

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

2021 г.

Регистрационный № 017-0321



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РУБЦОВ И ВОЗРАСТНОЙ АТРОФИИ  
КОЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО  
ПРОДУКТА КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:** государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси».

**АВТОРЫ:** д.м.н., проф. В.Н. Подгайский, В.М. Басалай, к.м.н., доцент А.Ч. Часнойть, к.м.н., доцент Петрова Д.Ю., Трацевская Е.Н., к.м.н., доцент А.Е. Гончаров, академик НАН Беларуси, д.б.н., проф. И.Д. Волотовский, к.б.н. З.Б. Квачева, И.Б. Василевич

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения атрофических рубцов и возрастной атрофии кожи (L90.5, L57.4 по МКБ-10) с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) «Культура фибробластов дермы человека», который может быть применен в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение вышеизложенных заболеваний.

Инструкция предназначена для врачей – пластических хирургов, врачей-дерматологов, врачей косметологов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с атрофическими рубцами и возрастной атрофией кожи в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара.

## **1 Показания к применению**

Атрофические рубцы (код по МКБ-10 L90.5).

Возрастная атрофия кожи (код по МКБ-10 L57.4).

## **2 Противопоказания к применению**

Беременность на поздних сроках, острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации, иные противопоказания, соответствующие таковым для применения биомедицинских клеточных продуктов, медицинских изделий и лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

## **3 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники, лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и др.**

3.1 Изделия медицинского назначения и медицинская техника, необходимые для эксплантации биоптата кожи и введения инъекционным способом биомедицинского клеточного продукта:

- комплект хирургического инструментария, включающий хирургический пинцет, скальпель, ножницы, иглодержатель, шовный материал;

- шприцы с иглами.

3.2 Биомедицинский клеточный продукт «Культура фибробластов дермы человека», приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.008-2019 или иной биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных фибробластов дермы человека, внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь и соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: слегка опалесцирующая жидкость беловатого цвета без посторонних включений;
- количество клеток: не менее  $1 \times 10^6$  в 1 мл хлорида натрия 0,9%;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 90%;
- подлинность клеток: содержание виментина - не менее чем у 95 % клеток; содержание фибронектина - не менее чем у 25 % клеток;
- стерильность: стерильно (далее – БМКП).

3.3 Оборудование, инструменты и расходные материалы, необходимые для подготовки биомедицинского клеточного продукта в соответствии с утвержденными ТНПА:

- CO<sub>2</sub>-инкубатор (автоматическое поддержание температуры 37°C и концентрации углекислого газа 5%);
- ламинарный бокс с вертикальным потоком воздуха II класса защиты;
- центрифуга (1500–3000 об./мин);
- холодильник (от +2°C до +8°C);
- морозильник (-20°C);
- 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, 20–200 и 1-20 мкл);
- питательная среда ДМЕМ;
- сыворотка аутологичная;
- 0,2 % раствор диспазы;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);
- трипсин-ЭДТА (0,25% раствор);
- раствор хлорида натрия 0,9% для инъекций;
- 0,4% раствор трипанового синего;
- моноклональные антитела к виментину;
- моноклональные антитела к фибронектину;
- среда тиогликолевая и среда Сабуро;
- натриевая соль бензилпенициллина;
- сульфат стрептомицина;
- гентамицин.

#### **4 Описание технологии использования метода**

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

##### **4.1 Эксплантация, хранение и транспортировка материала**

В качестве биологического материала для получения БМКП используют полнослойный биоптат кожи. Эксплантация неповрежденного участка кожи пациента, площадью не менее 0,5 см<sup>2</sup>, проводится в заушной области под местной анестезией путем иссечения участка кожи в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Биоптат кожи помещают во флакон с 10 мл питательной среды и антибиотиками (натриевая соль бензилпенициллина 500 ЕД/мл; сульфат стрептомицина 500 мг/мл) и доставляют в лабораторию. Транспортировка биоматериала

осуществляется в герметичном термоконтейнере в течение не более 24-х часов после эксплантации при температуре от +2°C до +10°C.

## **4.2 Производство и контроль качества биомедицинского клеточного продукта**

4.2.1 Культуры дермальных фибробластов готовят по разработанной методике, согласно утвержденным ТНПА. Доставленный в лабораторию полнослойный биоптат кожи инкубируют в 0,2% растворе диспазы при +4°C в течение 12-14 час, затем с помощью пинцета отделяют эпидермис от дермы. Дерму измельчают до небольших фрагментов (0,2-0,3 см), которые помещают в стерильные пластиковые чашки Петри, куда вносится питательная среда DMEM с добавлением 10% сыворотки крови пациента и антибиотиков (раствор гентамицина в концентрации 100 мкг/мл). Чашки инкубируют 2-3 недели в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с 5% содержанием углекислого газа при 37°C до образования монослоя фибробластов, осуществляя смену среды каждые 3 дня.

4.2.2 Приготовление аутологичной сыворотки производят общепринятыми методами из крови, взятой из периферической вены в объеме 50 мл. Транспортируют образцы венозной крови в стерильных пробирках без консерванта и помещают в холодильник при температуре от +4°C до +6°C на сутки для ретракции сгустка и образования дефибринированной сыворотки. При формировании кровяного сгустка пробирки с кровью центрифугируют при 1500 об./мин. в течение 15 мин. Дальнейшее получение сыворотки осуществляют в стерильных условиях ламинарного бокса. Сыворотку отбирают в стерильные пробирки и последовательно фильтруют через фильтры 0,45 мкм и 0,2 мкм. Далее сыворотку используют для культивирования клеток или замораживают и хранят при температуре -20°C. Заготовленные сыворотки размораживают

однократно, непосредственно перед проведением культивирования клеток.

4.2.3 Для накопления биомассы клеток проводится их субпассирование (2-3 пассажа), путем пересева клеток в новые культуральные пластиковые флаконы (площадь роста клеток - 25 см<sup>2</sup>, затем 75 см<sup>2</sup>) в концентрации 150 - 200 тыс. на 1 см<sup>2</sup>. Монослой фибробластов формируется в течение 5-7 суток, Для получения взвеси клеток монослой клеток обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе ЭДТА.

4.2.4 Для приготовления БМКП клеточную взвесь разводят раствором хлорида натрия 0,9% для инъекций до необходимой концентрации.

4.2.5 Контроль стерильности осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

4.2.6 Для контроля подлинности клеток осуществляют оценку фенотипического состава БМКП с использованием моноклональных антител к виментину и фибронектину, меченных флуорохромами. Учет проводят на проточном цитофлуориметре.

4.2.7 Для определения жизнеспособности клеток используют 0,4 % раствор трипанового синего. Учет результатов проводят с использованием камеры Горяева и светового микроскопа.

4.2.8 БМКП считают прошедшим контроль качества при содержании виментина не менее чем у 95 % клеток и фибронектина не менее чем у 25 % клеток, жизнеспособности – не менее 90 %, отсутствии контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами.

### 4.3 Применение биомедицинского клеточного продукта

#### 4.3.1 Введение БМКП осуществляют в процедурном кабинете.

При первом введении БМКП для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа проводят кожный тест, для чего вводят подкожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл взвеси клеток. Наблюдают за состоянием пациента на протяжении 30 минут. При отсутствии системных и местных аллергических реакций (гипотензия, крапивница, бронхоспазм и др.) переходят к выполнению дальнейших этапов инструкции. При наличии системных и местных аллергических реакций пациенту оказывают необходимую медицинскую помощь, применение БМКП прекращают.

4.3.2 БМКП вводят интрадермально папульно с соблюдением правил асептики и антисептики, угол наклона иглы при введении составляет 10-15°, срез иглы направлен книзу. При коррекции атрофических рубцов введение БМКП производится в дозе  $10 \times 10^6$  фибробластов в 1 мл раствора хлорида натрия 0,9% из расчета  $2 \times 10^5$  фибробластов/см<sup>2</sup> рубца. При коррекции возрастной атрофии кожи введение БМКП производится в дозе  $10 \times 10^6$  фибробластов в 1 мл раствора хлорида натрия 0,9% в область проблемных зон на расстоянии не менее 0,5 см от каждого введения из расчета 0,01-0,0125 мл БМКП на одно введение ( $1-1,25 \times 10^5$  фибробластов/инъекция).

4.3.3 Повторяют этапы 4.3.2 инструкции 2-3 раза с интервалом в 2-3 недели.

4.3.4 Через 3 месяца с момента завершения этапов 4.3.3 инструкции определяют эффективность лечения на основании клинической картины участков поражения.

4.3.5 Повторение этапов 4.3.2 и 4.3.3 инструкции показано не ранее, чем через 8-12 месяцев после последнего введения БМКП.



## **5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

После применения БМКП в течение суток может наблюдаться отечность, инфильтрация, болезненность, гиперемия, зуд в месте введения, что непосредственно связано с методикой выполнения инъекций. Данные симптомы исчезают через 1-5 дней.

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