

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневич  
«*Пиневич*» 2015г.

*20*  
Регистрационный № 144-1214

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ БИОТРАНСПЛАНТАТОМ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

**АВТОРЫ:**

д.м.н., профессор С.А. Алексеев, д.м.н., профессор М.П. Потапнев,  
к.м.н. доцент В.С. Деркачев, к.м.н. доцент С.М. Космачева,  
Н.Н. Данилкович

Менск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
20.01.2015  
Регистрационный № 144-1214

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ БИОТРАНСПЛАНТАТОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.А. Алексеев, д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнев, канд. мед. наук, доц. В.С. Деркачев, канд. мед. наук, доц. С.М. Космачева, Н.Н. Данилкович

Минск 2014

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

$\alpha$ -МЕМ — культуральная среда

ЖСП — жизнеспособность

КМ — костный мозг

КОЕ-Ф — колониеобразующие единицы фибробластов

МНК — моноклеарные клетки

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

ОХРПК — отделение хранения и распределения продуктов крови

ПКМ — пунктат костного мозга

ППС — полная питательная среда

РФТ — растворимые факторы тромбоцитов

ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор

ЯСК — ядродержащие клетки

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод биотрансплантации на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, растворимых факторов тромбоцитов, фибринового клея и материала-носителя (скаффолда) для замещения костных дефектов.

Инструкция предназначена для врачей-травматологов-ортопедов, врачей-хирургов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с последствиями повреждений костно-суставного аппарата в стационарных условиях.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Инструменты и расходные материалы для забора костного мозга:

- внутрикостные иглы;
- стерильные пробирки;
- раствор гепарина 5000 ед./мл.

2) Инструменты и расходные материалы для подготовки составляющих биотрансплантата:

- ламинарный шкаф с потоком воздуха II класса защиты;
- центрифуга (1500–3000 об./мин);
- холодильник;
- морозильник;
- проточный цитофлюориметр;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37°C);
- микроскоп инвертированный;
- микроскоп световой бинокулярный;
- счетчик клеточных элементов;
- камера Горяева;
- флаконы для культуры клеток T175 и T75;
- серологические пипетки разного объема, однократного применения;
- пробирки центрифужные на 50 и 15 мл, однократного применения;
- чашки Петри (диаметром 100 мм);
- микропробирки «эппендорф»;
- пробирки стерильные полипропиленовые на 5 мл;
- криопробирки;
- пипеточные дозаторы;
- стерильные наконечники для дозаторов (100–1000 и 20–200 мкл);
- системы фильтрации 0,45 и 0,2 мкм, однократного применения.

3. Необходимые реагенты:

- среда для культур клеток  $\alpha$ -MEM с рибонуклеозидами и глутамаксом;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния;
- трипсин-ЭДТА 0,25% раствор;
- сыворотка АВ(IV), инактивированная при +56°C в течение 30 мин;
- $\beta$ -глицерофосфат (10 мМ/мл);
- L-аскорбиновая кислота (50 мкг/мл);
- дексаметазон (0,1  $\mu$ М/мл);
- гистопак (1077 г/л);

- раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий;
- бензилпеницилина натриевая соль;
- стрептомицина сульфат;
- 0,4% раствор трипанового синего с 0,1% азиды натрия;
- 3% уксусная кислота;
- 1% раствор оксалата аммония;
- диметилсульфоксид (ДМСО);
- моноклональные антитела к CD90, CD105, CD45, CD34 человека.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

- переломы костей различных локализаций в стадии замедленной консолидации, сопровождающиеся недостатком костной ткани;
- посттравматический остеомиелит длинных трубчатых костей в стадии ремиссии с краевым дефектом;
- дефекты костей в результате многооскольчатых переломов, замедленной консолидации, ложных суставов и др.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

- возраст до 18 и старше 60 лет;
- серопозитивная реакция по анти-ВГС, HBsAg и ВИЧ (основание — инструкция «О порядке предоперационной заготовки аутологичной крови и ее компонентов», утвержденная приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 03.09.2012 № 981).

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### **Приготовление культуральной среды и реагентов**

*Культуральная среда* (полная питательная среда, ППС):

- α-МЕМ с рибонуклеозидами и глутамаксом;
- 100 Ед/мл бензилпеницилина натриевой соли;
- 100 мг/мл стрептомицина сульфата;
- 10% АВ (IV)-сыворотки.

#### **Приготовление остеогенной среды**

- ППС;
- 10 мМ/мл β-глицерофосфата;
- 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты;
- 0,1 мМ/мл дексаметазона.

#### **Получение АВ (IV) сыворотки**

Сыворотку получают после свертывания свежей крови, заготовленной в соответствии с «Инструкцией о порядке осуществления организациями переливания крови заготовки, переработки, хранения, реализации крови и ее компонентов на территории Республики Беларусь», утвержденной постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2011 № 38.

После образования сгустка емкость с кровью помещают в центрифугу и отжимают сгусток в режиме 2000 об./мин при 4°C в течение 20 мин. Пипеткой отбирают сыворотку крови в пропиленовые пробирки и центрифугируют в режиме 3000 об./мин 20 мин. После этого проводят визуальный контроль сыворотки на

наличие гемолиза и хилеза: образцы с данными признаками выбраковывают. Для получения объединенной пробы (пула) все образцы сыворотки переносят в общую емкость и центрифугируют в режиме 3000 об./мин в течение 20 мин при +4°C. Сначала сыворотку фильтруют через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм для освобождения сыворотки от всех микроорганизмов. Проводят контроль стерильности. Перед использованием АВ (IV) сыворотку инактивируют при 56°C 30 мин.

Сыворотка АВ (IV) является добавкой к питательной среде для культивируемых *in vitro* культур клеток как источник ростовых факторов, белков, липидов, солей, витаминов, микроэлементов, аминокислот и других компонентов. Продукт стерилен и протестирован на отсутствие маркеров инфекционных заболеваний (вирусы гепатита В и С, иммунодефицита человека).

### **Получение аутологичной сыворотки**

В пробирку без антикоагулянта забирают 20–25 мл крови пациента. Сыворотку получают после свертывания крови: пробирки с образовавшимся сгустком центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об./мин и отбирают сыворотку в чистую пробирку. Затем следует повторить центрифугирование в указанном выше режиме для удаления форменных элементов. Полученную сыворотку фильтруют через фильтры с размером пор 0,45 и 0,2 мкм, маркируют с указанием ФИО пациента и хранят до применения при -20°C. Перед применением сыворотку размораживают. В случае выпадения криопресипитатов рекомендовано повторно фильтровать сыворотку через фильтры с размером пор 0,2 мкм.

### **Технология создания остеогенного биотрансплантата на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток**

#### **1. Получение клеточного компонента биотрансплантата**

##### **1.1. Забор костного мозга**

Общепринятыми методами осуществить забор костного мозга из крыла подвздошной кости пациента объемом 30–40 мл в стерильные пробирки с гепарином из расчета 50 единиц гепарина на 1 мл костного мозга.

##### **1.2. Выделение и наращивание МСК**

Провести подсчет ядродержащих клеток в пунктате костного мозга.

ПКМ развести фосфатно-буферным раствором Дульбекко в соотношении 1:1 и аккуратно перемешать.

Разведенный ПКМ наслоить на градиент плотности фиколл-пак ( $\rho = 1077$  г/л) в соотношении 1 часть градиента: 2 части ПКМ. Пробирки центрифугировать в течение 30 мин при 400g (1500 об./мин) при комнатной температуре.

Стерильной пипеткой отобрать фракцию моноклеарных клеток и перенести ее в чистую пробирку; аккуратно ресуспендировать в 10 мл фосфатного буферного раствора с 1% сыворотки АВ (IV) и центрифугировать в течение 10 мин при 400g (1500 об./мин) для отмывки от остатков градиента. Процесс отмывки повторить 2 раза.

Полученный осадок МНК фракции ресуспендировать в 10 мл полной питательной среды.

Произвести подсчет клеток при помощи гемоцитометра.

Для определения числа колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф тест) отобрать суспензию клеток, содержащую  $1,0 \times 10^6$  и  $0,5 \times 10^6$  клеток,

ресуспендировать их в 10 мл полной питательной среды, высеять в чашки (диаметром 100 мм) и культивировать в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 9–14 дней без смены среды до стадии образования развитых колоний.

Провести учет колоний. Для этого из чашек удалить среду, промыть адгезионную поверхность 15 мл ФСБ и внести 15 мл этанола на 15 мин. Удалить этанол, подсушить чашки на воздухе при комнатной температуре и под инвертированным микроскопом подсчитать колонии. Учету подлежат колонии, содержащие не менее 50 клеток. Для каждой чашки рассчитать количество колоний на 100 тыс. МНК, внесенных для культивирования. По результатам подсчета колоний в обеих чашках вычислить среднюю величину — значение КОЕ-Ф теста. Его используют для анализа качества ПКМ, оценки пролиферативной активности МСК, эффективности наращивания культуры.

Оставшиеся МНК рассеять во флаконы Т175 в посевной концентрации 0,3–0,6×10<sup>6</sup>/см<sup>2</sup> в 30 мл ППС для получения культуры МСК.

Клетки инкубировать при +37°C в инкубаторе CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Из флаконов отобрать супернанант, отмыть ростовую поверхность ФСБ для удаления неприкрепившихся клеток.

Внести 30 мл свежей ППС, добавить 1–2,5% растворимых факторов тромбоцитов, полученных методом активации тромбином, и продолжить культивирование со сменой среды каждые 3 дня. При достижении клетками 80–90% конфлюентности клетки снять с пластика 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (4 мл на флакон Т175) в течение 5–7 мин при +37°C после предварительной промывки клеточной культуры ФСБ. Инактивировать действие трипсина добавлением 2 мл АВ (IV) сыворотки и 6 мл ФСБ.

Клетки ресуспендировать, отмыть ФСБ центрифугированием при 400g в течение 10 мин, пересеять в новые флаконы Т175 в количестве 2,5–3 тыс. клеток/см<sup>2</sup> в ППС с добавлением 1–2,5% РФТ для наращивания достаточного количества клеток.

Культивировать МСК в течение 2–3 пассажей для получения необходимой клеточной массы.

После каждого посева клеток проводится бактериологический контроль стерильности клеток и сред. Клетки 2–3-го пассажей при достижении ими 80–90% конфлюентности переводятся на остеогенную среду. Среду готовить непосредственно перед употреблением.

Культуральные флаконы поместить в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37°C на 3 сут для индукции МСК в остеогенном направлении.

По истечении времени остеогенной индукции клетки во флаконах отмыть от питательной среды физиологическим раствором 0,9% для инъекций, снять 0,25% раствором трипсин-ЭДТА. Клетки дважды отмыть физиологическим раствором с 1% аутологичной сывороткой в режиме центрифугирования при 400 g в течение 10 мин. Ресуспендировать МСК в физиологическом растворе с 5% аутологичной сывороткой из расчета 3–8×10<sup>6</sup> МСК на 1 см<sup>3</sup> костного дефекта.

### 1.3. Контроль качества полученного клеточного материала

Показатели	Предъявляемые требования
Содержание клеток	Не менее 40×10 <sup>6</sup> МСК
Жизнеспособность клеток	Не менее 95%

Иммунофенотип CD90, CD105, CD45, CD34	CD 90 <sup>+</sup> >95%, CD 105 <sup>+</sup> >95%, CD 34 <sup>+</sup> <5%, CD 45 <sup>+</sup> <5%.
Стерильности	Стерильно
Срок хранения	Не более 4 ч

Часть клеток заморозить при -196°C (в жидком азоте) и хранить в качестве контрольного образца в течение 1 года.

Возможно использование готового клеточного продукта с содержанием не менее  $40 \times 10^6$  мезенхимальных стволовых клеток.

## ***2. Получение растворимых факторов тромбоцитов***

Концентрат тромбоцитов получают из обогащенной тромбоцитами плазмы донора, заготовленной из дозы консервированной крови в контейнерах полимерных строенных для заготовки крови дозой в 50 или 200 мл. Содержимое контейнера тщательно перемешать и отобрать образец концентрата тромбоцитов для подсчета клеток.

Подсчет тромбоцитов: в центрифужную пробирку внести 4 мл 1% оксалата аммония и 20 мкл концентрата тромбоцитов, оставить при комнатной температуре на 20 мин, затем заполнить камеру Горяева. При помощи светового микроскопа визуально подсчитать в 25 малых квадратах сетки камеры Горяева тромбоциты. Рассчитать число клеток в 1 мкл взвеси концентрата. Концентрацию тромбоцитов можно подсчитать с помощью автоматического гемоцитометра. Затем рассчитать общее количество клеток, содержащееся в дозе тромбоцитов (50 или 200 мл).

Концентрат тромбоцитов разлить в центрифужные пробирки объемом 50 мл и осадить клетки при режиме центрифугирования 3500g в течение 20 мин.

### ***2.1. Получение РФТ методом шоковой заморозки***

Использовать концентрат тромбоцитов, полученный из дозы донорской крови группы АВ (IV) или совместимой по группе АВО пациента. Осадок тромбоцитов ресуспендируют в 40 мл ФСБ для отмывки тромбоцитов от остаточных количеств плазмы крови. Изготавливают суспензию тромбоцитов на изотоническом растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий до конечной концентрации клеток  $5 \times 10^{10}$ /мл. Суспензию с клетками подвергают замораживанию при -80°C. При очистке супернатанта РФТ необходимо поместить пробирки в термостат при +37°C для полного размораживания. Провести центрифугирование в режиме 3500g 3–4 раза, а затем однократно при 12000g в течение 20 мин. для полной очистки супернатанта от стромы тромбоцитов. Полученный раствор РФТ профильтровать через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм. Супернатант РФТ расфасовать в объеме 5 и 10 мл в пробирки, асептически их укупорить, наклеить этикетки и хранить при -80°C до применения. РФТ, полученные данным способом, используются в качестве компонента биотрансплантата.

Контроль стерильности приготовленных реагентов проводится согласно требованиям, описанным в технологии получения аутологичных МСК. За 2 ч до использования РФТ разморозить при температуре от +4 до +10°C до полного исчезновения кристаллов льда.

### ***2.2. Получение РФТ методом активации тромбином***

Концентрат тромбоцитов, полученный из дозы донорской крови, после осаждения в «жестком» режиме центрифугирования ресуспендировать в

изотоническом растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий до конечной концентрации клеток  $5 \times 10^{10}$ /мл. Затем добавить раствор тромбина из расчета 1 ед./мл и инкубировать 20 мин при комнатной температуре. Отжать сформированный сгусток и дважды очистить супернатант РФТ от форменных элементов в режиме центрифугирования 3500 g в течение 20 мин. Для получения пула пробирки с раствором РФТ, полученными от 8–10 обследованных доноров методом активации тромбином, перенести в ламинарный шкаф. Все пробы объединить в общей емкости, перемешать и центрифугировать дважды в режиме 3500g в течение 20 мин для удаления клеточных элементов. Супернатант отобрать в стерильные бутылки для предварительной очистки (фильтрации). Конечный раствор РФТ профильтровать через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм. Раствор РФТ расфасовать в объеме 4,5 мл в пробирки, асептически закупорить, снабдить этикетками с датой изготовления, номером серии; хранить при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до применения.

РФТ, полученные данным методом, используются как добавка к ППС при культивировании МСК с низкой пролиферативной активностью или при необходимости сокращения сроков культивирования.

Контроль стерильности РФТ: растворы РФТ объемом 10 мл передаются в бактериологическую лабораторию.

### ***3. Фибриновый клей***

Фибриновый клей изготавливается на основе фибриногена и тромбина в соответствии с инструкцией производителя. Оказывает местное гемостатическое действие, наступающее в течение минуты после нанесения, обеспечивает формирование и организацию фибринового сгустка (геля), который плотно фиксируется на раневой поверхности.

Фибриновый клей используется в составе биотрансплантата для его фиксации в месте нанесения, создания внешней защитной оболочки, формирования костной ткани и ремоделирования окружающих тканей благодаря наличию в нем биологических активных веществ.

### ***4. Остеопластические материалы (скаффолды)***

В составе биотрансплантата используют доступные остеопластические материалы, такие как:

- искусственный и натуральный гидроксиапатит (ГА);
- $\beta$ -трикальциевые фосфаты и коллаген;
- другие материалы, обладающие свойствами остеокондукции, остеоиндукции и биодеградации.

### ***5. Введение биотрансплантата***

Введение биотрансплантата проводят в условиях операционной, соблюдая следующую последовательность:

- 1) приготовить разведения фибриногена и тромбина согласно инструкции производителя;
- 2) отобрать в шприц из пробирки ростовые факторы тромбоцитов (до 3 мл) и обильно обработать раневое ложе дефекта кости половиной объема раствора — до 1,5 мл;
- 3) аккуратно отобрать в шприц суспензию, содержащую не менее  $40 \times 10^6$  мезенхимальных стволовых клеток;

- 4) внести половину от объема клеточной суспензии непосредственно в область костного дефекта;
- 5) заполнить дефект остеопластическим материалом (скаффолдом);
- 6) нанести вторично из шприца по всей поверхности материала оставшийся раствор РФТ;
- 7) медленно распределить в месте дефекта оставшуюся половину клеточной суспензии из шприца;
- 8) зафиксировать биотрансплантат фибриновым клеем;
- 9) рану послойно ушить общепринятыми методами.

**6. Определение эффективности применения биотрансплантата**

Критерием эффективности применяемого биотрансплантата является положительная клиничко-рентгенологическая картина. Периодичность контрольных осмотров — через 1 мес., затем каждые 3 мес. после трансплантации.

**ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Этапы трансплантации	Осложнения и ошибки при выполнении	Пути устранения
Подбор пациентов для трансплантации	Терапия пациентов с противопоказаниями, перечисленными в п. 2	Соблюдение правил подбора пациентов, установленных настоящей инструкцией
Забор крови/костного мозга	Нарушение правил забора	Соблюдать установленные инструкции
	Нестерильные пробирки для забора крови/костного мозга. Использование неподходящего антикоагулянта	В качестве антикоагулянта допускается использование только гепарина
	Нарушение сроков хранения биоматериала	Срок хранения костного мозга не более 5 ч
Подготовка мезенхимальных стволовых клеток и контроль их качества	Контаминация микроорганизмами	Соблюдения правил асептической работы с культурами клеток
	Низкая пролиферативная активность клеток	Контроль качества питательной среды, добавление в питательную среду растворимых факторов тромбоцитов