

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ:

Первый заместитель Министра
Здравоохранения Республики Беларусь

_____ В. В. Колбанов

_____ 2005 г.

Регистрационный № 064-0604

СПОСОБ КОНСЕРВИРОВАНИЯ СТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
В СЛАБЫХ РАСТВОРАХ АЛЬДЕГИДОВ

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Гродненский государственный медицинский университет

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

В инструкции по применению освещены вопросы заготовки, консервирования, стерилизации и хранения биологических тканей в растворах альдегидов, способы деминерализации кости и последующей консервации и хранения костного матрикса.

Инструкция по применению рассчитана на травматологов, хирургов, нейрохирургов, стоматологов и оториноларингологов, занимающихся костной пластикой.

ЗАГОТОВКА ТКАНЕЙ

Заготовка кожи. Кожные лоскуты берут с туловища и конечностей (исключая кисти и стопы). Для этого с участков сбывают волосы, не повреждая эпидермиса, обрабатывают участки дезинфицирующими растворами (70% спирт; 2,4% муравьиной кислотой, 3% новосептом, 2% дегмицидом и др., исключая настойку йода), а затем дерматомом заготавливают расщепленные лоскуты. Кожно-жировые лоскуты срезают скальпелем или реберно-хрящевым ножом. Заготовленные лоскуты помещают в герметизированные и маркированные пакеты и доставляют в лабораторию. Образованные после изъятия кожи дефекты тканей закрывают влагонепроницаемой тканью (полиэтилен, клеенка) или нанесением пленкообразующих препаратов (диацетилцеллюлоза).

Забор бедренной кости осуществляется через одиночный разрез, идущий от передне-верхней ости подвздошной кости книзу по передней поверхности бедра до коленного сустава. В области тазобедренного сустава отделяют отводящие мышцы, илиопсоас, оставляя сухожилия этих мышц, мышцы бедра расслаивают поднадкостнично. На уровне коленного сустава обнажают последний, сохраняя места прикрепления связок, пересекают капсулу сустава коленного и тазобедренного суставов и высвобождают бедренную кость. При заборе фрагмента кости капсулу суставов не вскрывают, а пилой Джигли выпиливают необходимых размеров костный трансплантат, который очищают от мягких тканей, промывают под проточной водой, просушивают марлевыми салфетками или матерчатой тканью и погружают в банки с формалино-глутарово-альдегидным раствором для стерилизации и консервирования.

Забор большеберцовой и малоберцовой костей осуществляют через передний разрез, вскрывая фасцию. Отслаивают мышцы, рассекают межкостную мембрану и производят дезартикуляцию. При заборе фрагмента - пилой Джигли выпиливают нужных размеров костный фрагмент.

Малоберцовую кость или ее фрагмент можно извлечь через прямой или боковой

наружный разрез.

Забор плечевой кости осуществляют через передневнутренний доступ. Скелетируют мышцы плеча, пересекают их, сохраняя сухожильную часть, вычленяют плечо или производят забор его фрагмента.

Забор локтевой и лучевой костей осуществляют через разрез, идущий по внутренней поверхности предплечья. Кости выделяют поднадкостнично, оставляя места прикрепления сухожилий.

Взятие мелких костей кисти производят со стороны ладонной поверхности, а стоп - со стороны тыла.

Образовавшиеся дефекты трубчатых костей замещают протезами из деревянных или металлических конструкций.

Заготовка костей свода черепа и твердой мозговой оболочки. По линии, соединяющей ушные раковины, через свод черепа производят разрез кожи, не повреждая апоневроз. Отслаивают кожу в сторону надбровных дуг и затылка. Обработывают апоневроз антисептиком, прорезают его до кости по окружности, а затем выпиливают кость по окружности, не повреждая твердую мозговую оболочку. Костный лоскут промывают под проточной водой и физиологическим раствором хлорида натрия и помещают в эксикатор с консервирующим раствором. Затем ампутирующим ножом или ножницами иссекают твердую мозговую оболочку, промывают под проточной водой и помещают ее в консервирующую среду.

Взятие грудины, реберных хрящей, ребер осуществляют через срединный разрез кожи, отсепааровывают мышцы и производят иссечение тканей.

Губчатые трансплантаты получают из грудины, костей таза, тел позвонков, пяточных костей после скелетирования и обнажения соответствующих участков.

Широкую фасцию бедра иссекают через продольный разрез кожи по передне-наружной поверхности бедра, очищают от мышечной ткани, промывают под проточной водой из крана, физраствором, прошивают за края капроновыми лигатурами и фиксируют на пластмассовых или стеклянных пластинах и помещают в консервирующий раствор.

Сухожилия заготавливают через небольшие разрезы кожи и подлежащих тканей над их проекцией с минимальной травматизацией мягких тканей. Обнаженные сухожилия подтягивают и пересекают у места перехода их в мышечную ткань, а дистальный конец выделяют долотом вместе с костной пластинкой.

Заготовка аллогенных фетотрансплантатов осуществляется в паталогоанатомических отделениях. Донорами являются плоды весом от 100 до 3000 грамм, длиной от 16 до 50 см, в возрасте от 4 до 10 лунных месяцев. После внешнего осмотра и санитарной обработки трупа в первые 6-9 часов после смерти из полостей сердца производят забор крови для последующих лабораторных исследований. Через разрезы кожи осуществляют обнажение соответствующих тканей и производят их забор для последующей консервации.

Согласие родственников на заготовку фетотрансплантатов не требуется. Кроме того, изъятые во время декомпрессивной трепанации черепа костные фрагменты сохраняют в консервирующем растворе для последующей отсроченной или поздней ауто- или аллокраниопластики.

Заготовка ксенотрансплантатов осуществляется на мясокомбинатах от молодых, здоровых животных, которые отбираются вместе с ветеринарным врачом. После отбора вешают бирку, чтобы узнать животное во время забоя и на последующих этапах его разделки. После забоя и вскрытия сосудов шеи берут кровь для последующих лабораторных исследований. Туша животного изолируется от остального потока, перемещается на отдельный участок, где сотрудниками банка (лаборатории) изымается нужный материал для консервации. Забор брeфоксе-нотрансплантатов (плодов животных) производят после эвентрации внутренностей. Кровь плодов исследуется вместе с кровью матери животного. Освидетельствование животного и его туши осуществляется ветеринарным врачом. Исключается бруцеллез, антропоознозы, столбняк, туберкулез, ящ>р, сап, актиномикоз, сибирская язва, бешенство, трихиниоз и др. После карантина и получения результатов лабораторных исследований крови заготовленные трансплантаты допускаются к использованию.

ПОДГОТОВКА ТКАНЕЙ ДЛЯ КОНСЕРВАЦИИ

Обработка тканей

Доставленные в лабораторию заготовленные ткани подвергают сортировке и обработке.

Общеизвестно, что наличие жира, жирового и миелоидного костного мозга снижает пластические свойства костных трансплантатов и отрицательно влияет на исходы оперативных вмешательств. Поэтому из трубчатых костей вначале механическим путем, а затем промыванием прочной водой и обработкой 5-7% перекисью водорода добиваются удаления костного мозга из трубчатых костей.

Этого можно достичь и применением 5% раствора соды, смеси пергидроля и ацетона в соотношении 1:3, этилового спирта и др.

Заготовленные кожные лоскуты освобождают от жира, растягивают на стеклянных или пластмассовых пластинах, фиксируя их капроновыми лигатурами к последним.

Заготовленные сухожилия и связки сортируют по диаметру и длине, фиксируют их шелком или капроном на стеклянных, пластмассовых пластинах или трубках диаметром 5-7 мм, связывая концы лигатур

Твердая мозговая оболочка растягивается на пластинах или из нее вырезают необходимой ширины полосы, фиксируя последние капроном на стекле или пластмассе.

Деминерализация костной ткани.

Заготовленную костную ткань помещают в 2,4 N раствор соляной кислоты. Для приготовления деминерализующего раствора берут 450 г (378 мл) 38% раствора соляной кислоты на 1450 мл дистиллированной воды. Деминерализацию осуществляют при 2-4 градусах Цельсия в течение 8-12 часов.

Для ускорения процесса деминерализации вначале разработан и применяется двухэтапный процесс: изъятые костные фрагменты помещают в 4,8 N раствор соляной кислоты на 6 - 8 часов, а затем в 2,4 N этой же кислоты. После завершения деминерализации (проба на изгиб, прокол иглой) костный матрикс в течение двух часов промывают проточной водой. Затем остатки соляной кислоты нейтрализуют 5% тиосульфатом натрия. При прекращении помутнения тиосульфата (полное погашение соляной кислоты), костный матрикс промывают в физиологическом растворе хлорида натрия и помещают в стеклянные банки, заполненные жидкими средами для стерилизации и консервирования.

В связи с запросами клиник деминерализация кости может быть полной, поверхностной и сегментарной. Поверхностная деминерализация обеспечивает прочностные характеристики трансплантатов, а тотальная – их гибкость. Получение таких трансплантатов обеспечивается избирательным погружением части или всего в деминерализующий раствор или использованием различных его концентраций. Защищая желатином и парафином определенные части трансплантата

можно деминерализовать среднюю его часть, концы, кортикальный или внутренний слой, т.е. получить костную ткань с заданными качествами. После деминерализации удаляют желатин и парафин, помещая пластический материал в.

Гомогенные формы деминерализованного костного матрикса получают на специальном измельчителе типа "мясорубки", пропуская через вращающе-режущее устройство фрагменты деминерализованной кости размером 3-4x1 см, получая таким образом однородную массу наподобие "костных опилок". В таком виде измельченный матрикс помещают в консервирующую смесь.

Из костной деминерализованной пудры возможно приготовить пасты, суспензии, остеомаатрикс форте.

Маркировка тканей

Доставленные с морга в лабораторию ткани должны быть промаркированы, Для этого на контейнерах или стеклянных банках наклеиваются ярлыки, которые должны содержать следующие сведения:

- наименование и адрес учреждения;
- наименование ткани;
- дата заготовки;
- кто заготавливал (должность, Ф.И.О.);
- идентификационный номер ткани;
- рекомендуемые условия хранения;

- разновидность и наличие консерванта;

- произведена ли стерилизация (результаты бактериологических исследований);
- количество и размеры трансплантатов; срок годности, На выбракованных тканях должны быть указаны причины выбраковки.

Приготовление консервирующих сред

Приготовление консервирующих сред осуществляли по методу, предложенному С.И. Болтрукевичем с соавт. (А.С. №1012856, 1984 и а.с.№ 1497784, 1989). Для этого из концентрированного раствора формалина (38% раствор формальдегида) и 25% или 50% глутарового альдегида на изотоническом растворе хлорида натрия готовили 0,4% раствор формалина и 0,1% раствор глутарового альдегида. Полученные растворы смешивали в соотношении 1:1 (а.с. №1012856), а с 1989 года на 1 литр консервирующей смеси добавляли биологически активные вещества: 30 мг/литр никотиновой кислоты, 450 мг/л пантотената кальция и 10 мл/л димексида (а.с.№ 1497784). рН среды растворов доводили до 7,0-7,4 добавлением на каждый литр консерванта 10-30 мл фосфатного буфера. Нейтрализация формалина до приготовления консервирующего

раствора осуществлялась в течение 3-х суток меловой пудрой из расчета 100 г мела на 1 литр формалина.

Методика консервирования.

Заготовленную эту донорскую костную ткань сортируют по форме и длине. Отбирают отдельные костные фрагменты для деминерализации. Сухожилия освобождают от окружающих тканей, сохраняя перитенон, группируют по длине и поперечным размерам. Сухожилия, фасции и твердую мозговую оболочку промывают физиологическим раствором хлорида натрия, просушивают марлевыми салфетками, полотенцами или простыней.

Приготовленный костный материал помещают в стеклянные банки или эксикатор и заливают консервирующим раствором, чтобы он полностью покрыл трансплантаты из расчета одна часть материала на 6-8 частей консерванта. Консервацию костной ткани осуществляют в смеси растворов 0,4% формалина и 0,1% глутарового альдегида. Консервирование сухожилий, хрящевой ткани, твердой мозговой оболочки производится в смеси растворов 0,2% формалина и 0,05% глутарового альдегида с добавлением в консервант глицерина в соотношении 1:4, что способствует сохранению эластичности этих тканей. Плотные закрытые банки помещают в бытовой холодильник с температурным режимом +2 - +4 градуса Цельсия. В течение первого месяца консервант меняют один раз в неделю, а в дальнейшем один раз в 1-2 месяца.

С 20-го дня и до 12 месяцев пластический материал используют для пластических операций в клинике.

По утвержденной МЗ РБ форме в журнале регистрации забора трупных тканей отражают возраст, результаты исследования трупа и его крови. В журнале регистрации выдачи тканей указывают дату забора, способ и срок консервации, результаты бактериологического исследования и в журнале учета результатов применения трансплантатов отражают ранние и поздние осложнения.

Бактериологический контроль

Бактериологический контроль за стерилизацией трансплантатов осуществляется со вторых суток с момента погружения тканей в формалино-глутарово-альдегидные растворы. Для этого кусочки биологических объектов до 0,3-0,5 см помещают в пробирки с 5% мясопептонным агаром, а смывы

стерильным ватным тампоном с поверхности тканей сеют в чашки Петри на поверхность мясопептонного агара, мясопептонного кровяного агара, среду Сабуро и Эндо. Инкубируют в течение 24-48 часов при температуре 37° С, после чего производят подсчет колоний. В течение первой недели консервации бактериологический контроль осуществляют ежедневно, а в дальнейшем один раз в месяц и перед трансплантацией. Бактериологический контроль осуществляется за всем консервируемым материалом. Полученные результаты заносили в журнал бактериологического контроля.

Контроль стабилизации консервирующих сред

Контроль стабильности консервирующих растворов осуществляли спектрофотометрическим способом определения уровня содержания никотиновой кислоты по А.Г. Халмурадову (1979) Ввиду того, что в течение первой недели происходит насыщение биологических объектов в процессе консервирования консервантом контроль стабилизации консервирующих сред в течение первой недели осуществляется ежедневно, а затем один раз в месяц. Полученные данные заносятся в журнал контроля стабилизации растворов консерванта.

Транспортировка тканей

Транспортировка тканей в лечебные учреждения осуществляется в банках с консервантом, помещенных в контейнеры со льдом, исключая возможность инфицирования трансплантатов при транспортировке.

При транспортировке тканей ярлыки должны содержать следующие сведения:

- наименование, адрес, телефон учреждения, направляющего ткань;
- адрес, куда направляется ткань;
- наименование ткани;
- условия хранения;
- рекомендации по обращению с тканями.

Ошибки и осложнения при заготовке, консервации и хранении пластического материала

Ошибки возможны при:

1. Несоблюдении положений законов Республики Беларусь и приказов МЗ РБ, регламентирующих юридическую деятельность тканевых банков (лабораторий) по забору материала у донора, что может привести к нарушению прав родственников или волеизъявления самого донора.

2. Несоблюдении показаний к забору донорских тканей.

3. Несоблюдении карантинных сроков пластического материала до получения результатов серологических исследований крови на ВИЧ-инфекцию, сифилис, гепатит.

4. Нарушения соблюдения режимов забора, консервации, сроков хранения, деминерализации, транспортировки и правил трансплантации.

5. Несоблюдении строгого бактериологического контроля за консервантом и трансплантатами.