

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«  2012 г.

Регистрационный № 111-08/2

**МЕТОД ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» ПОСЛЕ
АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

Исайкина Я.И., к.б.н., Минаковская Н.В., Алейникова О.В., член-
корреспондент НАНБ, д. м. н., профессор.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012

Регистрационный № 111-0812

**МЕТОД ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ
ПРОТИВ ХОЗЯИНА» ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Я.И. Исайкина, Н.В. Минаковская, д-р мед. наук, проф.,
чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2012

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-гематологов и врачей-трансплантологов организаций здравоохранения, других врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, у которых развились осложнения после аллогенной трансплантации костного мозга.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Проточный цитофлуориметр.
2. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD34, CD45, CD105, CD90, CD73.
3. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты для проведения процессинга ГСК и культуральных работ по получению биотрансплантата МСК.
4. CO₂-инкубатор для роста культуры МСК.
5. Центрифуга.
6. Микроскоп инвертированный.
7. Культуральные флаконы на 175 см² для роста МСК.
8. Пипетки серологические на 10 и 25 мл.
9. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
10. Камера Горяева.
11. Среда для клеточных культур Дюльбекко в модификации Искова (IMDM).
12. Эмбриональная телячья сыворотка.
13. Трипсин-ЭДТА, раствор 0,25%.
14. Фиколл-1077 Гистопак.
15. 0,9%-й раствор NaCl.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Тяжелые формы острой РТПХ (2-4 степени), развившейся у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, при отсутствии ответа на лечение РТПХ по протоколу (Приложение 3 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6).

Необходимым условием является получение письменного информированного согласия родителей или пациентов о приготовлении и дальнейшем использовании биотрансплантата МСК для лечения тяжелой формы РТПХ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод предназначен для лечения острой ≥ 2 степени тяжести и стероидорезистентной РТПХ, развившейся после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Этап 1. Лечение острой РТПХ ≥ 2 степени тяжести по протоколу ТГСК.

1 линия терапии острой РТПХ. Циклоспорин до уровня 150–200 нг/мл в крови и метилпреднизолон из расчета 1–2 мг/кг/с при 2 степени РТПХ или 5 мг/кг/с при ≥ 3 степени, разделенный на 3 равные дозы. При отсутствии ответа на 1-ю линию терапии назначается дополнительная иммуносупрессивная терапия (2-я линия).

2 линия терапии острой РТПХ ≥ 2 степени тяжести. Мофетил микофенолат 2×600 мг/м², замена циклоспорина на такролимус $2 \times 0,1$ мг/кг (уровень такролимуса 6–12 нг/мл), даклизумаб (моноклональные антитела к CD25) в дозе 1 мг/кг по схеме +1, +4, +8 +15 день, далее еженедельно. При отсутствии ответа на 2-ю линию терапии и развитии стероидорезистентной формы РТПХ назначается *третья линия терапии* РТПХ — цитотерапия с применением аллогенных МСК.

Этап 2. Принятие решения о применении биотрансплантата МСК для лечения острой РТПХ в случаях:

- прогрессирования симптомов РТПХ на фоне стероидной терапии;
- стабилизации симптомов РТПХ на фоне стероидной терапии, но невозможности ее отмены;
- улучшения и стабилизации симптомов РТПХ на фоне стероидной терапии, но невозможности ее проведения из-за выраженных побочных эффектов.

Этап 3. Получение биотрансплантата МСК из костного мозга аллогенного донора ГСК или «стороннего» донора.

3.1. Обследование потенциального донора костного мозга для МСК сразу после принятия решения о проведении трансплантации МСК. Доноры МСК должны иметь отрицательный результат анализа на ВИЧ, вирусы гепатита С (НСV) и гепатита В (НВV), человеческий вирус Т-клеточной лейкемии (HTLV), сифилис и, желательного, совместимы по цитомегаловирусному статусу с реципиентом;

3.2. Эксфузия костного мозга в объеме 20–50 мл у донора посредством костномозговой пункции под локальной анестезией.

3.3. Выделение популяции МСК из мононуклеарных клеток костного мозга и культивирование их в IMDM в концентрации $2-3 \times 10^6$ /мл.

3.4. Нарращивание эффективного для проведения трансплантации количества МСК путем проведения 3–4 пассажей (пересевов) клеток при получении 80–95% конфлюэнтного слоя с обязательным проведением контроля отсутствия бактериальной контаминации для клеток каждого пассажа.

3.5. Получение биотрансплантата МСК в количестве не менее $0,3 \times 10^6$ /кг веса пациента.

3.6. Идентификация полученных методом экспансии в культуре МСК на проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73. Биотрансплантат МСК содержит не менее 90% клеток с поверхностными маркерами CD105, CD90 и CD73.

3.7. Исследование МСК каждого пассажа на стерильность. Для инфузии пациенту применяют только трансплантат МСК с отрицательными показателями по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

Мероприятия 3.1–3.7 этапа 3 осуществляются согласно общепринятым методикам.

Этап 4. Проведение трансплантации МСК пациенту.

4.1. Обследование пациента до введения МСК:

- визуальная оценка состояния кожных покровов и слизистых оболочек, аускультация органов грудной клетки, перкуссия органов брюшной полости;
- общий анализ крови;
- биохимический анализ, включающий определение уровня глюкозы, билирубина, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, γ -глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, общего белка, креатинина, мочевины, ферритина в крови.

4.2. Введение МСК.

Суспензию МСК в 20 мл 0,9%-го раствора NaCl вводят пациенту внутривенно в течение 15 мин.

Этап 5. Обследование пациента после трансплантации МСК для лечения РТПХ.

Обследование проводится на 30, 60, 180 и 365 сут после трансплантации МСК и включает: общий анализ крови, биохимический анализ крови, миелограмму, иммунограмму и определение IgG, М, А; ПЦР-диагностику цитомегаловируса и вируса Эпштейна–Барр; общий анализ мочи; электрокардиограмму, УЗИ брюшной полости и малого таза; биопсию поврежденных участков кожи, печени, легких, желудочно-кишечного тракта; исследование химеризма МСК цитогенетического или молекулярного; химеризма ГСК эритроидного или лейкоцитарного.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При четком соблюдении заданий этапов и выполнении заготовки МСК и проведении процедуры введения клеток ошибки и осложнения отсутствуют.

Несоблюдение последовательности мероприятий этапа 3 может приводить к потере клеток в биотрансплантате МСК, потере их жизнеспособности.