

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц



«26» сентября 2019 г.

Регистрационный № 175 -1219

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Марченко Л.Н., канд. мед. наук, доц. Чекина А.Ю., канд. мед. наук, доц. Джумова М.Ф., д-р мед. наук, проф. Федулов А.С., д-р биол. наук, проф., академик НАН Беларуси Волотовский И.Д., канд. биол. наук Квачева З.Б., Василевич И.Б.

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 (МСК ЖТ).

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.

1 Показания к применению методов

Кератит (Н16), язва роговицы (Н16.0) резистентные к традиционным методам лечения; дистрофии роговицы (Н18.5); отторжение пересаженного органа и ткани неуточненных (Т86.9).

2 Противопоказания к применению методов

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.

3 Перечень необходимых медицинских изделий, лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов, реагентов и т.д.

3.1 медицинские изделия, необходимые для получения кератолимбального лоскута и жировой ткани;

3.2 БМКП - МСК ЖТ, 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⁺, CD44⁺, CD29⁺, CD105⁺, CD45^{low/-}, CD34^{low/-};
- стерильность: стерильно;

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.

3.3 медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т.д., необходимые для получения биоматериала, БМКП аутологичных ЛСК и МСК ЖТ:

- 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 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл;
- пробирки центрифужные стерильные объемом 15 мл и 50 мл;
- пробирки стерильные полипропиленовые объемом 1-2 мл;
- чашки Петри;
- средства индивидуальной защиты;
- гемоцитометр с сеткой Горяева.

3.4. медицинские изделия, медицинское оборудование, предназначенные для оценки офтальмологического статуса пациента:

- щелевая лампа офтальмологическая;
- пневмотонометр;
- флюоресцеин;

- таблица Головина-Сивцева для проверки остроты зрения.

4 Технология использования метода

4.1 Получение БМКП

4.1.1 Получение биоматериала

Эксплантация биоптата лимба из неповрежденного участка роговицы пациента выполняется в операционной под местной анестезией с использованием микроскопа и микрохирургического инструментария. Отсепаровывается конъюнктура 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 (шёлк 8,0). Пациенту назначают инстилляцию антибиотика в глаз 3 раза в 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 шёлком 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 см³ в околопупочной области или области внутренней поверхности верхней трети плеча в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Осуществляется общепринятыми методами. Иссечённая 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 часов.

4.1.2 Приготовление БМКП - ЛСК

Биологический материал (кератолимбальный лоскут) стерильным инструментом нарезают на фрагменты (экспланты) 0,5-1 мм² и 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) и инкубируют в СО₂-инкубаторе при +37°С до образования монослоя эпителиальных стволовых клеток лимба (10-14 дней). Замену ростовой среды осуществляют каждые три 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.

4.1.3 Приготовление БМКП - МСК ЖТ

В стерильных условиях проводится 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 1x10⁵ 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 чего среду заменяют на свежую.

При образовании монослоя МСК ЖТ 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.

4.1.4 Контроль качества БМКП

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

Учет проводят на проточном цитофлуориметре.

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

БМКП - МСК ЖТ 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.

4.2 Применение БМКП

Подготовленные и паспортизированные БМКП: аутологичные МСК ЖТ или аутологичные ЛСК должны быть использованы не позднее 4 часов при условии хранения от +10°C до +33°C и не позднее 12 часов - от +5°C до +10°C.

Перед введением БМКП аутологичных ЛСК или аутологичных МСК ЖТ (500 тыс. клеток в 0,4 мл хлорида натрия 0,9% для инфузий – одна лечебная доза для перилимбальной инъекции) пациенту проводятся исследования остроты зрения; внутриглазного давления и красящая проба 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 минут должен находиться в помещении.

Перилимбальное введение БМКП - аутологичных ЛСК или аутологичных МСК ЖТ может выполняться повторно с интервалом 14 суток и более. Кратность введения определяется динамикой патологического процесса роговой оболочки.

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

5. 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.