

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

29 декабря 2010 г.

Регистрационный №133-1110

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии»

УО «БГМУ»

ГУ «РНПЦ детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ:

д-р. мед. наук Скрягина Е. М.

канд. мед. наук Скрягин А. Е.

канд. биол. наук Исайкина Я. И.

Солодовникова В. В.

Минск 2010

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров.
Уровень внедрения: противотуберкулезные учреждения здравоохранения республики.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Мультирезистентный туберкулез легких.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

- Инструменты и расходные материалы для забора пунктата костного мозга и внутривенной реинфузии МСК: игла для костно-мозговой пункции, вакутайнеры по 10 мл с сухим гепарином, местный анестетик, катетер (G16-18).

- Оборудование и расходные материалы для выделения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга и их культивирование: Гистопак 1,077 для выделения мононуклеарных клеток (МНК) из костного мозга методом разделения клеток по градиенту плотности; среда IMDM, содержащая 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) 2 мМ/л L-глутамин и 10^{-4} М/л 2-меркаптоэтанол; флаконы для выращивания МСК; 0,25% трипсин-ЭДТА; 0,9% раствор хлорида натрия; ламинарный шкаф 2-го класса защиты для проведения культуральных работ по получению биотрансплантата МСК; CO₂-инкубатор.

- Оборудование и расходные материалы для проведения иммунофенотипического анализа МСК: проточный цитофлуориметр, наборы моноклональных антител (CD105, CD90, CD44, CD45+, CD34, CD14).

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА

Обоснование необходимости внедрения метода лечения туберкулеза (ТБ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) с использованием аутологичной трансплантации (АТ) мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

МЛУ–ТБ — это форма лекарственно-устойчивого туберкулеза, при котором микобактерии туберкулеза всегда имеют резистентность как минимум к изониазиду и рифампицину, с устойчивостью или без таковой к другим противотуберкулезным препаратам (ПТП). МЛУ–ТБ характеризуется крайне неудовлетворительными результатами лечения и негативным влиянием на общую эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу. Лечение туберкулеза с МЛУ характеризуется большой продолжительностью (до трех лет), частыми побочными эффектами ПТП, высокой стоимостью и низкой эффективностью. Успех лечения варьирует в пределах от 22 до 68%, а смертность — от 4 до 37%. Кроме того, имеются сообщения о значительном количестве рецидивов заболевания после излечения МЛУ–ТБ.

Помимо введения в режимы лечения новых ПТП и новых подходов к хирургическому лечению туберкулеза с МЛУ постоянно продолжается поиск эффективных методов воздействия на иммунологические и регенеративные

процессы организма. Одним из терапевтических подходов, привлекающих в настоящее время большое внимание, является цитотерапия, в частности аутотрансплантация МСК.

Три основные группы свойств определяют актуальность клеточной терапии МСК: 1) тканевая пластика, т.е. возможность заселять поврежденные органы, являться источником конечных клеточных элементов, специфичных для тканей данного органа; 2) иммуномодулирующий эффект; 3) транспорт для генной терапии. МСК, являясь плюрипотентными клетками, способны осуществлять как конституционную дифференцировку в клетки соединительной ткани, так и дифференцировку в эндодермальном направлении при воздействии специфических стимуляторов. Кроме того, МСК имеют следующие свойства, делающие их наиболее перспективными для применения в цитотерапии: 1) легкость в получении; 2) высокий пролиферативный потенциал; 3) генетическая стабильность; 4) воспроизводимость основных характеристик (способность к дифференцировке, миграционная активность) от пассажа к пассажи.

Технология проведения аутологичной трансплантации МСК

Забор костного мозга (КМ)

Пациенту с МЛУ–ТБ во время проведения основного или поддерживающего курса полихимиотерапии четырежды и более ПТП проводят забор костного мозга в асептических условиях под местной анестезией. Из одного или нескольких проколов подвздошной кости (со стороны задней поверхности) аспирируют 45–65 мл КМ. Аспират КМ помещают в 10-миллиметровые вакутайнеры с сухим гепарином и транспортируют в лабораторию.

Культивирование МСК

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяют из костного мозга методом деления клеток по градиенту плотности на Гистопаке 1,077 с последующей двукратной отмывкой отсепарированной фракции клеток в 0,9% растворе хлорида натрия. Полученные МНК ресуспендируют в среде IMDM, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), 2 мМ/л L-глутамин и 10^{-4} М/л 2-меркаптоэтанола, и переносят в концентрации 2– 3×10^6 /мл во флакон объемом 175 см². Клетки инкубируют при 37 °С в 5% CO₂. Через 48 ч. производят смену среды, удаляя таким образом клетки, находящиеся в суспензии. При 80–90% покрытия поверхности флакона прикрепленными клетками среду удаляют, и клетки дезадгезируют с пластика добавлением 5 мл 0,25% трипсин-ЭДТА. Через 4–5 мин действие трипсина ингибируют с помощью ЭТС. Клетки отмывают в 0,9% растворе хлорида натрия и в количестве 1×10^6 пересаживают во флаконы 175 см² (1-ый пассаж). Таким образом, проводят 3 пассажа, при которых МСК наращивают *in vitro* до необходимого количества в зависимости от массы пациента. Клетки, снятые с поверхности культуральных флаконов последнего пассажа, дважды отмывают в физиологическом растворе, переносят в шприц в объеме 20 мл для последующей инфузии пациенту с МЛУ–ТБ.

Перед инфузией пациенту клетки, выращенные *in vitro*, идентифицируют по наличию поверхностных маркеров CD105, CD90, CD44, характерных для МСК, и отсутствию маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD14, определяя жизнеспособность МСК.

Обязательным требованием является исследование МСК из каждого пассажа на стерильность по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

Характеристики аутотрансплантата МСК.

Биотрансплантат МСК создается для каждого пациента индивидуально. В среднем срок культивирования мезенхимальных стволовых клеток составляет 27–30 дней, что позволяет МСК, выделенным из костного мозга человека, не только сохранить высокий пролиферативный потенциал, но и оставаться мультипотентными, т.е. способными развиваться по любой линии дифференцировки, в т.ч. с такими конечными элементами, как эндотелиальные клетки, клетки альвеолярного и бронхиального эпителия, миоциты, фибробласты и адипоциты.

Все полученные *in vitro* МСК должны быть морфологически однородными, иметь фибробластоподобную форму при адгезии на пластике и в большинстве своем морфологически не проявлять признаков «старения», которое выражается в приобретении клетками крупного размера, распластанной «рваной» формы и вакуолизации цитоплазмы. Находясь в суспензии для введения пациенту, МСК имеют вид больших округлых клеток с круглым ядром, размер которых визуалью в 3–4 раза превышает размер нейтрофилов.

Для инфузии пациенту используется только свежеприготовленная культура МСК. Срок приготовления трансплантата МСК составляет 2–4 ч. до введения.

В клеточной культуре МСК при контроле на бактериальную и вирусную контаминацию не должно выявляться патогенов.

При получении аутотрансплантата МСК для пациентов с МЛУ–ТБ используется от 40 до 65 мл КМ, из которого выделяют в среднем $266,29 \pm 35,97 \times 10^6$ МНК. В результате экспансии клеток в культуре количество МСК на выходе в среднем составляет $72,23 \pm 7,59 \times 10^6$, что позволяет получить трансплантат МСК в средней дозе $1,03 \pm 0,1 \times 10^6$ /кг для каждого пациента.

Реинфузия МСК

Для проведения процедуры реинфузии МСК пациент переводится в отделение интенсивной терапии и реанимации (ОИТР). С учетом возможной интенсивной терапии в результате осложнений реинфузии МСК пациенту предлагают воздержаться от приема пищи и жидкости в течение 2 ч перед реинфузией. Пациенту устанавливают катетер (G16–18) в периферическую (кубитальную) вену. Полученную из лаборатории в 20-миллиметровом шприце суспензию МСК предварительно встряхивают несколько раз (для предотвращения клеточных клампов) и вводят внутривенно медленно в течение 3 мин. За 30 мин до реинфузии пациент получает димедрол 1%–1 мл внутримышечно. Мониторинг в условиях ОИТР продолжается не менее 2 ч,

после чего пациент переводится в свое отделение с рекомендациями термометрии через 2 часа, вечером и утром следующего дня, наблюдением дежурного врача и контроля общего анализа мочи и крови на следующее утро.

Ожидаемый эффект

В результате внедрения метода в практику фтизиатрии повысится эффективность лечения пациентов с МЛУ–ТБ, уменьшится количество и тяжесть побочных эффектов противотуберкулезных препаратов, сократятся сроки лечения, что позволит получить определенный социальный и экономический эффект.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ

- Аллергическая реакция на местный анестетик во время забора клеток.
- Аллергическая реакция во время или сразу после введения клеток и трансфузионная реакция в течение первых суток после внутривенного введения клеток, проявляющаяся повышением температуры до 37,5°C, умеренной слабостью и гриппоподобным состоянием.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- Возраст до 18 и более 60 лет.
- Беременность и лактация.
- Тяжелые острые и хронические сопутствующие заболевания.
- Аутоиммунные и аллергические заболевания в фазе обострения.
- Алкоголизм или наркомания у пациента.
- Пациенты, находящиеся на паллиативном лечении.
- Низкая приверженность к лечению (наличие отрывов в лечении в анамнезе, низкий социальный статус).