

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«07» июня 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

01.06.2018

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: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.П. Рубникович, канд. мед. наук В.А. Андреева, д-р мед. наук, проф. Ю.Л. Денисова, д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси И.Д. Волоотовский, канд. биол. наук 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 (далее — БМКП) на основе культивированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (далее — 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 НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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 37°C 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. Реагенты:

- питательная среда ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко);

- 0,1 % раствор коллагеназы;

- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (далее — 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 33–40°C.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рецессия десны (МКБ-10: К.06).

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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 ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 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 контроль 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 37°C в CO₂-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5 % CO₂. 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 недель для повторного введения клеток.

2.3 Контроль 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 10000 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 30–35°C) и средой Сабуро (рост дрожжеподобных грибов) при температуре 20–25°C. 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 соответствие с п. 2 настоящей инструкции, хранится при температуре от +5 до +10°C в течение не более 12 ч и при температуре от +10 до +37°C 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 1000000.

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 — 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 пп. 2, 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.