

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения

Е.Н. Кроткова



«24» декабря 2021 г.
Регистрационный № 177-1221

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ВНУТРИМАТОЧНЫХ СИНЕХИЙ, СИНДРОМА
АШЕРМАНА С ПРИМЕНЕНИЕМ БИМЕДИЦИНСКОГО
КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Михалевич С.И., канд. мед. наук, доц. Якутовская С.Л., Креер С.А., д-р биол. наук, акад. Волотовский И.Д., канд. биол. наук Полешко А.Г., Василевич И.Б.

Минск 2021

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод лечения внутриматочных синехий, синдрома Ашермана с применением биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани (ЖТ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение внутриматочных синехий, синдрома Ашермана. Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-акушер-гинекологов, оказывающих специализированную медицинскую помощь на III и IV технологических уровнях, в амбулаторных и/или стационарных условиях.

Инструкция включает подготовку пациентов, описание эксплантации ЖТ хирургическим методом, приготовление БМКП в соответствии с ТУ ВУ 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020, выполнение непосредственно метода локальной трансплантации БМКП, динамическое наблюдение за состоянием тканей матки в посттрансплантационном периоде.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БМКП, РЕАГЕНТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ И ДР.

- Ультрасонографический аппарат для выполнения стандартного исследования органов малого таза.
- Комплект хирургического инструментария, необходимого для выполнения операций для эксплантации жировой ткани, гистероскопии, гистерорезектоскопии.
- БМКП «Клетки стволовые мезенхимальные», приготовленный в соответствии с ТУ ВУ 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020 или другой БМКП, соответствующий следующим требованиям:

- внешний вид: бесцветная опалесцирующая жидкость без посторонних включений;
 - количество жизнеспособных клеток: не менее 85% от общего количества клеток;
 - иммунофенотипическая характеристика МСК ЖТ: обязательное наличие поверхностных маркеров - CD29, CD44, CD90, CD105 и отсутствие маркеров - CD45, CD34;
 - стерильность: стерильно.
- Медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т.д., необходимые для приготовления БМКП на основе аутологичных МСК ЖТ:
- CO₂-инкубатор (автоматическое поддержание температуры 37°C и концентрации углекислого газа 5%);
 - ламинарный бокс с потоком воздуха II класса защиты;
 - холодильник;
 - морозильник;
 - автоматический микробиологический анализатор;
 - микроскоп инвертированный;
 - центрифуга лабораторная (1500-3000 об/мин);
 - проточный цитофлуориметр;
 - термостат;
 - камера Горяева или автоматический счетчик клеток;
 - флаконы для культур клеток T25 и T75;
 - пробирки стерильные центрифужные полипропиленовые объемом 50 и 15 мл;
 - пробирки стерильные полимерные объемом 1-5 мл с завинчивающейся крышкой;
 - стерильные наконечники с фильтром для дозаторов (100-1000 мкл и 10-200 мкл);

- системы фильтрации 0,22 мкм, однократного применения;
- питательная среда α -МЕМ;
- сыворотка аутологичная пациента;
- антибиотик-антимикотик;
- 0,1% раствор коллагеназы;
- раствор натрия хлорида 0,9% для инъекций;
- фосфатно-буферный раствор (ФБР);
- раствор Версена;
- трипсин-ЭДТА 0,25% раствор;
- 0,4% раствор трипанового синего;
- тиогликолевая среда;
- среда Сабуро;
- моноклональные антитела к CD34, CD45 и CD29, CD44, CD90, CD105 человека;
- Антисептики, антибиотики.
- Мочевые катетеры.
- Шприцы 2 и 5 мл.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Пациенты женского пола в возрасте 18-49 лет.
2. Внутриматочные синехии, синдром Ашермана (N85.6) (по МКБ - 11: внутриматочные синехии, синдром Ашермана (GA16.2)).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Пациенты с врожденными аномалиями половых органов: агенезия и аплазия матки (Q 51.0), двурогая матка (Q51.3), однорогая матка (Q51.4), врожденный свищ между маткой и пищеварительным и мочевым трактами (Q 51.7), другие врожденные аномалии тела и шейки матки (Q 51.8). врожденная аномалия тела и шейки матки неуточненная (Q 51.9) (по МКБ - 11: другие уточненные аномалии развития (LE3Y)).

2. Наличие острых или хронических в стадии обострения инфекционных и неинфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис, туберкулёз, хламидиоз, микоплазмоз, уреоплазмоз, герпес, токсоплазмоз, краснуха, ЦМВ.
3. Наличие аутоиммунных заболеваний.
4. Наличие аллергических реакций в стадии обострения, установленная гиперчувствительность к любому компоненту исследуемых БМКП и носителей.
5. Постоянная терапия цитостатиками, гормонами.
6. Психические расстройства и расстройства поведения, наркотическая и/или алкогольная зависимость.
7. Наличие в анамнезе злокачественных и/или доброкачественных опухолей.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1 этап: Подготовка пациента к лечению с использованием метода лечения внутриматочных синехий, синдрома Ашермана с применением БМКП на основе МСК ЖТ.

1.1. Медицинский осмотр:

- возраст;
- семейный анамнез;
- основные, сопутствующие жалобы, нужно выяснить соответствие жалоб заболеванию, так как может быть их недооценка или преувеличение;
- образ жизни, питание, вредные привычки, условия труда и быта;
- перенесенные острые заболевания (детские инфекции);
- имеющиеся хронические инфекции, особенно с затяжным течением процесса;
- эндокринные расстройства;

– менструальная и репродуктивная функции (прием препаратов при сопутствующей патологии, которые могли бы повлиять на менструальную функцию, исходы беременностей и родов);

– используемый метод контрацепции или его отсутствие; – гинекологические заболевания (перенесенные острые, хронические, проводимое лечение);

– проведенные операции, в том числе на половых органах (послеоперационный период, осложнения);

– аллергологический анамнез;

– наследственный анамнез;

– гемотрансфузионный анамнез;

– история настоящего заболевания;

– тип телосложения: женский, мужской (высокий рост, длинное туловище, широкие плечи, узкий таз), евнухоидный (высокий рост, узкие плечи, узкий таз, длинные ноги, короткое туловище);

– степень оволосения и состояние кожных покровов;

– состояние молочных желез;

– определение индекса массы тела (ИМТ);

– гинекологический осмотр на кресле: осмотр шейки матки и влагалища в зеркалах, бимануальное исследование матки и придатков.

1.2. Клинико-лабораторные обследования согласно клиническому протоколу «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.02.2018 № 17): общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (общий, прямой, непрямой билирубин, общий белок, альбумин, мочевины, глюкоза, креатинин, мочевая кислота, АСТ, АЛТ, ЩФ, натрий и калий крови, холестерин), глюкоза крови, коагулограмма, группа крови, гепатиты

В и С, ВИЧ, сифилис, гормональный профиль по фазам цикла, гормоны щитовидной железы, хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, герпес, токсоплазмоз, краснуха, ЦМВ, мазок на флору, бактериологический посев из цервикального канала, онкоцитология шейки матки .

1.3. Инструментальные обследования согласно клиническому протоколу «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.02.2018 № 17): ультразвуковое обследование органов малого таза, молочных желез, вен нижних конечностей. электрокардиография (ЭКГ), флюорография органов грудной клетки, кольпоскопия, при необходимости уточнения диагноза магнитно-резонансная томография органов малого таза (МРТ ОМТ).

1.4. Информированное письменное согласие пациента после полного объяснения пациенту цели оперативного вмешательства и возможных осложнений.

2 этап: **Забор ЖТ.**

Забор ЖТ для получения БМКП выполняется под местной анестезией путем резекции 10–12 г подкожно-жировой клетчатки в околопупочной или надлобковой области в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Жировую ткань помещают в стерильный флакон с транспортной средой. Для получения аутологичной сыворотки выполняют получение крови из периферической вены общепринятыми методами, в количестве 40–50 мл, и помещают в стерильную пробирку.

3 этап: **Передача ЖТ.**

Передача ЖТ в специализированную лабораторию молекулярной биологии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси». Доставка биоматериала в лабораторию для последующего получения БМКП на основе МСК из ЖТ

осуществляется в стерильных завинчивающихся флаконах с транспортной средой в термоизолирующем контейнере, поддерживающем температуру не ниже 4°C с учетом временных параметров доставки в лабораторию (не более 2 ч от момента забора).

4 этап: **Приготовление БМКП на основе аутологичных МСК ЖТ.**

Приготовление БМКП на основе аутологичных МСК ЖТ в соответствии с ТУ ВУ 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020. В стерильных условиях ламинарного бокса проводится ферментативная обработка ЖТ в 0,1% растворе коллагеназы. Затем клеточная суспензия фильтруется через капроновые фильтры, центрифугируется при 1500 об/минуту 10 минут, удаляется супернатант. Осадок заливается ростовой средой α -MEM, содержащей 10% аутологичной сыворотки пациента. Клетки высеваются в культуральные флаконы и инкубируются в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при 5% CO₂. После этого среда с неадгезированными клетками удаляется и после промывки в ФСБ, заменяется на свежую. Полная смена ростовой среды проводится каждые 72 ч. После образования монослоя МСК пассируются с использованием 0,25% раствора трипсин-ЭДТА. Необходимое количество клеток накапливается в течение 2-3 пассажей.

Для оценки жизнеспособности клеток используется тест на исключение красителя трипанового синего, проникающего через мембрану погибших клеток. Пригодным для трансплантации считается БМКП, в котором не менее 85% жизнеспособных клеток. Для определения иммунофенотипа МСК в составе БМКП клетки 2 раза промывают ФСБ, ресуспендируют в фосфатно-буферном растворе, после чего к ним вносят меченые флуорохромом антитела к поверхностным антигенам CD34, CD45 и CD29, CD44, CD90, CD105 человека в разведении, согласно инструкции фирмы-производителя, инкубируют 30 мин. в темноте при комнатной

температуре, отмывают дважды ФБР, ресуспендируют в ФБР и анализируют с использованием проточного цитофлуориметра или флуоресцентного микроскопа. БМКП считается пригодным для трансплантации, если более 90% МСК в его составе экспрессируют CD29, более 80% CD44, более 90% CD90, более 90% CD105, менее 5% – CD34, менее 3% – CD45. Контроль стерильности БМКП с целью выявления микроорганизмов-контаминантов осуществляется согласно общей фармакопейной статьи «Стерильность» Государственной фармакопеи РБ. Культура считается стерильной при отсутствии роста микрофлоры в течение не менее 14 суток в специальных средах (тиогликолевой, Сабуро), в которые вносятся образцы БМКП. Срок годности БМКП составляет при температуре от +5°C до +10°C в течение не более 12 ч, при температуре от +10°C до +30°C – не более 4 ч с момента приготовления.

5 этап: Подготовка пациента к трансплантации БМКП.

Подготовка пациента осуществляется согласно клиническому протоколу «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.02.2018 № 17). Клинической трансплантации в обязательном порядке должно предшествовать микробиологическое, морфологическое, иммунофенотипическое тестирование клеточного компонента (МСК) в составе БМКП.

6 этап: Трансплантация БМКП.

Выполнение всех этапов гистероскопии/гистерорезектоскопии в соответствии с общепринятым методом. На 2 сутки после гистероскопии или гистерорезектоскопии в асептических условиях в полость матки вводится двухходовый катетер Фолея Ch 8-10, фиксируется в полости матки с помощью дилатации баллона, через катетер вводится на раневую

поверхность матки БМКП в виде суспензии МСК в физиологическом растворе общим объёмом 1 мл. Лечебная доза составляет от 20 млн клеток в 1 мл БМКП. Катетер на сутки оставляется в полости матки.

7 этап: Посттрансплантационный период.

После трансплантации БМКП пациентка в течении суток находится в горизонтальном положении, динамическое наблюдение: термометрия ежедневно. Катетер удаляется через 24 часа после трансплантации БМКП. Общий анализ крови на 2 сутки.

8 этап: Оценка эффективности терапии с использованием метода лечения внутриматочных синехий, синдрома Ашермана с применением БМКП на основе МСК ЖТ.

Оценка эффективности метода лечения метода лечения внутриматочных синехий, синдрома Ашермана с применением БМКП на основе МСК ЖТ проводят оценку динамики состояния полости матки на 5-6 сутки, 1, 2, 3, 6, 12 месяцев после трансплантации БМКП на основе МСК. Проводится внешний осмотр, гинекологический осмотр, УЗИ органов малого таза и доплерометрия, с определением состояния эндометрия (оценивается толщина, равномерность и структура), а также васкуляризация (доплерометрия). Клеточная терапия считается эффективной в случае минимизации спаечных процессов в матке и отсутствию синехий.

В случаях неэффективности терапии с использованием метода лечения послеоперационного рубца матки с применением БМКП на основе МСК ЖТ рекомендуется повторная гистероскопия/гистерорезектоскопия с/без применением БМКП на основе МСК ЖТ.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Аллергическая реакция на повидон-йод. Руководствуются протоколом оказания помощи при возникновении анафилактических состояний «Об утверждении клинических протоколов «Экстренная медицинская помощь пациентам с анафилаксией», «Диагностика и лечение системной токсичности при применении местных анестетиков» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 50).

2. Гипертермический синдром.

Руководствуются клиническим протоколом «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи женщинам в акушерстве и гинекологии» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.02.2018 № 17).