

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

29 ноября 2013 г.

Регистрационный № 156-1113

МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА
С ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ
АУТОЛОГИЧНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
пульмонологии и фтизиатрии»,

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ:

Д.м.н. Скрягина Елена Михайловна, д.м.н., профессор Гуревич Геннадий
Львович; к.м.н., доцент Скрягин Александр Егорович, к.б.н. Исайкина Янина
Ивановна, Солодовникова Варвара Валерьевна, Рогова Зоя Иосифовна

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

29.11.2013

Регистрационный № 156-1113

**МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА
С ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ
АУТОЛОГИЧНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Е.М. Скрягина, д-р мед. наук, проф. Г.Л. Гуревич, канд. мед. наук, доц. А.Е. Скрягин, канд. биол. наук Я.И. Исайкина, В.В. Солодовникова, З.И. Рогова

Минск 2013

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод клеточной терапии туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью аутологичными мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками.

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров, врачей анестезиологов-реаниматологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях, и разработана с целью повышения эффективности терапии пациентов с широко лекарственно-устойчивым туберкулезом (ШЛУ-ТБ).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Оборудование и расходные материалы для забора костного мозга (КМ) и внутривенной реинфузии аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК): игла для костно-мозговой пункции, вакутайнеры по 10 мл с сухим гепарином, местный анестетик, катетер (G 16–18).

2. Стандартное оборудование и расходные материалы для выделения ММСК из костного мозга и их культивирования.

3. Стандартное оборудование и расходные материалы для проведения иммунофенотипического анализа аутологичных ММСК.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ШЛУ-ТБ (бактериологически подтвержденный диагноз туберкулеза легких после проведения быстрых молекулярно-генетических тестов с детекцией чувствительности/устойчивости к противотуберкулезным лекарственным средствам первого (изониазид и рифампицин) и второго (инъекционные и фторхинолоны) ряда).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Возраст пациента до 18 или свыше 65 лет.

Беременность или 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).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Забор и процессинг ММСК

После получения результатов, соответствующих широкой лекарственной устойчивости, пациенту назначают эмпирическое лечение и проводят забор костного мозга общепринятыми методами в асептических условиях под местной анестезией.

Из одного или нескольких проколов подвздошной кости (со стороны задней поверхности) аспирируют 45–85 мл КМ. Аспират КМ помещают в 10-миллиметровые вакутайнеры с сухим гепарином и транспортируют в лабораторию.

В дальнейшем выделяют моноклеарные клетки (МНК) из костного мозга методом разделения клеток по градиенту плотности на среде Гистопак 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 $2-3 \times 10^6$ /мл во флакон объемом 175 см². Клетки инкубируют при 37°C в 5% CO₂. Через 48 ч производят смену среды, удаляя таким образом клетки, находящиеся в суспензии. При 80–90% покрытии 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 (первый пассаж). Таким образом, проводят 3 пассажа, при которых ММСК наращивают *in vitro* до необходимого количества в зависимости от массы пациента ($0,7-1,2 \times 10^6$ /кг массы тела 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 ШЛУ-ТБ.

Перед инфузией пациенту клетки, наращенные *in vitro*, идентифицируют по наличию поверхностных маркеров CD105, CD90, CD44 (не менее 90%), характерных для ММСК, и отсутствию маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD14 (не более 5%) и определяют жизнеспособность ММСК. Обязательным требованием является исследование ММСК из каждого пассажа на стерильность.

2. Характеристики аутотрансплантата ММСК

В среднем срок культивирования аутологичных ММСК составляет 27–30 дней. Для инфузии пациенту используется только свежеприготовленная культура аутологичных ММСК. Срок приготовления трансплантата ММСК составляет 2–4 ч до введения.

При получении аутотрансплантата ММСК для пациентов с ШЛУ-ТБ используется от 45 до 85 мл КМ, из которого выделяют в среднем $438 \pm 52 \times 10^6$ МНК. В результате экспансии клеток в культуре количество ММСК на выходе в среднем составляет $68,1 \pm 8,0 \times 10^6$, что позволяет получить трансплантат ММСК в среднем в дозе $1,2 \pm 0,16 \times 10^6$ /кг массы тела пациента.

3. Реинфузия аутологичных ММСК

Полученную из лаборатории суспензию ММСК предварительно встряхивают несколько раз (для предотвращения клеточных клампов) и вводят внутривенно медленно в течение 3 мин. Наблюдение за пациентом в условиях отделения интенсивной терапии и реанимации продолжают не менее 2 ч, после чего пациента переводят в отделение.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Аллергическая реакция на местный анестетик во время забора клеток.

Трансфузионная реакция в течение первых суток после внутривенного введения клеток, проявляющаяся повышением температуры до 37,5°C и гриппоподобным состоянием.