

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневич

« ____ » _____ 2019 г.

Регистрационный № _____ -1219

**Метод лечения воспалительно-дистрофических заболеваний роговицы
аутологичными стволовыми клетками**

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. 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., академик НАН Беларуси

И.Д. Волотовский, канд. биол. наук З.Б. Квачева, И.Б. Василевич

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения кератитов (МКБ-10, Н16) и дегенераций роговицы (МКБ-10, Н18.4) с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) аутологичных лимбальных стволовых клеток (ЛСК) или мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в смеси с гиалуронатом натрия 1%, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение дефектов роговой оболочки глаза воспалительно-дистрофического характера.

Инструкция предназначена 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 ЛСК и МСК ЖТ

Эпителиальные дефекты роговицы, язвенные кератиты различной этиологии (Н16.1), резистентные к традиционным методам лечения; дистрофические заболевания роговицы (Р18.05), сопровождающиеся отёком роговой оболочки глаза (Н18.2); буллезная кератопатия [Н18.1]; ожог глазной поверхности I – III ст.* (Т26.0, Т26.1); ятрогенные кератопатии (НКД Е03.2); рецидивирующий язвенный кератоувеит [Н15-Н22]; различные виды кератопластик с пересадкой донорской ткани (Z91.5, Z10.8); посттравматические, послеоперационные, контузионные кератиты (Н19) и кератопатии (Н18.9); аниридия* (Q13); кератоконус (Н18.6); болезнь трансплантата [Т86.1].

*ЛСК не показаны при аниридии и ожоге глазной поверхности IV степени. При данной патологии рекомендуется перилимбальное введение МСК ЖТ.

2 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, возраст пациентов до 18 лет. Относительным противопоказанием являются аномалии рефракции глаза высокой степени.

3 Перечень необходимых медицинских изделий, медицинской техники, лекарственных средств, реагентов, БМКП

1. медицинские изделия и медицинская техника, необходимые для выполнения эксплантации кератолимбального лоскута и жировой ткани, взятия периферической крови;

2. БМКП – МСК ЖТ, внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: прозрачная жидкость беловатого цвета без посторонних включений;
- количество клеток: не менее $0,5 \times 10^6$;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика): CD90⁺, CD44⁺, CD29⁺, CD73⁺, CD45^{low/-}, CD34^{low/-};
- стерильность: стерильно;

БМКП – ЛСК, внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: прозрачная жидкость беловатого цвета без посторонних включений;

- количество клеток: не менее $0,5 \times 10^6$;
- количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика: экспрессия цитокератина 19 не менее 50%, нестина не менее 20%;
- стерильность: стерильно.

3. медицинские изделия, реагенты, лекарственные средства, расходные материалы и др. необходимые для подготовки БМКП в соответствии с утвержденными ТНПА:

- питательная среда ДМЕМ; ДМЕМ/F12;
- эпидермальный фактор роста;
- ITS (инсулин, трансферрин, селенид);
- форскалин;
- 0,1% раствор коллагеназы;
- сыворотка крови аутологичная;
- моноклональные антитела к антигенам человека: CD29, CD44, CD90, CD105, 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;

4. медицинские изделия, медицинское оборудование, предназначенные для перилимбального введения БМКП:

- офтальмологический микроскоп;
- щелевая лампа офтальмологическая;
- оптический когерентный томограф для переднего отрезка глаза;
- пневмотонометр;
- тонометр Маклакова 10 г;
- флюоресцеин;
- таблица Головина-Сивцева для проверки остроты зрения;
- набор очковых линз;
- пробная очковая оправа;
- автоматический рефрактометр;
- тетракаин 1%;
- гиалуронат натрия 1%.

4 Технология использования метода

4.1 Взятие, хранение и транспортировка материала

Для получения аутологичной сыворотки выполняют забор крови из периферической вены общепринятыми методами, в количестве 40–50 мл, и помещают в стерильную пробирку.

Эксплантация биоптата лимба из неповрежденного участка роговицы пациента (желательно на 6-ти часах) выполняется в операционной под местной анестезией с использованием микроскопа, 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. Обнаженный участок лимба покрывается конъюнктивой по Кунту, фиксированной двумя швами (шёлк 8,0). Пациенту назначают инстилляци антибиотика в глаз 3 раза в день до снятия конъюнктивальных швов через 7 дней, а также инстилляци 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 кератолиम्бального 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 инстилляци антибиотика на 7 дней до снятия шва с конъюнктивы.

Эксплантация жировой ткани для получения БМКП выполняется под местной анестезией путем резекции подкожно-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 клетчатка 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.

4.2 Получение и контроль качества БМКП

4.2.1 Получение аутологичной сыворотки

Образцы крови помещают в холодильник при $t +4^{\circ}\text{C} - +6^{\circ}\text{C}$ на сутки для ретракции сгустка и образования дефибринированной аутосыворотки. Сыворотку получают после свертывания крови: пробирки с образовавшимся сгустком центрифугируют в течение 20 мин при 1500 об/мин. Дальнейшее получение сыворотки осуществляют в стерильных условиях ламинарного бокса. Сыворотку отбирают в чистую стерильную пробирку и последовательно фильтруют через фильтры с размером пор 0,45 и 0,2 мкм, маркируют с указанием ФИО пациента и хранят до применения при -20°C . Перед применением сыворотку размораживают. В случае выпадения криопреципитатов рекомендовано повторно фильтровать сыворотку через фильтры с размером пор 0,2 мкм.

Аутологичная сыворотка является добавкой к питательной среде для культивируемых клеток как источник ростовых факторов, белков, липидов, солей, витаминов, микроэлементов, аминокислот и других компонентов.

4.2.2 Получение БМКП – ЛСК

Биологический материал (кератолимбальный лоскут) стерильным инструментом нарезают на фрагменты (экспланты) $0,5-1 \text{ мм}^2$ 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 CO₂-инкубаторе при +37⁰С 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. Доводят концентрацию БМКП до необходимой из расчета 500 тыс. клеток в 0,2 мл раствора натрия хлорида.

4.2.3 Получение БМКП – МСК ЖТ

В стерильных условиях проводится ферментативная обработка жировой ткани в 0,1 % растворе коллагеназы. Затем клеточную суспензию фильтруют через фильтр, центрифугируют при 370 g 10 мин, удаляют супернатант. Осадок заливают ростовой средой ДМЕМ, содержащей 10 % аутологичной сыворотки. Клетки высевают в количестве 1×10^5 кл/см² в культуральные флаконы и инкубируют в течение 24 ч при 37⁰С 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 в количестве 4×10^3 кл/см², накапливают их необходимое количество в течение 2–3 пассажей, смену ростовой среды проводят каждые 72 ч.

На конечной стадии получения БМКП суспендируют в растворе натрия хлорида из расчета 500 тыс. клеток в 0,2 мл раствора.

4.3 Контроль качества БМКП

Контроль стерильности осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной

фармакопеи Республики Беларусь (Т. 3, 2009 г.).

Для контроля подлинности осуществляют оценку фенотипического состава БМКП 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, CD73, 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 20%, жизнеспособности – более 85%, отсутствии контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами.

4.4 Приготовление смеси БМКП (МСК ЖТ или ЛСК) с гиалуронатом натрия 1%

Культированные аутологичные ЛСК или МСК ЖТ 500 тыс. клеток в 0,1 мл физиологического раствора *ex tempore* непосредственно перед применением смешиваются с 0,3 мл гиалуроната натрия 1% и слегка встряхиваются. Предварительно гиалуронат натрия 1% необходимо разогреть до температуры 36–37°C на водяной бане или в термостате.

БМКП из аутологичных МСК ЖТ или ЛСК хранится при температуре от +5°C до +10°C в течение не более 12 ч и при температуре от +10°C до +33°C - не более 4 ч с момента приготовления.

4.5 Применение БМКП

Перед введением смеси аутологичных ЛСК или МСК ЖТ с гиалуронатом натрия 1% пациенту проводятся исследования: клинической рефракции на автоматическом рефрактометре; остроты зрения (без

коррекции и с коррекцией при наличии патологии рефракции); внутриглазного давления, биомикроскопия роговицы; красящая проба с флюоресцеином; периметрия, В-сканирование (при наличии сопутствующей патологии сетчатки, зрительного нерва).

Применение БМКП осуществляют в процедурном кабинете. Перилимбальное введение выполняется в 5 мм от лимба в меридиане воспалительно-дистрофического поражения роговой оболочки глаза. После введения пациенту не рекомендуется 20 минут выходить на открытый воздух. Продолжаются инстилляцией ранее назначенных глазных лекарственных средств (антиглаукомные, витаминные капли, лубриканты). Перилимбальное введение БМКП с гиалуронатом натрия 1% может выполняться повторно с интервалом 14 суток и более. Кратность введения определяется характером имеющегося воспалительно-дистрофического процесса роговой оболочки индивидуально для каждого пациента, а также положительным ответом на применяемый метод лечения.

Результаты лечения оценивают на 3, 7, 14 и 30 сутки по динамике регенеративного процесса воспалительно-дистрофического поражения роговой оболочки глаза: восстановление эпителия; результаты красящей пробы с флюоресцеином в синем кобальтовом свете; уменьшение отёка роговицы по данным ОКТ (пахиметрия); повышение остроты зрения; сроки эпителизации изъязвлений роговицы.

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.