактериологически (микробное число менее 10^5). АФБ наносят на раны в соотношении 30–50 тыс. кл. на 1 см^2. Трансплантацию АФБ производят на гранулирующие раны или на раневые поверхности после иссечения ожогового струпа до жизнеспособных тканей с последующей аутодермопластикой расщепленным перфорированным лоскутом. Для выполнения операции необходимы следующие инструменты и аппаратура:

1. Дерматом ДЭД-45, ДЭД-55 РШБ РАН, НПО «ДЕОСТ».

2. Перфоратор 1:2,1:4,1:6 типа ПКР-2, ПКР-4, ПКР-6 ИПБ РАН, НПО «ДЕОСТ»

3. Электрокоагулятор типа ЭХЧВ 100-5ТУ-11-81 ОХМ3.909-00-ТУ ВНИИМТ, рег. № 80/102-5

4. Материал для изготовления иммобилизационных лонгет гипс или материал пластический «Полевик» ТУ 38.106.325-78 Воронежского филиала ВНИИ синтетического каучука, ГЭП «ЦИТО», рег. № 92/161/02.

Технологическое описание метода

Показания к трансплантации фибробластов определяют на первой перевязке. Клеточная культура готовится в течение 2–3 суток. Перед проведением оперативного лечения глубоких (IIIв–IV ст.) ожогов выявляют их границы, после чего приступают к выполнению этапного хирургического лечения. Подготовка ран для оперативного лечения с последующей трансплантацией АФБ не отличается от обычного ведения ран определенной глубины и площади.

1 этап хирургического лечения – иссечение ожогового струпа.

Некрэктомия производится по стабилизации состояния больного на 2–5 сутки от момента травмы, когда минимально бактериальное обсеменение ран. В зависимости от глубины поражения иссечение производится в пределах глубоких слоев дермы, до подкожной клетчатки или до поверхностной фасции.

2 этап – трансплантация аллофибробластов и аутодермопластика.

В зависимости от радикальности некрэктомии, трансплантацию АФБ проводят одномоментно с иссечением струпа или отсроченно через несколько дней. При нанесении культуры на раны в виде взвеси в физиологическом растворе, АФБ выдерживаются 20 минут для фиксации к подлежащим тканям, затем на рану накладываются сетчатые аутотрансплантаты перфорированные 1:4, 1:6.

Покрытие «Фолидерм», с фиксированными на нем АФБ, накладывалось после ранней некрэктомии, для транслокации АФБ на рану и их фиксации в качестве временного биологического покрытия либо в сочетании с аутодермо-пластикой. Отсроченная трансплантация в ряде случаев может быть выполнена на 2 сутки после оперативного лечения. При дермальных ожогах АФБ на покрытии «Фолидерм» накладывается на раны после их очищения от нежизнеспособных тканей с целью стимуляции репаративных процессов.

Показания

Показаниями к применению культивированных аллофибробластов человека при лечении глубоких ожогов является наличие ожогов IIIБ–IV степени на площади более 10% поверхности тела, дефицит донорских ресурсов, длительно незаживающие гранулирующие раны, обширные дермальные ожоги, донорские раны.

Противопоказания

1. Недостаточно подготовленная раневая поверхность – высокая микробная обсемененность раны (более 10' микробных тел в грамме ткани) или нерадикальность хирургического иссечения, угроза развития вторичного некроза.

2. Крайне тяжелое состояние больного с декомпенсацией функций органов и систем на фоне несовместимых с жизнью ожогов или развитием тяжелого сепсиса. В этих случаях культивированные фибробласты не приживаются.

Возможные осложнения, их профилактика и купирование

Цитологические и морфологические исследования показали отсутствие каких-либо иммунологических реакций в ответ на трансплантацию АФБ, что связано с потерей антигенов гистосовместимости в процессе культивирования.

Неудовлетворительные результаты могут быть получены при наличии грибковой флоры, что требует применения противомикотических препаратов (как местное, так и общее этиотропное лечение).

При трансплантации культивированных аллофибробластов в функционально активных зонах необходимо применять аутодермотрансплантаты с меньшим коэффициентом перфорации, а также создавать условия для иммобилизации. Последняя достигается применением лонгет, моделируемых для каждого больного индивидуально.

Применение данной технологии показало ее высокую эффективность и экономическую целесообразность.

Приложение 1

Алгоритм применения клеточных культур для заместительной терапии в монослое при лечении поверхностных поражений

Клеточные культуры для заместительной терапии в монослое транспортируются во флаконах для кровезаменителей емкостью 50, 100, 250 мл, в срок не более 5 суток.

Емкость флакона	50 мл	100 мл	250 мл
Количество клеток (млн.)	0,75	1,5	3,5
Количество раствора Версена(ЭДТА)	10 мл	15 мл	40 мл

Подготовка клеток в монослое к использованию требует наличия центрифуги на 2000 об./мин., стерильного 0,02% раствора Версена и сбалансированных буферных растворов Эрла или Хенкса, желательно без индикатора. В крайнем случае растворы Эрла и Хенкса можно заменить

стерильным изотоническим физиологическим раствором. Все манипуляции с клетками проводят в стерильных условиях.

Алгоритм работы с клеточными культурами в монослое

1. Подготовительные операции

1.1 Изъять флаконы из транспортной тары;

1.2 Проверить целостность флакона и крышки (осмотреть флакон на наличие трещин, признаков протекания);

1.3 Визуально проверить pH – флакон с ярко-желтой мутной средой в работу не брать;

1.4 Обработать флакон спиртом и обжечь флакон с колпачком спиртовым факелом.

2. Основные операции

2.1 Занести флакон в чистое помещение (предоперационную);

2.1.1 Аккуратно снять алюминиевый защитный колпачок;

2.1.2 Обработать флакон спиртом и обжечь горло и стенки флакона спиртовым факелом;

2.1.3 Открыть флакон и слить транспортную среду;

2.1.4 Залить во флакон соответствующий объем раствора Версена, закрыть пробкой и выдержать флакон в термостате до полного отслоения клеток от стекла (как правило – 3–5 мин.) и энергично встряхивать 10–15 сек.;

2.1.5 Если рабочий объем центрифуги позволяет, во флаконе провести центрифугирование при 2000 об./мин. в течение 10 мин.;

2.1.6 Обработать флакон спиртом и обжечь горло и стенки флакона спиртовым факелом;

2.1.7 Аккуратно слить надосадочную жидкость;

2.1.8 Развести осадок до концентрации около 200 тыс.кл./мл раствором Эрла или Хенкса, в крайнем случае изотоническим физиологическим раствором;

2.1.9 Закрыть флакон пробкой и энергично встряхивать 30–40 сек. добиваясь получения максимально равномерной взвеси.

2.2. Если рабочего объема центрифуги не хватает, то необходимо обработать флакон спиртом и обжечь горло и стенки флакона спиртовым факелом, разлить содержимое в стерильные емкости, соответствующие центрифуге, провести центрифугирование при 2000 об./мин. в течение 10 мин.; далее действовать согласно 2.1.4–2.1.8.

3. Равномерно нанести взвесь на подготовленную рану.

Приложение 2

Алгоритм применения клеточных культур для заместительной терапии на носителе для лечения поверхностных поражений

Клеточные культуры на носителе транспортируют во флаконах емкостью 10, 50, 100, 250 мл, завальцованных алюминиевыми колпачками, в срок до 5 суток.

Максимальная площадь носителя и количество клеток на носителе соответственно:

Объем флакона (мл)	10	50	100	250
Площадь носителя ($см^2$)	3	15	30	70
Количество клеток (млн.)	0,150	0,75	1,5	3,5

Все работы с клеточной культурой выполняют в стерильных условиях. Для работы необходимо иметь: стерильный раствор Эрла или Хенкса – желательно без индикатора (возможна их замена на стерильный изотонический физиологический раствор); стерильную чашку Петри или кювету для ополаскивания носителя с клетками.

Алгоритм подготовки к применению клеточных культур на носителе (Фолидерм)

1. Подготовительные операции

1.1 Изъять флаконы из транспортной тары;

1.2 Проверить целостность флакона и крышки (осмотреть флакон на наличие трещин, признаков протекания);

1.3 Визуально проверить pH-флакон с ярко-желтой и мутной средой в работу не брать;

1.4 Аккуратно обжечь флакон с колпачком спиртовым факелом;

1.5 Занести флакон в операционную.

2. Основные операции: (проводятся в стерильных условиях)

2.1 Удалить алюминиевый колпачок;

2.2 Обжечь флакон спиртовым факелом;

2.3 Вынуть пробку, стерильным пинцетом достать носитель (клетки расположены на стороне, обращенной внутрь флакона);

2.4 Ополоснуть носитель в растворе Эрла или Хенкса;

2.5 Разместить носитель на подготовленной ране клетками к раневой поверхности.

Приложение 3

Алгоритм подготовки клеточной культуры во взвеси

Клеточные культуры для заместительной терапии во взвеси транспортируются во флаконах для кровезаменителей емкостью 50, 100, 250 мл, в срок не более 1 суток.

Транспортная концентрация клеточной взвеси 50 тыс.клеток/мл. Подготовка взвеси к использованию требует наличия центрифуги на 2000 об./мин. и сбалансированных буферных растворов Эрла или Хенкса, желательно без индикатора. В крайнем случае эти растворы можно заменить стерильным изотоническим физиологическим раствором. Все манипуляции с клетками проводят в стерильных условиях.

Алгоритм работы с клеточными культурами во взвеси

1. Подготовительные операции.

1.2. Изъять флаконы из транспортной тары;

1.3. Проверить целостность флакона и крышки (осмотреть флакон на наличие трещин, признаков протекания);

1.4. Визуально проверить pH – флакон с ярко-желтой средой в работу не брать;

1.5. Аккуратно обжечь флакон с колпачком спиртовым факелом.

2. Основные операции.

2.1. Занести флакон в стерильное помещение, где установлена центрифуга;

2.1.1. Если рабочий объем центрифуги позволяет, то провести центрифугирование при 2000 об./мин. во флаконе в течение 10 мин.;

2.1.2. Снять защитный алюминиевый колпачок;

2.1.3. Обжечь горло и стенки флакона спиртовым факелом;

2.1.4. Аккуратно слить надосадочную жидкость;

2.1.5. Развести осадок до концентрации около 200 тыс.кл./мл раствором Эрла или Хенкса, в крайнем случае изотоническим физиологическим раствором;

2.1.6. Закрыть флакон пробкой и энергично встряхивать 30–40 сек.; добиваясь получения максимально равномерной взвеси.

2.2. Если рабочего объема центрифуги не хватает то необходимо разлить содержимое в емкости, соответствующие центрифуге и провести центрифугирование при 2000 об./мин. в течение 10 мин. и далее действовать согласно 2.1.4–2.1.6.

3. Равномерно нанести взвесь на подготовленную рану.

За 4 года использования АФБ в клинике пролечено 40 детей с ожогами II–III а степени общей площадью от 4 до 56%. У 26 детей использовалась взвесь аллофибробластов, 14 детям накладывалось покрытие «Фолидерм» с трансплантированными АФБ. При этом достигнуты следующие результаты. Ускорение эпителизации ячеек сетчатых трансплантатов до 7–8 суток (при обычной трансплантации эпителизация происходит на 12–14 сутки). Приживляемость лоскутов составила 97% (при обычных методах лечения приживляемость составляет от 80 до 95%). Применение АФБ позволило сократить продолжительность лечения в данной группе больных на 7 суток.

Метод с использованием АФБ производства Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций с 2002 года применяется в Челябинском, Тюменском, Сургутском, Кемеровском ожоговых центрах.

Список литературы

1. *Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Туманов В.П.,* и др. Лечение ожогов с использованием культивированных клеток кожи человека // Хирургия. 1993. № 3. С. 22–26.

2. *Саркисов Д.С.* Теоретическое обоснование современных методов лечения обожженных с применением культивируемых клеток кожи человека//Новые методы лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи: Мат. междунар. симпоз. Тула, 1996. С. 9.

3. *Алексеев А.А.* Новые методы лечения ожогов III а ст. и донорских ран // Журнал «Комбустиология». № 3. 2001.

4. *Глинских Н.П.* Перспективы и принципы использования клеточных культур в заместительной терапии. Мат-лы конференции «Клеточная биотехнология и заместительная клеточная терапия в комбустиологии и стоматологии». Екатеринбург, 2002.

5. *Парамонов Б.А., Порембский В.Я.* Ожоги. Рук-во для врачей // СПб.: Медицина, 2000.

6. *Парамонов Б.А., Блинова М.И., Смирнова Т.Д.* и соавт. Совершенствование биотехнологических методов восстановления кожного покрова // Мат-лы международного конгресса «Комбустиология на рубеже веков». М., 2000.

7. *Саидгалин Г.З., Салистый П.В.* и соавт. Аллофибробласты в лечении глубоких ожогов у детей. Мат-лы международного конгресса «Комбустиология на рубеже веков». М., 2000.

Авторы-составители: *Глинских Н.П., Бахарев А.А., Устьянцев И.В., Штукатуров А.К., Марковская О.В., Саидгалин Г.З., Салистый П.В., Гриценко Д.А.*

Методические рекомендации утверждены
начальником ГУЗ г. Екатеринбурга
А.И. Прудковым
23.09.2003 г.