МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л.Пиневич
«__» _____ 2015 г.
Регистрационный № 104-1015

МЕТОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОЛНОСЛОЙНЫХ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии»

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор А.В. Белецкий, д.м.н., доцент О.Л. Эйсмонт, к.б.н. Я.И. Исайкина, Д.В. Букач.

Минск, 2015

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич
29.12.2015
Регистрационный № 104-1015

МЕТОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОЛНОСЛОЙНЫХ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А. В. Белецкий, д-р мед. наук, доц. О. Л. Эйсмонт, канд. биол. наук Я. И. Исайкина, Д. В. Букач

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкции) изложен метод восстановления полнослойных дефектов суставного хряща при III–IV ст. поражения суставного хряща (по классификации Outerbridge) с помощью трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (далее — МСК). Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний тазобедренных, коленных, голеностопных, плечевых суставов, сопровождающихся наличием полнослойных хрящевых дефектов

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Иглы для костномозговой пункции G14-G17.
2. Шприцы 20–60 мл.
3. Пробирки гепаринизированные на 10 мл.
4. Раствор гиалуроната натрия 1 %.
5. Общехирургический / ортопедический инструментарий.
6. Растворы для обработки операционного поля, стерильное белье.
7. Проточной цитофлуориметр.
8. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD105, CD90, CD73, CD45, CD14, CD34.
9. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты для культуральных работ по получению биомедицинского клеточного продукта МСК.
10. CO_2-инкубатор для роста культуры МСК.
11. Центрифуга.
12. Микроскоп инвертированный.
13. Культуральные флаконы на 175 $см^2$ для роста МСК.
14. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
15. Камера Горяева.
16. Среда Дюльбекко в модификации Искова (далее — IMDM).
17. Эмбриональная телячья сыворотка (далее — ЭТС).
18. Раствор трипанового синего 0,2%.
19. Гистопак-1077.
20. Трипсин-ЕДТА 0,25 %.
21. Раствор NaCl 0,9 %.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Травматические поражения суставного хряща (S83.3).
2. Застарелые и дегенеративные поражения суставного хряща (M24, M94).
3. Рассекающий остеохондрит (M93.2).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Более 2-х дефектов хряща или множественные (в т. ч. «целующиеся») дефекты.
2. Системные иммунные заболевания или инфекции сустава, включая остеоартрит.

3. Нестабильность сустава.

4. Осевые деформации сустава более 10°.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Получение биомедицинского клеточного продукта «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ BY 600395123.001-2014», регистрационный номер БК-7.4-1508 или аналогичного по характеристикам биомедицинского клеточного продукта:

1.1 эксфузия костного мозга в объеме 20–100 мл у пациента посредством костномозговой пункции крыла подвздошной кости под региональной анестезией за 20–30 сут до трансплантации МСК в дефект хряща;

1.2 транспортировка костного мозга пациента в специализированную лабораторию клеточной биотехнологии (срок доставки — не более 3-х ч после пункции костного мозга);

1.3 изготовление биомедицинского клеточного продукта:

1.3.1 выделение фракции мононуклеарных клеток из костного мозга в градиенте плотности раствора Гистопак-1077, путем наслоения костного мозга на Гистопак-1077 (соотношение 3:1) и последующего центрифугирования при 200g в течение 30 мин;

1.3.2 отмывка, выделенных мононуклеарных клеток в среде IMDM с последующим центрифугированием при 400g в течение 10 мин;

1.3.3 культивирование мононуклеарных клеток в полной среде IMDM с добавлением 10 % ЭТС в концентрации $3x10^6$/мл во флаконах для культивирования при 37 ^oC и 5 % CO_2 во влажной атмосфере;

1.3.4 при достижении прикрепленными клетками 80–90 % покрытия поверхности флакона выделение популяции МСК путем обработки клеток 0,25 % трипсин-ЕДТА в течение 5 мин с последующим переносом в среду IMDM с добавлением 10 % ЭТС;

1.3.5 подсчет выделенных МСК в камере Горяева и пересев клеток в количестве $1x10^6$ в новые культуральные флаконы 175 $см^2$ (I-й пассаж);

1.3.6 культивирование МСК с проведением 2–3 пассажей (пересевов) при получении 80–90 % конфлюэнтного слоя клеток в среде IMDM с добавлением 10 % ЭТС при 37 ^oC и 5 % CO_2 во влажной атмосфере до достижения суммарного количества МСК не менее $2x10^6$ с проведением контроля отсутствия бактериальной контаминации для клеток каждого пассажа;

1.3.7 двукратная отмывка МСК в 0,9 % NaCl с последующим центрифугированием при 400g в течение 5 мин и удалением надосадочной жидкости;

1.3.8 добавление к клеточному осадку 0,9 % NaCl для получения 1 мл суспензии;

1.3.9 идентификация полученных в культуре МСК на подлинность методом проточной цитофлуориметрии путем определения поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD45, CD14, CD34;

1.3.10 анализ количества МСК и их жизнеспособности путем подсчета в камере Горяева с использованием 0,2 % раствора трипанового синего;

1.3.11 исследование полученного клеточного продукта МСК на стерильность. Для трансплантации пациенту применяются только МСК с отрицательными показателями по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

Мероприятия 1.3.1–1.3.11 этапа 1 осуществляются согласно общепринятым методикам.

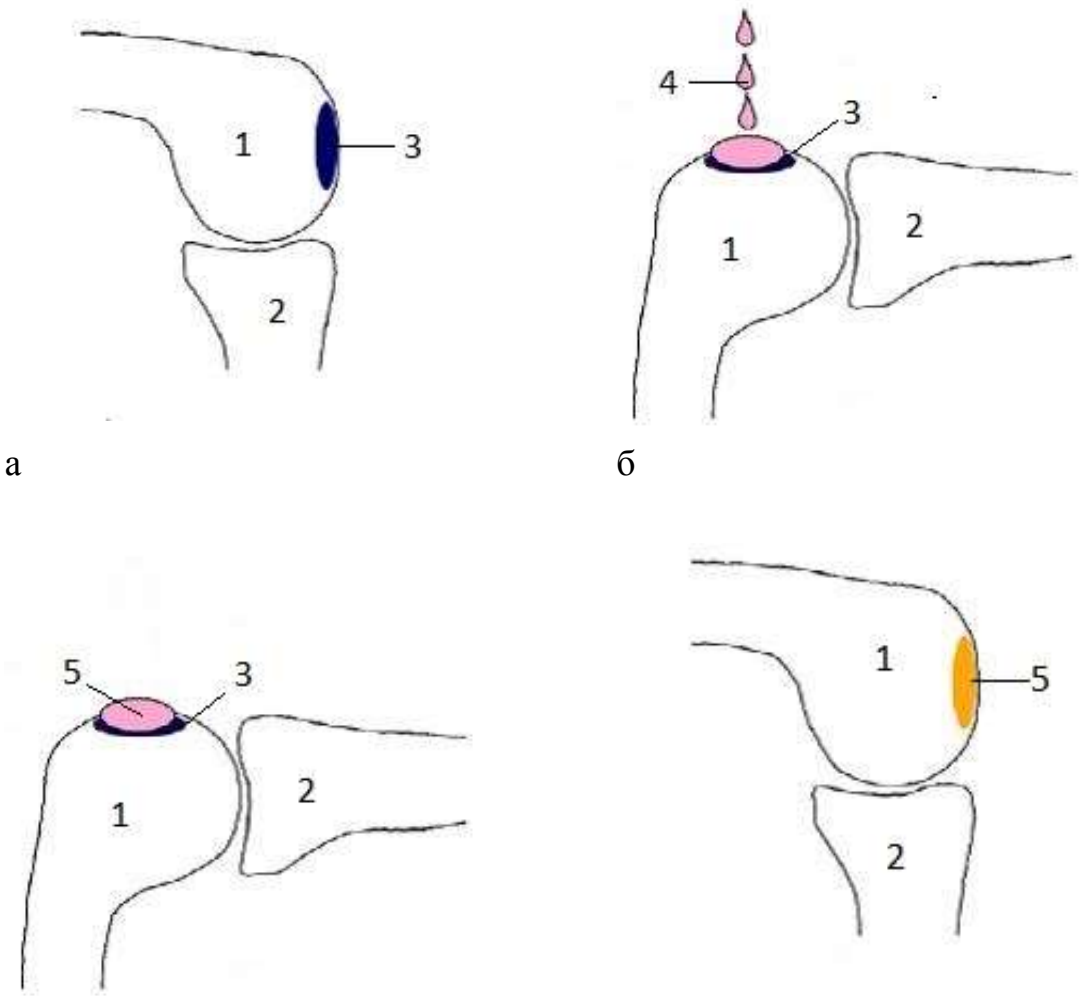
Для дальнейшего применения используется биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ BY 600395123.001-2014» или аналогичный биомедицинский клеточный продукт, полученный согласно данной инструкции и отвечающий следующим органолептическим, цитологическим параметрам и показателям микробиологической чистоты:

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Однородная суспензия беловатого цвета без посторонних включений
Количество клеток, клеток/мл, не менее	2×10^6
Количество жизнеспособных клеток, %, не менее	90
Подлинность клеток (иммунофенотип клеток)	CD 90, CD 105, CD73 > 90 % CD 34, CD 45, CD14 < 2 %
Стерильность	Стерильно

Этап 2. Проведение аутотрансплантации биомедицинского клеточного продукта «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ BY 600395123.001-2014» или аналогичного биомедицинского клеточного продукта в хрящевой дефект сустава:

2.1 для трансплантации пациенту используют только свежеприготовленный биомедицинский клеточный продукт МСК в 0,9 % NaCl, который перед введением смешивают с раствором гиалуроната натрия в соотношении 1:1. Срок приготовления биомедицинского клеточного продукта составляет 2–3 ч до введения;

2.2 операцию по трансплантации (на примере коленного сустава) проводят под общей или региональной анестезией в положении больного на спине. Доступ осуществляют следующим образом: в проекции хрящевого дефекта кожу, подкожную клетчатку и капсулу сустава рассекают минимально допустимым прямым продольным разрезом, достаточным для визуализации всего хрящевого дефекта, края раны раздвигают ранорасширителями. Дно и края дефекта освежают распатором до слабокровоточащей поверхности (рисунок а). Конечность располагают так, что бы хрящевой дефект располагался строго горизонтально. В дефект вводят трансплантат МСК (рисунок б) и экспонируют в таком положении не менее 10 мин (рисунок в), после чего конечности придают свободное положение (рисунок г). Накладывают швы на рану.



1 — мыщелок бедренной кости; 2 — мыщелок большеберцовой кости;
3 — дефект хряща коленного сустава; 4 — введение трансплантата МСК;
5 — трансплантат МСК

Рисунок — Схема трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дефект хряща коленного сустава

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При четком соблюдении заданий этапов ошибки и осложнения отсутствуют.

Несоблюдение условий выполнения этапов может привести к потере клеток в биомедицинском клеточном продукте, к потере их жизнеспособности.