МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
27.12.2013
Регистрационный № 147-1113

МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УО «Белорусский государственный медицинский университет», УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А.С. Федулов, канд. мед. наук, доц. М.М. Зафранская, канд. мед. наук Я.М. Мотузова, канд. биол. наук Д.Б. Нижегородова, канд. мед. наук, доц. С.И. Кривенко, канд. мед. наук, доц. А.В. Борисов, М.Ю. Юркевич, С.С. Багатка, Г.И. Иванчик, канд. мед. наук Н.Ф. Миланович, канд. мед. наук Т.В. Качан, И.В. Свирид, Д.И. Балванович

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) рассчитана на врачей-неврологов, врачей-гематологов, врачей-трансплантологов, врачей клинической лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим рассеянным склерозом.

В настоящей инструкции представлен метод лечения рассеянного склероза на основе предварительной оценки иммунорегуляторных свойств аутологичных мезенхимальных клеток.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. CO_2-инкубатор для культивирования стволовых клеток.
2. Микроскоп инвертированный универсальный.
3. Ламинарный бокс 2-й степени защиты с вертикальным потоком воздуха.
4. Центрифуга.
5. Проточный цитофлюориметр.
6. Анализатор микробиологический.
7. Шейкер.
8. Холодильник +4°С.
9. Морозильник -20°С.
10. Набор автоматических дозаторов переменного объема 2–5000 мкл.

Расходные материалы:

1. Шприцы 20 мл.
2. Игла Кассирского.
3. Раствор новокаина 0,25%.
4. Стерильный операционный материал (простыни, пеленки).
5. Раствор адреналина — 1 мл.
6. Стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл.
7. Стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл.
8. Пробирки для проточной цитофлуориметрии объемом 4 мл.
9. Стерильные культуральные пластиковые флаконы с газопроницаемыми крышками для адгезивных культур.
10. Стерильные чашки Петри диаметром 60 мм с поверхностью для адгезивных культур.
11. Стерильные 96-луночные культуральные планшеты.
12. Стерильные наконечники для дозаторов.
13. Гепарин (5000 Ед/мл).
14. Градиент плотности Histopaque-1077 (ρ = 1,077 г/см^3).
15. Фосфатный буферный раствор (PBS).
16. Культуральная среда DMEM-LG с 25мМ HEPES.
17. Культуральная среда RPMI-1640 с 25мМ HEPES.
18. Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), инактивированная (30 мин при 56°С).
19. Раствор антибиотика-антимикотика (5 мг/мл пенициллина, 5 мг/мл

стрептомицина, 10 мг/мл неомицина).

20. Раствор 200 мл L-глютамина.

21. Раствор 0,25% трипсин-ЭДТА.

22. Рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (ИЛ-2, 100 000 Ед).

23. Поликлональныймитогенфитогемагглютинин (ФГА, 5 мг).

24. Рекомбинантный миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1–125 (рМОГ$_{1\text{-}125}$, 1 мг).

25. 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетат N-сукцинимидил эфира (CFSE, 25мг).

26. Диметилсульфоксид (DMSO).

27. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам Т-клеток памяти – CD3, CD45RO и поверхностным маркерам МСК — CD90, CD105, CD44, CD119, CD45, CD34, CD31, CD14.

28. Специализированные среды для посева на аэробную флору.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Рассеянный склероз (РС) (рецидивно-ремиттирующий и прогредиентно-рецидивирующий типы течения при количестве баллов по расширенной шкале инвалидизации Куртцке (EDSS) от 1 до 6,5), верифицированный на основании клинико-диагностических критериев протоколов терапии рассеянного склероза, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

2. Прогрессирование заболевания (ухудшение неврологического статуса за последний год $\geq$1 балла по шкале EDSS (если исходный уровень EDSS составлял $\leq$5,0 баллов) либо на 0,5 балла (если исходный уровень EDSS составлял $\geq$5,5 баллов.

3. Отсутствие эффекта от терапии, модифицирующей клиническое течение заболевания и отсутствие эффекта/ухудшение патоморфологических показателей по данным нейровизуализации в течение 6 месяцев до забора биологического материала.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Беременность, лактация.
2. Острые либо хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхо-легочной, эндокринной систем и желудочно-кишечного тракта в стадии декомпенсации.
3. Психические заболевания.
4. Онкологические заболевания.
5. Острый либо обострение хронического воспалительного процесса придаточных пазух носа или полости рта (синусит, фронтит, гайморит, фарингит, стоматит).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Методика костномозговой пункции

Пациентам с РС, имеющим показания к проведению трансплантации МСК, для получения взвеси клеток выполняют общепринятым методом костномозговую пункцию.

Эксфузию костного мозга с целью получения МСК выполняют под местной

анестезией. Костный мозг аспирируют иглой Кассирского из области грудины или иглами большого диаметра путем пункций гребня крыла подвздошной кости с обеих сторон в шприцы, содержащие антикоагулянт (гепарин). Объем забираемой костномозговой взвеси — от 30 до 100 мл.

2. Выделение МСК костного мозга

1. Мононуклеары из пунктата костного мозга выделяют по стандартной методике сепарации на градиенте фиколл-верографин (р = 1,077).

2. Полученную суспензию клеток отмывают центрифугированием в течение 10 мин/400G в фосфатном буферном растворе и высевают во флаконы культуральные пластиковые стерильные газопроницаемыми крышками в специализированной среде для культивирования МСКв плотности $5x10^6/см^2$ поверхности дна флакона.

3. Через 24 ч инкубации в CO_2-инкубаторе среду с неадгезировавшимися клетками собирают, флакон культуральный троекратно активно промывают стерильным фосфатным буферным раствором и заливают специализированной средой для культивирования МСК.

3. Культивирование МСК костного мозга

1. Каждые 7 сут производят смену 1/2 объема специализированной среды для культивирования МСК с визуальным контролем скорости пролиферации методом микроскопирования с использованием универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста.

2. По достижении культурами 70–80% конфлюэнтности монослоя клетки снимают с поверхности культурального пластика с помощью раствора трипсина/ЭДТА. Для этого удаляют весь объем специализированной среды из культурального флакона. Клетки заливают раствором трипсина/ЭДТА и инкубируют при 37°С в течение 5–7 мин. Контроль слущивания клеточного монослоя регистрируют визуально с использованием универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста.

3. Полученную суспензию клеток переносят в центрифужные пробирки и двукратно отмывают центрифугированием в течение 10 мин/400G.

4. После двукратного отмывания клетки высевают во флаконы пластиковые стерильные с газопроницаемыми крышками для получения первого пассажа.

5. По достижении первым пассажем 75–90% конфлюэнтности, клетки пересевают для получения последующих пассажей до получения необходимого для трансплантации объема МСК.

4. Контроль качества трансплантата МСК

Морфологический анализ и определение жизнеспособности клеток

1. Морфологический анализ культур МСК проводят с помощью универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста каждый раз при замене среды в культуральных флаконах. Морфологически МСК представляют собой адгезивные клетки типичной фибробластоидной морфологии, образующие скопления, характеризующиеся сливным ростом и формированием монослоя.

2. Жизнеспособность клеток определяют при постановке первичной культуры и пассировании клеток по исключению трипанового синего. 20 мкл суспензии

исследуемых клеток смешивают с 20 мкл 0,2% раствора красителя, приготовленного на забуференном физиологическом растворе (pH = 7,4) с добавлением 0,02% (от объема) азида натрия. Общее число клеток и количество живых клеток посчитывают в камере Горяева.

Жизнеспособность МСК после трипсинизации должна составлять не менее 95%.

Иммунофенотипический анализ

Иммунофенотипирование МСК проводят перед трансплантацией в день «0».

Для определения фенотипа мезенхимальных стволовых клеток методом проточной цитофлюориметрии используют следующую панель моноклональных антител (МКАТ): CD13, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105.

Приготовление анализируемой пробы клеточной суспензии выполняют согласно инструкции фирмы-производителя МКАТ.

Исследование выполняют на проточном цитофлюориметре, оснащенном двумя лазерами с длиной волны 488 и 630 нм, по инструкции к прибору.

Мезенхимальные стволовые клетки оценивают как CD13+, CD29+, CD34–, CD44+, CD45–, CD90+, CD105+.

Культивированный трансплантат МСК используют для терапии при выявлении экспрессии клетками 2 отрицательных и любых 3 положительных маркеров клеточной поверхности.

Микробиологический анализ

Микробиологический анализ МСК проводят непосредственно перед трансплантацией в день «0».

Суспензию клеток, не содержащую антибиотики, помещают в специализированную среду для посева на аэробную флору по инструкции фирмы-производителя. Оценку результатов производят по инструкции к используемому анализатору.

Суспензия МСК должна быть стерильна.

5. Паспортизация трансплантата МСК

Культивированные аутологичные МСК передают врачу, выполняющему трансплантацию, не позднее чем через 30 мин после трипсинизации. На каждый образец заполняют паспорт образца стволовых клеток для терапии, содержащий следующую информацию:

1. Тип клеток_____
2. Дата заготовки _____
3. Продолжительность культивирования _____
4. Пассаж _____
5. Повергались ли клетки криоконсервированию: да нет

(если да, то указать следующее):

- дата криоконсервирования _____
- концентрация клеток при криоконсервировании _____
- дата разморозки _____
- продолжительность восстановительного культивирования _____

6. Дата и результаты бактериального посева _____
7. Дата и результаты иммунофенотипирования _____

8. Жизнеспособность клеток _____

9. Общее количество клеток в образце _____

10. Объем образца _____

11. Среда разведения (серия) _____

12. Дата и время выдачи образца _____

Паспорт подписывают врач лабораторной диагностики, подготовивший образец к трансплантации, и врач-специалист, выполняющий трансплантацию.

6. Иммунологическая оценка способности МСК костного мозга супрессировать антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти периферической крови у пациентов с РС

Программа протокола иммунологической оценки способности МСК костного мозга супрессировать антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти периферической крови у пациентов с РС состоит из следующих этапов:

1. Выделение мононуклеаров из пунктата костного мозга и периферической крови.

2. Культивирование мононуклеаров костного мозга для получения гомогенной культуры МСК 1 или 2-го пассажей.

3. Фенотипическая характеристика МСК.

4. Окрашивание МПК внутриклеточным флуоресцентным красителем 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетат N-сукцинимидил эфиром (CFSE).

5. Культивирование окрашенных МПК в условиях митогенной (ФГА) или миелин-специфической ($рМОГ_{1–125}$) стимуляции в присутствии или отсутствии аутологичных и/или аллогенных МСК 1 или 2-го пассажей в соотношении 10:1.

6. Оценка антиген-неспецифической и антиген-специфической пролиферации $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток-памяти, культивируемых в ко-культурах МПК с и без МСК, методом проточной цитофлюориметрии.

7. Расчет коэффициента супрессии *k* ФГА/$рМОГ_{1–125}$-индуцированной пролиферации Т-клеток памяти.

Выделение мононуклеаров из пунктата костного мозга и периферической крови, культивирование мононуклеаров костного мозга для получения гомогенной культуры МСК 1 или 2-го пассажей и фенотипическая характеристика МСК были описаны выше.

6.1. Окрашивание МПК внутриклеточным флуоресцентным красителем CFSE (CFSE-метод)

Перед совместным культивированием МПК предварительно окрашивают внутриклеточным красителем CFSE, по изменению интенсивности флуоресценции которого, после окончания культивирования оценивают количество поделившихся клеток.

Для окрашивания 1×10^7 МПК ресуспендируют в 1 мл культуральной среды RPMI-1640 и добавляют CFSE-препарат в конечной концентрации 7 μM. Инкубируют 5 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливают путем добавления охлажденной до +4°С полной культуральной средой RPMI-1640. Центрифугируют 10 мин (400G) и температуре +4°С. Удаляют

супернатант, ресуспендируют клеточный осадок окрашенных МПК в полной культуральной среде RPMI-1640 и повторно центрифугируют 10 мин при 1500 об./мин и температуре +4°С. Удаляют супернатант, ресуспендируют осадок окрашенных МПК в полной культуральной среде RPMI-1640 в концентрации 4×10^6 клеток/мл.

6.2. Совместное культивирование МСК и МПК

Схема 5-дневного совместного культивирования МСК и МПК в 96-луночном планшете представлена в таблице 1. В лунки А1-А3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640 без добавления антигенов. В лунки В1-В3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей неспецифический поликлональныймитоген ФГА в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. В лунки С1-С3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток и МСК в концентрации 2×10^4 клеток (соотношение 10:1) в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей ФГА в конечной концентрации 2,5 мкг/мл.

После внесения компонентов инкубируют планшет в CO_2-инкубаторе при 37°С, 5% CO_2 и 99% влажности воздуха в течение 5 суток.

Таблица 1 — Схема 5-дневного совместного культивирования МПК и МСК

	1	**2**	**3**
А	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК
В	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА
С	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК

Обозначения: МПК — мононуклеары периферической крови; МСК — аутологичные/аллогенные мезенхимальные стволовые клетки 1 или 2-го пассажей; ФГА — фитогемагглютинин;1–3 — вертикальное обозначение лунок планшета; А–С — горизонтальное обозначение лунок планшета.

Схема 10-дневного совместного культивирования МСК и МПК в 96-луночном планшете представлена в таблице 2. В лунки А1–А3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640 добавления. В лунки В1–В3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей миелиновый аутоантиген $рМОГ_{1–125}$ в конечной концентрации 10 мкг/мл. В лунки С1–С3 добавляют МПК в концентрации 2×10^5 клеток и МСК в концентрации 2×10^4 клеток (соотношение 10:1) в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей $рМОГ_{1–125}$ в конечной концентрации 10 мкг/мл.

После внесения компонентов инкубируют планшет в CO_2-инкубаторе при 37°С, 5% CO_2 и 99% влажности воздуха в течение 10 сут.

Таблица 2 — Схема 10-дневного совместного культивирования МПК и МСК

	1	**2**	**3**
A	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК
B	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$
C	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$ 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$ 2×10^4МСК	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ$_{1-125}$ 2×10^4 МСК

Обозначения: МПК — мононуклеары периферической крови; МСК — аутологичные/аллогенные мезенхимальные стволовые клетки 1 или 2-го пассажей; рМОГ$_{1–125}$ — миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1–125; 1–3 — вертикальное обозначение лунок планшета; А–С — горизонтальное обозначение лунок планшета.

На 6-е сут отбирают половину среды (100 мкл) из лунок планшета с 10-дневным совместным культивированием и добавляют 100 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей ИЛ-2 в конечной концентрации 10 Ед/мл.

6.3. Оценка антиген-неспецифической и антиген-специфической пролиферации Т-клеток памяти в ко-культурах МПК с и без МСК методом проточной цитофлюориметрии

После 6- и 10-дневного культивирования клеточные суспензии из каждой лунки переносят в пробирки для проточной цитометриии добавляют по 10 мкл на 1 пробу моноклональных антител к поверхностным маркерам Т-клеток памяти: CD3 (маркер Т-лимфоцитов) и CD45RO (маркер Т-клеток памяти). Инкубируют в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После окончания инкубации клетки осаждают центрифугированием в течение 5 мин (400G), удаляют супернатант и ресуспендируют клеточный осадок в 400 мкл PBS. Дальнейшие измерения выполняют на проточном цитофлюориметре.

Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции устанавливают границы популяции $CD3^+$Т-клеток среди живых лимфоцитов, в пределах которой выделяют субпопуляцию $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти. Пролиферацию Т-клеток памяти оценивают по интенсивности флуоресценции внутриклеточного красителя CFSE в диапазоне флуорохромафлуоресцинизоцианата – FITC (спектр излучения ~521 nm). Метод количественного анализа клеточного деления основан на том, что в процессе каждого деления флуоресценция клетки уменьшается в два раза, пока не снизится до фонового уровня неокрашенных клеток. Таким образом, можно отследить до 8-ми делений клетки.

После измерения пролиферацию Т-клеток памяти оценивают как процент неподелившихся ($CFSE^{high}$) и поделившихся ($CFSE^{low}$) $CD3^+CD45RO^+$Т-лимфоцитов. Результат регистрируют на 50000 событий в пробе.

6.4. Интерпретация данных

После регистрации пролиферации Т-клеток памяти определяют коэффициент супрессии пролиферативного ответа *k*(%) по формуле:

$$k = 100 - \frac{П_{Тп+МСК} \times 100}{П_{Тп}},$$

где $П_{Тп+МСК}$ — пролиферация $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти в ко-культуре МСК и МПК, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %;

$П_{Тп}$ — пролиферация $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти в культуре МПК, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %.

Нижняя граница референтных интервалов, основанных на вычислении 95% доверительного интервала коэффициента супрессии *k* на момент обследования пациентов с РС, представлена в таблице 3. Коэффициент супрессии *k* позволяет оценить способность аутологичных МСК 1 или 2-го пассажей супрессировать *in vitro* ФГА-/$рМОГ_{1–125}$-индуцированный пролиферативный ответ $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти пациентов с РС.

Таблица 3 — Референтные интервалы коэффициентов супрессии $CD3^+CD45RO^+$Т-клеток памяти, *k* (%)

Коэффициент супрессии МСК *k*	Референтный интервал
k антиген-неспецифической пролиферации (в ответ на ФГА)	≥20,2%
k антиген-специфической пролиферации (в ответ на $рМОГ_{1–125}$)	≥41,3%

При вычислении значения *k* определяют возможность использования исследуемых клеточных культур МСК для патогенетической терапии пациентов с РС:

1. МСК, *k* которых находится в пределах референтных интервалов, рекомендуются для трансплантации пациентам с РС в качестве патогенетической терапии.

2. МСК, *k* которых находится ниже референтных интервалов, не рекомендуются для трансплантации пациентам с РС в качестве патогенетической терапии.

7. Методика трансплантации аутологичных МСК

Трансфузию МСК проводят в день 0. Проводят дополнительную уборку палаты с применением дезинфицирующих средств. Пациент принимает гигиенический душ, проводят смену белья. В палате с соблюдением правил асептики и антисептики накрывают операционный столик.

Премедикацию, состоящую из внутривенного введения 60 мг преднизолона и 4 мл ондансетрона, выполняют за 15–30 мин до начала трансфузии МСК. Трансфузию взвеси мезенхимальных клеток начинают сразу же после их доставки в отделение. Введение выполняют в течение 20–30 мин внутривенно в дозе не менее 1 млн клеток на кг веса пациента.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Контаминация бактериями и/или грибками при несоблюдении стерильности трансплантата.