МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОМЕДИЦИНСКОГО 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения хронического периодонтита с применением биомедицинского клеточного продукта на основе культивированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ), индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении.

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, и (или) в условиях отделений дневного пребывания.

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 эксплантации жировой ткани;

2. Биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные стволовые, индуцированные к дифференцировке в остеогенном

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

направлении», приготовленный в соответствии с ТУ BY 100217351.014-2020 или иной биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток ЖТ, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, соответствующий следующим требованиям:

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

– количество клеток мезенхимальных стволовых, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении: не менее $0,4\times10^6$ в 0,05 мл хлорида натрия 0,9% для заполнения 1 внутрикостного кармана;

– количество жизнеспособных мезенхимальных стволовых клеток, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении: не менее 85%;

– подлинность клеток мезенхимальных стволовых, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении: экспрессия гена остеопонтина и гена щелочной фосфатазы повышена не менее чем в 2,0 раза по отношению к контрольной культуре (культивирование клеток в ростовой среде без индукторов дифференцировки), положительны на окраску ализариновым красным;

– стерильность: стерильно (далее – БМКП).

3. Медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т.д., необходимые для приготовления БМКП:

- инкубатор углекислотный (автоматическое поддержание температуры $+37^0$С и концентрации углекислого газа 5%);

- ламинарный бокс с потоком воздуха II класса защиты;

- центрифуга (1500–3000 об./мин.);

- холодильник;

- морозильник;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- амплификатор с возможностью автоматической детекции накопления продуктов амплификации в реальном времени ;

- микроскоп инвертированный;

- микроскоп световой бинокулярный;

- камера Горяева;

- флаконы для культур клеток Т12,5; Т25 и Т75;

- пробирки стерильные центрифужные на 50 мл 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 мкл и 20 – 200 мкл);

- системы фильтрации 0,45 мкм и 0,2 мкм, однократного применения;

- 0,1% раствор коллагеназы;

- питательная среда ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко);

- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);

- 0,02% раствор Версена;

- 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;

- аскорбиновая кислота;

- β-глицерол-2-фосфат;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- дексаметазон;

- костный морфогенетический белок (BMP-2);

- набор реагентов для выделения РНК;

- набор реагентов для синтеза кДНК;

- набор реагентов для постановки полимеразной цепной реакции;

- референс-ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы;

- праймеры для определения экспрессии генов: щелочной фосфатазы, остеопонтина;

- тиогликолевая среда;

- среда Сабуро;

- термостат, позволяющий поддерживать температуру от +33°С до +40°С;

- лидокаина гидрохлорид 2%-2 мл, стерильный.

4. Медицинские изделия, лекарственные средства и т.д., необходимые для хирургической операции направленной тканевой регенерации внутрикостного кармана:

- средства индивидуальной защиты;

- стоматологическая установка;

- зеркало стоматологическое;

- скальпель стоматологический №15 или №15С;

- гладилка хирургическая серповидная;

- распатор стоматологический;

- пинцет;

- иглодержатель;

- шовный материал нить монофиламентного нейлона толщиной 5/0, 6/0);

- ножницы остроконечные;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- материал на основе костного коллагена стерильного по ТУ 9393-001-96476322-2011 или аналог (далее – мембрана);

- артикаина гидрохлорид 4%-2 мл, стерильный;

- шприц одноразовый;

- ручные инструменты для удаления зубных отложений;

- ультразвуковые инструменты для удаления зубных отложений;

- антисептическое лекарственное средство для нанесения на слизистую оболочку рта – хлоргексидина биглюконат 0,05%;

- адгезивная герметизирующая повязка «Солкосерил дентальная паста» или аналог.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Приготовление БМКП

1.1 Получение биологического материала

Для получения биологического материала, необходимого для приготовления БМКП, проводят эксплантацию жировой ткани в околопупочной области или внутренней поверхности верхней трети бедра под местной инфильтрационной анестезией в условиях операционной с соблюдением правил асептики.

1.1.1 Операционное поле обрабатывается антисептическим раствором, выполняется инфильтрационная анестезия кожи в области зоны вмешательства раствором лидокаина гидрохлорида 2%.

1.1.2 Производят дугообразный разрез кожи, иссекают участок подкожно-жировой клетчатки массой 5 – 20 г.

1.1.3 Разрез послойно ушивают, накладывают асептическую повязку.

1.1.4 Жировая ткань помещается в стерильный флакон с транспортной средой, закрывается стерильной крышкой и маркируется.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Биологический материал (жировая ткань) может транспортироваться и храниться при температуре от +2°С до +12°С не более 24-х часов от времени эксплантации.

1.2 Приготовление аутологичной сыворотки

Для приготовления аутологичной сыворотки производят получение общепринятыми методами венозной крови из периферической вены в объеме 50 мл. Транспортируют образцы венозной крови в стерильных пробирках без консерванта и помещают в холодильник при температуре от +4°С до +6°С на сутки для ретракции сгустка и образования дефибринированной аутосыворотки. 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°С. Заготовленные сыворотки размораживают однократно, непосредственно перед проведением исследования.

1.3 Получение и индукция МСК ЖТ к дифференцировке в остеогенном направлении

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°С в CO_2-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5% CO_2. Полную смену ростовой среды проводят каждые

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

72 ч. После образования монослоя МСК ЖТ пересевают каждые 10-12 дней. Для этого монослой промывают фосфатным буферным раствором, обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе Версена при +37°С. Клетки высевают в пластиковые культуральные флаконы, накапливают их необходимое количество в течение 2-3 пассажей. После чего осуществляется замена среды, куда добавлены индукторы дифференцировки: аскорбиновая кислота – 50 мкг/мл, β-глицерол-2-фосфат – 10 мМ, дексаметазон – 100 нМ, BMP-2 – 50 нг/мл. Полную смену индукционной среды проводят каждые 72 ч. Культивирование МСК ЖТ в среде для индукции остеогенной дифференцировки проводится в течение 5-7 дней. Далее БМКП переводят из монослоя в суспензию. Для этого монослой промывают фосфатным буферным раствором, обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе Версена при +37°С. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Доводят концентрацию БМКП до необходимой из расчета $0,4\times10^6$ в 0,05 мл раствора натрия хлорида 0,9 % для инфузий.

1.4. Контроль качества БМКП

Для оценки жизнеспособности МСК ЖТ, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении используют тест на исключение красителя, который основывается на способности 0,4% 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 85% жизнеспособных клеток.

Для анализа подлинности клеток, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, оценивают морфологию клеток после культивирования МСК ЖТ в индукционной среде -

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

появление скоплений округлой формы клеток, которые прокрашиваются 0,5% ализариновым красным (наличие минерализации).

Для подтверждения дифференцировки МСК ЖТ в остеогенном направлении используют метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР) с использованием праймеров на экспрессию специфических генов, детерминирующих остеогенную дифференцировку: SPP1 (ген, кодирующий белок остеопонтин), ALPL (ген, кодирующий изофермент щелочную фосфатазу) (согласно Инструкции к набору).

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, полученный в соответствии п. 1.3 настоящей инструкции, хранится при температуре от +5°С до +10°С в течение не более 12 ч и при температуре от +10°С до + 30°С не более 4 ч со времени приготовления.

3. Нанесение БМКП на мембрану.

Для реализации целей настоящей инструкции может быть использован биомедицинский клеточный продукт, приготовленный в соответствие с п. 1.3 настоящей инструкции, либо биомедицинский клеточный продукт по ТУ BY 100217351.014-2020, либо иной биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток ЖТ, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, соответствующий следующим требованиям:

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– количество клеток мезенхимальных стволовых, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении: не менее $0,4\times10^6$ в 0,05 мл хлорида натрия 0,9% для заполнения 1 внутрикостного кармана;

– количество жизнеспособных мезенхимальных стволовых клеток, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении»: не менее 85%;

– подлинность клеток мезенхимальных стволовых, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении: экспрессия гена остеопонтина и гена щелочной фосфатазы повышена не менее чем в 2,0 раза по отношению к контрольной культуре (культивирование клеток в ростовой среде без индукторов дифференцировки), положительны на окраску ализариновым красным;

– стерильность: стерильно.

3.1 Определение количества МСК ЖТ, индуцированных в остеогенном направлении в составе БМКП

Для реализации метода лечения, изложенного в настоящей инструкции, для заполнения 1 внутрикостного кармана в составе БМКП должно содержаться $0,4\times10^6$ МСК ЖТ, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении, в 0,05 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Необходимое количество клеток в составе БМКП для пациента рассчитывают путем умножения количества внутрикостных карманов на $0,4\times10^6$.

3.2 Подготовка мембраны и нанесение на нее БМКП

Мембрану 3-х кратно промывают в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций в стерильных условиях в течение 5-10 минут. БМКП наносят на мембрану из расчета $0,4\times10^6$ в 0,05 мл в 0,9% растворе натрия хлорида на 1 $см^2$.

4. Хирургическая операция направленной тканевой регенерации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

внутрикостного кармана с БМКП.

4. 1 Подготовка полости рта пациента.

Перед началом операции пациенту проводят орошение полости рта раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%.

4.2 Обезболивание.

Хирургическую операцию начинают с выполнения местной проводниковой анестезии соответствующего участка челюсти с применения раствора артикаина 4%.

4.3 Создание доступа к внутрикостному карману.

Проводят рассечение скальпелем мягких тканей в межзубных промежутках в проекции апроксимального внутрикостного кармана. Рассечение десневых сосочков и внутриборoздковые разрезы производят на участке зубного ряда, превышающей область намеченного вмешательства на 1-2 зуба с каждой стороны. Направление разреза в межзубном пространстве – параллельно основанию сосочка между проксимальными сторонами зубов. При этом, скальпель, 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 скальпеля перемещают по направлению от корня к коронке зуба. Затем поочередно с каждой стороны, распатором скользя по поверхности зуба, входят в периодонтальный карман и, продвигая распатор 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.

4.4 Подготовка внутрикостного кармана.

4.4.1 Удаление патологического содержимого внутрикостного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

кармана.

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 скальпеля в мягкие ткани.

4.4.2 Удаление 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.

4.5 Применение мембраны.

Рану тщательно промывают раствором хлоргексидина биглюконата 0,05% под давлением из шприца с затупленной иглой. Внутрикостные карманы заполняют коллагеновой мембраной с БМКП. Лоскуты укладывают на место и герметично сшивают в межзубных промежутках отдельными узловыми швами. 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 адгезивная герметизирующая повязка по

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

десневому краю и межзубным промежуткам в области разрезов. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru