

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра



**МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ КЕРАТИТОВ И ДИСТРОФИЙ РОГОВИЦЫ  
АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМБАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ  
И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ  
ТКАНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Л. Н. Марченко, канд. мед. наук, доц. А. Ю. Чекина, канд. мед. наук, доц. М. Ф. Джумова, д-р мед. наук, проф. А. С. Федулов, д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси И. Д. Волотовский, канд. биол. наук З. Б. Квачева, И. Б. Василевич

Минск 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

26.12.2019

Регистрационный № 175-1219

**МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ КЕРАТИТОВ И ДИСТРОФИЙ РОГОВИЦЫ  
АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМБАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ  
И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ  
ЖИРОВОЙ ТКАНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный  
медицинский университет», ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии  
НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Л. Н. Марченко, канд. мед. наук, доц. А. Ю. Чекина,  
канд. мед. наук, доц. М. Ф. Джумова, д-р мед. наук, проф. А. С. Федулов, д-р биол.  
наук, проф., акад. НАН Беларуси И. Д. Волоотовский, канд. биол. наук З. Б. Квачева,  
И. Б. Василевич

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы лечения пациентов с кератитами и дистрофиями роговицы в комплексе медицинских услуг с применением биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) аутологичных лимбальных стволовых клеток (ЛСК) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСКЖТ).

Методы, изложенные в настоящей инструкции, предназначены для врачей-офтальмологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с патологией роговицы глаза в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Медицинские изделия, необходимые для получения кератолимбального лоскута и жировой ткани.

2. БМКП — МСКЖТ, приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.004-2014, внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь, соответствующий следующим требованиям:

внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;

количество клеток: не менее  $0,5 \times 10^6/0,4$  мл раствора натрия хлорида 0,9 % для инфузий;

количество жизнеспособных клеток: не менее 85 %;

подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика): CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD45<sup>low/-</sup>, CD34<sup>low/-</sup>;

стерильность: стерильно.

3. БМКП — ЛСК, приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.012-2019 внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь, соответствующий следующим требованиям:

внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;

количество клеток: не менее  $0,5 \times 10^6/0,4$  мл раствора натрия хлорида 0,9 % для инфузий;

количество жизнеспособных клеток: не менее 85 %;

подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика: экспрессия цитокератина 19 не менее 50 %, нестина не менее 25 %;

стерильность: стерильно.

4. Медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т. д., необходимые для получения БМКП аутологичных ЛСК и МСКЖТ:

питательная среда ДМЕМ;

питательная среда ДМЕМ/F12;

эпидермальный фактор роста (ЭФР);

инсулин;

трансферрин;

селенид;  
форскалин;  
0,1 % раствор коллагеназы;  
моноклональные антитела к антигенам человека: CD29, CD44, CD90, CD 105, CD45, CD34, цитокератин 19, нестин;  
трипсин-ЭДТА (0,25 % раствор);  
бензилпенициллина натриевая соль;  
стрептомицина сульфат;  
фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);  
раствор натрия хлорида 0,9 % для инфузий;  
0,4 % раствор трипанового синего;  
среда тиогликолиевая и среда Сабуро;  
флаконы для культур клеток T25, T75;  
наконечники стерильные 20-200; 100-1000; 1-5 мл;  
пробирки центрифужные стерильные объемом 15 и 50 мл;  
пробирки стерильные полипропиленовые объемом 1-2 мл;  
чашки Петри;  
средства индивидуальной защиты;  
гемоцитометр с сеткой Горяева.

5. Медицинские изделия, медицинское оборудование, предназначенные для оценки офтальмологического статуса пациента:

щелевая лампа офтальмологическая;  
пневмотонометр;  
флюоресцеин;  
таблица Головина–Сивцева для проверки остроты зрения.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Кератит (H16).
2. Язва роговицы (H16.0) резистентные к традиционным методам лечения.
3. Дистрофии роговицы (H18.5).
4. Отторжение пересаженного органа и ткани неуточненных (T86.9).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Беременность и лактация; острые соматические и хронические соматические заболевания в стадии декомпенсации; иные противопоказания, соответствующие таковым для использования БМКП, медицинских изделий, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции; возраст пациента до 18 лет. Относительным противопоказанием являются аномалии рефракции глаза высокой степени.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Получение БМКП**

#### *Получение биоматериала*

Эксплантация биоптата лимба из неповрежденного участка роговицы пациента выполняется в операционной под местной анестезией с использованием

микроскопа и микрохирургического инструментария. Отсепаровывается конъюнктива на протяжении 5 мм и лезвием иссекается кератолимбальный фрагмент длиной 4 мм, шириной 2 мм и глубиной 1 мм без захвата склеры. Иссеченный биоптат лимба помещается в стерильный флакон с транспортной средой, закрывается стерильной крышкой, маркируется и доставляется в лабораторию для получения БМКП ЛСК. Зона иссечения лимба покрывается конъюнктивой по Кунту с фиксацией двумя швами (шелк 8,0). Пациенту назначают инстилляцию антибиотика в глаз 3 раза в 1 день до снятия конъюнктивальных швов через 7 дней, а также инстилляцию НПВП или глюкокортикостероидов (ГКС), лубрикантов, частота и продолжительность применения которых зависит от этиологии, клинического течения, имеющегося воспалительно-дистрофического процесса роговой оболочки и определяется индивидуально.

Эксплантация жировой ткани орбиты выполняется сразу же после забора кератолимбального лоскута через разрез конъюнктивы в области наружной трети нижнего свода. При легком надавливании на нижнее веко, на участке разреза между конъюнктивой и теноновой капсулой глазного яблока показывается жировая орбитальная клетчатка. Последняя захватывается пинцетом, иссекается ножницами, размером 1,0x1,0x1,0 см и помещается в стерильный флакон с транспортной средой, закрывается стерильной крышкой, маркируется и доставляется в лабораторию для получения БМКП МСК ЖТ. На конъюнктиву накладывают непрерывный шов шелком 8.0. Назначают инстилляцию антибиотика на 7 дней до снятия шва с конъюнктивы.

Эксплантация подкожной жировой ткани выполняется под местной анестезией путем резекции жировой клетчатки размером 1 см<sup>3</sup> в околопупочной области или области внутренней поверхности верхней трети плеча в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Осуществляется общепринятыми методами. Иссеченная жировая ткань помещается в стерильный флакон с транспортной средой, маркируется и доставляется в лабораторию для получения БМКП.

Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от 2 до 12 °С не более 24-х ч.

#### *Приготовление БМКП — ЛСК*

Биологический материал (кератолимбальный лоскут) стерильным инструментом нарезают на фрагменты (экспланты) 0,5-1 мм<sup>2</sup>; помещают в чашки Петри или культуральные флаконы с покрытием адгезионной поверхности флакона коллагеном первого типа; добавляют ростовую среду, в состав которой входит питательная среда ДМЕМ/F12 с добавлением эпидермального фактора роста (ЭФР — 10 нг/мл), аутологичной сыворотки (10 %), форскалина (50 мкг/мл), ITS (инсулин, трансферрин, селенид); инкубируют в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С до образования монослоя эпителиальных стволовых клеток лимба (10-14 дней). Замену ростовой среды осуществляют каждые 3 дня.

После образования монослоя клетки пересевают каждые 10-12 дней и накапливают их необходимое количество в течение 2-3 пассажей. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. На конечной стадии получения БМКП клетки

суспендируют в растворе натрия хлорида 0,9 % для инфузий из расчета 500 тыс. клеток в 0,4 мл.

#### *Приготовление БМКП — МСКЖТ*

В стерильных условиях производится ферментативная обработка жировой ткани в 0,1 % растворе коллагеназы. Затем клеточную суспензию фильтруют, центрифугируют при 370 g 10 мин, удаляют супернатант. Осадок заливают ростовой средой ДМЕМ, содержащей 10 % аутологичной сыворотки. Клетки высевают в количестве  $1 \times 10^5$  кл/см<sup>2</sup> в культуральные флаконы и инкубируют в течение 24 ч при 37 °С в СО<sub>2</sub>-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5 % СО<sub>2</sub>, после чего среду заменяют на свежую.

При образовании монослоя МСКЖТ пересевают, для чего монослой промывают ФСБ, обрабатывают 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА. Клетки высевают в культуральные флаконы и накапливают их необходимое количество в течение 2-3 пассажей. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. На конечной стадии получения БМКП клетки суспендируют в растворе натрия хлорида 0,9 % для инфузий из расчета 500 тыс. клеток в 0,4 мл.

#### *Контроль качества БМКП*

Для контроля подлинности клеток осуществляют оценку их фенотипа с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами.

Учет осуществляют на проточном цитофлуориметре.

Для определения жизнеспособности БМКП используют тест на исключение жизнеспособными клетками красителя трипанового синего.

БМКП — МСКЖТ считают прошедшим контроль качества при экспрессии молекул CD29, CD105, CD90 — более 90 %, CD44 — более 80%, CD34 — менее 5%, CD45 — менее 3%, жизнеспособности — более 85%, отсутствии контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами.

БМКП — ЛСК считают прошедшим контроль качества при экспрессии цитокератина 19 не менее 50 % и нестина — не менее 25 %, жизнеспособности — более 85 %, отсутствии контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами.

Контроль стерильности осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь (Т. 3, 2009 г.). Должна отсутствовать контаминация бактериями и дрожжеподобными грибами в компонентах БМКП.

#### **Применение БМКП**

Подготовленные и паспортизированные БМКП: аутологичные МСКЖТ или аутологичные ЛСК должны быть использованы не позднее 4 ч при температуре от 10 до 33 °С и не более 12 ч — от 5 до 10 °С.

Перед введением БМКП аутологичных ЛСК или аутологичных МСКЖТ (500 тыс. клеток в 0,4 мл хлорида натрия 0,9 % для инфузий — одна лечебная доза для перилимбальной инъекции) пациенту исследуют остроту зрения; внутриглазное давление и красящую пробу с флюоресцеином для оценки актуального офтальмологического статуса.

Применение БМКП осуществляют в процедурном кабинете. Перилимбальное введение выполняется инсулиновым шприцом в 5 мм от лимба в меридиане язвенного кератита или дистрофического поражения роговой оболочки

глаза. После введения БМКП пациент в течение 20 мин должен находиться в помещении.

Перилимбальное введение БМКП — аутологичных ЛСК или аутологичных МСКЖТ может выполняться повторно с интервалом 14 сут и более. Кратность введения определяется динамикой патологического процесса роговой оболочки.

Эффективность лечения оценивают на 3, 7-е, 14-е и 30-е сут при офтальмологическом обследовании по результатам флюоресцеиновой пробы и остроте зрения.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Точное соблюдение всех пунктов, изложенных в инструкции, позволяет исключить осложнения и побочные эффекты, связанные с использованием метода.