

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц
_____ 2018 г.
Регистрационный № 098-0918



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И
ГОРТАНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ
ВЫСТИЛКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Чекан В.Л., канд. мед. наук Гончаров А.Е.,
канд. мед. наук Стринкевич Э.А., канд. биол. наук Антоневиц Н.Г.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
30.11.2018
Регистрационный № 098–0918

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И ГОРТАНИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГОУ «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В. Л. Чекан, канд. мед. наук А. Е. Гончаров, канд. мед. наук Э. А. Стринкевич, канд. биол. наук Н. Г. Антоневиц

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод лечения хронических стенозов трахеи и гортани (ХСТГ) с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) — аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ), который может входить в комплекс медицинских услуг, направленных на лечение ХСТГ.

Инструкция предназначена для врачей-оториноларингологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ХСТГ в стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Изделия медицинского назначения и медицинская техника, необходимые для выполнения биопсии слизистой оболочки средних носовых ходов.

2. Транспортная среда — DMEM с антибиотиками (гентамицин сульфат в концентрации 100 мкг/мл, амфотерицин Б в концентрации 10 мкг/мл).

3. Изделия медицинского назначения, реагенты и расходные материалы, необходимые для подготовки аутологичных МСК ОВ в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

– среда бессывороточная для культивирования МСК с хепесом и глутамином;

– раствор трипсина 0,25 % в растворе Версена;

– фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния;

– раствор Версена;

– раствор натрия хлорида 0,9 % для инфузий;

– раствор человеческого альбумина 10 %, стерильный;

– аминоактиномицин Д;

– моноклональные антитела к антигенам человека CD90, CD105, CD45, CD31;

– среда тиогликолиевая;

– среда Сабуро;

– гентамицина сульфат, раствор 0,4 %;

– флаконы для культур клеток T12,5, T25, T75, T175;

– наконечники сериальные однократного применения 1–20, 20–200, 100–1000 и 1–5 мл;

– пипетки серологические однократного применения 1, 2, 5, 10 и 25 мл;

– пробирки центрифужные 15 и 50 мл однократного применения;

– чашки Петри;

– средства индивидуальной защиты.

4. Медицинская техника, необходимая для подготовки аутологичных МСК ОВ в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

– ламинарный шкаф 2В класса защиты;

– инкубатор углекислотный;

– термостат;

- проточный цитофлуориметр;
- микроскоп инвертированный;
- центрифуга с горизонтальным или угловым ротором для пробирок емкостью 1,5–50 мл (1500–3000 об/мин);
- автоматические дозаторы переменного объема (0,5–10, 10–100, 100–1000 и 0,5–5 мл);
- пипеточный дозатор;
- гемоцитометр с сеткой Горяева;
- холодильник бытовой с морозильной и холодильной камерами (2–8 °С; -20 °С).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Стеноз верхнего отдела трахеи (J38.6 по МКБ-10), стеноз под собственно голосовым аппаратом после медицинских процедур (J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса с наличием или без трахеоларингостомы, в т. ч. после хирургических вмешательств по восстановлению просвета гортани и трахеи.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютные противопоказания: злокачественные новообразования, беременность во все сроки, гиперчувствительность к человеческому сывороточному альбумину, иные противопоказания, соответствующие таковым для применения изделий медицинского назначения и лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в инструкции. Относительные противопоказания: острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор, хранение и транспортировка материала

Забор биоптатов ткани обонятельной выстилки слизистой оболочки носа из области средней носовой раковины проводят под местной анестезией, размер биоптатов может составлять от 5 до 20 мм³. Ткань помещают в стерильный флакон с 5 мл транспортной среды. Флакон с тканью транспортируют и хранят при 4 °С не более 24 ч.

Получение и контроль качества аутологичных МСК ОВ

Подготовка аутологичных МСК ОВ осуществляется в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций.

1. Биоптат ткани ОВ размером 5–20 мм³ промывают в фосфатном буфере с гентамицином. После 2–3-кратной промывки ткань измельчают острым скальпелем на фрагменты размером 0,5–1 мм³, которые затем переносят в пластиковый культуральный флакон площадью 12,5 см², добавляют ростовую среду. Культивирование проводят в стандартных условиях в СО₂-инкубаторе (5 % СО₂) при 37 °С и влажности 95 %, осуществляют смену всей ростовой среды каждые 2–3 дня.

2. С использованием фазово-контрастного микроскопа оценивают процесс формирования монослоя. Выселение из эксплантов ткани ОВ эпителиеподобных клеток происходит на 2–5-е сут, фибробластоподобных клеток ОВ — в течение 7–14 сут. При достижении 50–70 % конфлюентности монослоя в первичной культуре (21–25 сут), появлении очагов многослойности в участках с фибробластоподобными клетками осуществляют 1-й пассаж первичной культуры. Клетки снимают трипсином, подсчитывают и высевают в новые культуральные флаконы в концентрации 20 тыс./см².

3. Дальнейший пересев субкультур производят аналогично п. 2 при конфлюентности монослоя 80–90 %. Рассевают клетки в концентрации 5–10 тыс./см². Накопление биомассы фибробластоподобных клеток — МСК ОВ происходит на протяжении 3–6 пассажей.

4. Контроль морфологии МСК ОВ проводят в течение всех сроков культивирования. МСК ОВ при росте в монослойной культуре имеют фибробластоподобную морфологию. Оценивают наличие значительной примеси клеток иных популяций (эпителиеподобные и др.), видимых признаков микробной контаминации, цитодеструкции монослоя. При изменении клеточной морфологии, нарушении архитектоники монослоя — открепление клеток от культуральной поверхности, деструкция — клетки не используют для производства БМКП.

5. Контроль стерильности осуществляют согласно инструкции по применению «Методы контроля контаминации микроорганизмами культур мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови» (рег. № 167-1208, утв. МЗ РБ 25.12.2010).

6. Для контроля подлинности клеток оценивают фенотипический состав клеточной культуры с использованием моноклональных антител к CD90, CD105, CD45, CD31, меченных флюорохромами. С целью определения жизнеспособности клетки окрашивают зондом – аминоактиномицином Д. Результаты учитывают методом проточной цитометрии. Клетки считают прошедшими контроль качества при экспрессии CD90 — более 90 %, CD105 — более 90 %, CD31 — менее 3 %, CD45 — менее 3 %, жизнеспособности — более 90 %.

7. На конечной стадии производства БМКП монослой клеток снимают трипсином, отмывают центрифугированием в 0,9 % растворе хлорида натрия 10 мин при 200g для осаждения клеток. Повторяют процедуру отмывания клеток в 0,9 % растворе хлорида натрия 2 раза. Клетки суспендируют в растворе 10 % альбумина в концентрации 1×10⁷/мл, суспензию МСК ОВ разливают по 1 мл в стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл (1 единичная доза БМКП — 20 млн клеток).

К каждой единице БМКП прилагается аналитический паспорт, в котором приводится информация о соответствии МСК ОВ предъявляемым требованиям по количеству содержащихся МСК ОВ, показателям подлинности, жизнеспособности и микробиологической чистоты.

Применение аутологических МСК ОВ

При первом применении МСК ОВ для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа проводят кожный тест, для чего вводят

подкожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл взвеси клеток. Через 30 мин при отсутствии системных и местных реакций используют оставшуюся взвесь МСК ОВ.

Во время оперативного вмешательства по восстановлению просвета дыхательных путей после удаления рубцовой и грануляционной ткани трахеи и/или гортани по периметру всей площади дезэпителизованного участка инсулиновым шприцем вводят под слизистую оболочку единичными инъекциями по 100–200 мкл суспензию МСК ОВ. На участок площадью до 2 см² используют 1 единичную дозу БМКП — 20 млн клеток в 2 мл. В послеоперационном периоде проводится фиброскопический контроль восстанавливаемого участка.

Допускаются отечность, инфильтрация, болезненность, гиперемия, зуд в месте введения МСК ОВ, субфебрилитет в течение 1–3 сут после применения.

Через 4–6 недель выполняют эндоскопический осмотр области гортани и трахеи для определения эффективности лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.