

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Е.Л.Богдан  
» декабря 2020 г.  
Регистрационный № 163-1220



## МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА С ПРИМЕНЕНИЕМ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

(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 Рубникович С.П., к.м.н. Андреева В.А., к.м.н. Хомич И.С., к.м.н. Кузьменко Е.В., д.м.н., профессор Денисова Ю.Л., д.б.н., профессор, академик НАН Беларуси Волотовский И.Д., к.б.н. Квачева З.Б., Василевич И.Б.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения хронического периодонтита, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с заболеваниями периодонта (К.05) с применением биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе культивированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ), индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, иммобилизованных на коллагеновой мембране.

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 тканей периодонта в амбулаторных и (или) стационарных условиях.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Хронический периодонтит (К.05.3).

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

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Беременность во все сроки, лактация, острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации, иные противопоказания, соответствующие таковым для использования БМКП, медицинских изделий, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БИОМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, РЕАГЕНТОВ И Т.Д.**

1. Медицинские изделия, необходимые для получения жировой ткани;

2. БМКП «Клетки стволовые мезенхимальные», приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020 или другой БМКП, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани: наличие поверхностных маркеров: CD 73, CD44, CD90, CD105 и отсутствие маркеров CD45, CD34;
- стерильность: стерильно.

3. БМКП «Клетки мезенхимальные стволовые, индуцированные к дифференцировке в остеогенном направлении», приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.014-2020, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;
- количество клеток: не менее  $0,4 \times 10^6$  в 0,05 мл хлорида натрия 0,9% для нанесения на коллагеновую мембрану  $1 \times 1 \text{ см}^2$  при операционном вмешательстве в области одного зуба;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- подлинность клеток: экспрессия генов остеопонтина, щелочной фосфатазы, положительны на окраску ализариновым красным;
- стерильность: стерильно.

4. Медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т.д., необходимые для приготовления БМКП аутологичных МСК ЖТ,

индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении для нанесения на коллагеновую мембрану:

- инкубатор углекислотный (автоматическое поддержание температуры 37<sup>0</sup>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 T12,5; T25 и T75;

- пробирки стерильные центрифужные на 50 и 15 мл, однократного применения;

- чашки Петри (диаметром 35 - 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.

- 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;
- 0,5% раствор ализаринового красного;
- моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК – CD 73, CD44, CD90, CD105, CD45, CD34 человека;
- набор реагентов для постановки ПЦР;
- праймеры для определения экспрессии генов: щелочной фосфатазы, остеопонтина;
- тиогликолевая среда;
- среда Сабуро;
- коллагеновая мембрана, используемая в хирургической стоматологии;
- средства индивидуальной защиты;
- стоматологическая установка;
- стандартный набор стоматологических хирургических инструментов;
- антисептик – хлоргексидина биглюконат 0,05%;
- раствор анестетика;
- термостат 33-40<sup>0</sup>С.

## **ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Приготовление БМКП**

#### **1.1 Получение биоматериала**

Эксплантация жировой ткани пациента (2-5 грамм), необходимой для приготовления БМКП, выполняется общепринятыми методами под местной анестезией раствором лидокаина гидрохлорида 2% в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Иссечённый биоматериал помещается в стерильный флакон с транспортной средой. Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от +2 °С до +12 °С не более 24-х часов.

## **1.2 Приготовление БМКП**

### **1.2.1 Приготовление культуры МСК ЖТ**

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.

Клетки высевают в культуральные флаконы и инкубируют в течение 24 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5% CO<sub>2</sub>. 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 фосфатным буферным раствором (ФСБ), обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе Версена при 37°C. Клетки высевают в пластиковые культуральные флаконы, накапливают их необходимое количество в течение 2-3 пассажей. Полученные клетки используют для приготовления остеоиндуцированных МСК.

### **1.2.2 Приготовление БМКП - МСК ЖТ, индуцированные к дифференцировке в остеогенном направлении**

В культуральные флаконы высевают МСК ЖТ, приготовленные по ТУ 100217351.004-2014 (2-3 пассажа). Клетки культивируют в ростовой среде, до достижения культурой 70-80 % конфлюентности. После чего осуществляется замена среды на свежую, куда добавлены индукторы дифференцировки: аскорбиновая кислота - 50 мкг/мл, β-глицерол-2-фосфат - 10 мМ, дексаметазон - 100 нМ, BMP-2 - 50 нг/мл. Культивирование МСК в индукционной среде проводится в течение 5-7

дней. Далее клетки переводят из монослоя в суспензию из расчета не менее  $0,4 \times 10^6$  в 0,05 мл в 0,9% растворе хлорида натрия для нанесения на коллагеновую мембрану.

## **2. Контроль качества БМКП**

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  $1 \times 10^5$  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.

Для анализа фенотипа (подлинности) клеток, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, оценивали морфологию клеток после культивирования МСК ЖТ в индукционной среде - появление скоплений округлой формы клеток, которые прокрашивались ализариновым красным (наличие минерализации). Для подтверждения дифференцировки МСК ЖТ в остеогенном направлении использовали

метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР) с использованием праймеров для определения экспрессии генов щелочной фосфатазы и остепонтина (согласно Инструкции производителя).

Контроль стерильности БМКП осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь либо иным методом. Должна отсутствовать контаминация бактериями и дрожжеподобными грибами в компонентах БМКП.

БМКП хранится при температуре от +5°C до +10°C в течение не более 12 ч и при температуре от +10°C до +30°C - не более 4 ч с момента приготовления.

### **3. Нанесение БМКП на коллагеновую мембрану**

Коллагеновую мембрану 3-хкратно промывают в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций в стерильных условиях в течение 5-10 минут, наносят БМКП на мембрану из расчета  $0,4 \times 10^6$  в 0,05 мл в 0,9% растворе натрия хлорида на  $1 \times 1 \text{ см}^2$ .

### **4. Условия оперативного вмешательства в костные карманы зуба для заполнения коллагеновой мембраной с БМКП – МСК ЖТ, индуцированные в остеогенном направлении**

Осуществляют анестезию соответствующего участка челюсти. Операцию начинают с рассечения скальпелем мягких тканей в межзубных промежутках в проекции апроксимального костного кармана. Направление разреза в межзубном пространстве - параллельно основанию сосочка между проксимальными сторонами зубов. При этом, режущий инструмент, плоскостью скользя по вестибулярной поверхности зуба, вводят в периодонтальный карман и направляют к середине проксимальной поверхности соседнего зуба до упора. Вслед за этим режущую часть инструмента перемещают по направлению от корня к

коронке зуба. Рассечение десневых сосочков и внутрибороздковые разрезы производят на участке зубного ряда, превышающей область намеченного вмешательства на 1-2 зуба с каждой стороны. Это дает возможность, сохранив площадь операционного поля, обойтись без вертикальных разрезов, которые могут приводить к рецессии десны в послеоперационном периоде. Вертикальные разрезы проводят в исключительных случаях, когда хирургический доступ требует этого: например, при очень глубоком костном кармане и невозможности его визуализации без вертикальных разрезов. Затем поочередно с каждой стороны, распатором скользя по поверхности зуба, входят в периодонтальный карман и, продвигая инструмент к апикальной части, веерообразными движениями отслаивают лоскуты с обеих сторон альвеолярного отростка на протяжении всего разреза и на глубину поражения. Затем лоскуты отводят от кости на расстояние, обеспечивающее свободное манипулирование в операционном поле. Удаление грануляций и вегетаций эпителия начинают с апикальных частей поверхности лоскутов, при этом может быть применен скальпель, который во время манипулирования им находится по отношению к поверхности лоскута под углом от 30 до 90° и движется от основания лоскута к периферии, соскабливая грануляции и вегетации. Во время удаления грануляций и вегетаций с лоскута, последний укладывают наружной поверхностью на указательный палец. Этим обеспечивают его надежную фиксацию и контроль глубины погружения режущего инструмента в мягкие ткани. Далее приступают к удалению поддесневых зубных отложений и грануляций, прилежащих к зубу и альвеолярной кости. На этом этапе используют ультразвуковой скейлер с длинной насадкой, а также ручные инструменты для снятия зубного камня (кюреты) и малые кюретажные ложки. Обработку корней зубов проводят с

помощью ультразвукового скейлера, а также соскабливая острыми инструментами (экскаватор, различные по форме острые крючки) поверхностные отложения зубного камня вместе с оставшимися грануляциями и некротизированными тканями на поверхности цемента. Рану тщательно промывают раствором антисептика - хлоргексидина биглюконата 0.05% под давлением из шприца с затупленной иглой. Костные карманы заполняют коллагеновой мембраной с БМКП – МСК ЖТ, индуцированных в остеогенном направлении. Лоскуты укладывают на место и герметично сшивают в межзубных промежутках отдельными узловыми швами. Перед укладыванием лоскутов на место при необходимости производят их мобилизацию путем рассечения надкостницы на всем протяжении длины, создавая условия для смещения лоскутов в коронковом направлении. Ввиду того, что край лоскута в основном сохраняет свою первоначальную форму, создается возможность полного восстановления анатомической конфигурации зубных сосочков. Швы накладывают из монофиламентного нейлона толщиной 5/0 или 6/0, узлы оставляют на уровне межзубных промежутков на 1-2 мм ниже основания сосочка. После наложения швов накладывается защитная герметизирующая повязка по десневому краю и межзубным промежуткам в области разрезов из «Солкосерил дентальная адгезивная паста». Швы снимают на 7-10 сутки.

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

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