

ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»
Отдел термических поражений

**Возможности применения обогащенной
тромбоцитами плазмы и клеточной суспензии
стромально-васкулярной фракции
при лечении ожоговых поражений**

Пособие для врачей



Санкт-Петербург
2024

Авторы:

Зиновьев Е.В., Костяков Д.В., Алексеев А.А., Мануковский В.А.,
Демко А.Е., Филимонов К.А., Дерий Э.К.

Рецензенты:

д.м.н. профессор Крылов К.М.;
д.м.н. доцент Шаповалов С.Г.

Редактор:

д.м.н. профессор Парфенов В.Е.

Возможности применения обогащенной тромбоцитами плазмы и клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции при лечении ожоговых поражений: пособие для врачей / Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. – СПб.: СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе, 2024. – 40 с.

Пособие подготовлено сотрудниками отделов термических поражений ГБУ «Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А. В. Вишневского» МЗ РФ. В пособии представлены основные теоретические аспекты применения клеточных продуктов в комбустиологии, сформулированы показания к их трансплантации, а также описаны последовательные алгоритмы выполнения данных манипуляций

Пособие предназначено для комбустиологов, травматологов, хирургов, анестезиологов-реаниматологов, организаторов здравоохранения, в задачи которых входит оказание медицинской помощи пострадавшим с термическими поражениями, а также для обучающихся (клинических ординаторов, слушателей циклов дополнительного профессионального образования и др.).

*Утверждено в качестве учебного пособия проблемной комиссией № 1
ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе протокол № 8 от 27.08.2024*

ISBN 978–5–907834–16–3

© Авторы, 2024
© Санкт-Петербургский НИИ скорой
помощи им. И.И. Джанелидзе, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Строение кожного покрова	6
1.1. Эпидермис	7
1.2. Дерма	8
1.3. Гиподерма (подкожно-жировая клетчатка)	9
2. Классификация ожоговых поражений по глубине	9
3. Клеточные продукты	12
3.1. Обогащенная тромбоцитами плазма	13
3.2. Стромально-васкулярная фракция	13
4. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP терапия).	14
5. Применение клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции	16
6. Результаты аутодермопластики в комбинации с применением аутологичной стромально-васкулярной клеточной фракции при лечении глубоких ожогов	21
6.1. Результаты инъекционного введения аутологичной стромально-васкулярной клеточной фракции при кожной пластике	21
6.2. Результаты аппликационного применения аутологичной стромально-васкулярной клеточной фракции при кожной пластике	27
7. Заключение	32
Список литературы	33
Приложение А	35
Приложение Б	37

ВВЕДЕНИЕ

История развития человеческого общества неразрывно связана с огнем. Огонь помогал защищать людей от диких животных, согреть в холодные времена года, а также изготавливать оружие и инструменты. Закономерно, что взаимодействие с термическими агентами приводило к высокой частоте травм, нередко заканчивающихся летальным исходом. Данное обстоятельство послужило одним из триггеров развития медицины и комбустиологии, перед которой стояла задача поиска новых способов лечения раневых дефектов при ожоговых поражениях.

Согласно высказыванию Allgower (1956): «Едва ли найдется что-нибудь в поле, лесу, на лугу, кухне и в аптеке, что не было бы испытано для лечения ожогов». Как известно из древних источников, врачи пытались оказывать помощь пострадавшим с термическими травмами путем аппликации масла и вина (папирус Эберста 3000 до н. э.), повязок из смолы и измельченных рубцов (Гиппократ, III в до н. э.), кипящего масла или раскаленного железа (А. Паре, 1510–1590) и т. д. На Руси предлагали наносить на ожоги мази из скипидара, розового масла, а также яичных желтков. Уже в то время врачи понимали, что правильный выбор местного лечения ожоговой раны определяет физиологическое состояние всего организма и исход лечения, но были ограничены соответствующим уровнем знаний.

Неуклонный прогресс науки и техники увлекал за собой в том числе и медицину. В распоряжении специалистов начали появляться новые лекарственные препараты, ранозаживляющие средства, а также различные раневые покрытия. В ногу со временем развивалась и хирургия. В 1869 году J. Reverden выполнил первую пересадку аутодермотрансплантата, ознаменовавшую начало становления отдельного её направления – кожной пластики. Заложены основы регенеративной медицины, которая представляет собой комплекс методик, направленных на восстановление дефектов мягких тканей путем трансплантации различных культур клеток. Ключевой точкой развития клеточных технологий стало исследование Rheiwald J.G и Green H., позволившее в 1975 году разработать методику культивирования кератиноцитов, пригодных для трансплантации. Вслед за данной работой последовали сообщения об успешном использовании данной культуры при лечении пострадавших с ожогами кожи (Bell S.C., 1983). К концу XX века насчитывалось уже более 500 исследований, демонстрирующих эффективность применения кератиноцитов. Значительный вклад в развитие регенеративной медицины внесли и отечественные ученые. В 1990 году в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А. В. Вишневского» МЗ РФ Алек-

сеевым А.А. с соавторами под руководством Саркисова Д.С. был разработан оригинальный метод лечения пострадавших с обширными ожогами путем трансплантации фибробластов. Первый случай успешного применения стволовых клеток у обожженных в 2004 году также был представлен российским ученым Расуловым М.В. Параллельно с методиками применения живых клеток активно совершенствовались и разрабатывались различные типы их носителей. Полимерные матрицы на основе биорезорбируемых материалов обеспечивают оптимальные условия для существования в них клеток и стимулируют репаративные процессы в ране. При этом послойная культивация в них кератиноцитов, фибробластов и стволовых клеток позволяет изготавливать структурные аналоги естественного кожного покрова.

В основе технологии биопринтинга заложены все передовые достижения регенеративной медицины. В настоящее время разработаны методики изготовления нервов, кровеносных сосудов, хрящей, а также комплексов тканей. В 2006 году была опубликована работа коллектива авторов во главе с Atala J.A. по первой успешной трансплантации пациенту мочевого пузыря, изготовленного технологией 3D-биопринта. Развитие данного направления открывает широкие возможности не только для комбустиологии, но и всей системы здравоохранения в целом.

Несмотря на обширный опыт применения клеточных культур в медицине, который был накоплен за последние десятилетия, регенеративная медицина продолжает активно развиваться. В настоящее время не до конца выяснена роль трансплантируемых клеток в раневом процессе, т. е. они непосредственно участвуют в регенерации или осуществляют паракринную стимуляцию. Остаются открытыми многие вопросы, связанные со стволовыми клетками и их возможностями дифференцировки, а также нормативно-правовой регуляцией.

В Российской Федерации все аспекты, связанные с производством, регистрацией, применением, транспортировкой, утилизацией и т. д. лекарственных средств, содержащих живые клетки человека, регламентируются Федеральным законом от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» с правками, внесенными Федеральным законом от 04.08.2023 № 466-ФЗ «О внесении изменений в статью 4 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» и Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах». Согласно данному нормативно-правовому акту под биомедицинским клеточным продуктом понимают (БМКП) комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ, либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения, и (или) фармацевтическими субстанциями, включенными в государственный реестр лекарственных средств, и (или) медицинскими изделиями. К аутологичным,

аллогенным или смешанным БМКП не относятся объекты трансплантации, а также высокотехнологические лекарственные средства (ВТЛС), включая генно-терапевтические лекарственные средства, подлежащие регистрации в соответствии с правом Евразийского экономического союза и (или) государственной регистрации в соответствии с Федеральным законом от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Согласно актам Евразийского экономического союза, ВТЛС включают в себя генотерапевтические лекарственные препараты, лекарственные препараты на основе соматических клеток, препараты тканевой инженерии. Таким образом, имеются два возможных пути определения и регистрации продуктов, содержащих клетки. При этом в каждом случае применяются различные регламентирующие документы, что вносит очевидную неопределенность.

Новое постановление Правительства Российской Федерации предусматривает новые ограничения для клинических учреждений, имеющих клеточные лаборатории. В них БМКП должны использоваться только в рамках изделия произведённого для отдельного пациента и каждый клинический случай их применения должен быть обоснован и зарегистрирован в единой информационной системе. Правила обращения с такими продуктами утверждены Постановлением Правительства Российской Федерации № 384 от 28 марта 2024 года «Об утверждении Правил обращения биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения биомедицинского клеточного продукта, специально произведенного для отдельного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется данный биомедицинский клеточный продукт».

В настоящее время биотехнологии являются одним из наиболее перспективных направлений, с точки зрения оказания медицинской помощи пациентам не только с хирургической, но и терапевтической патологией. В представленном пособии приведены сведения о доступных для практикующего специалиста методов биотехнологического восстановления кожного покрова, используемых для лечения пациентов с ожогами кожи.

1. СТРОЕНИЕ КОЖНОГО ПОКРОВА

Кожа является самым большим органом в теле человека, общая площадь которого составляет около 1,5–2 м². Она выполняет не только защитную, но и экскреторную, терморегуляционную, а также бактерицидную функции. Наличие значительного объема нервных окончаний позволяет реализовать сигнальную функцию путем реакции на боль, температуру или давление. Кожный покров участвует в процессах газообмена, метаболизма и состоит

из трех основных слоев: эпидермис, дерма и гиподерма (подкожно-жировая клетчатка). Они отличаются друг от друга по своим функциям, строению и происхождению (рис. 1).

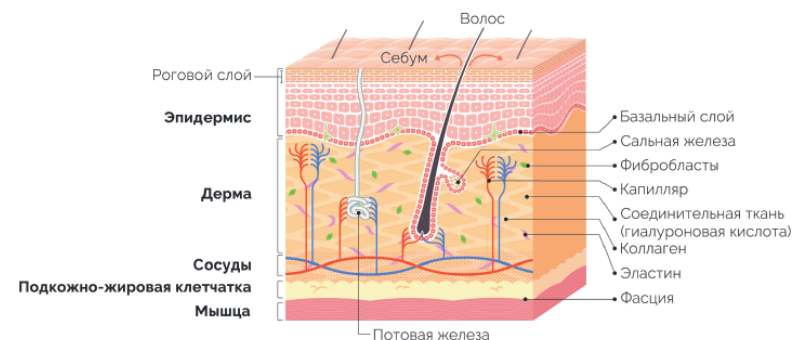


Рис. 1. Общая структура кожного покрова

1.1. Эпидермис

Эпидермис – эпителиальный слой кожного покрова эктодермального происхождения, толщина которого варьируется от 0,03 до 1,5 мм. Он представляет собой барьер, защищающий организм от облигатной и факультативной микрофлоры, а также обезвоживания. Эпителиальные клетки характеризуются высокой скоростью деления. Полный цикл обновления происходит за 26–28 суток. В состав эпидермиса входит 5 слоев: базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой. В области ладоней и стоп эпидермис значительно толще относительно других анатомических областей и содержит дополнительный блестящий слой (рис. 2).

ЭПИДЕРМИС

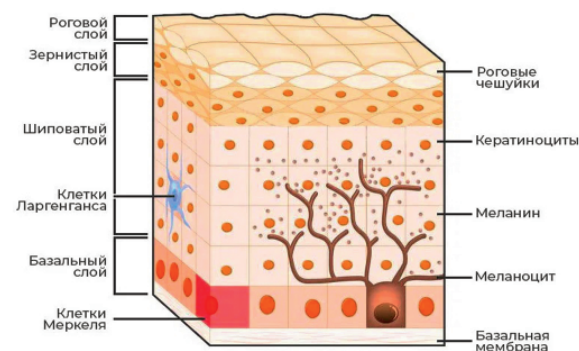


Рис. 2. Структура эпидермального слоя кожного покрова

1.2. Дерма

Глубже эпидермиса располагается дерма, состоящая из сосочкового и ретикулярного слоев (рис. 3). Данная область заполнена соединительной тканью – коллагеном I, III, IV, V, VI, VII типа и эластичными волокнами, объединенными гликопротеинами, молекулами воды и гликозамингликанами. Это обуславливает упругость, эластичность дермального слоя кожного покрова, позволяя ему восстанавливать свою форму при деформации. Несмотря на плотную структуру, в дерме располагаются нервно-сосудистая сеть, лимфатические микрососуды, а также придатки кожи: волосы, потовые и сальные железы. Последние отсутствуют только на поверхности ладоней, стоп и выделяют за сутки до 20 г секрета, обладающего фунгицидным эффектом. Потовые железы располагаются на всей площади кожного покрова. За счет выделительной функции осуществляется экскреция от 700 до 1300 мл пота, обеспечивая детоксикацию организма и удаление излишков воды. Дермальный слой разделен на две части: папиллярную (сосочковую) и ретикулярную (сетчатую).

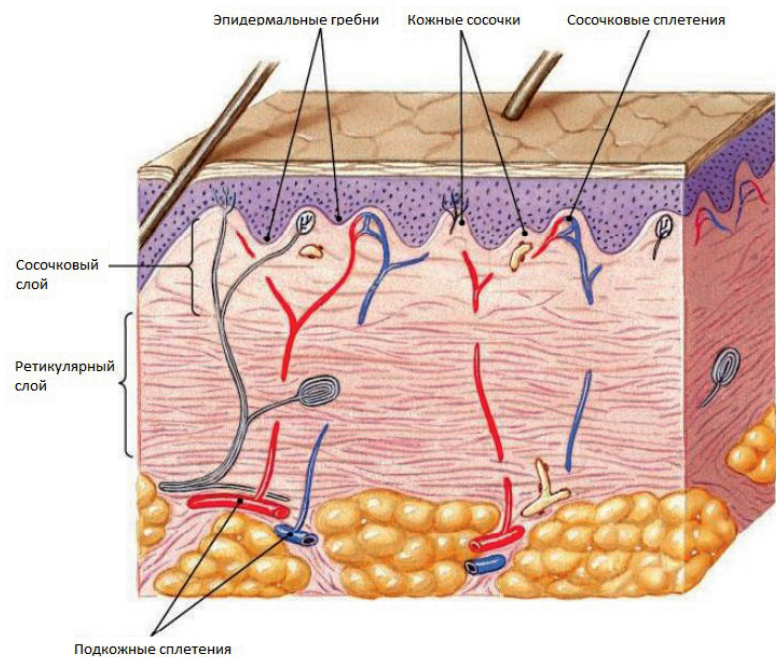


Рис. 3. Структура дермального слоя кожного покрова

1.3. Гиподерма (подкожно-жировая клетчатка)

Гиподерма, или подкожно-жировая клетчатка локализуется под дермальным слоем кожного покрова (рис. 4).



Подкожная жировая клетчатка

Рис. 4. Подкожно-жировая клетчатка

Она обеспечивает механическую защиту подлежащих тканей и органов, регулирует теплообмен. Данный слой кожного покрова также выступает в роли «депо» метаболитов. Толщина гиподермы на различных участках тела неодинакова и зависит от пола, типа телосложения организма. Основным массив тканей подкожно-жировой клетчатки представлен адипоцитами, разделенными перпендикулярными соединительнотканными перегородками. В гиподерме располагаются основания волосных фолликулов, потовых желез, а также крупные сосуды и нервы.

2. КЛАССИФИКАЦИЯ ОЖОГОВЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПО ГЛУБИНЕ

Ожоговые поражения являются полиэтиологичной травмой. Они могут возникать в результате воздействия пламя, горячих жидкостей, электричества, химических веществ, радиационного излучения. Повреждение кожных покровов также возникает вследствие прямого контакта с высокотемпературным агентом (контактные ожоги).

Для выбора тактики ведения ожоговой раны и возможности применения клеточных технологий необходимо точно определить глубину поражения. В настоящее время в лечебных учреждениях применяется классификация термических поражений по МКБ-10 (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение классификаций ожогов кожи по глубине поражения

МКБ 10	Глубина поражения
I степень	поверхностные
II степень	пограничные
III степень	глубокие

Поверхностные поражения I степени характеризуются повреждением только эпидермального слоя кожного покрова с выраженным экссудативным воспалением (рис. 5). Они могут возникать при воздействии солнечного или других видов ультрафиолетового излучения. Чаще всего проявляются гиперемией (ожоговой эритемой), которая полностью регрессирует в течение трех суток с незначительным местным шелушением. При более глубоком повреждении возможно образование тонкостенных пузырей, заполненных прозрачной жидкостью близкой по составу к плазме. Формирующиеся раны заживают самостоятельно в течение десяти суток за счет сохранившегося пула эпителиальных клеток в базальной мембране и придатках кожи (волосяные фолликулы, сальные и потовые железы). В ряде случаев развивается нарушение пигментации.

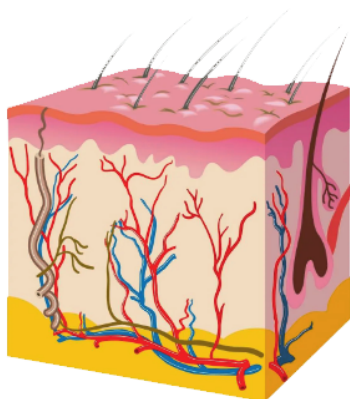


Рис. 5. Структура поражений кожи при ожогах I степени (по МКБ-10)

Ожоги II степени являются пограничными или дермальными поражениями. При этом повреждается эпидермис и дерма до сетчатого слоя с сохранением волосяных фолликулов, сальных и потовых желез, за счет которых происходит эпителизация раны (рис. 6). Воспалительный процесс затрагивает всю дерму, а также подкожно-жировую клетчатку, снижая интенсивность микроциркуляции в области травмы. Ожоги II степени эпителизируются самостоятельно в течение 18–20 суток. В большинстве случаев отмечается

нарушение пигментации. При осложненном течении раневого процесса или отсутствии адекватного местного лечения могут формироваться рубцы. Последние наиболее характерны для «мозаичных поражений», которые представляют собой чередование точечных повреждений II и III степени.

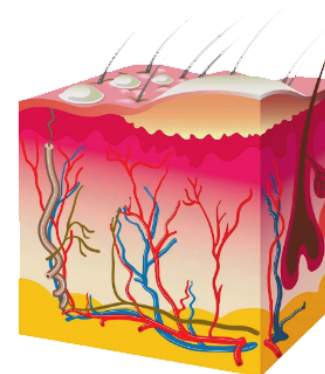


Рис. 6. Структура поражений кожи при ожогах II степени (по МКБ-10)

При глубоких ожогах III степени происходит поражение кожного покрова на всю толщину (рис. 7).

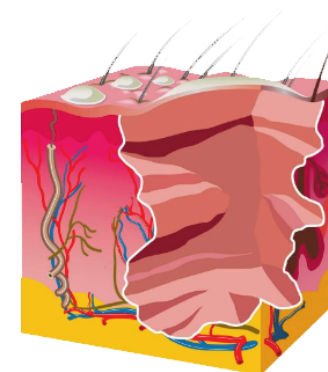


Рис. 7. Структура поражений кожи при ожогах III степени (по МКБ-10)

Часто отмечается некроз глубже лежащих тканей: подкожно-жировой клетчатки, мышц, фасции, кости и т. д. Самостоятельное восстановление таких дефектов возможно только при незначительной их площади – до 0,5% п. т. Основным способом лечения глубоких ожогов является кожная пластика. После заживления всегда отмечается нарушение пигментации, формируются послеожоговые рубцы, в том числе патологические и рубцовые деформации.

3. КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

БМКП представляет собой комплекс, состоящий из клеточной линии и вспомогательных веществ/лекарственных препаратов.

По своему происхождению они могут быть аутологичными, аллогенными или комбинированными.

В первом случае источником клеточной линии является пациент, во втором – донор. При комбинированном типе клетки изготавливаются из материала, полученного от нескольких людей.

Вспомогательные вещества неорганического или органического происхождения, используемые при разработке и производстве БМКП, имеют важное значение. Их основной задачей является обеспечение жизнеспособности клеток и стимуляция репарации за счет деградации на структурные элементы. Клеточная культура может применяться в нескольких формах: на коллагеновом носителе и в виде геля. Каждый вид изделия обладает как положительными, так и отрицательными сторонами (рис. 8).

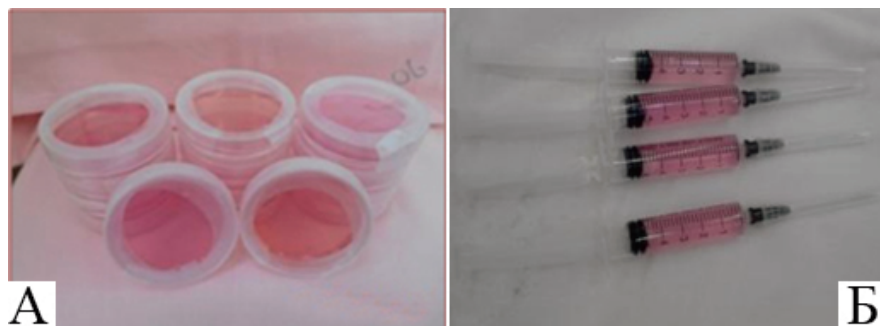


Рисунок 8 – БМКП на основе аллогенных фибробластов.

А – на коллагеновом носителе (ФГБУН «ИНЦ РАН»);

Б – в виде геля (ООО «Покровский БСК»)

В случае коллагенового носителя биологический материал формируется в чашки Петри и изолируется от внешней среды. Разгерметизация упаковки в процессе транспортировки недопустима, так как приводит к нарушению стерильности клеточной культуры. Также извлечение БМКП требует от специалиста определенных навыков. Это обусловлено тем, что коллагеновый носитель обладает низкой механической устойчивостью и повреждается при незначительном воздействии.

У БМКП в виде геля отсутствует большинство указанных недостатков. Транспортировка биологического материала осуществляется в стерильных емкостях (шприце), надежно изолированных от внешней среды. Нане-

сение клеточного продукта на раневую поверхность также не представляет сложностей. Гель легко распределяется на ожоговой ране и моделируется в соответствии с её рельефом. Основным недостатком данной формы изготовления БМКП является невозможность адекватной его аппликации на наклонные поверхности, например, боковая поверхность бедра или плеча, что обусловлено дислокацией геля под силой собственной тяжести.

Как указывалось ранее, в основе любого БМКП лежит клеточная линия. Она представляет собой стандартизованную аутологичную или аллогенную популяцию клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученную путем изъятия из организма человека биологического материала. С целью восстановления целостности кожного покрова особый интерес представляют культуры кератиноцитов, фибробластов, а также стволовых клеток. Отдельно необходимо отметить возможность применения обогащенной тромбоцитами плазмы и клеточной суспензии стромально-вазкулярной фракции.

3.1. Обогащенная тромбоцитами плазма

Плазму крови с целью стимуляции регенерации дефектов кожных покровов начали активно использовать ещё с середины XX века. Современное развитие медицины позволило усовершенствовать данную технологию и повысить её эффективность. Одной из основных вариаций её применения является изготовление обогащенной тромбоцитами плазмы. Последняя представляет собой концентрат биологических активных веществ, содержащий, например, тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста бета, фактор роста фибробластов, инсулиноподобные факторы роста, факторы роста эндотелия сосудов, эпидермальный фактор роста, интерлейкин 8, фактор роста кератиноцитов, эндостатин и др.

Обогащенная тромбоцитами плазма изготавливается из цельной венозной крови пациента путем её однократного центрифугирования. Методика не требует от персонала специфических навыков и наличия специализированного оборудования. Полученный концентрат может вводиться в область дефекта кожного покрова как инъекционно, так и путем аппликации на раневую поверхность.

3.2. Стромально-вазкулярная фракция

Стромально-вазкулярная фракция (СВФ) представляет собой гетерогенный конгломерат клеток, выделенный из жировой ткани. В её состав входят: эндотелиоциты, фибробласты, эритроциты, перциты, моноциты/макрофаги, мезенхимальные стволовые клетки и др. Терапевтический механизм действия СВФ основан на многоуровневом паракринном взаимодействии с реципиентной зоной. При этом отмечается выраженная стимуляция регенерации, ангио- и нейрогенеза, иммуномодуляция и ингибирование апоптоза.

СВФ изготавливается из жировой ткани пациента путем её липоаспирации, механической деструкции и двукратного центрифугирования. Данная технология является чрезвычайно простой. СВФ может применяться инъекционно (в толщу грануляционной ткани) и аппликационно как изолированно, так и в комбинации с обогащенной тромбоцитами плазмой.

4. ПРИМЕНЕНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ (PRP ТЕРАПИЯ)

Плазма крови является высокоэффективным стимулятором репаративной регенерации, которая используется в комбустиологии на протяжении последних нескольких десятков лет. В настоящее время внедряется современная вариация данной методики, которая предусматривает применение обогащённой тромбоцитами фракции плазмы, содержащей большую концентрацию биологически активных веществ. Показания к применению данной линии клеток представлены на рисунке 14.



Рис. 14. Перечень показаний к стимуляции репаративной регенерации ожоговых ран с использованием плазмы крови пациента

Методика получения плазмы крови (Приложение А) не требует от специалистов специальных навыков и оборудования за исключением лабораторной центрифуги. Биологически активный материал может применяться несколькими способами: инъекционно, в толщу грануляционной ткани с помощью инсулинового шприца (расстоянием между вколами иглы до 2 см) и аппликационно на раневую поверхность, в т. ч. под аутодермотрансплантаты.

Методика стимуляции репаративной регенерации ожоговых ран с помощью данной технологии представлена следующими этапами:

1) в условиях операционной или перевязочного кабинета хирургического отделения после снятия повязок выполняют обработку раневой поверхности антисептиками с последующим обильным её промыванием физиологическим раствором NaCl 0,9% или фурацилином 0,02%;

2) после смены стерильных перчаток осуществляют забор венозной крови в шприц 10 мл, содержащем антикоагулянт (цитрат натрия) 0,1 мл. Возможно изготовление обогащенной тромбоцитами плазмы без ингибиторов коагуляции, однако в таком варианте значительно возрастает риск её преждевременного свертывания (рис. 15);



Рис. 15. Целая венозная кровь пациентов

3) емкость с биологическим материалом центрифугируют при 2 600 оборотов в течение 10 минут (рис. 16);

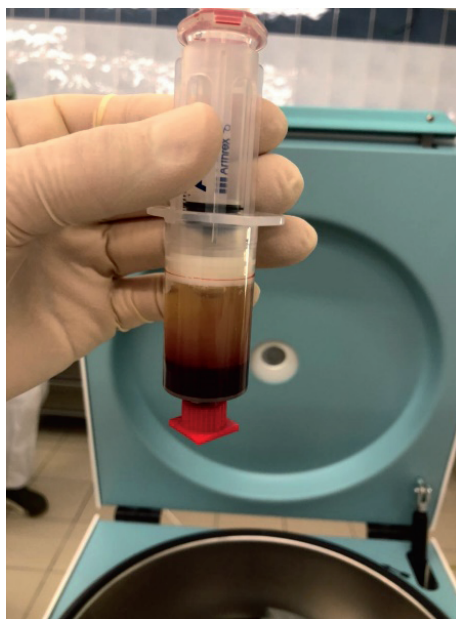


Рис. 16. Сепарация цельной венозной крови пациента после её центрифугирования

4) после разделения фракций плазму крови переносят в другой шприц, а форменные элементы в осадке утилизируют;

5) плазму крови инъецируют в грануляционную ткань или наносят на раневую поверхность аппликационно;

6) дальнейшее ведение ран осуществляется по общепринятым методикам, утвержденным в лечебном учреждении.

5. ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ

Стромально-васкулярная фракция в настоящее время является одним из наиболее перспективных клеточных продуктов, которые возможно применять в качестве биологического стимулятора репаративной регенерации ожоговых ран. Данный метод не требует специальных навыков и оборудования, а значит, может быть внедрен в клиническую практику лечебных учреждений различного ранга. В качестве клеточного продукта выступает стромально-васкулярная фракция, содержащая широкий перечень клеточных линий, таких как фибробласты, эндотелиоциты, перициты, мезен-

химальные стволовые клетки и др. Данная методика может применяться изолированно, а также в сочетании с обогащённой тромбоцитами плазмой, образуя высокоэффективный продукт. Показания к её применению приведены на рисунке 17.



Рис. 17. Перечень показаний к стимуляции репаративной регенерации ожоговых ран с использованием клеток стромально-васкулярной фракции

Методика изготовления (Приложение Б) и применения клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции представлена следующими этапами:

1) подготовка раствора для инфильтрации: в емкость с физиологическим раствором NaCl 0,9% объемом 500 мл добавляется 0,5 мл 1% эpineфрина (из расчета 0,1 мл на 100 мл);

2) липоаспирация не менее двух зон до заполнения адипогенной тканью пары шприцов емкостью по 20 мл каждый (рис. 18);

3) первичное центрифугирование в течение четырех минут при 2 500 оборотов в минуту (рис. 19);

4) удаление верхней (фрагменты разрушенных клеток) и нижней фракций (раствор для инфильтрации), образовавшихся в шприцах после центрифугирования. Средняя сохраняется, так как она представлена жизнеспособными адипоцитами (рис. 20);



Рис. 18. Липоаспирация

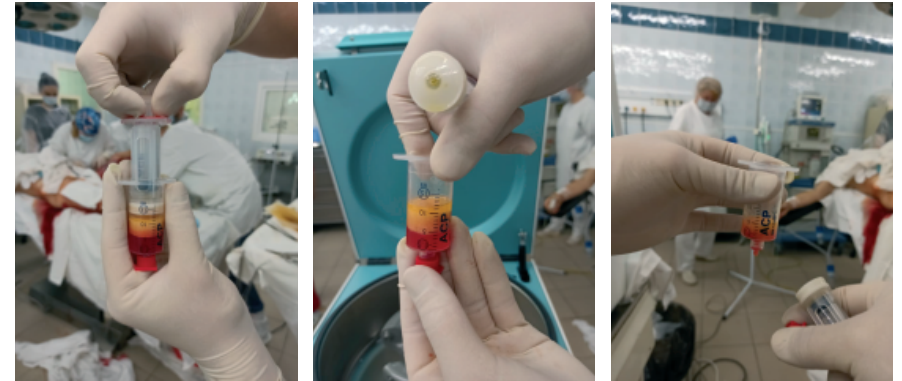


Рис. 20. Выделение средней фракции (адипоциты)

5) механическая деструкция жировой ткани (средняя фракция) путем её деструкции через коннектор или эмульсификатор до образования гомогенной суспензии (рис. 21);



Рис. 21. Механическая деструкция жировой ткани



Рис. 19. Первичное центрифугирование липоаспирата

6) объединение содержимого обоих шприцов в один с его повторным центрифугированием в течение 2 минут при 3 000 оборотов в минуту (рис. 22);



Рис. 22. Суспензия жировой ткани

7) извлечение нижней фракции, представленной клетками стромально-васкулярной фракции в отдельный шприц. Остатки разрушенных адипоцитов утилизируются (рис. 23);



Рис. 23. Стромально-васкулярная фракция и обогащенная тромбоцитами плазма

8) аппликация на раневую поверхность или инъекция в грануляционную ткань изготовленного клеточного продукта изолированно или после объединения его с плазмой крови пациента, полученную по методике, описанной в главе 6.

6. РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ В КОМБИНАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНОЙ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ФРАКЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЛУБОКИХ ОЖОГОВ

6.1. Результаты инъекционного введения аутологичной стромально-васкулярной клеточной фракции при кожной пластике

С целью повышения эффективности хирургического лечения пострадавших с ожогами кожи за счет внедрения технологии инъекционного введения клеток аутологичной стромально-васкулярной фракции жировой ткани в ожоговом центре ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе совместно с ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ проведено клиническое исследование с участием 61 пациента. Обожженные были разделены на две группы. Первая группа (сравнение) – пострадавшие, у которых лечение глубоких ожогов предусматривало выполнение аутодермопластики расщепленными перфорированными трансплантатами на $24,9 \pm 2,8$ сутки, с последующим их ведением под атравматичными раневыми покрытиями «Активтекс» (Российская Федерация). Вторая группа (исследуемые) – пациенты с аналогичными по площади и глубине ожогами, хирургическое лечение у которых предусматривало аутодермопластику расщепленными трансплантатами перфорированными в соотношении 1:3 с одномоментным введением в грануляционную ткань под трансплантат аутологичной стромально-васкулярной клеточной фракции жировой ткани на $25,7 \pm 4,3$ сутки с последующим ведением их под атравматичными раневыми покрытиями «Активтекс» (Российская Федерация).

В ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе у пациентов в группе сравнения начало эпителизации перфорантных ячеек отмечалось к $4,1 \pm 1,6$ суткам, а окончательно приживление трансплантатов – к $9,2 \pm 2,1$ сутками, в то время как в группе, где применялась СВФ, начало эпителизации перфорантных ячеек было констатировано к $3,2 \pm 1,4$ ($p < 0,05$) суткам, а окончательное приживление трансплантатов к $8,3 \pm 1,8$ ($p < 0,05$) суткам.

По результатам планиметрической оценки можно заключить, что аутодермопластика расщепленными перфорированными трансплантатами совместно с однократным инъекционным применением СВФ жировой ткани позволяет ускорить сроки начала эпителизации перфорантных ячеек на 28% ($p < 0,05$), а также сроки окончательного приживления трансплантатов на 11% ($p < 0,05$).

Проведена оценка структуры послеоперационных осложнений в исследуемых группах клинических наблюдений (табл. 2).

Таблица 2. Частота лизиса и отторжения, инфекционных осложнений в послеоперационном периоде аутодермопластики с учетом введения СВФ

Группы сравнения	Частота, %	
	лизиса и отторжения	нагноения ран
группа сравнения	25	35
введение стромально-васкулярной фракции	10	15

Примечание: критерий χ^2 : * – $p < 0,05$ по сравнению с группой сравнения

Результаты, представленные в таблице 2, позволяют заключить, что применение стромально-васкулярной фракции снижает частоту нагноений и лизисов/отторжения расщепленных перфорированных аутодермотрансплантатов в послеоперационном периоде на 20% ($p < 0,05$) и 15% ($p < 0,05$), соответственно.

У пациентов, находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ, в группе сравнения начало эпителизации перфорантных ячеек (1:6) отмечалось на $5,1 \pm 1,1$ сутки, а окончательно приживление трансплантатов к $17 \pm 2,7$ сутками. Послеоперационные осложнения отмечались в 45% случаев в виде негативных явлений (инфицирование, лизис, формирование некроза, отторжение трансплантата). В то время как в группе, где применялась СВФ, начало эпителизации перфорантных ячеек перфорированных 1 к 6 кожных трансплантатов было зафиксировано к $3,4 \pm 1,2$ ($p < 0,05$) суткам, а окончательное приживление трансплантатов, при отсутствии послеоперационных осложнений, было отмечено на $9,7 \pm 1,4$ ($p < 0,05$) сутки. В целом частота послеоперационных осложнений уменьшилась до 15%.

Для подтверждения клинических данных проведено цитологическое исследование мазков-отпечатков ран до проведения хирургического лечения, а также на 3-е и 12-е сутки после кожной пластики (табл. 3).

Таблица 3. Цитологическая картина глубоких ожогов после проведения аутодермопластики с учетом введения СВФ

Анализируемые параметры	Средняя величина параметров в мазке-отпечатке (M±m), %					
	группа сравнения			введение стромально-васкулярной фракции		
	до начала лечения	3 сутки	12 сутки	до начала лечения	3 сутки	12 сутки
нейтрофилы	77,2±5,6	47,3±4,6	19,2±1,3	76,5±4,7	37,2±2,3*	14,3±1,0*
фибробласты	2,9±1,1	3,3±1,2	25,6±3,1	2,8±1,0	4,2±1,1*	31,7±1,3*
макрофаги	15±3,9	3,3±1,1	36,5±2,7	14,6±2,2	2,9±1,1	42,1±1,4*
лимфоциты	3,8±0,9	2,1±1,2	3,9±1,9	4,1±1,2	3,9±1,3	3,7±1,2

Примечание: Критерий U Манна-Уитни: * – $p < 0,05$ относительно группы сравнения

Данные, приведенные в таблице 3, позволяют заключить, что однократное инъекционное применение СВФ жировой ткани в область гранулирующей раны одномоментно при аутодермопластике позволяет снизить содержание нейтрофилов в мазках-отпечатках к третьим и двенадцатым суткам на 35% ($p < 0,05$) и 26% ($p < 0,05$), соответственно. Использование СВФ после проведенной аутодермопластики увеличивает содержание фибробластов к третьим суткам на 27% ($p < 0,05$) и к двенадцатым на 24% ($p < 0,05$). В отношении макрофагов в мазках исследуемой группы отмечено повышение их числа к двенадцатым суткам на 15% ($p < 0,05$). Полученные данные позволяют заключить, что однократное инъекционное применение СВФ жировой ткани существенно купирует воспалительную реакцию и обеспечивает более ранний переход к регенераторной фазе раневого процесса.

Для подтверждения клинических, планиметрических и цитологических данных выполнено гистологическое и иммуногистохимическое исследования биоптатов кожи пациентов после аутодермопластики на 3-е и 10-е сутки на фоне введения СВФ. При их изучении в группе сравнения на третьи сутки после аутодермопластики определяется сетчатый слой дермы, с выраженным отеком и немногочисленными протоками эккринных желез. В толще дермы значительная нейтрофильная и лимфоцитарная инфильтрация. В процессе исследования биоптатов выявлены крупноочаговые фокусы струпа (рис. 24А). В тоже время у пациентов, которым была выполнена аутодермопластика с одномоментным введением СВФ, визуально определяется сосочковый и сетчатый слои дермы, визуализируются участки эпидермиса с роговым слоем, констатировано полное приживление трансплантата. Нейтрофильная и лимфоцитарная инфильтрация выражена слабее, чем в группе контроля. Отек умеренный (рис. 24В). Данные гистологического исследования на третьи сутки после аутодермопластики позволяют заключить, что

у пациентов, которым было выполнено однократное инъекционное введение стромально-васкулярной фракции, значительно меньше выражена воспалительная реакция и созданы более оптимальные условия для приживления кожных трансплантатов.

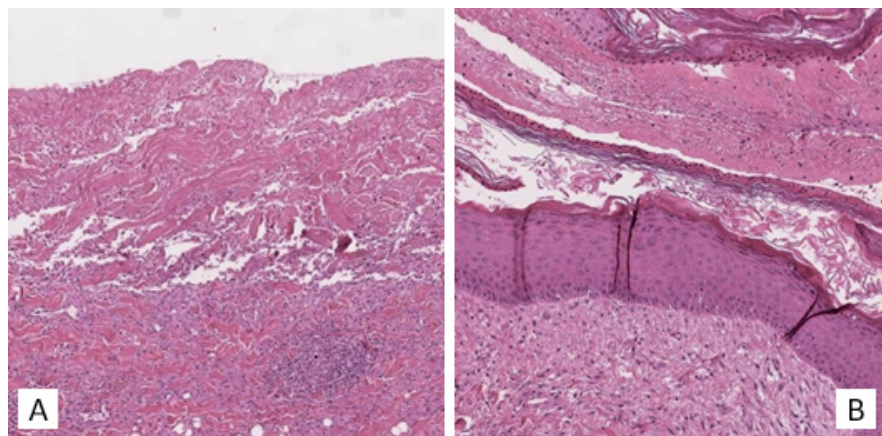


Рис. 24. Фрагмент восстановленного кожного покрова пациента на третьи сутки после проведенной аутодермопластики с учетом введения СВФ. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$. А – без введения СВФ, В – на фоне инъекционного введения СВФ

Для определения структуры коллагенового каркаса и наличия фибрина нами была выполнена окраска биоптатов по Пикро-Маллори. В биоптатах кожи пациентов, перенесших аутодермопластику без введения СВФ, определяется слабо выраженный коллагеновый каркас, отсутствует фибрин (рис. 25А), что свидетельствует об угнетении репаративных процессов в послеоперационном периоде. В то же время у обожженных исследуемой группы в биоптатах визуально определяется хорошо развитая сеть коллагеновых волокон, образующая плотный каркас с участками фибрина (рис. 25В). Это свидетельствует об ускорении регенераторных процессов в ожоговой ране, что подтверждает эффективность инъекционного применения СВФ.

Для оценки течения раневого процесса в динамике нами было проведено гистологическое исследование биоптатов кожи на 10-е сутки после проведенного хирургического восстановления кожного покрова методом аутодермопластики расщепленными перфорированными трансплантатами с использованием СВФ. У пациентов группы сравнения (без введения СВФ) при гистологическом исследовании в биоптатах кожи визуально определялись четко идентифицируемый сосочковый и сетчатый слои дермы, участки эпидермиса с роговым слоем. Лимфоцитарная и нейтрофильная инфильтрация выражены умеренно (рис. 26А). У обожженных из группы, в которой при проведении аутодермопластики применялась СВФ

жировой ткани, визуально наблюдалась та же гистологическая картина, однако лимфоцитарная и нейтрофильная инфильтрация были выражены незначительно (рис. 26В).

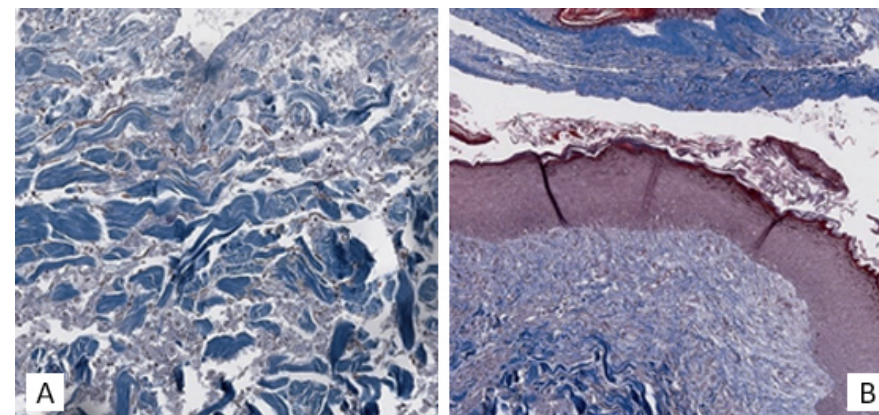


Рис. 25. Фрагмент восстановленного кожного покрова пациента на третьи сутки после проведенной аутодермопластики с учетом введения СВФ. Окраска Пикро-Маллори. Увеличение $\times 100$. А – без введения СВФ, В – на фоне инъекционного введения СВФ

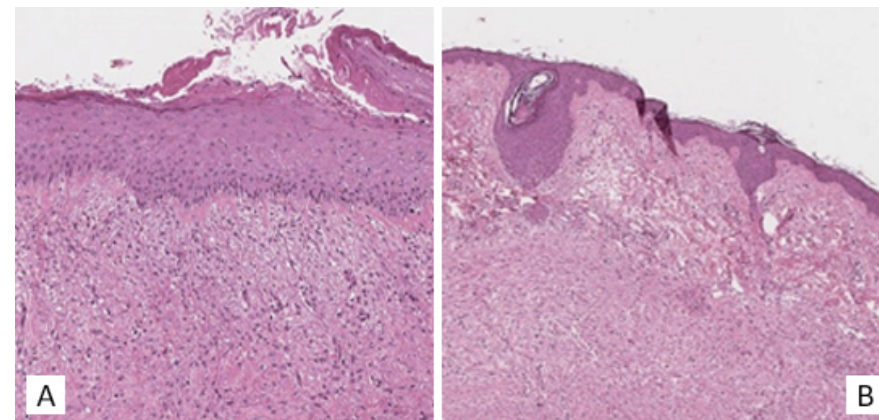


Рис. 26. Фрагмент восстановленного кожного покрова пациента на десятые сутки после проведенной аутодермопластики с учетом введения СВФ. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$. А – без введения СВФ, В – на фоне инъекционного введения СВФ

При окраске биоптатов кожи на десятые сутки после хирургического лечения по Пикро-Маллори значимых различий в гистологической картине групп сравнения выявлено не было. У пациентов, перенесших аутодермопластику на фоне введения стромально-васкулярной фракции, отмечено хорошее формирование коллагенового каркаса кожи (рис. 27).

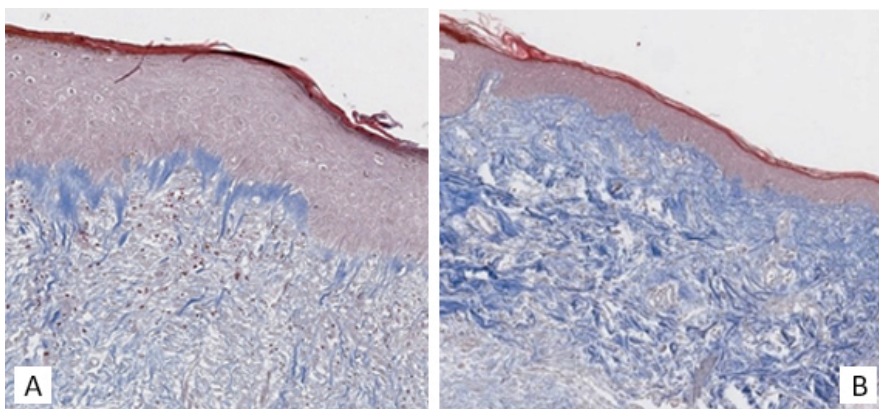


Рис. 27. Фрагмент восстановленного кожного покрова пациента на десятые сутки после проведенной аутодермопластики с учетом введения СВФ. Окраска Пикро-Маллори. Увеличение $\times 100$. А – без введения СВФ, Б – на фоне инъекционного введения СВФ

Для подтверждения клинических данных о степени активности воспалительной реакции в области ожоговых ран, на третьи сутки нами было проведено иммуногистохимическое исследование биоптатов кожи с определением экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45+, являющегося маркером воспалительной реакции (рис. 28).

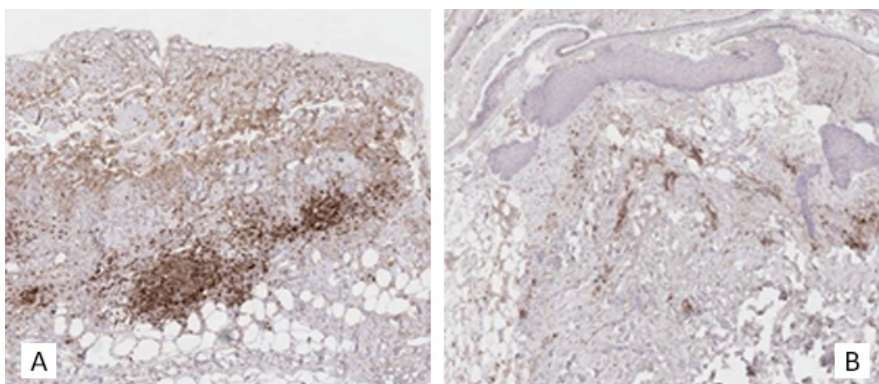


Рис. 28. Экспрессия общего лейкоцитарного антигена на третьи сутки после аутодермопластики с учетом введения СВФ. Увеличение $\times 100$. А – Крупные очаги CD45+ клеток (более 60% площади), Б – мелкие очаги CD45+ клеток (менее 20% площади)

При подсчете содержания CD45+ клеток у пациентов группы, где проводилась только аутодермопластика без введения СВФ, на третьи сутки отмечались крупноочаговые скопления клеток и их диффузная инфильтрация (более 60% площади поверхности среза). В сравнении с этим, у пациентов, которым выполнялась аутодермопластика, на фоне однократного инъек-

ционного введения СВФ жировой ткани в этот же срок визуализировались более мелкие очаги, которые суммарно занимали до 20% от общей площади. Это подтверждают результаты клинического наблюдения, а также данные цитологических и гистологических исследований.

Таким образом, однократное инъекционное введение стромально-вазкулярной клеточной фракции жировой ткани при выполнении аутодермопластики свободным расщепленным перфорированным в соотношении 1:3 трансплантатом у больных с глубокими ожогами позволяет ускорить сроки начала эпителизации перфорантных ячеек на 28% ($p < 0,05$) и сроки окончательного приживления трансплантата на 11% ($p < 0,05$), а также уменьшить частоту лизиса и отторжения трансплантатов на 15% ($p < 0,05$), и соответственно частоту инфекционных осложнений в послеоперационном периоде на 20% ($p < 0,05$) за счет купирования воспалительной реакции в области ожоговых ран и ускорения регенераторной фазы раневого процесса.

Применение аутологичных клеток СВФ жировой ткани полученных ферментативным методом у пациентов с обширными ожогами также позволяет добиться аналогичных результатов в комбинации с широкоперфорированными кожными трансплантатами в соотношении 1:6 как по срокам их эпителизации, так и по возможным послеоперационным местным осложнениям.

6.2. Результаты аппликационного применения аутологичной стромально-вазкулярной клеточной фракции при кожной пластике

Для оценки эффективности технологии местного лечения глубоких ожогов на основе аппликационного применения СВФ, в том числе в комбинации с обогащённой тромбоцитами плазмой (ОТП), при аутодермопластике расщепленным сетчатым трансплантатом, в ожоговых центрах ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе и ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ проведено совместное проспективное исследование хирургического лечения 54 обожженных. Большинство из них (23 пациента) выполнялась аутодермопластика расщепленным, сетчатым трансплантатом с перфорацией 1:3 и аппликационным применением аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП. Группу сравнения составили 20 пациентов, которым проводилась традиционная аутодермопластика. У 11 больных с обширными, глубокими ожогами применялась аутодермопластика расщепленным, сетчатым трансплантатом с перфорацией 1:6. При этом у 6 пациентов она была дополнена трансплантацией аутологичных клеток СВФ аппликационным методом. В ходе работы оценивались сроки начала эпителизации перфорационных ячеек и окончательного приживления аутодермотрансплантатов, анализировалась частота послеоперационных осложнений, а также цитологическая картина раневой поверхности и интенсивность микроциркуляции на 5 сутки после кожной пластики. Дополнительно

изучена продолжительность хирургического вмешательства в зависимости от выбранной методики его выполнения.

Установлено, что применение аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП при аутодермопластике сетчатым трансплантатом с перфорацией 1:3 позволило уменьшить сроки восстановления целостности кожного покрова (рис. 29).

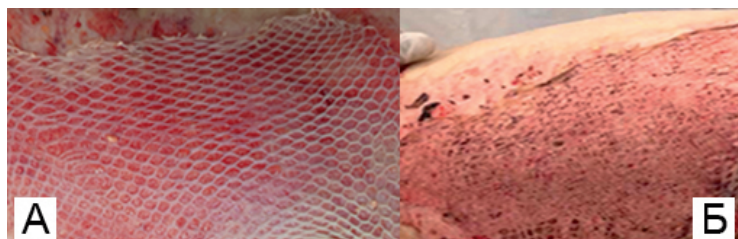


Рис. 29. Пациент Б., 68 лет. А – аутодермопластика сетчатыми трансплантатами с коэффициентом перфорации 1:3 в сочетании с СВФ и ОТП, Б – внешний вид раны на 5-е сутки после кожной пластики

Результаты оперативного лечения больных с глубокими ожогами в основной и сравняемой группах ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джanelидзе представлены на рисунке 30.

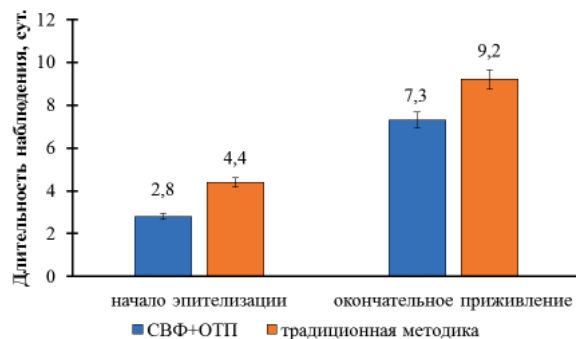


Рис. 30. Оценка эффективности аутодермопластики у больных с глубокими ожогами при использовании аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП и в сравняемой группе

Средние сроки начала эпителизации перфорационных ячеек в группе пациентов с трансплантацией аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП аппликационным методом составили 2,8 суток, что на 36,3% ($p < 0,05$) меньше аналогичного показателя при традиционной методике выполнения кожной пластики. Окончательные сроки приживления аутодермотрансплантатов в этой группе также были минимальными – 7,3 суток. При этом сроки эпителизации в группе сравнения составили в среднем 9,2 суток, что на 26% ($p < 0,05$) больше, по сравнению со сроками заживления ран у пациентов основной группы.

Результаты аутодермопластики расщепленным, сетчатым трансплантатом с высокой степенью соотношения перфорационных ячеек (1:6) в комбинации с трансплантацией аутологичных клеток СВФ аппликационным методом у пациентов с обширными глубокими ожогами в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ, представлены на рисунке 31.

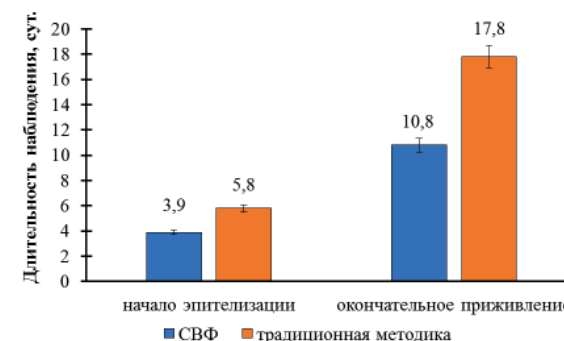


Рис. 31. Оценка эффективности аутодермопластики у больных с обширными глубокими ожогами при использовании аутологичных клеток СВФ и в сравняемой группе

Выполнение аутодермопластики расщепленным трансплантатом с высоким коэффициентом перфорации (1:6) в комбинации с трансплантацией аутологичных клеток СВФ аппликационным методом позволило добиться начала эпителизации в перфорационных ячейках на $3,9 \pm 1,3$ суток, что на 32% ($p < 0,05$) меньше, чем в группе сравнения. Сроки полной эпителизации пересаженного трансплантата составили в среднем $10,8 \pm 2,5$ суток, что на 39% ($p < 0,05$) быстрее сроков эпителизации при традиционной аутодермопластике.

Одной из основных причин неудовлетворительных результатов кожной пластики у пострадавших с глубокими ожогами кожи является развитие раневой инфекции в области оперативного вмешательства с возможным лизисом и отторжением аутодермотрансплантатов. Частота послеоперационных осложнений представлена на рисунке 32.

Наименьшая частота осложнений наблюдалась у пациентов, которым выполнялась аутодермопластика с трансплантацией аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП аппликационным методом. В данной группе наблюдений гнойно-воспалительный процесс был зафиксирован у 3 (13%) пациентов, а лизис/отторжение аутодермотрансплантатов в 1 (8,3%) наблюдении. В случае традиционной методики кожной пластики аналогичные показатели составили 35% и 25% случаев, соответственно.

Для объективной оценки динамики раневого процесса на 5-е сутки после пластики проведено цитологическое исследование, результаты которого представлены на рисунке 33.

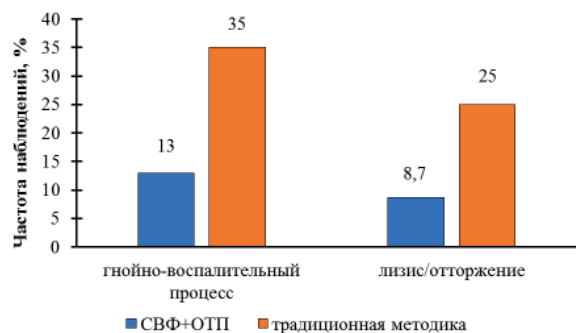


Рис. 32. Сравнительная оценка частоты послеоперационных осложнений с учетом методики выполнения аутодермопластики

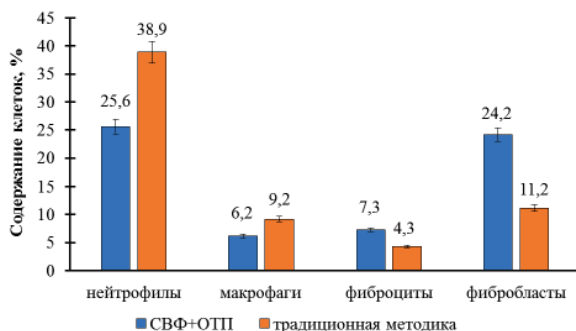


Рис. 33. Сравнительная оценка цитологической картины ран на 5-е сутки после аутодермопластики в зависимости от метода ее выполнения

Применение аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП при аутодермопластике позволяет уменьшить содержание нейтрофилов и макрофагов (клетки воспалительного звена), соответственно, на 34,1% ($p < 0,05$) и 32% ($p < 0,05$) относительно традиционной методики выполнения кожной пластики. При анализе клеточных популяций регенераторного звена отмечена обратная тенденция. Одновременно наблюдалось повышение уровня фиброцитов и фибробластов в 1,7 раза ($p < 0,05$) и в 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами, которым данная процедура не выполнялась.

С целью изучения состояния микроциркуляции в зоне операции проводилась оценка ее интенсивности с использованием лазерной доплерофлуометрия аппаратом ЛАКК 02 (рис. 34).

Представленные данные демонстрируют более высокую интенсивность микроциркуляции в области кожной пластики с применением аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП, которая достигает 7,9 пф. ед. Данный пока-

затель оказался в 2,1 раза ($p < 0,05$) выше относительно результатов, полученных при традиционной технике выполнения аутодермотрансплантации. В интактном кожном покрове рядом с послеоперационной раной анализируемый показатель также оказался меньше и составил 5,8 пф. ед., т. е. на 36,2% ($p < 0,05$) меньше.

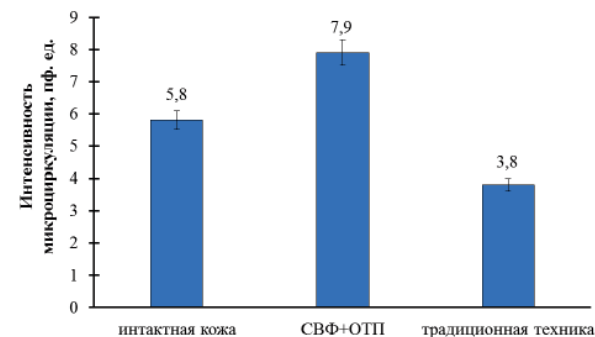


Рис. 34. Сравнительная оценка интенсивности микроциркуляции на 5 сутки после аутодермопластики в зависимости от метода её выполнения

Одним из важных критериев, которые необходимо учитывать при дополнении общепринятых техник хирургического вмешательства новыми технологиями, является их влияние на продолжительность манипуляции (рис. 35).

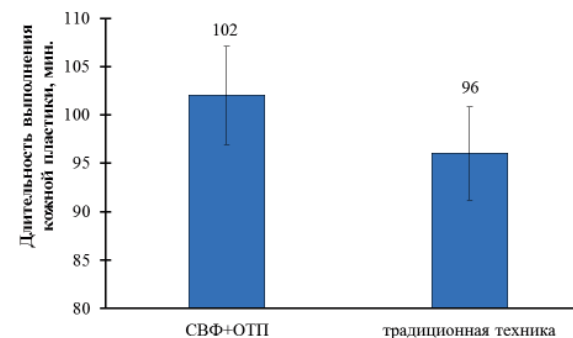


Рисунок 35. Сравнительная оценка продолжительности аутодермопластики в зависимости от метода ее выполнения

Средняя продолжительность выполнения аутодермотрансплантации в сочетании с трансплантацией аутологичных клеток СВФ в комбинации с ОТП составила 102 мин., что всего на 6,25% ($p > 0,05$) больше относительно затраченного времени на выполнение традиционной операции. Отсутствие зна-

чимых различий в продолжительности хирургического вмешательства связано с включением в операционную бригаду дополнительного специалиста.

Технология местного лечения глубоких ожогов на основе аппликационного применения аутологичных клеток СВФ, в том числе с использованием ОТП в комбинации с аутодермопластикой расщепленным перфорированным сетчатым трансплантатом, оказывает значительное многофакторное влияние на интенсивность регенерации тканей в процессе их приживления, позволяет улучшить результаты хирургического лечения больных с глубокими ожогами. Применение аутологичных клеток СВФ, выделенных механическим способом в комбинации с ОТП при выполнении аутодермопластики расщепленным сетчатым трансплантатом с перфорацией 1:3, позволило не только сократить сроки эпителизации трансплантата в среднем на 2 суток, по сравнению с традиционной аутодермопластикой, но и уменьшить частоту послеоперационных осложнений в 2 раза ($p < 0,05$). При этом аппликация клеток СВФ, выделенных ферментативным методом у пациентов с обширными глубокими ожогами в комбинации с аутодермопластикой расщепленным, сетчатым трансплантатом с высоким коэффициентом перфорации 1:6, позволила сократить сроки эпителизации трансплантата в среднем на 7 суток, по сравнению с традиционной аутодермопластикой.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ожоги кожи продолжают оставаться одной из наиболее значимых проблем системы здравоохранения. Несмотря на совершенствование методов консервативного и хирургического лечения обожженных, летальность среди данной группы пострадавших продолжает оставаться на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению. Ни одно из доступных в настоящее время высокотехнологичных раневых покрытий не может полностью заменить естественный кожный покров, а аппликация аллогенной кожи, являющейся «золотым стандартом», в РФ ограничена. В свете данных событий клеточные технологии и регенеративная медицина в целом являются наиболее перспективным направлением развития комбустиологии. Разработка новых БМКП, совершенствование их носителей, а также модификация существующих методик трансплантации культур позволит приблизиться к полностью биотехнологическому восстановлению кожного покрова как альтернативе традиционной аутодермопластике. Имеющиеся технологии уже способны на это при ограниченных по площади глубоких поражениях. Активная методическая и практическая работа по внедрению биотехнологий в практическую деятельность лечебных учреждений различного ранга позволит значительно повысить эффективность оказания медицинской помощи пострадавшим от ожогов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Александр-Синклер Э.И., Кухарева Л.В., Нашекина Ю.А., Плескач Н.М., Крылова Т.А., Зиновьев Е.В., Крылов К.М., Костяков Д.В., Вагнер Д.О., Крылов П.К., Солошенко В.В., Биниенко М.А., Давыденко В.В., Мельцова А.Ж., Хабарова И.Г., Лапин А.Ю. Эквивалент дермальный ЭД. – СПб. 2022. – 270 с.
2. Вагнер Д.О., Зиновьев Е.В., Крылов К.М., Крылов П.К., Солошенко В.В., Костяков Д.В., Юркевич Ю.В., Енукашвили Н.И., Блинова М.И., Александрова О.И., Михайлова Н.А. Опыт клинического применения аллогенных фибробластов у пострадавших с обширными ожогами кожи. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2018 ; 10 ; 3 : 65–72.
3. Дерий Э.К., Зиновьев Е.В., Костяков Д.В., Пятаков С.Н., Мануковский В.А. Эффективность применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, и стромально-васкулярной клеточной фракции жировой ткани при аутодермопластике. Инновационная медицина Кубани. 2023; 8; 3: 87–93.
4. Зиновьев Е.В., Костяков Д.В., Крылов П.К., Вагнер Д.О., Солошенко В.В. Биомедицинские клеточные продукты в комбустиологии. Клиническая патофизиология. 2020; 26; 3 : 56–60.
5. Зиновьев Е.В., Крайнюков П.Е., Асадулаев М.С., Костяков Д.В., Вагнер Д.О., Крылов П.К., Османов К.Ф. Клиническая оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток при термических ожогах. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2018 ; 13 ; 4 : 62–67.
6. Костяков Д.В., Зиновьев Е.В., Арцимович И.В., Гостимский А.В., Заворотный О.О., Семиглазов А.В. Первый опыт применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и аутоплазмы при аутодермопластике. Неотложная хирургия им. И.И. Джанелидзе. 2021; S1: 35–36.
7. Костяков Д.В., Зиновьев Е.В., Асадулаев М.С., Солошенко В.В. Результаты первого применения комбинированной последовательной трансплантации дермального эквивалента и культуры аллокератиноцитов. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Скорая медицинская помощь – 2020». 2021; 40–41.
8. Постановление Правительства Российской Федерации № 384 от 28 марта 2024 года «Об утверждении Правил обращения биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения биомедицинского клеточного продукта, специально произведенного для отдельного пациента непосред-

ственно в медицинской организации, в которой применяется данный биомедицинский клеточный продукт». Доступно по: <http://publication.pravo.gov.ru/document/0001202403290033>.

9. Расулов М.Ф. Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран. Тихоокеанский медицинский журнал. 2004; 1 : 7–9.
10. Федеральный закон Российской Федерации № 180-ФЗ от 23 июня 2016 года «О биомедицинских клеточных продуктах». Доступно по: <https://base.garant.ru/71427992/>.
11. Федеральный закон Российской Федерации № 466-ФЗ от 04 августа 2023 года «О внесении изменений в статью 4 Федерального закона “Об обращении лекарственных средств” и Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах». Доступно по: <https://base.garant.ru/407484125/>.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)

«Изготовление обогащенной тромбоцитами плазмы крови»

1. Назначение:

– изготовление обогащенной тромбоцитами плазмы для её последующего аппликационного/инъекционного применения у пациентов с ожогами кожи с целью стимуляции репаративной регенерации поверхностных, пограничных (дермальных), донорских ран или повышения эффективности кожной пластики.

2. Ответственность:

2.1. Пользователи, ответственные за выполнение процедуры:

– медицинские сестры, отвечающие за подготовку к манипуляции на основании должностных инструкций;
– лечащий врач (хирург, травматолог).

2.2. Контроль исполнения процедуры:

– лечащий врач (хирург, травматолог);
– заведующий отделением.

2.3. Критерии оценки:

– соответствие СОП;
– отсутствие осложнений.

3. Область применения

3.1. *Операционные и перевязочные кабинеты хирургических/травматологических отделений стационаров.*

3.2. Место трансплантации клеточных культур:

– поверхностные ожоги;
– пограничные (дермальные) ожоги;
– донорская рана;
– гранулирующая рана.

3.3. Возможные проблемы пациента:

– отказ от манипуляции;
– отказ от подписания добровольного информированного согласия;
– гематома в области взятия венозной крови;
– ухудшение состояния пациента;
– инфицирование ожоговой раны.

4. Оборудование и материалы:

– стерильные перчатки;
– стерильный шприц (емкость 10 или 20 мл);
– лабораторная центрифуга;

– вакуумные или лабораторные пробирки с антикоагулянтом (например, цитрат натрия), заполненные цельной венозной кровью пациента.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)

«Изготовление клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции»

1. Назначение:
 - изготовление клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции для её последующего аппликационного/инъекционного применения у пациентов с ожогами кожи с целью стимуляции репаративной регенерации поверхностных, пограничных (дермальных), донорских ран или повышения эффективности кожной пластики.
2. Ответственность:
 - 2.1. *Пользователи, ответственные за выполнение процедуры:*
 - медицинские сестры, отвечающие за подготовку к манипуляции на основании должностных инструкций;
 - лечащий врач (хирург, травматолог).
 - 2.2. *Контроль исполнения процедуры:*
 - лечащий врач (хирург, травматолог);
 - заведующий отделением.
 - 2.3. *Критерии оценки:*
 - соответствие СОП;
 - отсутствие осложнений.
3. Область применения
 - 3.1. *Операционные и перевязочные кабинеты хирургических/травматологических отделений стационаров.*
 - 3.2. *Место трансплантации клеточных культур:*
 - поверхностные ожоги;
 - пограничные (дермальные) ожоги;
 - донорская рана;
 - гранулирующая рана.
 - 3.3. *Возможные проблемы пациента:*
 - отказ от манипуляции;
 - отказ от подписания добровольного информированного согласия;
 - местные осложнения (гематома, серома) в области липоаспирации;
 - развитие целлюлита;
 - ухудшение состояния пациента;
 - инфицирование ожоговой раны.
4. Оборудование и материалы:
 - стерильные перчатки;

Этапы	Обоснование
Открытие центрифуги, равномерное распределение нагрузки: • при наличии четного числа пробирок они устанавливаются друг напротив друга; • при их нечетном количестве в пустой контейнер напротив пробирки с цельной венозной кровью устанавливается равная ей по весу и объему емкость	Правильная подготовка оборудования является одним из основных факторов, определяющих результат манипуляции. Несоблюдение правил эксплуатации приведет к неадекватной сепарации цельной венозной крови и снижению срока службы центрифуги
Центрифугирование цельной венозной крови пациента в течение 10 минут при 2600 об/мин	Указанные параметры являются рациональными с точки зрения трудозатрат и обеспечивают полное разделение биологической жидкости на фракции
Бережное извлечение пробирки с фракционированной цельной венозной кровью пациента	Извлечение биологического материала не должно сопровождаться его ротацией и/или колебанием, так как это может привести к перемешиванию образованных фракций
Извлечение обогащенной тромбоцитами плазмы крови (верхняя фракция, прозрачная, соломенного цвета) в подготовленный стерильный шприц	При центрифугировании в пробирке с цельной венозной кровью пациента образуется две основные фракции: плазма (прозрачная, соломенного цвета, верхняя часть пробирки) и форменные элементы крови (красного цвета, нижняя часть пробирки)

- стерильные шприцы с системой замка Luer-lock (емкость 20 мл);
- канюля для инфльтрации;
- канюля для липоаспирации;
- эмульсификатор или переходник для переноса жировой ткани;
- раствор для инфльтрации (физиологический раствор NaCl 0,9% 500 мл с добавлением 0,1 мл эпинефрина);
- лабораторная центрифуга.

Этапы	Обоснование
Определение области липоаспирации	Для набора необходимого количества жировой ткани необходимо использовать зоны с наибольшим её содержанием в отдалении от ожоговых ран. Они могут быть индивидуальными для каждого пациента, но в большинстве случаев липоаспирация осуществляется на передней или боковой поверхности туловища
Обработка операционного поля	Очищение кожных покровов от естественных продуктов жизнедеятельности организма (пот, кожное сало) и элиминация микроорганизмов
Разрез шириной 2–3 см	Разрез для проведения процедуры липоаспирации должен обеспечивать свободный ход канюли в тканях и не быть чрезмерно травматичным
Инфльтрация подкожно-жировой клетчатки	С помощью инфльтрационной канюли, к которой через замок Luer-lock присоединен шприц, заполненный подготовленным раствором, осуществляют гидротрепаровку тканей. Движения инструмента в подкожно-жировом слое должны быть направлены вверх от брюшной полости и контролироваться свободной рукой, которая формирует складку кожи
Липоаспирация	С помощью липоаспирационной канюли, к которой через замок Luer-lock присоединен пустой шприц, выполняют разрушение и забор жировой ткани. Движения инструмента в подкожно-жировом слое должны быть направлены вверх от брюшной полости и контролироваться свободной рукой, которая формирует складку кожи
Оценка объема липоаспирата	В случае заполнения двух шприцов объемом 20 мл жировой тканью пациента процедуру прекращают. В случае необходимости липоаспирацию можно выполнить на противоположной стороне или другом участке туловища
Ушивание линии разреза	После проведения процедуры липоаспирации линии разреза ушиваются несколькими узловыми швами с целью получения наилучшего эстетического результата рубцевания

Этапы	Обоснование
Открытие центрифуги, установка пробирок в контейнеры напротив друг друга	Правильная подготовка оборудования является одним из основных факторов, определяющих результат манипуляции. Несоблюдение правил эксплуатации приведет к неадекватной сепарации содержимого и снижению срока службы центрифуги
Центрифугирование липоаспирата в течение 4 минут при 2500 об/мин	Первый этап центрифугирования осуществляется с целью разделения в шприце остатков инфльтрационного раствора и жировой ткани пациента. В результате визуально отмечается образование трех фракций: верхняя (разрушенные адипоциты), средняя (интактные адипоциты), нижняя (физиологический раствор с адреналином)
Утилизация остатков инфльтрационного раствора и разрушенных адипоцитов в обоих шприцах	Удаление остатков инфльтрационного раствора и разрушенных адипоцитов из шприцов, так как они не имеют практического значения для последующего изготовления клеточной суспензии
Механическая деструкция жировой ткани через эмульсификатор или коннект для шприцов	Интактная жировая ткань разрушается с целью получения гомогенной смеси клеток, из которой выделяется стромально-васкулярная фракция. Во время данной процедуры необходимо выполнить не менее 30 перемещений липоаспирата
Открытие центрифуги, установка пробирки в контейнер, напротив которого фиксируется равная ей по весу и объему емкость или специальный груз	Соблюдение техники эксплуатации оборудования. В современных устройствах центрифугирование не начнется, пока не будет равномерно распределена нагрузка на контейнеры
Центрифугирование жировой эмульсии в течение 2 минут при 3000 об/мин	Данные параметры являются оптимальными с точки зрения объема и жизнеспособности получаемых живых клеток из жировой эмульсии. В результате в шприце образуется две фракции: верхняя (жировая эмульсия) и нижняя, объемом около 1,5 мл (клеточная суспензия стромально-васкулярной фракции)
Извлечение клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции	Изготовленная клеточная суспензия переносится в другой шприц для последующего её применения

**Возможности применения обогащенной тромбоцитами плазмы
и клеточной суспензии стромально-васкулярной фракции
при лечении ожоговых поражений**

Пособие для врачей

Технический редактор: В.Н. Васильева
Корректор: О.С. Говорухина
Оператор: Н.С. Орлов

Подписано в печать 12.11.2024
Формат 60х84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Уч.-изд. л. 1,89. Усл.-печ. л. 2,30. Заказ № 3333.8. Тираж 100.

Отпечатано в типографии ООО «Принт».
426035, г. Ижевск, ул. Тимирязева, 5.