

**Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации
Министерство образования и науки Российской Федерации
Министерство**

от 5 февраля 2012 года

Д-р Паоло Маккиарини

Трансплантация трахеи

Протокол клинического исследования

по направлению «Молекулярная и клеточная биология, биотехнология, регенеративная медицина» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования по договору от «19» октября 2011 г. № 11.G34.31.0065 между Министерством образования и науки Российской Федерации и Государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и ведущим ученым Маккиарини Паоло, осуществляющим руководство научным исследованием на период с 19 октября 2011 года по 31 декабря 2013 года

СОДЕРЖАНИЕ

- 1.0 Клинические врачи-исследователи
- 2.0 Механизмы мониторинга
- 3.0 Вступление / Краткий обзор
- 4.0 Одобрение и утверждение Плана клинического исследования
- 5.0 Краткое описание предшествующих исследований у людей
- 6.0 Обоснование отсутствия отказа
- 7.0 Подписание добровольного информированного согласия пациента
- 8.0 Генеральный план исследования
- 9.0 Ожидаемые риски
- 10.0 Нежелательные явления
- 11.0 Введение поправок
- 12.0 Политика в отношении публикаций
- 13.0 Индивидуальная регистрационная карта

1.0 Клинические врачи-исследователи

1.1 Ведущий исследователь: д-р Паоло Маккиарини, Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция

1.2 Клинический исследователь-координатор: профессор Порханов Владимир Алексеевич, главный врач ГБУЗ «Краевая клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского Департамента здравоохранения Краснодарского края»

1.3 Другие исследователи: к.м.н. Поляков И.С., к.м.н. Пашкова И.А, Гилевич И.В., Федоренко Т.В.

1.4 Исследовательские центры / клиники:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Краевая клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского Департамента здравоохранения Краснодарского края

1.5 Финансирование: Министерство Здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Министерство образования и науки Российской Федерации

2.0 Механизмы мониторинга

Этот протокол предназначен для запроса на получение разрешения на трансплантацию трахеи в качестве интраоперационного решения при обструктивной опухоли трахеи и других состояниях, требующих замещение собственной трахеи (табл 1). Процедура предполагает использование синтетического биоинженерного каркаса, засеянного аутологичными моноклеарными клетками, и считается единственным шансом на выздоровление для некоторой категории пациентов. Ведущий исследователь, доктор Паоло Маккиарини, будет контролировать процедуру при содействии группы врачей и исследователей, которые совместно с финансирующей организацией, будут отвечать за мониторинг пациента до, во время и после процедуры. Эти данные будут записаны в соответствии с требованиями, принятыми для индивидуальной регистрационной карты, которая может быть отдельно рассмотрена Независимым комитетом по мониторингу данных или подобной комиссией.

3.0 Вступление / Краткий обзор

Трансплантация трахеи является единственной терапевтической альтернативой в тех случаях, когда инструментальные, эндоскопические и другие исследования показывают, что длина остаточных здоровых дыхательных путей (примерно 6 см или более 50% от всей длины дыхательных путей), а также локализация и распространение обструкции делают невозможным выполнение хирургического удаления патологического сегмента (табл. 1). В промежуточный период пациенты могут получать временное облегчение посредством эндотрахеального кюретажа и/или введения в трахею Т-трубки для поддержания дыхательных путей открытыми, однако без хирургической трансплантации течение болезни таких пациентов обычно приводит к терминальному исходу.

Таблица 1 - Показания для трансплантации дыхательных путей

Тип заболевания	Обоснование	Противопоказания для трансплантации
Первичные злокачественные опухоли трахеи (доброкачественные и злокачественные)	Распространение пораженного участка трахеи сверх пределов стандартной резектабельности*	Наличие системных метастазов и медиастинальных лимфатических узлов (злокачественные новообразования); Обычные функциональные и психологические противопоказания
Фистула трахеи и пищевода	Трахеино-пищеводный дефект превышает пределы стандартной резектабельности	Злокачественное новообразование
Стеноз трахеи	Распространение пораженного участка трахеи сверх пределов стандартной резектабельности	Обычные функциональные и психологические противопоказания
Трахеобронхиальное размягчение (первичное или вторичное)	Распространение пораженного участка трахеи сверх пределов стандартной резектабельности или лечения (сэндолломинальное стентирование или дилатация)	Обычные функциональные и психологические противопоказания

*(6 см от всей длины дыхательных путей)

Предлагаемый протокол предполагает замену трахеи у терминальных пациентов путем трансплантации синтетического биоинженерного каркаса, засеянного аутологичными мононуклеарными клетками.

3.1 Специальное обучение / опыт

В дополнение к хирургическим методам пересадки трахеи данный протокол требует знаний и опыта по подготовке аутологичных клеток, а также по процедуре посева клеток на биокаркас. Операция и соответствующее обучение будут проводиться Ведущим исследователем; подготовка клеток будет проконтролирована специалистом Каролинского Института, Стокгольм, Швеция.

4.0 Одобрение Протокола клинического исследования

Протокол и информированное согласие одобрены на заседании Этического комитета Кубанского государственного медицинского университета от 21 декабря 2011 (протокол № 8). Новая версия протокола, брошюра исследования, добровольное информированное согласие и регистрационная карта пациента были одобрены на заседании Этического комитета Кубанского государственного медицинского университета от 15 февраля 2012 (протокол № 9), на заседании Локального этического комитета при ГБУЗ «Краевая клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского Департамента здравоохранения Краснодарского края» университета от 24 января 2012 (протокол № 45).

5.0 Краткое описание предшествующих исследований у людей

Клинический успех аналогичных операций по трансплантации искусственного трахеобронхиального дыхательного пути, проведенных в Госпитале Каролинского университета, Стокгольм, Швеция, 6 июня 2011 года и 17 ноября 2011, показал, что биоинженерный трахеобронхиальный трансплантат с использованием биоинженерных наноконструкций и аутологичных моноклеарных клеток может представлять единственный шанс на выздоровление для неизлечимых больных.¹

Предыдущие исследования подтвердили способность моноклеарных клеток периферической крови стимулировать миграцию стволовых клеток периферической

¹ Jungebluth, P, Alici, E, Baiguera S, et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. Lancet 2011 Dec 10;378 (9808):1997-2004.

крови на сегменты трансплантированной очищенной от клеток трахеи и вызвать их дифференцировку как в клетки дыхательного эпителия, так и в хрящевые клетки.²

Выполняя данную процедуру трансплантации, мы сможем не только полностью удалить пораженные дыхательные пути, но и предоставить пациенту достаточно оптимистичный шанс на излечение и нормальное качество жизни.

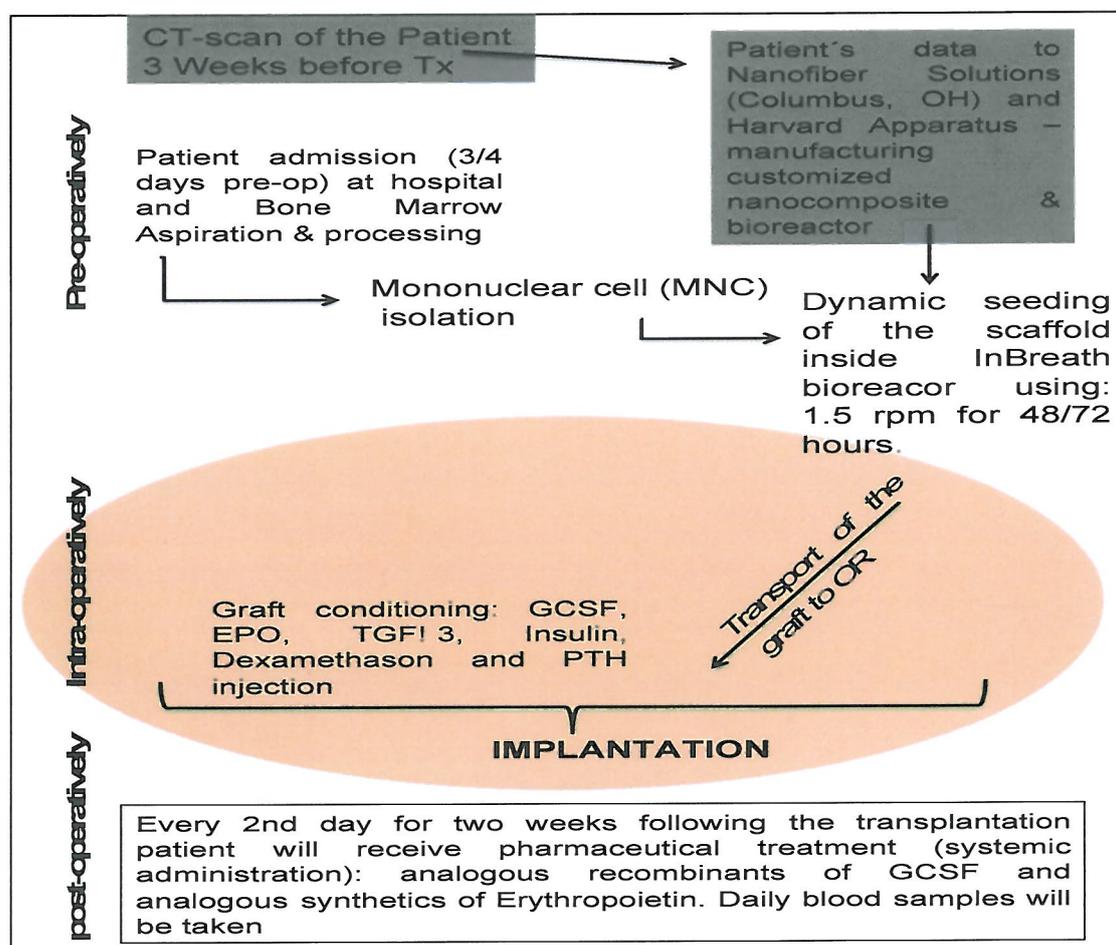


Рис. 1: Последовательность действий согласно Протоколу трансплантации трахеи, впервые примененному при пересадке нанокompозитной биоинженерной искусственной трахеи (ПЭТ биокаркас)

Описание схемы

Предоперационные процедуры:

Компьютерная томография пациента за 3 недели до трансплантации

Пересылка данных пациента компаниям Nanofiber Solutions (город Коламбус, штат Огайо) и Harvard Apparatus (или другим производителям) для производства индивидуальных нанокompозита и биореактора.

Поступление пациента в клинику (за 3/4 дня до операции), забор костного мозга и обработка. Выделение мононуклеарных клеток

Динамическое засеивание биокаркаса внутри биореактора InBreath при 1,5 об/мин, в течение 48/72 часов.

² Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet 2008; 372,2023-3030.

Интраоперационные процедуры:

Подготовка трансплантата: инъекции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF, эритропоэтина, трансформирующего ростового фактора бета-3, инсулина, дексаметазона и паратиреоидного гормона.

Транспортировка трансплантата в операционную

Трансплантация

Послеоперационные процедуры:

Пациент принимает лекарственные препараты (систематическое применение): рекомбинантные аналоги фактора G-CSF и синтетические аналоги эритропоэтина - каждые вторые сутки в течение двух недель после пересадки трансплантата. Забор крови производится ежедневно.

На сегодняшний день, две операции по трансплантации трахеи с использованием синтетического искусственного биокаркаса были успешно выполнены доктором Маккиарини совместно с коллегами из Каролинского института в Стокгольме, Швеция. При первой операции (июнь 2011 г.) использовали нанокompозитный биокаркас из POSS-PCU (полиэдрический олигомерный силсесквиоксан), а при второй операции (ноябрь 2011 г.) использовали нановолоконный композитный биокаркас из ПЭТ (полиэтилентерефталат). В обоих случаях наблюдали люминальное врастание здоровых клеток эпителия дыхательных путей.

На Рис. 2 показаны результаты бронхоскопии и эпителиальные клетки дыхательных путей после операции с применением ПЭТ-композитного нановолоконного биокаркаса в ноябре 2011, биокаркаса того же типа, что предлагается в данном протоколе. Бронхоскопия и паттерн окрашивания клеток демонстрируют появление нормальной слизистой оболочки на биокаркасе через неделю после пересадки.

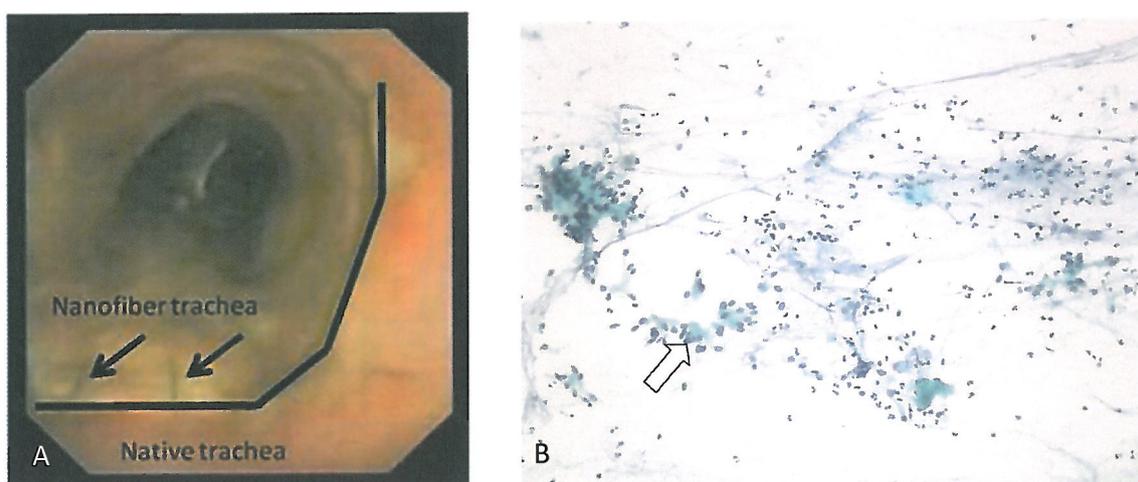


Рис 2: А. Бронхоскопия ПЭТ-нанокompозитной трахеи через неделю после имплантации (ноябрь 2011) показывает появление нормальной слизистой оболочки на биокаркасе; Б. Цилиарные дыхательные

эпителиальные клетки (белая стрелка), полученные после бронхоскопического соскабливания из центра пересаженной трахеи через неделю после имплантации. Тот факт, что биопсия из центра трансплантата была сделана почти сразу после имплантации, позволяет предположить, что эти клетки возникли вследствие дифференциации стволовых клеток, а не путем непосредственного распространения обычного эпителия в проксимальных или дистальных зонах трансплантата.

6.0 Обоснование отсутствия отказа

В ходе предыдущих исследований не было зарегистрировано каких-либо негативных последствий, которые обусловили бы отказ от предлагаемого плана исследования (протокола).

7.0 Процедура получения добровольного информированного согласия

Информация для пациентов изложена в информированном добровольном согласии (прилагается к протоколу). Форма информированного добровольного согласия для ознакомления выдается пациентам до проведения процедур, необходимых для включения в протокол исследования. Пациенту предоставляется возможность ознакомиться с содержанием информированного согласия в специальной отдельной комнате или взять с собой для ознакомления домой, получить ответы на возникшие вопросы и подписать с указанием даты и времени подписания. Все манипуляции по подготовке пациента к трансплантации, предусмотренные протоколом, начинаются после подписания согласия. Исследователь при заполнении карты пациента вносит дату и время начала ее заполнения.

8.0 Генеральный план исследования

Действия по пересадке трахеи будут выполнены последовательно, как показано на Рис. 1 "Последовательность действий согласно Протоколу трансплантации трахеи, впервые примененного при пересадке нанокompозитной биоинженерной искусственной трахеи (ПЭТ биокаркас)".

Предоперационная оценка будет включать следующие процедуры:

- Томография шеи и груди, а также трехмерная реконструкция дыхательных путей
- Жесткая / гибкая фибробронхоскопия
- Оценка сердечной функции (сканирование с таллием во время нагрузки)
- Оценка дыхательной функции (спирометрия)
- Анализ крови, включая факторы свертывания крови
- Оценка функции печени и почек
- Иммуногенные оценки образца периферической крови для определения фенотипа HLA и серологических инфекций (ВИЧ, сифилис, ВЭБ и т.д.)

- Оценка базального уровня кроветворных стволовых клеток пациента. Примерно 30 мл периферической крови будет взято при поступлении для оценки базального уровня гемопоэтических стволовых клеток, и часть этого образца будет заморожена для дальнейших анализов
 - Оценка базального уровня эндогенного эритропоэтина в периферической крови.
- В случае успешной предоперационной оценки образцы костного мозга будут отобраны примерно за 1-4 недели до операции.

Забор мононуклеарных клеток костного мозга и засеивание биокаркаса [за 48 или 72 часов до пересадки, в зависимости от необходимой формы биокаркаса (трубчатая или раздвоенная форма)]

- Процедура будет производиться под общим наркозом
- Будет отобрано примерно 250-300 мл костного мозга (КМ); КМ будет передан в отделение гематологии или другое отделение для выделения мононуклеарных клеток (МНК)
- Клеточная среда DMEM (Среды Игла в модификации Дульбекко)* + аутологическая сыворотка (10%) + антибиотики
- Образец периферической крови (50 мл) будет отобран с гепарином (в операционной) и передан в лабораторию для выращивания клеточных культур с соблюдением надлежащей производственной практики. Полученные МНК будут изолированы и заморожены в жидком азоте.
- Бронхоскопия и бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). Необходимо сохранить БАЛ (отобрать супернатант, добавить PBS, осадить клетки центрифугированием и заморозить)
- Биореактор будет стерилизован предварительно (локально, с помощью плазменной стерилизации, согласно требованиям производителя)
- Синтетический биокаркас будет стерилизован спиртом (этанол) или посредством гамма-облучения, а затем инкубирован в клеточной среде в течение 2 часов перед добавлением клеток
- Необходимые материалы: швы и щипцы, стерилизованные ножницы
- Инкубатор

- Посев и выращивание клеток на синтетическом биокаркасе (сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), микроскопические исследования живых клеток, гистология)

* - среды и их производители могут меняться

За 48 часов до трансплантации:

Пациент получит стимулирующую терапию для мобилизации клеток с помощью внутривенных инъекций рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (филграстим, 10 мкг/кг, не более 30 млн. МЕ) и эритропоэтина (эритропоэтин альфа или бета, не более 40 000 МЕ).^{3,4,5}

Пациент получит полную и точную информацию с использованием формы информированного согласия, в устной и письменной форме, о рисках терапевтической процедуры.

Процедура подготовки клеток

Процедура выделения костного мозга и дальнейшие манипуляции

За 72/48 часов до пересадки (в зависимости от требуемой формы биокаркаса: раздвоенная или трубчатая) пробы костного мозга (КМ) будут отобраны путем билатеральной многократной аспирации из гребня подвздошной кости, общим объемом 250-300 мл. Эта процедура будет проводиться под общим наркозом и длиться примерно 20 минут. Эксплантированный материал будет передан в гематологическое отделение (или в другое отделение) для выделения моноклеарных клеток (МНК). МНК будут получены путем разделения в градиенте плотности с фиколом, при плотности 1,077 г/мл. После разделения клетки будут трижды промыты физиологическим раствором (с добавлением 5% альбумина человека) для устранения остаточного фикола и оставлены в растворе, состоящем исключительно из компонентов, одобренных для клинического применения. Вся процедура будет осуществляться в закрытой системе (Sepax 3 Biosafe America Inc, Хьюстон, штат

³Haas R, Murea S. The role of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization and transplantation of peripheral blood progenitor and stem cells. *Cytokines MolTher*. 1995;1: 249-70.

⁴Jia Y, Warin R, Yu X, Epstein R, Noguchi CT. Erythropoietin signalling promotes transplanted progenitor cell survival. *FASEB J*. 2009;23(9):3089-99.

⁵Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J InternMed*. 2008;264(5):405-32.

Техас) для гарантии стерильности и полной автоматизации процесса.⁶ Изолированные МНК будут перенесены в пакет объемом 600 мл со средой “Игла, модифицированная по способу Дульбекко” (DMEM) (с добавлением 10% альбумина человека) при температуре 4°C и переданы в лабораторию GMP для заполнения синтетического биокаркаса (стерилизованного этанолом или гамма-излучением), после инкубации в среде (DMEM) в течение 2 часов. После того, как биокаркас будет зафиксирован в биореакторе, МНК (в среде DMEM) будут посеяны на поверхность трансплантата. Затем будут добавлены соответствующая среда и ростовые факторы (10 нг/мл рекомбинантного трансформирующего фактора роста β -3 человека (R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота, США), 10 нмоль/л рекомбинантного паратиреоидного гормон-родственного пептида (PeproTech), 100 нмоль/л дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина (оба - Sigma-Aldrich, Дорсет, Великобритания). Биореактор будет помещен в инкубатор и запущен с начальной скоростью 1 цикл в минуту в течение 18 часов, затем скорость будет поэтапно увеличена до 1,5 циклов в минуту. По истечении 48/72 часов камера будет помещена в стерильный контейнер и аккуратно перенесена в операционную.

Изолированные МНК будут проверены на следующие показатели:

- Количество моноклеарных клеток (МНК): минимальное количество 2×10^6 клеток/мл
- Жизнеспособность клеток, путем цитофлюорометрического анализа (7-AAD): интервал 94-98%
- Оценка мезенхимальных клеток-предшественников CFU-F
- Оценка гемопоэтических клеток-предшественников CD34+

В общей сложности 15×10^6 клеток будут отдельно помещены в три крио-флакона и заморожены в ДМСО в соответствии со стандартной процедурой для последующего анализа контроля качества. Стерильный трансплантат будет затем повторно засеян

⁶ Dal Pozzo S, Urbani S, Mazzanti B, et al. High recovery of mesenchymal progenitor cells with non-density gradient separation of human bone marrow. *Cytotherapy*. 2010; 12(5):579-86.

клетками в операционной, непосредственно перед имплантацией (см. Трансплантация дыхательных путей, стр. 14.)

Нанокompозитный биоинженерный трансплантат дыхательных путей

Компания Nanofiber Solutions (доктор Джед Джонсон, Колумбус, штат Огайо) разработала трансплантат трахеи и трахеобронхиальных дыхательных путей, который сделан из полиэтилентерефталата (ПЭТ). ПЭТ успешно используется в течение более 10 лет для производства компонентов хирургических имплантатов и медицинских устройств, начиная от нерассасывающихся шовных ниток и включая сосудистые трансплантаты и ортопедические имплантаты. Предлагаемый полимер для изготовления трансплантата трахеи является биологически неабсорбирующим полиэтилентерафталатом, который был трансформирован в нановолокна (средний диаметр 350 нм), встроен в полукруглые распорки, изготовленные из материала Dacron, и образует нанокompозит, полностью биосовместимый и имеющий волоконную нано-структуру природной трахеи (см. Рис. 3 и 4).

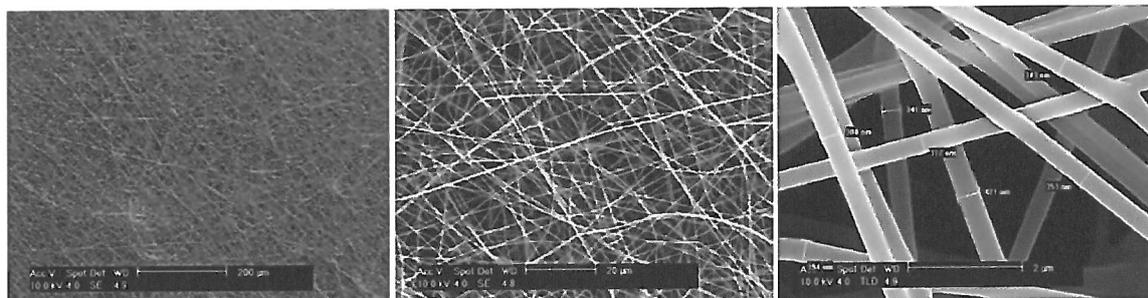


Рис. 3. Трансформированные нановолокна с диаметром в интервале 300 - 400 нм.

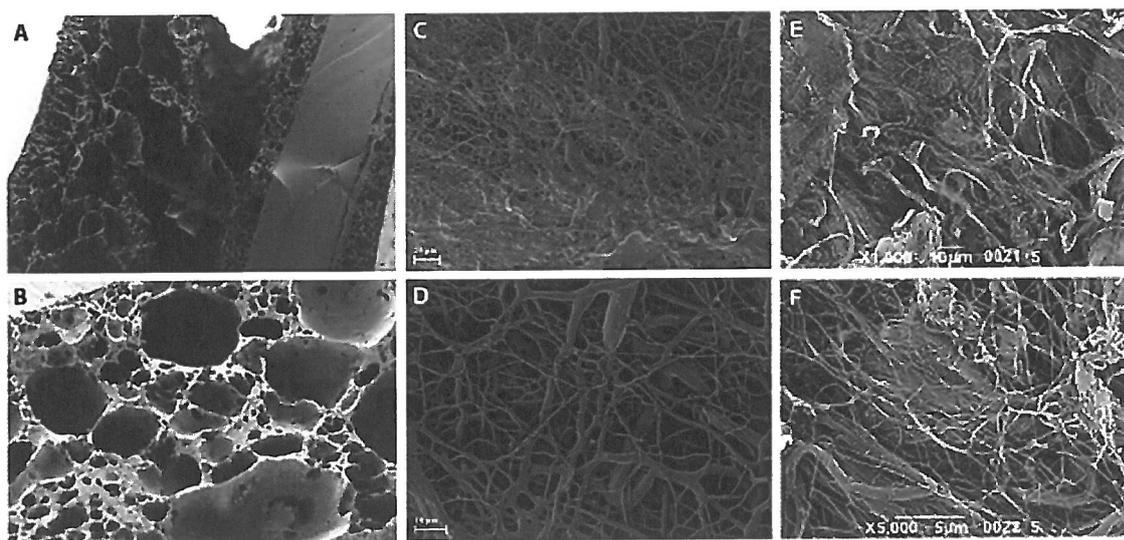


Рис. 4: Ультраструктурное сравнение нанокомпозитов POSS-PCE (сегменты А, В) и ПЭТ (сегменты С, D). ПЭТ нанокомпозиты лучше имитируют внешний вид натуральной трахеи человека после удаления клеток (сегменты E, F).

Последние опубликованные исследования показали, что трехмерные биокаркасы из ПЭТ полностью биосовместимы с кроветворными клетками человека и даже могут стимулировать экспансию клеток CD34+.⁷ Дополнительные данные по биосовместимости можно найти в Приложении 1 в конце описания данной процедуры.

Обширные исследования *in vitro* и долгосрочные исследования ПЭТ *in vivo* на токсичность и биосовместимость были проведены ранее.^{7,8,9,10,11,12,13,14} Кроме того,

⁷ Feng Q, Chai C, Jiang X, et al. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A*; 2006 September 15; 78(4):781-791.

⁸ Acocella F, Brizzola S, et al. Prefabricated tracheal prosthesis with partial biodegradable materials: a surgical and tissue engineering evaluation *in vivo*. *Journal of Biomaterials Science; Polymer Edition* 2007; 18(5):579-594.

⁹ Rainer A, Centola M, et al. Comparative study of different techniques for the sterilization of poly-L-lactide electrospun microfibers: effectiveness vs. material degradation. *Intl Jour Artificial Organs* 2010;33(2):76-85.

¹⁰ Kaschke O, Gerhardt HJ, Böhm K, et al. Experimental *in vitro* and *in vivo* studies of epithelium formation on biomaterials seeded with isolated respiratory cells. *J Invest Surg* 1996; 9:59-79.

¹¹ Zhu Y, Leong MF, et al. Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly (L-lactide-co-caprolactone)(PILC)nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2007; 28(5):861-868.

¹² Komura M, Komura H, et al. An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J PedSurg* 2008; 43(12): 2141-2146.

¹³ Tsukada H, Matsuda S, et al. Comparison of bioabsorbable materials for use in artificial tracheal grafts. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2009; 8(2):225-229.

биоволоконный нанокompозит был успешно использован для трансплантации, которая была проведена в Швеции, в Госпитале Каролинского Университета в ноябре 2011 года. В ходе ноябрьского исследования моноклеарные клетки выделяли из аспирата костного мозга и высевали на биокаркас с помощью плазмастерилизованного биореактора, который описан ниже. Результаты показали улучшение приживаемости клеток (увеличение числа клеток, улучшение ориентации и накопление внеклеточного матрикса) для биокаркаса из ПЭТ по сравнению с биокаркасами из POSS (см. Рис. 5 и 6).

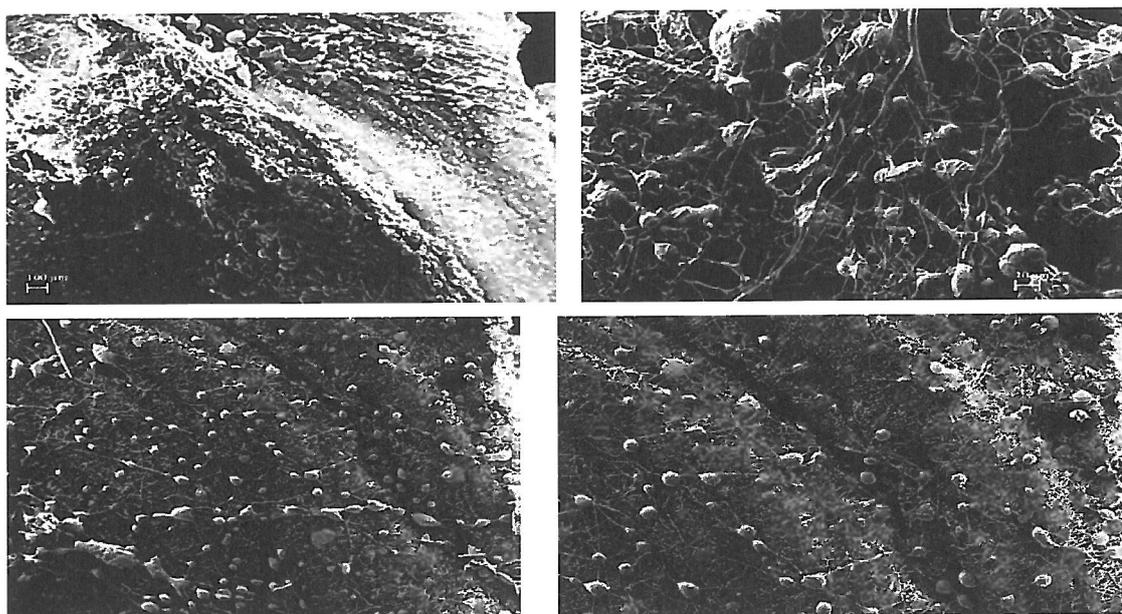


Рис. 5: ПЭТ-нанокompозитная структура после посева аутологических клеток-предшественников

¹⁴Kanzaki M, Yamato M, et al. Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. *Tissue Engineering* 2006; 12(5):1275-1283.

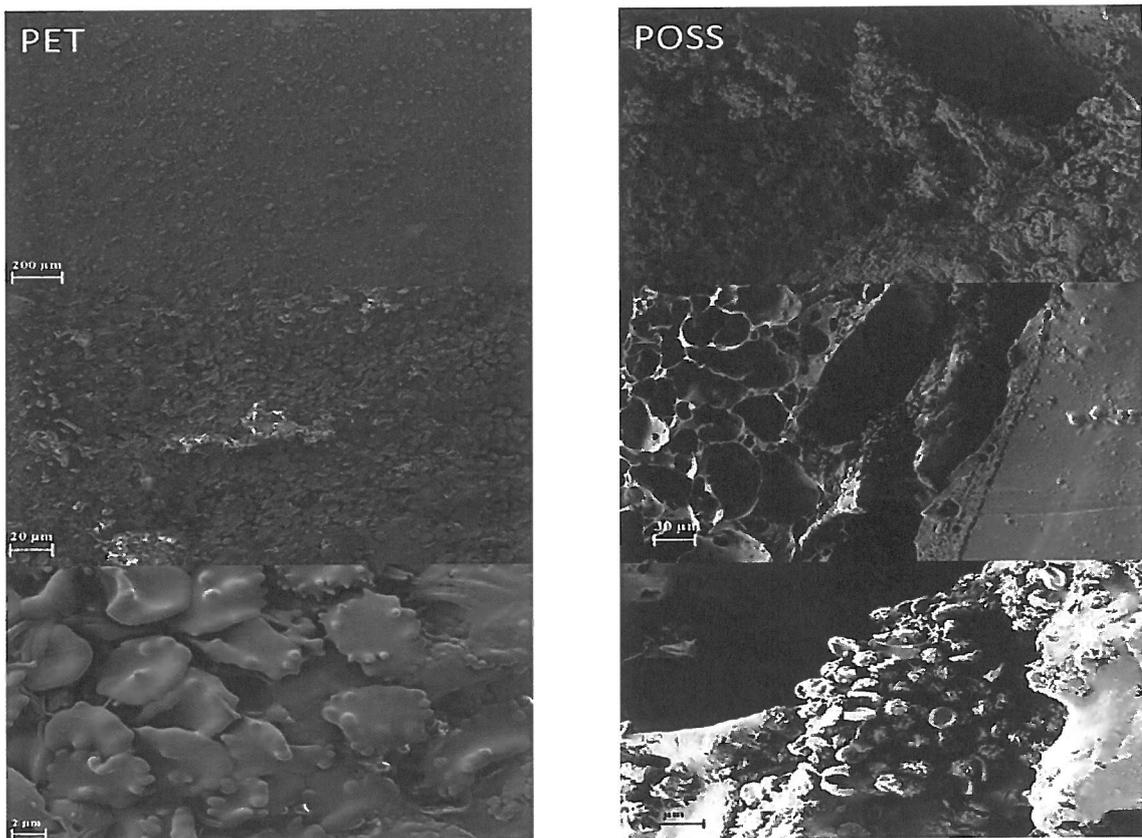


Рис. 6: Биокаркас из ПЭТ дает более высокую приживляемость клеток по сравнению с биокаркасом из POSS-PCU.

Мы предлагаем изготовление для пациентов индивидуального синтетического биоинженерного трансплантата трахеи на основании результатов недавней компьютерной томографии и эндоскопического исследования; трансплантат будет изготовлен из трансформированных полимерных нановолокон (Nanofiber Solutions®, Колумбус, Огайо, США), имеющих механические и структурные свойства, которые имитируют естественные дыхательные пути (Рис. 4). Компания Nanofiber Solutions изготовит хрящевые кольца трахеи с механическими свойствами, близкими к свойствам натуральной трахеи для ее устойчивости к механическому коллапсу. Хрящевые кольца будут зажаты между нановолокон и помещены с регулярными интервалами в специальную форму, в точности повторяющую форму трахеи пациента, затем трансформированные нановолокна будут использованы для покрытия каждого кольца внутри и снаружи, соответственно.

Компания Nanofiber Solutions не видит каких-либо проблем с точки зрения изготовления устройства. Как описано ранее, инертная природа полимера, в сочетании с биомиметической топографией поверхности трансформированных нановолокон трансплантата обеспечивает необходимые свойства поверхности для улучшенной приживляемости клеток, включая моноклеарные и эпителиальные клетки, специфичные для трахеи.

Биореактор InBreath

Данный протокол включает дизайн биореактора, ранее использованного нашей группой в ходе проведенной впервые успешной имплантации человеку биоинженерной трахеи. Устройство, известное под рыночным названием InBreath 3D Organ Bioreactor (Harvard Bioscience, Холлистон, штат Массачусетс), размещается внутри инкубатора для культивирования клеток и состоит из отдельной камеры из полисульфона, в которую помещают искусственные органы, а также моторного блока и пульта управления. Информацию о материалах, использованных в конструкции биореактора, можно найти в Приложении 2.

Камера биореактора InBreath легко отделяется от моторного блока и может подвергаться плазменной стерилизации. Мотор обеспечивает постоянное вращение клеточной основы внутри камеры, обеспечивая, таким образом, контролируемое воздействие гидродинамических сил на растущий трахейный трансплантат. Защитный корпус полностью покрывает бесщёточный электромотор, защищая его от коррозионного действия влаги, образующейся внутри инкубатора (Рис. 7). Пульт управления помещается вне инкубатора, давая возможность настраивать скорость вращения дистанционно, не затрагивая инкубатор.

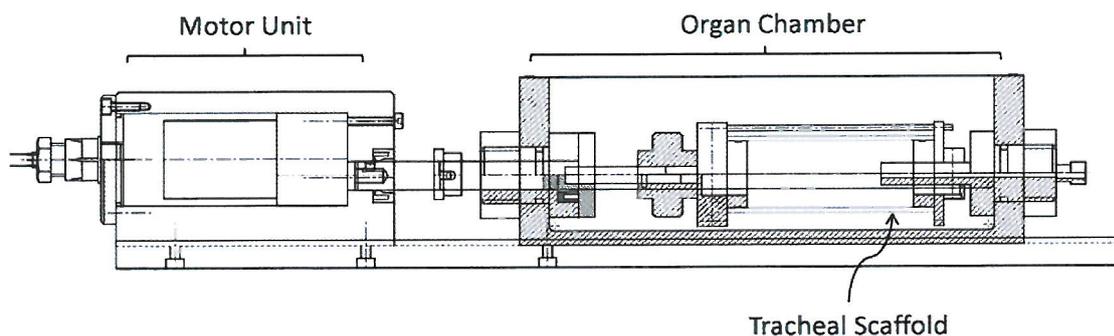


Figure 7: Биореактор InBreath® 3D Organ Bioreactor, Harvard Bioscience, Холлистон, штат Массачусетс

Согласно данному протоколу, синтетический биокаркас будет специально изготовлен для пациента с использованием синтетического материала (ПЭТ). Как внутренние, так и наружные поверхности биокаркаса будут засеяны в биореакторе аутологичными недифференцированными моноклеарными клетками.

Засев биокаркаса клетками

1. Изолированные МНК будут помещены в пакет, содержащий 300 мл DMEM (с добавлением 10% альбумина человека) при температуре 4° С для транспортировки из операционной в лабораторию, работающую по принципам GMP (надлежащей производственной практики).
2. Биокаркас (стерилизованный этанолом или гамма-излучением), биореактор (плазменно-стерилизованный) и хирургические инструменты (автоклавированные) будут доставлены в стерильную комнату для культивирования клеток.
3. Все лица, которые будут выполнять манипуляции с клетками / биореактором и биокаркасом, должны выполнять требования надлежащей производственной практики, в том числе - иметь стерильные перчатки, специальную защитную одежду и т.д.
4. Биореактор будет открыт в вытяжном шкафу в стерильных условиях и помещен на стерильную поверхность.
5. После этого исследователю необходимо использовать новую пару стерильных перчаток.

6. Биокаркас будет извлечен из первичной стерильной упаковки и закреплен внутри биореактора в соответствующих креплениях.
7. После того, как биокаркас будет закреплен внутри биореактора, МНК (+ DMEM) будут засеяны на поверхности биокаркаса.
8. Среда (с добавлением аутологичной плазмы и альбумина человека) общим объемом 250 мл, будет добавлены в камеру биореактора.
9. Следующие ингредиенты будут добавлены к среде (см. Приложение 3 "Список биологических агентов и характеристика TGF-β3"): 10 нг/мл рекомбинантного трансформирующего фактора роста β-3 человека (R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота, США), 10 нмоль/л рекомбинантного паратиреоидного гормон-подобного пептида (PergoTech), 100 нмоль/л дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина (оба - Sigma-Aldrich, Дорсет, Великобритания).

(Примечание: здесь и далее упомянуты компании-производители, продукция которых была использована в предыдущих трансплантациях. Возможно использование продукции других производителей).

10. После этого биореактор будет помещен в инкубатор и закрыт в камере (включая биокаркас и МНК + 250 мл среды).
11. ПРИМЕЧАНИЕ: трахеобронхиальный биокаркас раздвоенной формы не соответствует должным образом форме камеры биореактора, и это может привести к динамическому напряжению внутренней части биореактора. Это напряжение (сдвиг) будет передано через внешние связи на электромотор и может привести к прекращению вращения камеры электромотором. В этом случае биореактор необходимо контролировать вручную каждые 20 минут. В случае низкой скорости сдвига под воздействием динамического напряжения, можно уравновесить камеру с каким-либо предметом для обеспечения непрерывной связи между этими двумя компонентами. В случае значительного динамического напряжения (сдвига), необходимо понять, будет ли дополнительное воздействие безопасным для биокаркаса. Как правило, такое воздействие является неблагоприятным для трубчатого биокаркаса.
12. Биореактор будет запущен с начальной скоростью 1 оборот в минуту в течение 18 часов, а затем поэтапно скорость будет увеличена до 1,5 оборотов в минуту.

13. По истечении 24 часов, 50 мл вышеупомянутой среды будут добавлены внутрь камеры до общего объема 300 мл.
14. По истечении 48/72 часов, камера будет помещена в стерильный контейнер и аккуратно перенесена в операционную комнату.

Трансплантация дыхательных путей

Пациент будет подвергнут общему наркозу и интубирован при помощи одной эндотрахеальной трубки. Все имеющиеся Т-трубки будут удалены. Пациент также будет подвергнут аспирации костного мозга, согласно процедуре подготовки клеток (см. выше). Срединная стернотомия будет осуществлена в положении лежа. После резекции поврежденного сегмента дыхательных путей в трансплантат дыхательных путей будут введены (кондиционирование) ростовые факторы, включая 10 нг/мл рекомбинантного трансформирующего фактора роста β -3 человека (R & D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота, США), 10 нмоль/л рекомбинантного паратиреоидного гормон-родственного пептида (PeproTech), 100 нмоль/л дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина (оба - Sigma-Aldrich, Дорсет, Великобритания, G-CSF (10 мкг/кг) и эритропоэтин (40 000 МЕ), для стимуляции мобилизации периферических гемопоэтических клеток.^{3,14} Имплантат будет подогнан по размеру, а затем - анастомозирован проксимально и дистально для исправления дефекта дыхательных путей при использовании нерассасывающихся нитей, таких как Cardionyl 3/0 (Peters Surgical). Затем он будет покрыт путем оборачивания основным лоскутом ткани сальника (васкуляризированная жировая ткань отделяется от большого изгиба желудка и правой желудочно-сальниковой артерии и переносится на медиаститум диафрагматически или субстернально) для обеспечения долгосрочной защиты трансплантата и анастомоза, а также для стимуляции непрямой неоваскуляризации трансплантата.

Тесты на стерильность

Для оценки риска бактериального/грибкового заражения среда будет исследована под микроскопом до начала трансплантации. Качество всех компонентов среды проверяется компаниями-изготовителями, они остаются нераспечатанными вплоть до

процедуры посева клеток. Последующая оценка качества среды проводится по завершении биоинженерного процесса. (Таблица 2).

Таблица 2 — Тесты и критерии приемлемости

Анализ	Критерий приемлемости / Метод
Стерильность	Стерильно / Критерии стерильности (Евр. Ф. 2.6.1)
Эндотоксины	<0,5 эндотоксиновых единиц/мл / Лал-тест
Микоплазма	Микоплазма не обнаружена / Культивация

*British Pharmacopoeia Volume IV. Appendix XVI A. Test for Sterility

Образец клеточной среды с культурой МНК будет добавлен во флакон для выращивания клеток крови незадолго до процедуры инкубации. Появление любой чужеродной культуры в этих образцах в течение последующих 48-72 часов будет считаться важным событием и может привести к прекращению всей процедуры. Во время инкубационного периода в биореакторе, через 24 часа после открытия биореактора и помещения в него свежей среды, образцы жидкости из биореактора, а также образцы свежей среды будут также добавлены во флаконы для выращивания клеток крови и инкубированы для проверки на контаминацию. В день хирургической имплантации, как уже упоминалось выше, нео-трахеи будут оцениваться на предмет роста клеток и покрытия ими поверхности биокаркаса; в этот момент образцы среды из биореактора будут направлены на анализ СТАТ - окрашивание по Граму, а также инокулированы во флаконах для выращивания клеток крови. Если окрашивание по Граму даст отрицательный результат, трансплантат будет считаться стерильным и готовым по микробиологическим характеристикам для имплантации в организм пациента. Небольшой кусочек трансплантата будет отобран в операционной непосредственно перед имплантацией для последующего анализа клеточной культуры. Он будет помещен в пробирку для стандартного мазка и подвергнут стандартному анализу для проверки дренажной жидкости из раны. Все образцы будут проанализированы в общей сложности за 14 дней, чтобы оценить наличие микобактериальных и грибковых инфекций. Сертификаты анализа будут включены в отчеты.

Послеоперационные процедуры

Для стимулирования процесса регенерации в послеоперационный период пациент будет получать фармакологические средства посредством следующих системных инъекций:

а) рекомбинантные аналоги GCSF (филграстин, 10 мкг/кг/день, не более 30 мкг/кг/день)

б) синтетические аналоги эритропоэтина (эритропоэтин альфа или бета, не более 40000 МЕ).

Оба этих фактора будут вводиться в соответствующих концентрациях (в восстановительной дозах, не связанных с какими-либо побочными эффектами) для стимуляции мобилизации / трансформации клеток-предшественников / стволовых клеток костного мозга.^{3,4,5,15,16} Каждый день будут контролироваться плазменный уровень эритропоэтина и подсчёт форменных элементов крови (в том числе лейкоцитарная формула крови). Уровни выше 50 000 - 60 000 лейкоцитов в крови будут считаться проявлением токсичности и, как следствие, будут снижены дозы / прекращена терапия. Лечение будет проводиться через день в течение 2 недель после трансплантации.

Последующее врачебное наблюдение

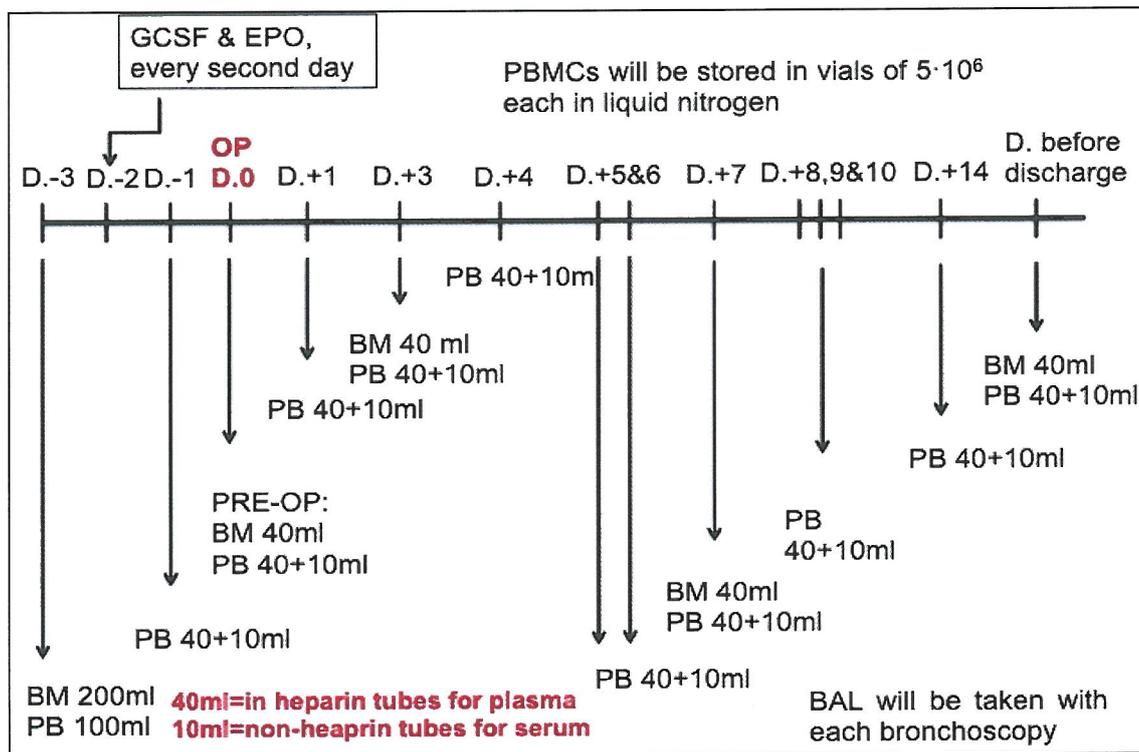
Последующее врачебное наблюдение будет включать в себя:

- Эндоскопия (гибкая и / или жесткая бронхоскопия) трансплантированных дыхательных путей - каждый день или через день (по клиническим показаниям) в течение первой недели и по меньшей мере один раз перед выпиской из больницы. Бронхоскопия будет выполняться ежемесячно в течение первых шести месяцев, а затем - каждые 6 месяцев в течение первых 5 лет. Образцы слизистой оболочки дыхательных путей должны быть собраны и будут храниться для анализов качества.
- Подсчёт форменных элементов крови, включая лейкоцитарную формулу крови) - каждый день в течение первых двух недель.

¹⁵ Bader A, Macchiarini P. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach. J Cell Mol Med 2010; 14(7):1877-89.

¹⁶ Jungebluth P, Moll G, Baiguera S, Macchiarini P. Tissue engineered airway: a regenerative solution. Clin Pharm Ther 2012; 91:81-93

- Оценка и подсчет мобилизованных клеток-предшественников - согласно нижеприведенному графику:



- Оценка иммуногенности. По истечении 3, 7 и 30 дней после трансплантации будут отобраны образцы крови для анализа гистосовместимости посредством изучения антител. Последующие иммуногенные исследования будут также осуществлены через 3, 6 и 12 месяцев после трансплантации.
- Компьютерная томография шеи и груди с трехмерной реконструкцией пересаженных дыхательных путей будет сделана в течение первого, третьего и шестого месяцев в ходе последующего врачебного наблюдения, а затем - каждые 6 месяцев в течение первых 5 лет.
- Последующее онкологическое наблюдение будет вестись в течение всей жизни пациента и включать стандартные обследования.

9.0 Ожидаемые риски

Положительный эффект данной операции, как предполагается, превышает риск, поскольку данная процедура может явиться единственным возможным шансом на излечение для некоторых пациентов. Подготовка клеток будет проводиться в соответствующей лаборатории с соблюдением надлежащей практики производства, кроме того, перед трансплантацией трахеи будут проведены многочисленные тесты на стерильность для всех клеток и материалов. В случае, если стерильность клеток и материалов будет под вопросом, что представляется маловероятным, вся процедура будет немедленно прекращена.

10.0 Нежелательные явления

Возможными осложнениями данной трансплантации являются послеоперационные кровотечения, повреждения *nervus recurrens*, респираторные инфекции, несостоятельность анастомоза, инфицирование раны, дыхательная недостаточность и необходимость искусственной вентиляции. Все нежелательные явления должны быть документально зарегистрированы и доведены до сведения Ведущего исследователя, спонсора, и комитетов по этике университета и лечебного учреждения.

Адрес и телефон клиники для экстренных случаев ГБУЗ «Краевая клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского Департамента здравоохранения Краснодарского края» по адресу: 350086, г. Краснодар, ул. Первого Мая, д. 167, тел.:(861) 252-73-02, 260-35-11, заведующий онкологическим отделением, врач высшей категории, к.м.н. Поляков Игорь Станиславович

11.0 Введение поправок

Данный план клинических исследований не может быть изменен без письменного разрешения Ведущего исследователя, финансирующей организации и комитета по этике университета и клиники. Поправки могут потребовать нормативно-правового одобрения до их вступления в силу. Все поправки к протоколу, карте больного и информированного согласия пациента должны получить одобрение локального этического комитета университета и клиники.

12.0 Политика в отношении публикаций

Результаты данного исследования могут быть использованы для публикации.

13. Индивидуальная регистрационная карта (отдельное приложение)

Приложение 1: Биосовместимость, приживляемость/пролиферация клеток и механические характеристики медицинских устройств из ПЭТ, доступных на рынке в настоящее время

Материал биокаркаса: Полиэтилентерефталат (ПЭТ), не рассасывающийся

Резюме по биосовместимости: Полиэтилентерефталат успешно используется уже более десяти лет для производства многочисленных хирургических имплантатов и медицинских устройств, начиная от сосудистых и внутрисердечных трансплантатов и заканчивая нитками для хирургических швов.

Компания Nanofiber Solutions (Коламбус, штат Огайо) разработала трахейный и трахеобронхиальный биокаркасы, имитирующие нановолоконную структуру натуральной трахеи (Рис. 8). Данные биокаркасы изготовлены из нерассасываемого полиэтилентерефталата, трансформированного в нановолокна со средним диаметром 350 нм.

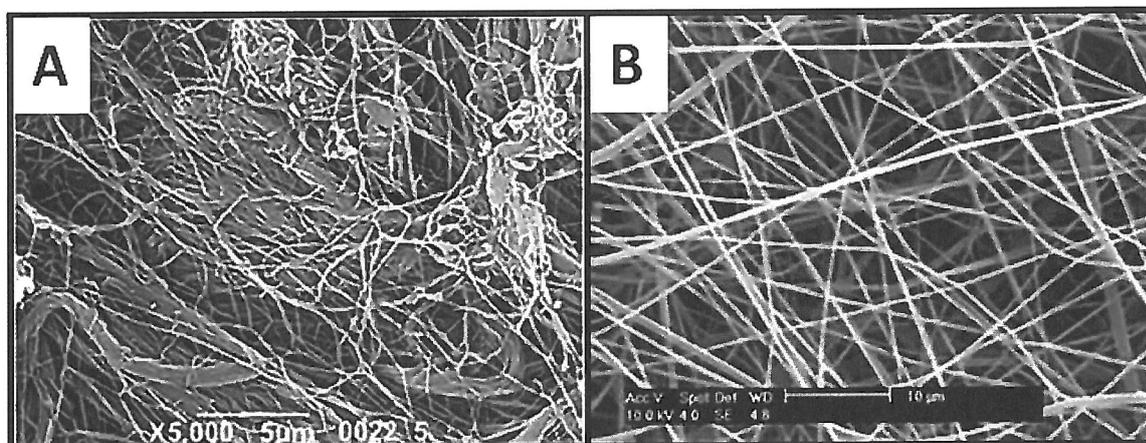


Рис. 8. Сканирующая электронная микрофотография очищенной от клеток трахеи человека (А) и искусственной ПЭТ трахеи, изготовленной в компании Nanofiber Solutions (В).

Искусственный трансплантат трахеобронхиального пути с использованием биокаркаса из ПЭТ-материала уже был успешно пересажен в Госпитале Каролинского Университета, Стокгольм, Швеция, в ноябре 2011. Клинический успех этой операции указывает на то, что биоинженерный трахеобронхиальный трансплантат с использованием биоинженерного нанокompозита и аутогенных мононуклеарных клеток может представлять собой единственный шанс на излечение для некоторых пациентов.

Мы предлагаем использовать тот же материал для биокаркаса и те же процедуры его изготовления, которые были успешно применены при пересадке, проведенной с

использованием данного протокола трансплантации трахеи в ноябре 2011 г. Полимерные нанокompозиты из ПЭТ тщательно изучались на клеточную совместимость, и недавняя операция, проведенная в Госпитале Каролинского Университета, продемонстрировала их способность обеспечивать приживляемость и пролиферацию аутологичных мононуклеарных клеток и раннюю (7 дней) реэпителизацию клетками дыхательного эпителия.

Заключение: Информация о биосовместимости имплантируемых протезов спинного мозга, пищевода и сердечных клапанов, изготовленных из подобного ПЭТ-материала, приведена ниже в таблице. Все данные подтверждают отличную биосовместимость потиэтилентерефталата при его использовании в качестве материала для медицинских имплантатов жизненно важных органов. Эти данные, а также успешная пересадка трахейного трансплантата пациенту в ноябре 2011 г., продемонстрировавшая отличную биосовместимость, позволяют заключить, что предлагаемый материал биокаркаса удовлетворяет требованиям биосовместимости и является безопасным для использования.

Данные о биосовместимости медицинских устройств из ПЭТ, доступных на рынке в настоящее время

Тест на биосовместимость Per ISO 10993	Критерии приемлемости	Ссылка #1—спинальный имплантат Zimmer Dynesys (FDA 510(k) K092234)-Компонент спинного мозга ¹⁷	Ссылка #2—эндоскопический имплантат Enteryx™ для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (FDA PMA P020006) ¹⁸	Ссылка #3—сердечный чрезкатетерный клапан Edwards Sapien™ (FDA PMA P010041) ¹⁹	Ссылка #4—Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ биопротез, модель 2650 (аортный) (FDA PMA P10041) ²⁰
Цитотоксичность	0, 1 или 2 (нетоксично)	СООТВЕТСТВУЕТ (0 для всех)	СООТВЕТСТВУЕТ (Отсутствие признаков токсичности)	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксично)	СООТВЕТСТВУЕТ

¹⁷ Zimmer Spine FDA Executive Summary, 2009, for K092234: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/medicaldevices/medicaldevicesadvisorycommittee/orthopaedicandrehabilitationdevicespanel/ucm188734.pdf>

¹⁸ Enteric Medical Technologies FDA Summary of Safety and Effectiveness, 2003, for P020006: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3921b1_SSED.pdf

¹⁹ Edwards SAPIEN™ Transcatheter Heart Valve FDA Summary of Safety and Effectiveness, 2011, for P010041: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/CirculatorySystemDevicesPanel/UCM262936.pdf>

²⁰ Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ Bioprosthesis, Model 2650 (Aortic) FDA Summary of Safety and Effectiveness, 2002, P010041: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/P010041b.pdf

Тест на биосовместимость Per ISO 10993	Критерии приемлемости	Ссылка #1—спинальный имплантат Zimmer Dynesys (FDA 510(k) K092234)-Компонент спинного мозга ¹⁷	Ссылка #2—эндоскопический имплантат Enteryx™ для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (FDA PMA P020006) ¹⁸	Ссылка #3—сердечный чрескатетерный клапан Edwards Sapien™ (FDA PMA P010041) ¹⁹	Ссылка #4—Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ биопротез, модель 2650 (аортный) (FDA PMA P10041) ²⁰
		образцов; нетоксичный)			(ингибирование - 0%)
Острая системная токсичность	Тестируемый имплантат должен продемонстрировать ≤ биологическую реакцию по сравнению с контрольной группой (мыши); < 2 мышей могут иметь признаки токсичности; < 3 мышей могут продемонстрировать потерю веса >2 г	СООТВЕТСТВУЕТ (не наблюдается признаков токсичности и потери веса >2 г)	СООТВЕТСТВУЕТ (удовлетворяет критериям Фарм. США (USP))	СООТВЕТСТВУЕТ (Никаких изменений в течение 72 часов)	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксично)
Тест на раздражение	Показатель основного первичного раздражителя (PI) Шкала от 0 – 0,4 (незначительный); не вызывает раздражения	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает раздражения; PI; категория раздражения =0)	СООТВЕТСТВУЕТ (удовлетворяет критериям USP)	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает раздражения)	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает раздражения)
Тест на мутагенность	Менее, чем двукратное увеличение числа ревертантных колоний на чашку по сравнению со средним числом колоний контрольной группы для каждого штамма	СООТВЕТСТВУЕТ (немутагенный; менее, чем двукратное увеличение для каждого штамма)	СООТВЕТСТВУЕТ (негативные результаты)	СООТВЕТСТВУЕТ (негативные результаты)	Не проводился

Тест на биосовместимость Per ISO 10993	Критерии приемлемости	Ссылка #1—спинальный имплантат Zimmer Dynesys (FDA 510(k) K092234)-Компонент спинного мозга ¹⁷	Ссылка #2—эндоскопический имплантат Enteryx™ для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (FDA PMA P020006) ¹⁸	Ссылка #3—сердечный чрезкатетерный клапан Edwards Sapien™ (FDA PMA P010041) ¹⁹	Ссылка #4—Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ биопротез, модель 2650 (аортный) (FDA PMA P10041) ²⁰
Аллергическая проба	Класс <1 или отсутствие кожной аллергической реакции, превышающей реакцию контрольной группы. С использованием модели Magnusson-Klingman, Класс 1, Класс аллергической реакции «Слабый аллерген»	СООТВЕТСТВУЕТ (реакция не превышает 0; аллергическая реакция 0%); классифицируется как Класс 1 (Слабый аллерген)	СООТВЕТСТВУЕТ (Класс 1 Слабая реакция, эквивалентна негативному контролю)	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает аллергической реакции)	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает аллергической реакции)
Тест на пирогенность	Температурная разница не превышает 0,5 °C от исходной температуры через 1-3 часа после введения	СООТВЕТСТВУЕТ (непирогенный; у животных не наблюдалось повышения температуры более чем на 5 градусов Цельсия)	Не проводился	СООТВЕТСТВУЕТ (не было зарегистрировано повышения или изменения температуры)	Не проводился
Тест на генотоксичность/мутации клеток млекопитающих	Немутагенный, если изолированная культура тестируемого образца имеет частоту мутаций менее, чем двукратное увеличение для раствора контрольной группы	СООТВЕТСТВУЕТ (экстракты не проявили мутагенности)	СООТВЕТСТВУЕТ (негативные результаты)	СООТВЕТСТВУЕТ	Не проводился
Анализ аберраций хромосом	Немутагенный, если значение $p > 0,05$ для тестируемого	СООТВЕТСТВУЕТ (немутагенный; нет)	СООТВЕТСТВУЕТ (негативные результаты)	СООТВЕТСТВУЕТ (немутагенный)	СООТВЕТСТВУЕТ (немутагенный)

Тест на биосовместимость Per ISO 10993	Критерии приемлемости	Ссылка #1—спинальный имплантат Zimmer Dynesys (FDA 510(k) K092234)-Компонент спинного мозга ¹⁷	Ссылка #2—эндоскопический имплантат Enteryx™ для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (FDA PMA P020006) ¹⁸	Ссылка #3—сердечный чрезкатетерный клапан Edwards Sapien™ (FDA PMA P010041) ¹⁹	Ссылка #4—Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ биопротез, модель 2650 (аортный) (FDA PMA P10041) ²⁰
	образца по сравнению с контрольной группой с негативным уровнем аберрации	статистически значимого увеличения в уровне аберрации)			
Подкожная имплантация	Разница между средним показателем тестируемого образца и средним показателем контрольной группы равняется степени инкапсуляции; не вызывает раздражения, если разница равняется нулю	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает раздражения; разница гистопатологических показателей равна 0)	СООТВЕТСТВУЕТ (удовлетворяет критериям USP)	СООТВЕТСТВУЕТ (не вызывает раздражения)	Не проводился
Подострая токсичность	2х-недельное исследование токсичности с внутривенным введением препарата мышам; нетоксичный	Не проводился	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксичный)	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксичный)	Не проводился
Хроническая токсичность	Оценка внутримышечного имплантата у кролика; нетоксичный	Не проводился	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксичный; слабая воспалительная реакция через 1 год)	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксичный после 90 дней)	СООТВЕТСТВУЕТ (нетоксичный после 90 дней)
Канцерогенность	gasH2 трансгенная модель мыши – 6 месяцев; неканцерогенный	Не проводился	СООТВЕТСТВУЕТ (неканцерогенный)	Не проводился	Не проводился (так как тестируемые образцы не проявили мутагенного потенциала)
Гемосовместимос	Не	Не проводился	Не проводился	СООТВЕТСТВ	СООТВЕТСТВ

Тест на биосовместимость Per ISO 10993	Критерии приемлемости	Ссылка #1— спинальный имплантат Zimmer Dynesys (FDA 510(k) K092234)- Компонент спинного мозга ¹⁷	Ссылка #2— эндоскопический имплантат Enteryx™ для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (FDA PMA P020006) ¹⁸	Ссылка #3— сердечный чрезкатетерный клапан Edwards Sapien™ (FDA PMA P010041) ¹⁹	Ссылка #4— Carpentier-Edwards™ S.A.V.™ биопротез, модель 2650 (аортный) (FDA PMA P10041) ²⁰
ть	наблюдалось гемолиза <i>in vitro</i> ; время свертывания не изменилось			УЕТ (не повлиял на гемолиз и время свертывания)	ВУЕТ (не повлиял на гемолиз и время свертывания)
Выводы	УДОВЛЕТВОРИТЕЛЬНО	СООТВЕТСТВУЕТ: Степень поражения тканей в течение испытательного периода не изменилась. ПЭТ-частицы не вызвали никаких иммунологических реакций, включая индукцию остеолитического; системной токсичности не наблюдалось. Скорость и качество заживления тестируемых и контрольных животных были сходными и соответствовали на каждом этапе исследования.	СООТВЕТСТВУЕТ: Долгосрочное (12 месяцев) исследование эндоскопического имплантата Enteryx на собаках продемонстрировало, что ПЭТ-материал может быть безопасно введен собакам с минимальными реакциями при длительном использовании.	СООТВЕТСТВУЕТ: The Сердечный чрезкатетерный клапан SAPIEN модели 9000TFX удовлетворяет всем требованиям биосовместимости.	СООТВЕТСТВУЕТ: Клапан модели 2650, материал и пленка из ПЭТ, были успешно протестированы на биосовместимость. Результаты <i>in vivo</i> имплантации на животных и долгосрочных клинических испытаний S.A.V. клапана на безопасность подтверждают биосовместимость готового устройства

Приживляемость и пролиферация клеток

Полимерный ПЭТ был всесторонне проанализирован на предмет клеточной совместимости, была доказана его способность эффективно поддерживать приживание клеток, их дисперсию и прикрепление, проницаемость для экзогенных агентов, сохранение фенотипа клеток, а также была показана биомеханическая динамическая

стрессоустойчивость.²¹ Кроме того, биокаркасы, состоящие из трансформированных нановолокон продемонстрировали способность предоставить соответствующую микросреду для хондрогенной и остеогенной дифференциации клеток-предшественников.²²

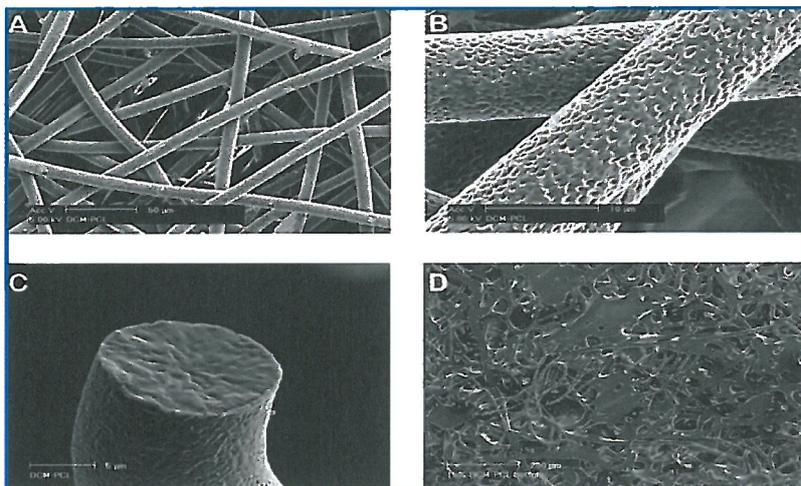


Рис. 9. СЭМ биокаркаса из трансформированных нановолокон показывает: (А) исходную микроструктуру волоконной сети, (В) нано-поры на поверхности волокон, которые способствуют прикреплению клеток, (С) сечение волокна - демонстрирует отсутствие пор внутри него, (D) относительно плотную плоскую нижнюю поверхность биокаркаса - для замедления миграции клеток в плашку со средой.

²¹ Nam J, Rath B, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Novel electrospun scaffolds for the molecular analysis of chondrocytes under dynamic compression. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(3):513-23.

²² Nam J, Johnson J, Lannutti JJ, Agarwal S. Modulation of embryonic mesenchymal progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1516-24.

Механические характеристики биокаркаса

SPECIMEN	Electrospun bifurcated* scaffold produced by Nanofiber Solutions, Columbus, OH
TEST	Uniaxial tensile test
CONDITIONS	Universal testing machine Lloyd LRX Load cell: 2500 N Preload: 1 N Speed of testing: 1 mm/s Stainless steel custom-made grips fixed to the rigid rings of the scaffold. In order to prevent slippage, grips were glued to the sample. Tests were carried out on both as-received scaffolds and scaffolds sterilized by immersion in ethanol overnight and then dried for 24 h. For each specimen 5 measurements were performed. Measured properties: Force at break (Fmax) Elongation at break, defined as the percentage increase in length, before the break occurs, with respect to the initial length of the specimen

ИЗДЕЛИЕ

Раздвоенный биокаркас из трансформированных нановолокон, произведенный компанией Nanofiber Solutions, г. Колумбус, Огайо, США

АНАЛИЗ

Испытание на одноосное растяжение

УСЛОВИЯ

Универсальная испытательная машина Lloyd LRX

Нагрузка в ячейке: 2500 Н

Предварительная нагрузка: 1 Н

Скорость растяжения: 1 мм/с

Специальные зажимы из нержавеющей стали прикрепляются к твердым кольцам биокаркаса. Для предотвращения соскальзывания зажимы приклеиваются к биокаркасу.

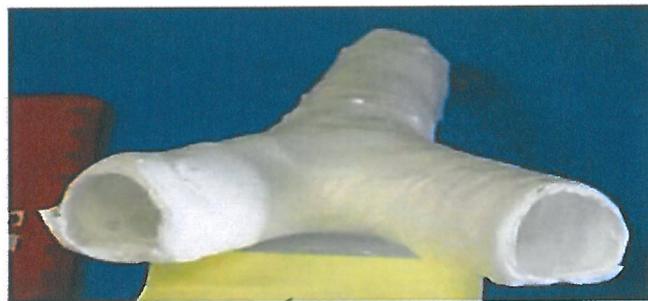
Анализ был проведен на обоих полученных биокаркасах, биокаркасы были стерилизованы

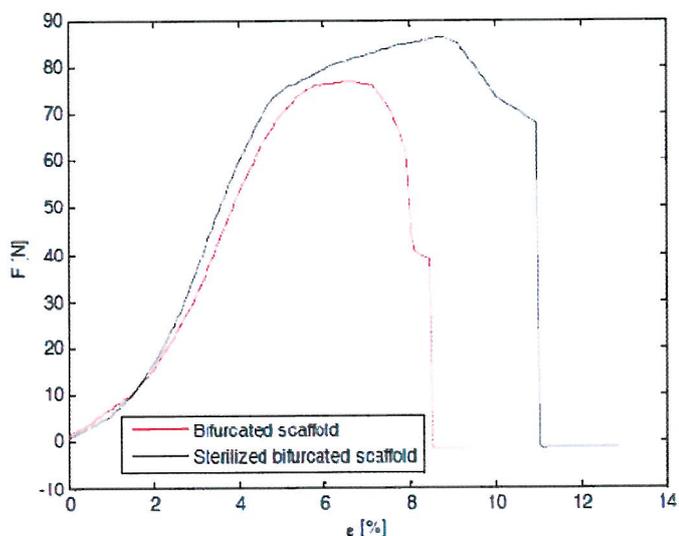
путем погружения в этанол на одну ночь, а затем высушены в течение 24 часов. Для каждого изделия было выполнено по 5 измерений.

Измеренные параметры: Сила разрыва (F_{max})

Растяжение при разрыве, определяемое как процент увеличения длины перед моментом разрыва, по отношению к исходной длине изделия.

Ниже: Раздвоенный биокаркас из трансформированных нановолокон

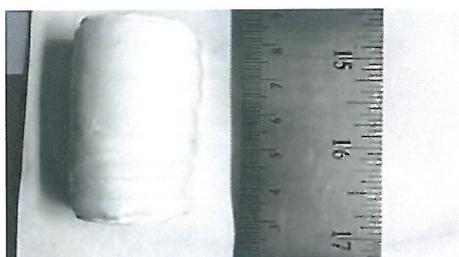




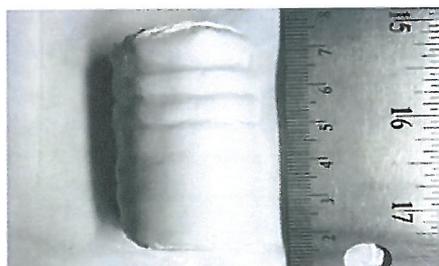
Вверху слева: Типичные графики зависимости растяжения от силы и графики силы при разрыве для тестируемого биокаркаса до и после гамма-стерилизации.

Анализ гамма-стерилизованного биокаркаса показал отсутствие каких-либо изменений размера, цвета, прочности на разрыв, или структуры материала согласно сканирующей электронной микроскопии, как показано ниже:

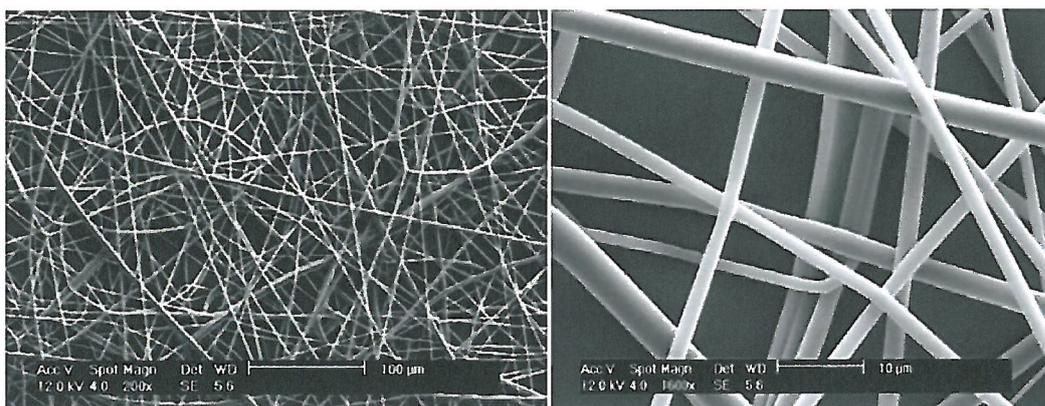
До стерилизации



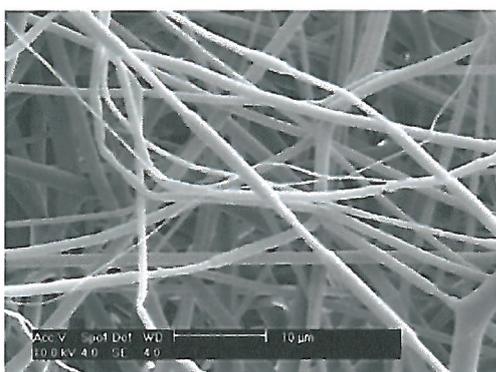
После стерилизации



Размеры биокаркаса	Исходные	После гамма-стерилизации
Длина	6,1 см	6,1 см
Ширина	2,9 см	2,9 см



Вверху: СЭМ фотографии нановолоконного материала до стерилизации гамма-облучением.
Внизу: СЭМ фотографии нановолокон после стерилизации гамма-облучением (28kGy).



Данные измерений предела прочности при растяжении (n=5):

	Средняя (МПа)	Стандартное отклонение	Стандартная погрешность
Контрольный образец	2,01	0,34	0,15
Образец после стерилизации гамма-облучением (28 kGy)	1,77	0,39	0,17

Приложение 2: Материалы биореактора (различные виды медицинских пластмасс и нержавеющей сталь)

Резюме: Медицинские материалы успешно применяются в целом ряде медицинских устройств, включая имплантаты, уже более двадцати лет. Используемый в данном клиническом исследовании биореактор помогает осуществить поддержку биокаркаса и обеспечить процесс выращивания клеток на его поверхности перед имплантацией. Биореактор изготовлен в основном из нескольких видов медицинских пластмасс, удовлетворяющих критериям Фарм. США (USP) Класса VI биосовместимости (Класс 6) (см. таблицы ниже). Основные материалы, покрывающие поверхность биореактора, полиоксиметилен (POM-C) и полисульфон (PSU), уже использовались ранее для культивирования двух искусственных трансплантатов трахеобронхиального дыхательного пути, операции по пересадке которых были успешно проведены в Госпитале Каролинского университета, Стокгольм, Швеция, в июне и ноябре 2011 года.

Заключение: Применение материалов Класса VI USP (медицинского класса/Класса 6) в сочетании с успешным клиническим исходом вышеупомянутых операций в июне и ноябре 2011 года указывает на то, что биореактор удовлетворяет критериям биосовместимости как аппарат для предоперационной обработки и процедуры переноса клеток на биокаркас в соответствии с протоколом для трахейного трансплантата.

Материалы, использованные в конструкции биореактора:

Компонент	Химический материал	Торговое название	Производитель	Удовлетворяет USP, Класс 6 (Медицинский материал)
Уплотнения, статические	EPDM резина	70 EPDM 291	Freudenberg Process Seals GmbH & Co. KG, Германия	Да
Уплотнения, динамические	Фторкаучук (FKM)	FKM 80.445-01	Angst+Pfister AG, Швейцария	-

Компонент	Химический материал	Торговое название	Производитель	Удовлетворяет USP, Класс 6 (Медицинский материал)
Зажимы	X10 CrNi 18-8 (нержавеющая сталь)	1.4310	AGILFedern, Германия	Нержавеющая сталь
Контейнер	Полисульфон (PSU)	TECASON™S	Ensinger Inc, США	Да
Крышка для контейнера с культурой	Полисульфон (PSU)	TECASON™S	Ensinger Inc, США	Да
Переносная крышка	Полисульфон (PSU)	TECASON™S	EnsingerInc, США	Да
Переносной контейнер	Полиоксиметилен сополимер (POM-C)	Centrodal C	Centroplast Engineering Plastics GmbH, Германия	Да
Крышка переносного контейнера	Полипропилен (PP)	CentrolabHT™	Centroplast Engineering Plastics GmbH, Германия	Да
Вращающиеся детали	Полиоксиметилен сополимер (POM-C), Полиэфирэфиркетон (PEEK)	Centrodal C, PEEK LSG	Centroplast Engineering Plastics GmbH, GermanySchmidt + Bartl GmbH	Да
Вал привода	X2 CrNiMo 18-15-3 (нержавеющая сталь)	1.4441 ESU	EZMEdelstahlZieherei Mark GmbH, Германия	Не применимо
Оправка	X6 CrNiMoTi 17-12-2 (нержавеющая сталь)	1.4571	BSGStahlhandel, Германия	Не применимо

Результаты тестов по биосовместимости для материалов PEEK и CentrolabHT™, проведенных производителями (выполнение критериев Класса 6 USP подразумевает тестирование материалов на острую системную токсичность, внутрикожную реакцию и приживление):

Тест на биосовместимость Согласно ISO 10993	Критерии приемлемости	Материал PEEK	Материал CentrolabHT™
Острая системная токсичность	Тестируемая группа должна продемонстрировать ≤ биологическую реакцию по сравнению с контрольной группой (мыши); < 2 мышей могут	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (Отсутствие признаков токсичности и потери веса >2 г)	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (удовлетворяет требованиям USP)

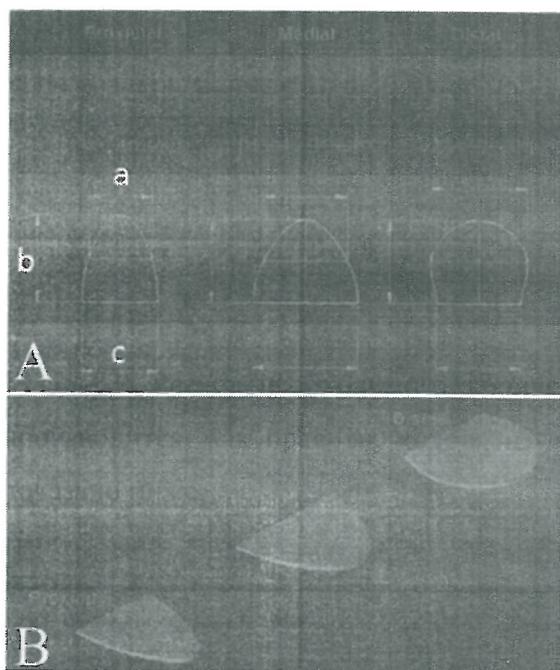
Тест на биосовместимость Согласно ISO 10993	Критерии приемлемости	Материал PEEK	Материал CentrolabHT™
	иметь признаки токсичности; < 3 мышей теряют вес >2 г		
Внутрикожная реакция через 72 часа	Должны удовлетворять требованиям минимальной реактивности	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (минимальная реактивность)	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (минимальная реактивность)
Тест на приживление (7 дней)	Нет реакции	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (нет реакции)	УДОВЛЕТВОРЯЕТ (нет реакции)

Приложение 3: Характеристики биологических агентов и фактора TGF-β3

В нижеследующей таблице перечислены ростовые факторы, используемые в настоящем протоколе интраоперационно и послеоперационно для ускорения регенерации тканей:

Фактор	Актив-ность	Компания	Дистрибьютор в Швеции	Кол-во	Интраопе-рационное кол-во	Пред- и послеопе-рацион-ное кол-во
Рекомбинант-ный фактор человека TGF-β 3, CF*	TGF-β3	R&D Systems	R&D Systems Europe Ltd. info@RnDSystems.co.uk www.RnDSystems.co.uk	10 мкг	1 флакон (5 мкг)	1 флакон (5 мкг) предоп.
Гранулоцитар-ный колониестиму-лирующий фактор (G-CSF)	Филграстим (Neupogen®)	AMGEN	Amgen Inc. One Amgen Center Drive Thousand Oaks, California 91320-1799 USA	30 МЕ (0,6 мг/мл)	1 флакон (30 МЕ)	9 флаконов (30 МЕ)
Нео Рекормон	Эритропо-этин α рекомби-нантный Epoetin α (Procrit)	Janssen Biotech	Janssen Biotech, Inc. 800 Ridgeview Road Horsham, PA 19044	10000 МЕ или 40000 МЕ	4 флакона по 10000 МЕ (всего 40000 МЕ)	9 флаконов по 40000 МЕ
Рекомбинант-ный фактор человека PTHrP	rhPTH	PEPROTech	PeproTech SE Klarabergsviadukten 70 • 107 24 Stockholm • Sweden	50 мкг	0,5 флакона предоп.	0,5 флакона предоп.
Инсулин		Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Technical Services PO Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA	10 мкг/мл	5 мкг/мл	5 мкг/мл
Дексаметазон		Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Technical Services PO Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA	100 нмоль/л	50 нмоль/л	50 нмоль/л

*TGF-β3: Расчет необходимого количества TGF-β3 основан на размерах трахеи человека и производится, как правило, исходя из средней латеральной площади 1 хрящевого кольца, как показано ниже.



Physical			
Diameter (cm)	Proximal	Medial	Distal
a	1.5±0.4	1.9±0.2	2.1±0.5
b	2.4±0.3	2.0±0.2	2.0±0.4
c	1.6±0.1	1.9±0.4	2.1±0.2
Lateral Area (mm ²)	48.27±3.52	50.29±2.56	53.08±2.25
Mean lateral area	50.54±2.41		
Cartilaginous ring thickness	0.3±0.1		
Cartilaginous ring width	0.12±0.02		
Mechanical			
Rupture force (N)	212±18		
Tensile modulus [Mpa]	2.0±0.9		

C

Используя вышеприведенный пример определения средней латеральной площади, было подсчитано, что требуемая концентрация TGF-β3 составит 0,1 мкг/мм² (примерно 5 мкг на кольцо). Это дает в итоге, что необходимо приготовить раствор 10 мкг/мл TGF-β3 и вводить по 0,5 мл на каждое хрящевое кольцо.

Ведущий ученый  П. Маккиарини