

Алейник Д.Я., Докукина Л.Н., Квицинская Н.А., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П., Воловик М.Г.

ПРИМЕНЕНИЕ СВЕЖЕЗАГОТОВЛЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК В ПРАКТИКЕ ДЕТСКОЙ КОМБУСТИОЛОГИИ

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, г. Нижний Новгород

Aleynik D.Ya., Dokukina L.N., Kvitsinskaya N.A., Charykova I.N., Rubtsova Yu.P., Volovik M.G.

USE OF FRESH AUTOLOGOUS CELLS IN CHILDREN'S COMBUSTIOLOGY PRACTICE

Privolzhsky Federal Research Medical Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhniy Novgorod

Резюме

Цель исследования – оценить эффективность применения оригинальной технологии, основанной на сочетании свежeweделенных аутологичных клеток кожи и фибринового клея при лечении ожогов II–III степени.

Технология использовалась у 104 детей с площадью ожогов 10–80% поверхности тела, лечившихся в ожоговом центре ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России.

Для оценки состояния пациента и ран использовали клиническое наблюдение, визуальную характеристику раневой поверхности, фотодокументирование, планиметрию, тепловидение, ЛАК.

Характеристику клеточного материала проводили микроскопическими методами, определяя жизнеспособность и концентрацию клеток, а фенотип клеток определяли методом цитофлуориметрии.

При ожогах II степени клеточную взвесь и фибриновый клей наносили непосредственно на рану после первичного туалета, а при ожогах III степени – на раневое ложе, сформированное после ранней некрэктомии.

Использование технологии позволило сократить количество перевязок и улучшить качество вновь образованного кожного покрова при лечении ожогов II–III степени.

Разработанный метод эффективен, безопасен, не требует дополнительных затрат и может выполняться практически в любом хирургическом стационаре.

Ключевые слова: ожоги, аутоклетки, фибриновый клей.

Abstract

The purpose of this research is to assess the efficiency of the original technology based on combining fresh autologous skin cells and fibrin glue in treating 2nd and 3d degree burns.

This technology was used in 104 children with the burn area from 10 to 80% of the body surface, who received treatment in the burn centre of Privolzhsky Federal Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia.

The status of patients and their wounds was assessed using clinical observation, visual characterizing of the wound surface, photo registration, planimetry, IR imaging, and laser doppler flowmetry.

The cell material was characterized using microscopic methods, specifying cell viability and concentration. Cell phenotype was determined by the cytofluorometry method.

For 2nd degree burns, cell suspension and fibrin glue were applied directly to the wound after a primary toilet; for 3d degree burns – to the wound bed formed after an early necrectomy.

The use of this technology made it possible to reduce the number of dressings and improve the quality of a newly formed skin integument in treating 2nd and 3d degree burns.

The developed method is effective, safe and requires no additional costs; it can be used in any surgical hospital.

Key words: burns, autologous cells, fibrin glue.

Введение

Лечение пострадавших с ожоговыми поражениями кожи до настоящего времени остается сложным и высокочувствительным процессом. Особой проблемой является ухудшение качества жизни пациентов с последствиями ожоговой травмы, которые резко нарушают их социальную адаптацию.

Инновационным направлением в лечении пациентов с поражениями кожи стало применение биотехнологических конструкций, включающих культивированные клетки. Ряд тканевых эквивалентов для восстановления дефектов кожи достиг стадии коммерческой реализации и апробирован у тысяч пациентов [9]. Однако подавляющее большинство из них применяется при сложных для терапии, но незначительных по площади поражениях: например, при диабетических и трофических язвах, ограниченных ожогах, – и по своим качествам и срокам подготовки они не всегда удовлетворяют специалистов. Перечисленные проблемы и высокая себестоимость ограничивают применение этих лечебных средств.

Некоторые недостатки коммерческих продуктов позволяет устранить одно из современных направлений клеточной терапии – использование свежeweделенного клеточного материала. Это направление представлено системой ReCell компании Avita Medical, успешно используемой в Европе, Канаде, Китае, Австралии при лечении поверхностных ожогов [5, 6, 8]. Система ReCell апробировалась и в России, в том числе в ПФМИЦ Минздрава России в 2012–2013 гг.

Наш небольшой опыт применения системы (7 случаев) подтвердил ее эффективность при лечении пациентов с ожогами II степени, но показал увеличение времени оперативного пособия на 30–60 минут за счет длительной ферментативной обработки исходного материала. Другим недостатком использования этой системы является то, что при расположении ран на боковой поверхности тела и/или конечностей клеточная взвесь стекает с нее, к тому же ее применение ограничивает достаточно высокая стоимость – около 50 тысяч рублей за набор (по ценам 2013–2014 гг.).

С целью устранения вышеперечисленных недостатков разработан способ лечения пострадавших с ожогами кожи на основе сочетания ау-

тологических клеток кожи с фибриновым клеем «Тиссукол» [2].

Цель работы – оценить эффективность сочетанного применения свежeweделенных аутологических клеток кожи с клеем «Тиссукол» при лечении детей с ожоговыми ранами II и III степени.

Материал и методы исследования

Технологию использовали у 104 детей: 70 мальчиков и 34 девочек в возрасте от 5 мес до 15 лет с общей площадью поражения от 10 до 80% поверхности тела (п.т.); у 65 диагностированы ожоги II, у 39 – III степени. При лечении детей с ожогами III степени трансплантация клеток сочеталась с некрэктомией на площади до 12% п.т. Площадь одновременно восстановленной кожи варьировала от 100 до 800 см².

Протокол исследования утвержден комитетом по этике и ученым советом ПФМИЦ Минздрава России. Методику использовали после получения информированного согласия официальных представителей пациента.

Для оценки состояния пациента и ран использовали клиническое наблюдение, визуальную характеристику раневой поверхности, фотодокументирование, планиметрию, тепловидение, лазерную доплеровскую флуориметрию.

При визуальной оценке состояния раны учитывали наличие или отсутствие пузырей, некрозов, геморрагий, количество и характер раневого отделяемого, выраженность эпителизации, состояние окружающих тканей. У 23 детей косвенную оценку состояния микроциркуляции в раневой поверхности и ее перифокальной зоне проводили с помощью тепловидения (матричный тепловизор «Thermo Tracer TH-9100», NEC, Япония, спектральный диапазон 8–14 мкм, чувствительность 0,025–0,03 °С, погрешность ±1%, разрешение ИК-матрицы – 320×240 пикселей). С целью оценки глубины ожогового поражения регистрировали исходное распределение температур, после чего проводили холодовую пробу [3]. Верификацию тепловизионных данных осуществляли прямыми измерениями параметров микроциркуляции на аппарате ЛАКК-М (НПП «Лазма», Россия).

У детей с ожогами II степени трансплантацию клеток выполняли на 2–3-й день (до 5 дня после травмы), а у детей с ожогами III степени – в со-

четании с некрэктомией, не позднее 7-го дня; у одной пациентки – на 10-й день после получения ожога.

На первом этапе за 18 час. до оперативного вмешательства под вводным наркозом длительностью не более 5–7 мин. с помощью дерматома забирали биоптат кожи толщиной 0,28–0,3 см площадью в среднем 4 кв.см. Образовавшееся донорское место обрабатывали гемостатическими препаратами (транексам, гемостатическая губка). Биоптаты в стерильном физиологическом растворе доставляли в лабораторию, где проводили подготовку клеточного материала. Однако при необходимости все этапы подготовки могут выполняться непосредственно в операционной. Кожу отмывали, меняя раствор, и обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина (ООО «ПанЭко», Москва) в течение 18 час. при $t\ 4\ ^\circ\text{C}$. После трипсинизации кожу легко разделяли на эпидермис и дерму по линии базальной мембраны, смывали клетки с внутренней поверхности обоих слоев физиологическим раствором, ресуспендировали и получали клеточную взвесь. Действие фермента останавливали добавлением предварительно заготовленной аутологичной сыворотки. В полученной взвеси подсчитывали концентрацию клеток с помощью камеры Горяева, жизнеспособность – с применением витального красителя трипанового синего и 500 тыс. клеток передавали для определения фенотипа. Фенотипирование проводили на цитометре Navios Vscan Coulter с панелью антител Vscan Coulter (маркеры – CD 45PC 5, CD 14 PC5, CD HLA-DR PC7, CD 34PC7, Cetokeratin-Fitc, CD 90 Fitc, CD 105PE, CD 44Fitc, CD 73PE, CD 10PC7, CD 13 PC5 с соответствующими изотипическими контролями). По результатам исследования составляли паспорт клеточного материала, в котором отражали его индивидуальные характеристики для каждого пациента.

Подготовленную клеточную взвесь трансплантировали на раны.

Второй этап – операцию трансплантации – проводили под внутривенной анестезией. Перед трансплантацией при ожогах II степени удаляли налет фибрина и погибший эпидермис, рану обильно промывали сначала антисептиками, а затем физиологическим раствором хлорида натрия. При глубоком поражении ожоговые струпы удаляли дерматомом либо с помощью гидрохирурги-

ческой системы «Версаджет» до жизнеспособных тканей. На очищенную раневую поверхность наносили клеточную взвесь с «Тиссуколом» 500 ME, застывающим за 30 сек. Клей готовили перед трансплантацией из двух компонентов согласно инструкции производителя и наносили одновременно с клеточной суспензией, причем порядок действий не принципиален: это можно делать поверх клеток либо в смеси с ними. На практике это осуществляется следующим образом: хирург из шприца наносит клетки, а ассистент одновременно с ним – клей. В результате обеспечивается взаимодействие клеток с раневой поверхностью при непосредственном прилегании к ней или внутри фибринового клея. Известным свойством «Тиссукола» является пролонгированный срок биодеградации, обеспечивающий условия для взаимодействия клеток с раневой поверхностью в течение длительного времени. Кроме того, клей обеспечивает надежный гемостаз раны, что особенно важно при использовании технологии после ранней некрэктомии. Свойства «Тиссукола» позволяют использовать его в качестве фиксирующего и гемостатического средства в различных областях хирургии [1, 7]. При особых локализациях (поражение лица) раны оставляли непосредственно под «Тиссуколом», в других случаях поверх него накладывали прозрачное цельное или перфорированное индифферентное раневое покрытие, предотвращающее повреждение и смещение новообразованной пленки и позволяющее визуально контролировать состояние раны в динамике. Поверх покрытия накладывали фиксирующие марлевые повязки, смоченные физиологическим раствором хлорида натрия.

Первую перевязку после трансплантации клеток (удаление фиксирующих повязок) проводили на 5–7-е сутки. Перевязка проводилась без травмирования послеоперационной поверхности и, так как болевой синдром полностью отсутствовал, без наркоза. Прозрачность пленки позволяла оценить внешний вид раны. При повышенной экссудации фиксирующие повязки меняли.

При катamnестическом наблюдении на сроках 1 месяц, 6 месяцев и 1 год оценивали состояние восстановленного кожного покрова: выраженность пигментации, наличие и характер рубцов, функцию пораженных областей.

Результаты исследования и их обсуждение

Каждая полученная клеточная взвесь была охарактеризована. Визуально клетки суспензии были разного размера, округлой формы, без признаков деградации, отмечалось незначительное количество клеточного детрита. Концентрация клеток в суспензии варьировала от 4 до 17 млн клеток/мл, жизнеспособность – от 70 до 90% (в среднем – $84,3 \pm 6,5\%$). При фенотипировании преобладали клетки, положительные на *Cetokeratin* (внутриклеточный маркер, характерный для кератиноцитов), составляющие $83,3 \pm 3,6\%$. Маркеры мезенхимальных клеток, характерные для основной популяции клеток дермы, – фибробластов (CD 90+, CD 105PE+, CD 44+, CD 73+, CD 10+, CD 13+) определялись на $18,2 \pm 5,4\%$ клеток. Маркеры гемопоэтических клеток (CD 45, CD 14, CD HLA-DR, CD 34) не выявлялись.

Таким образом, щадящий метод трипсинизации обеспечивает значительный выход клеток из биоптата и хороший уровень жизнеспособности среди клеток взвеси, что согласуется с общепринятыми данными [4]. С помощью фенотипирования показано, что в составе взвеси представлены основные клеточные популяции обоих слоев кожи (и эпидермиса, и дермы) с преобладанием клеток эпидермиса.

Перед началом лечения ожоговая поверхность при поражении II степени представляла собой обнаженную дерму розового или багрового цвета с белесоватыми участками, иногда с геморрагиями и налетом фибрина.

При более глубоких поражениях (III степень) раны были покрыты формирующимися либо сформированными влажными или сухими струпами желтого и коричневого цвета с перифокальной гиперемией, у части пациентов – с воспалением, серозно-гнойным отделяемым, отеком мягких тканей и сомнительной сосудистой реакцией. При обширных ожогах у пациентов наблюдалась симптоматика, характерная для ожоговой болезни: интоксикация, обезвоживание, нарушения гемодинамики. Тепловизионно определяли степень нарушения микроциркуляции в различных участках в пределах раневой поверхности, что позволяло картировать ее по глубине ожогового поражения и в дальнейшем контролировать в динамике процесс заживления.

В зависимости от глубины поражения определяли вид оперативного пособия: трансплантация

аутоклеток после туалета раны или трансплантация клеток в сочетании с некрэктомией.

Фиксированное время оперативного пособия не увеличилось, оно варьировало от 10 до 30 мин. в зависимости от вида операции и площади пораженной поверхности. При первой перевязке после операции (удаление фиксирующих повязок) под прозрачной пленкой оценивали внешний вид раны и отмечали отсутствие признаков воспаления, завершенную (при ожогах II степени) либо очаговую (при ожогах III степени) эпителизацию. При ожогах II степени после первой перевязки пациенты уже выписывались из стационара. Средние сроки заживления после использования клеточного материала составили $7 \pm 2,5$ дня.

На первой перевязке у детей с ожогами III степени при незаконченной эпителизации прозрачную пленку оставляли на ране и удаляли при последующих перевязках по мере заживления. Сроки восстановления кожного покрова после некрэктомии и трансплантации аутологичных клеток у пациентов с ожогами III степени составили $14 \pm 3,2$ дня, что определялось площадью пораженной поверхности. По данным тепловизионного исследования, характеристики раневой зоны в эти сроки приближаются к таковым у интактной кожи.

Ни в одном случае не наблюдали осложнений, связанных с трансплантацией клеток: лизиса, выраженных воспалительных или аллергических реакций.

Через месяц у пострадавших на месте ожоговых ран II степени отмечается более или менее выраженная пигментация кожного покрова, иногда – кожный зуд. У детей после операции некрэктомии наряду с пигментацией имеются участки новообразованного нежного фиброзного рубца. Через 6 месяцев в зоне поражения у пациентов с ожогами II степени пигментация незначительна, а с ожогами III степени видны фиброзные рубцы – мягкие, более гладкие, бледные, ни в одном случае не отмечено нарушений функции суставов. При катанестическом обследовании через год после травмы продемонстрировано хорошее качество вновь образованного кожного покрова без нарушения функции заинтересованных функциональных областей. Количество перевязок уменьшалось и составило 1–2 у детей с ожогами II степени и 2–4 с ожогами III степени после некрэктомии. Все перечислен-

ное позволило уменьшить использование средств для наркоза и инфузионных сред.

Клинические примеры

Пациентка Т., 10 лет, и.б. № 259 605, поступила с диагнозом: ожог на площади 4% поверхности тела. Раневая поверхность в виде обнаженной сухой дермы темно-багрового цвета с петехиями и участками сухого струпа. Учитывая глубину ран, решено выполнить некрэктомию с одномоментной трансплантацией аутологичных клеток. Под наркозом проведена операция некрэктомии ожоговых струпов. Время нахождения жгута – 15 мин. После гемостаза на раневые поверхности нанесены аутоклетки с «Тиссуколом» 500 МЕ, поверх накладывали прозрачные полупроницаемые повязки. Общее время операции не превышало 30 мин. При первой перевязке на 6-й день после операции отмечена активная эпителизация ран с периферии, в центре – сухие корочки коричневатого цвета (засохшие кровяные сгустки), отделяемое отсутствует. Наложена повязка с левомеколем, через сутки она удалена. Таким образом, на 8-й день после применения технологии рана полностью эпителизовалась. После восстановительного лечения ребенок выписан с полным объемом движений в голеностопном суставе.

Пациентка М., 1 год 5 мес, и.б. № 287 501, поступила в первые сутки после травмы с диагнозом: ожог кипятком II–III степени туловища, верхних конечностей, левой стопы на площади 25% поверхности тела. Раны представляли собой обнаженную дерму розового и багрового цвета, местами с гемorragиями и белесоватыми участками с умеренным серозным отделяемым. 7 апреля 2015 г. взят аутоотрансплантат с площади 6 кв.см, а через 18 час. проведена трансплантация аутологичных клеток на площади 12% поверхности тела в сочетании с «Тиссуколом» 500 МЕ, поверх слоя клея наложена повязка. При первой перевязке, 13 апреля 2015 г. (на 5-й день), под пленкой фиксировалась эпителизация ран на всей площади. Повязки удалены. В зоне поражения виден ярко-розовый, вновь образованный нежный шелушащийся эпителий. Ребенок выписан из стационара на 9-е сутки после травмы с общими рекомендациями.

Таким образом, проведение технологии у детей с ожогами II степени позволяет сократить

количество перевязок (до 1–2) и предотвратить их углубление, так как оно проводится в ранние сроки после травмы до образования некрозов, их последующей секвестрации, сопровождающейся воспалением, вероятностным нагноением и дальнейшим формированием гранулирующих ран. В результате удается избежать развития рубцовых деформаций, улучшить косметический эффект после восстановления ожоговых ран и предотвратить ухудшение качества жизни пациента.

У пострадавших детского возраста с ожогами III степени сочетание трансплантации клеток с ранней некрэктомией уменьшает объем операции, площадь донорских участков, количество перевязок и расход сред. Следует отметить такие преимущества технологии, как использование аутологичного материала, минимальные затраты реактивов и минимально необходимое оборудование. Использование фактически только двух реактивов (физиологический раствор и трипсин) и аутологичной сыворотки позволяет свести затраты практически к стоимости фибринового клея, общая стоимость которого в несколько раз меньше, чем при использовании системы ReCell.

Важным достоинством данной технологии является возможность использования ее в любом ожоговом центре или хирургическом стационаре, без специального оборудования и инвентаря. Выделение клеточной суспензии может выполняться врачом-лаборантом или хирургом после проведения необходимых организационных мероприятий по обеспечению работы в операционной и кратковременного обучения исполнителей.

Выводы.

1. Получаемый клеточный материал содержит клетки и эпидермиса, и дермы с высокой концентрацией и жизнеспособностью.

2. Метод прост в исполнении и может выполняться в любом хирургическом стационаре без серьезных дополнительных затрат.

3. Применение технологии предотвращает углубление ожогов II степени, объем операции у детей с ожогами III степени, уменьшает число перевязок, обеспечивает улучшение качества восстановленного кожного покрова.

Литература

1. Миланов Н.О., Адамян Р.Т., Шехтер А.Б., Истратов А.Л., Эюбов Ю.Ш. Использование фибринового клея для укрытия микрохирургических аутотрансплантатов свободной расщепленной кожей // Хирургия. 2004. № 12. С. 4–9.
2. Карякин Н.Н., Докукина Л.Н., Алейник Д.Я., Аминев В.А., Квицинская Н.А., Соколов Р.А. Способ лечения глубоких ожогов на ранних этапах // Патент России. 2013. № 2 499 603. Бюл. № 3.
3. Левин В.М., Кошечкин С.В., Абызова Н.Е. Способ диагностики ожогов IIIA – IIIB степени // Патент России. 1997. № 2085 109. Бюл. № 21.
4. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: БИНОМ, 2010. – 691 с.
5. Sood R., Roggy D.E., Zieger M.J., Nazim M., Hartman B.C., Gibbs J.T. A comparative study of spray keratinocytes and autologous meshed split-thickness skin graft in the treatment of acute burn injuries // Wounds. 2015. Vol. 27. No 2. P. 31–40.
6. Gravante G., di Fede M.C., Araco A., Grimaldi M., de Angelis B., Arpino A., Cervelli V., Montone A. A randomized trial comparing ReCell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns // Burns. 2007. Vol. 33. No 8. P. 966–972.
7. Kassam A., Horowitz M., Carrau R., Snyderman C., Welch W., Hirsch B., Chang Y.F. Use of Tisseel fibrin sealant in neurosurgical procedures: incidence of cerebral spinal fluid leaks and cost-benefit analysis in a retrospective study // Neurosurgery. 2003. Vol. 52. No 5. P. 1102–1105.
8. Wood F.M., Stoner M.L., Fowler B.V., Fear M.W. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process // Burns. 2007. Vol. 33. No 6. P. 693–700.
9. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // Wound Repair. Regen. 2014. Vol. 22. No 1. P. 14–22.

Авторы

Алейник Диана Яковлевна	Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией биотехнологий и консервации тканей ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
ДОКУКИНА Людмила Николаевна	Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий 2-м ожоговым отделением (детское ожоговое отделение) ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
КВИЦИНСКАЯ Наталья Александровна	Младший научный сотрудник 2-го ожогового отделения (детское ожоговое отделение) ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
ЧАРЫКОВА Ирина Николаевна	Врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биотехнологий и консервации тканей ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
РУБЦОВА Юлия Павловна	Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологий и консервации тканей ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.
ВОЛОВИК Михаил Григорьевич	Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения функциональной диагностики ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, г. Нижний Новгород.