

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«04» июля 2018 г.

Регистрационный № 048 - 0518



МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РЕЦЕССИИ ДЕСНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ С КОЛЛАГЕНОВЫМ ГЕЛЕМ 7%

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д.м.н., профессор С.П. Рубникович; к.м.н. В.А. Андреева; д.м.н., профессор Ю.Л. Денисова; д.б.н., профессор, академик НАН Беларуси И.Д. Волотовский; к.б.н. З.Б. Квачева; И.Б. Василевич; Г.Ю. Панасенкова

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения рецессии десны с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе культивированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в смеси с коллагеновым гелем 7%, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний и патологий состояния десны (К.06).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-специалистов стоматологического профиля и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим заболеваниями и патологиями состояния десны в амбулаторных и (или) стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БМКП, РЕАКТИВОВ И Т. Д.

1. Инструменты и расходные материалы для эксплантации жировой ткани путем липоаспирации:

- стандартный комплект хирургического инструментария, необходимого для липоаспирации.

2. Оборудование, инструменты и расходные материалы для приготовления БМКП:

- инкубатор углекислотный (автоматическое поддержание температуры 37⁰ С и концентрации углекислого газа 5%);
- ламинарный бокс с потоком воздуха II класса защиты;
- центрифуга (1500–3000 об./мин.);
- холодильник;
- морозильник;
- проточный цитофлуориметр;
- микроскоп инвертированный;

- микроскоп световой бинокулярный;
- камера Горяева;
- флаконы для культур клеток T25 и T75;
- пробирки стерильные центрифужные на 50 и 15 мл, однократного применения;
- чашки Петри (диаметром 100 мм);
- пробирки стерильные полипропиленовые на 1 мл;
- автоматические дозаторы переменного объема;
- стерильные наконечники для дозаторов (100–1000 и 20–200 мкл);
- системы фильтрации 0,45 и 0,2 мкм, однократного применения.

3. Необходимые реагенты:

- питательная среда ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко);
- 0,1% раствор коллагеназы;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);
- трипсин-ЭДТА 0,25% раствор;
- сыворотка аутологичная;
- раствор натрия хлорида 0,9% для инъекций;
- бензилпенициллина натриевая соль;
- стрептомицина сульфат;
- 0,4% раствор трипанового синего;
- моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК – CD 73, CD44, CD90, CD105, CD45, CD34 человека;
- тиогликолевая среда;
- среда Сабуро.

4. БМКП:

- БМКП аутологичных МСК из жировой ткани по ТУ 100217351.0042014 или аналог.

5. Медицинские изделия и т.д.:

- 7% коллагеновый гель;
- стоматологическая установка;
- стандартный набор стоматологических инструментов;
- антисептик – хлоргексидина биглюконат 0,05%;
- инсулиновые шприцы;
- термостат 33-40⁰С.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рецессия десны (МКБ – 10: К.06).

Необходимым условием для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции, является информированное согласие пациента.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Противопоказания, соответствующие таковым для использования лекарственных средств, медицинских изделий, БМКП, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

2. Беременность.
3. Кормление грудью.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, состоит из нескольких последовательных этапов:

1. Эксплантация жировой ткани у пациентов путем липоаспирации.
2. Приготовление БМКП аутологичных МСК из жировой ткани:
 - 2.1 выделение МСК из жировой ткани;
 - 2.2 культивирование МСК ЖТ *in vitro* в течение не более 4 пассажей;
 - 2.3 проведение контроля качества клеточной культуры (подсчет количества и оценка жизнеспособности МСК, определение фенотипа клеток с использованием моноклональных антител, оценка и контроль контаминации микроорганизмами).
3. Определение количества МСК ЖТ в составе БМКП.

4. Приготовление смеси полученного БМКП с коллагеновым гелем 7% в соотношении 1:1.

5. Выполнение инъекций смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%:

5.1 первое введение смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%;

5.2 повторное введение смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%.

1. Эксплантация жировой ткани для выделения и культивирования МСК ЖТ

Эксплантация жировой ткани у пациентов с рецессией десны проводится под местной анестезией путем липоаспирации в околопупочной области или по внутренней поверхности верхней трети бедра в объеме 10 – 12 мл в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Осуществляется общепринятыми методами.

2. Метод приготовления БМКП аутологичных МСК из жировой ткани в стерильных лабораторных условиях

Транспортировка эксплантированной в соответствии с п. 1 настоящего метода жировой ткани осуществляется в стерильных закрытых шприцах в закрытом термоконтейнере.

2.1 Выделение МСК из жировой ткани

В стерильных условиях ламинарного бокса проводится ферментативная обработка жировой ткани в 0,1% растворе коллагеназы. Затем клеточную суспензию фильтруют через капроновые фильтры, центрифугируют при 1500 об./мин. 10 мин., удаляют супернатант. Осадок заливают ростовой средой ДМЕМ, содержащей 10% аутологичной сыворотки.

2.2 Культивирование МСК ЖТ *in vitro*

Клетки высевают в количестве 1×10^5 кл/см² в культуральные флаконы и инкубируют в течение 24 ч при 37⁰С в СО₂-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5% СО₂. После этого среду с

неадгезированными клетками удаляют и после промывки в ФСБ, заменяют на свежую. Полную смену ростовой среды проводят каждые 72 ч. После образования монослоя МСК ЖТ пересевают каждые 10-12 дней. Для этого монослой промывают ФСБ, обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе Версена в течение 1-3 мин. при 37°C. Клетки высевают в пластиковые культуральные флаконы в количестве 4×10^3 кл/см², накапливают их необходимое количество в соответствии с п. 3 настоящей инструкции в течение 2-3 пассажей. Далее МСК ЖТ переводят из монослоя в суспензию. МСК ЖТ в растворе ФСБ из расчета 1,0 млн. клеток в 0,1 мл передают для первого введения пациенту. Клетки 3-4 пассажей продолжают культивировать в течение 2-х недель для повторного введения клеток.

2.3 Проведение контроля качества клеточной культуры (подсчет количества и оценка их жизнеспособности МСК ЖТ, контроль фенотипа МСК, микробиологический контроль стерильности)

Для оценки жизнеспособности клеток используют тест на исключение красителя, который основывается на способности 0,5% раствора трипанового синего проникать через цитоплазматическую мембрану погибших клеток. С использованием камеры Горяева под микроскопом подсчитывают количество (процентное содержание) жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (окрашенных) клеток, должно быть не менее 95% жизнеспособных клеток.

Для анализа фенотипа и отнесения их к МСК клетки в количестве 1×10^5 ресуспендируют в 100 мкл ФСБ и вносят меченые антитела к поверхностным антигенам: CD105, CD73, CD 44, CD34, CD90, CD45 (PE, фикоэритрин) в разведении согласно инструкции фирмы-производителя, инкубируют 30 мин. в темноте при комнатной температуре, отмывают дважды (ФСБ), ресуспендируют в 300 мкл ФСБ и анализируют с

использованием проточного цитофлуориметра. Для каждого антигена анализируют не менее 10 000 клеток. Клетки, на поверхности которых экспрессируются маркеры CD 44 - более 90%, CD105 - более 90%, CD73 - более 90%, а CD34 - менее 3%, CD45 - менее 2,5%, считаются прошедшими фенотипический контроль на принадлежность к МСК.

Контроль на бактериальные и микотические загрязнения проводят путем посева культуральной жидкости, содержащей клетки в пробирки с тиогликолевой средой (рост грамположительных и грамм отрицательных бактерий при температуре 30-35⁰С) и средой Сабуро (рост дрожжеподобных грибов) при температуре 20-25⁰С. При отсутствии роста микроорганизмов в течение 14 дней инкубации исследуемый образец считается прошедшей контроль стерильности (микробиологической чистоты).

БМКП аутологичных МСК из жировой ткани, полученный в соответствии с п. 2 настоящей инструкции, хранится при температуре от +5⁰С до +10⁰С в течение не более 12 ч и при температуре от +10⁰С до +37⁰С - не более 4 ч с момента приготовления.

3. Определение количества МСК ЖТ в составе БМКП

Для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции, в область рецессии десны у одного зуба вводится БМКП аутологичных МСК из жировой ткани с содержанием клеток не менее 1,0 млн. в 0,1 мл. Необходимое количество клеток в составе БМКП для пациента рассчитывают путем умножения количества зубов с рецессией десны на 1.000.000.

4. Приготовление смеси БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ с коллагеновым гелем 7%

Приготовленный в соответствии с п. 2 настоящей инструкции БМКП, либо БМКП по ТУ 100217351.0042014 или аналог в асептических

условиях непосредственно перед использованием смешивают с 7% коллагеновым гелем в соотношении 1:1, интенсивно перемешивая до однородной консистенции. Предварительно гель необходимо разогреть до температуры 36-37°C на водяной бане или термостате, но не выше 42°C (во избежание коагуляция белка). Смесь из стерильной пробирки набирают в стерильный инсулиновый шприц, удаляют воздух из шприца.

5. Выполнение инъекций смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%

5.1 Первое введение смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%

Перед введением смеси БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ с коллагеновым гелем 7% пациенту проводится орошение (полоскание) полости рта 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата. В области рецессии десны у одного зуба на равных расстояниях – 2-3 мм определяют 4 точки инъекций: междесневые сосочки, слизистая десны на 2 мм ниже линии прикрепления. Иглу располагают перпендикулярно оси зуба и продвигают в ткани десны на 2 мм (рисунок).

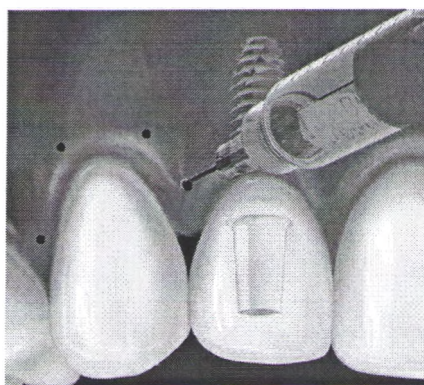


Рисунок 1. Схема введения смеси БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ с коллагеновым гелем 7% в области рецессии десны

Смесь БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ с коллагеновым гелем 7% общим объемом 0,2 мл распределяют равными

долями на 4 инъекции в области одного зуба (объем в 1 точке инъекции – 0,05 мл). Количественное содержание МСК ЖТ в 0,2 мл смеси – 1,0 млн. клеток. После выполнения инъекций пациенту проводится орошение (полоскание) полости рта 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата. Рекомендации по уходу за полостью рта заключаются в исключении использования средств гигиены с высокой абразивностью в течение 10 дней.

5.2 Повторное введение смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%

Осмотр полости рта пациента проводят через 10 дней. Регистрируются показатели состояния тканей десны в области рецессии. Определяется количество МСК ЖТ в составе БМКП согласно п. 3 для повторного введения.

Повторное введение смеси БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ с коллагеновым гелем 7%, приготовленных в соответствии с п. 2, п. 4 выполняется через 4 дня согласно п. 5.1 настоящей инструкции.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При соблюдении перечня указанных показаний и противопоказаний, а также точном использовании техники выполнения манипуляций, изложенных в инструкции осложнения и побочные эффекты исключены.