

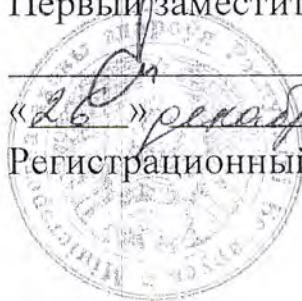
УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«26» декабря 2019 г.

Регистрационный № 173-1219



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ КОЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ
АУТОЛОГИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И КЕРАТИНОЦИТОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Подгайский В.Н., канд. мед. наук, доц. Часнойть А.Ч., д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси Волотовский И.Д., канд. биол. наук Квачева З.Б., Василевич И.Б., Серебряков А.Е., Путик В.В., Басалай В.М.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения ожогов кожи, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с пограничными мозаичными ожогами кожных покровов 2 степени с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе аутологичных кератиноцитов и фибробластов кожи в смеси с коллагеновым гелем 7%.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-комбустиологов-хирургов, врачей-хирургов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ожогами кожи в стационарных условиях.

1. Показания к применению

Термические и химические ожоги головы и шеи 2 степени (МКБ 10: T20.2, T20.6), термические и химические ожоги туловища 2 степени (МКБ 10: T21.2, T21.6), термические и химические ожоги области плечевого пояса и верхней конечности, исключая запястье и кисть 2 степени (МКБ 10: T22.2, T22.6), термические и химические ожоги запястья и кисти 2 степени (МКБ 10: T23.2, T23.6), термические и химические ожоги области тазобедренного сустава и нижней конечности, исключая голеностопный сустав и стопу 2 степени (МКБ 10: T24.2, T24.6), термические и химические ожоги области голеностопного сустава и стопы 2 степени (МКБ 10: T25.2, T25.6).

2. Противопоказания к применению

Беременность во все сроки, лактация, острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации, иные противопоказания, соответствующие таковым для использования БМКП, медицинских изделий, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов, реагентов и т.д.

3.1 медицинские изделия, необходимые для получения кожного лоскута;

3.2 БМКП, приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.011-2019 или другой БМКП аутологичных фибробластов и кератиноцитов, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;
- количество клеток: не менее 5×10^4 на 1 см^2 раневой поверхности;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика фибробластов: экспрессия виментина не менее 95% и фибронектина не менее 25%, иммунофенотипическая характеристика кератиноцитов: экспрессия цитокератина 19 не менее 50% и нестина не менее 25%);
- стерильность: стерильно;

3.3 медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т.д., необходимые для получения биоматериала, БМКП аутологичных фибробластов и кератиноцитов и смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%:

- питательная среда ДМЕМ;
- питательная среда ДМЕМ/F12;
- эпидермальный фактор роста (ЭФР);
- форсколин;
- инсулин;
- трансферрин;
- селенид;
- 0,1% раствор коллагеназы;

- 0,2 % раствор диспазы;
- гентамицина сульфат;
- моноклональные антитела к антигенам человека: виментин, фибронектин, цитокератин 19, нестин;
- трипсин-ЭДТА (0,25% раствор);
- бензилпенициллина натриевая соль;
- стрептомицина сульфат;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);
- раствор натрия хлорида 0,9 % для инфузий;
- 0,4% раствор трипанового синего;
- среда тиогликолиевая и среда Сабуро;
- флаконы для культур клеток T25 и T75;
- наконечники стерильные объемом 1–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;
- пробирки центрифужные стерильные объемом 15 мл и 50 мл;
- пробирки стерильные полипропиленовые объемом 1–2 мл;
- чашки Петри;
- средства индивидуальной защиты;
- гемоцитометр с сеткой Горяева;
- покрытие раневое (с нановолокнами хитозана или др.);
- раствор лидокаина гидрохлорида 2%;
- коллагеновый гель 7%.

4 Технология использования метода

4.1 Получение БМКП

4.1.1 Получение биоматериала

Получение биоматериала – кожного лоскута площадью не менее 2 см², необходимого для приготовления БМКП, выполняется общепринятыми методами под местной анестезией раствором лидокаина гидрохлорида 2%

в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Иссечённый биоматериал помещается в стерильный флакон с транспортной средой. Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от +2 °С до +12 °С не более 24-х часов.

4.1.2 Приготовление БМКП

Полученный кожный лоскут инкубируют в 0,2% растворе диспазы при +4°С на протяжении 12 часов, затем с помощью пинцета отделяют эпидермис от дермы. Дерму измельчают до небольших фрагментов (0,2–0,3 см²), которые помещают в стерильные пластиковые чашки Петри, куда вносится питательная среда DMEM. Чашки Петри инкубируют в термостате с 5% содержанием CO₂ при 37°С на протяжении 14–21 дней до образования монослоя фибробластов.

Для выделения кератиноцитов эпидермис обрабатывают 0,1% раствором коллагеназы 1-го типа на протяжении 10 минут, фильтруют через фильтр с диаметром пор 100 мкм, затем осаждают клетки центрифугированием. Осадок клеток ресуспендируют в питательной среде DMEM/F12 с добавками: ЭФР 10 нг/мл, инсулин 5 мкг/мл, трансферрин 5 мкг/мл, селенид 6,7 мкг/мл, форскалин 50 мкг/мл, 50 мкг/мл гентамицина сульфата, и помещают в культуральные флаконы, которые инкубируют в термостате с 5% содержанием CO₂ при 37°С на протяжении 14–21 дней до образования монослоя кератиноцитов.

На стадии сформированного монослоя клетки переводят во взвесь в 0,9% растворе натрия хлорида для инфузий. Подсчитывают количество фибробластов и кератиноцитов и доводят до концентрации клеток $1,0 \times 10^6$ /мл в 0,9% растворе хлорида натрия. Количественное соотношение фибробластов к кератиноцитам должно составлять 4:1.

Терапевтическая доза клеток зависит от площади раны и рассчитывается исходя из того, что на 1 см² раневого повреждения

применяется 50 тысяч клеток.

БМКП хранится при температуре от +5°C до +10°C в течение не более 12 ч и при температуре от +10°C до +33°C не более 4 ч с момента приготовления.

4.1.3 Контроль качества БМКП

Для контроля подлинности клеток осуществляют оценку их фенотипического состава с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами. Учет проводят на проточном цитофлуориметре. Фибробласты дермы считают прошедшими контроль качества при экспрессии виментина не менее, чем у 95% клеток и фибронектина не менее, чем у 25% клеток. Кератиноциты считают прошедшими контроль качества при экспрессии цитокератина 19 не менее, чем у 50% клеток, а нестина не менее, чем у 20% клеток.

Для определения жизнеспособности БМКП используют тест на исключение жизнеспособными клетками красителя трипанового синего. Жизнеспособность должна составлять более 85%.

Контроль стерильности БМКП осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь либо иным методом. Должна отсутствовать контаминация бактериями и дрожжеподобными грибами в компонентах БМКП.

4.2 Смешивание БМКП с коллагеновым гелем 7% и нанесение на покрытие раневое

Приготавливают 2% разведение коллагенового геля путем смешивания коллагенового геля 7% с 0,9% раствором хлорида натрия для инфузий в соотношении 1:3,5. Полученное 2% разведение коллагенового геля смешивают с БМКП в соотношении 1:1.

Полученный БМКП в смеси с разведением коллагенового геля, слегка взбалтывается и послойно наносится на покрытие раневое.

4.3 Подготовка ожоговой раны к нанесению БМКП в смеси с разведением коллагенового геля

Подготовка ожоговой раны производится в соответствии с «Клиническим протоколом диагностики, лечения и медицинской реабилитации пациентов с термическими поражениями и их последствиями», утвержденным приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 07.08.2009 № 781.

Для ускорения подготовки ран, удаления налета фибрина, участков некротических тканей может применяться ультразвуковая кавитация ран с последующим (либо без него) наложением вакуумной повязки для снижения микробной контаминации и ускорения подготовки раны к применению БМКП.

Клиническими критериями готовности ожоговой раны к нанесению БМКП в смеси с разведением коллагенового геля являются признаки завершения фазы воспаления: отсутствие некротических тканей, налета фибрина, уменьшение общего микробного числа до значения менее 10^3 КОЕ/мл, появление признаков краевой эпителизации.

4.4 Нанесение БМКП в смеси с разведением коллагенового геля на покрытие раневом на ожоговую рану

В асептических условиях выполняется нанесение на ожоговую рану БМКП в смеси с разведением коллагенового геля на покрытие раневом (с нановолокнами хитозана или др.). После нанесения БМКП накладывается асептическая атравматичная повязка на 3–5 суток.

5. Перечень возможных осложнений при выполнении и пути их устранения

Во время и после получения кожного эксплантата возможно развитие осложнений – таких, как кровотечение, нагноение и некроз края раны. Соблюдение правил асептики и антисептики, минимальная травматичность хирургической техники и тщательный гемостаз во время получения кожного эксплантата позволяют исключить развитие указанных осложнений.

Точное соблюдение всех пунктов, изложенных в инструкции, позволяет исключить осложнения и побочные эффекты, связанные с использованием метода.