МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра здравоохранения
_____ Е.Н. Кроткова
«14» декабря 2021 г.
Регистрационный № 126-1121

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РУБЦА МАТКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОМЕДИЦИНСКОГО 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

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____Е. Н. Кроткова
24.12.2021
Регистрационный № 126-1121

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РУБЦА МАТКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

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

Минск 2021

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод лечения послеоперационного рубца матки 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 послеоперационного рубца матки. Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей – акушеров-гинекологов, оказывающих специализированную медицинскую помощь на III и IV технологических уровнях. Инструкция включает подготовку пациентов, описание эксплантации ЖТ хирургическим методом, приготовление БМКП в соответствии с ТУ BY 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020, выполнение непосредственно метода локальной трансплантации БМКП, динамическое наблюдение за состоянием тканей матки в посттрансплантационном периоде.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Ультрасонографический аппарат для выполнения стандартного исследования органов малого таза (ОМТ).
2. Комплект хирургического инструментария, необходимого для выполнения операций для эксплантации ЖТ, лапаротомной метропластики, кесарева сечения.
3. Биомедицинский клеточный продукт «Клетки стволовые мезенхимальные», приготовленный в соответствии с ТУ BY 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.

4. Медицинские изделия, лекарственные средства, реагенты и т. д., необходимые для приготовления БМКП на основе аутологичных МСК ЖТ:

CO_2-инкубатор (автоматическое поддержание температуры 37 °С 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 Т25 и Т75;

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.

5. Антисептики, антибиотики.

6. Мочевые катетеры.

7. Шприцы 2 и 5 мл.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Пациенты женского пола в возрасте 18–49 лет.

2. Послеоперационный рубец матки, требующий предоставления медицинской помощи матери (МКБ-10: О34.2) (по МКБ-11: Послеоперационный рубец матки, требующий предоставления медицинской помощи матери (JA84.2)).

2. Разрыв матки до начала родов (МКБ-10: О71.0), разрыв матки во время родов (О71.1) (по МКБ-11: Разрыв матки до родов (JB0A.0), Разрыв матки во время родов (JB0A.1)).

3. Другие нарушения мочеполовой системы после медицинских процедур (МКБ-10: N99.8) (по МКБ-11: Другие указанные симптомы, признаки или клинические данные мочеполовой системы (MG1Y)).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Пациенты с врожденными аномалиями половых органов: Агенезия и аплазия матки (МКБ-10: Q51.0), Двурогая матка (МКБ-10: Q51.3), Однорогая матка (МКБ-10: Q51.4), Врожденный свищ между маткой и пищеварительным и мочевым трактами (МКБ-10: Q51.7), Другие врожденные аномалии тела и шейки матки (МКБ-10: Q51.8), Врожденная аномалия тела и шейки матки неуточненная (МКБ-10: Q51.9) (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,

туберкулез, хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, 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

Этап I: Подготовка пациента к лечению с использованием метода лечения послеоперационного рубца матки 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 т. ч. 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;

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, мочевина, 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, цитомегаловирусная инфекция, 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, флюорография органов грудной клетки, кольпоскопия, при необходимости уточнения диагноза магнитно-резонансная томография органов малого таза.

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

Этап II: Забор жировой ткани

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.

Этап III: Передача жировой ткани

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).

Этап IV: Приготовление биомедицинского клеточного продукта на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

Приготовление БМКП на основе аутологичных МСК ЖТ в соответствии с ТУ BY 100217351.004-2014 изм. № 1, 2020. В стерильных условиях ламинарного бокса производится ферментативная обработка ЖТ в 0,1 % растворе коллагеназы.

Затем клеточная суспензия фильтруется через капроновые фильтры, центрифугируется при 1500 об/мин в течение 10 мин, удаляется супернатант. Осадок заливается ростовой средой α-МЕМ, содержащей 10 % аутологичной сыворотки пациента. Клетки высеваются в культуральные флаконы и инкубируются в течение 24 ч при 37 °С 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 производится 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. Биомедицинский клеточный продукт 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 Республики Беларусь. Культура считается стерильной при отсутствии роста микрофлоры в течение не менее 14 сут в специальных средах (тиогликолевой, Сабуро), в которые вносятся образцы БМКП. Срок годности БМКП составляет при температуре от 5 до 10 °С в течение не более 12 ч, при температуре от 10 до 30 °С — не более 4 ч с момента приготовления.

Этап V: Подготовка пациента к трансплантации биомедицинского клеточного продукта

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 в составе БМКП.

Этап VI: Трансплантация биомедицинского клеточного продукта

Во время операции кесарева сечения или лапаратомной метропластики осуществляется выполнение всех этапов операций до ушивания раны матки в соответствии с инструкцией по применению «Современные подходы к

родоразрешению путем операции кесарево сечение» (утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 27.12.2005, регистрационный № 77-0705).

Ушивание необходимо начинать с углов через все слои матки. Рану на матке обычно ушивают двумя рядами узловых синтетических рассасывающихся нитей полигликолида мышечно-мышечных швов с расстоянием между швами не более 1 см. Рана также может быть ушита непрерывным однорядным (двухрядным) швом. БМКП на основе культивированных аутологичных МСК ЖТ общим объемом 1 мл распределяют равными долями на 5 инъекций клеточного материала на глубину 2–4 мм в области 1 $см^2$ раны (объем в одной точке инъекции — 0,2 мл). Лечебная доза составляет 20 млн клеток в 1 мл физиологического раствора. Далее выполняется перитонизация и последующие этапы операции кесарева сечения/лапаротомной метропластики в соответствии с инструкцией по применению «Современные подходы к родоразрешению путем операции кесарево сечение» (утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 27.12.2005 регистрационный № 77-0705).

Этап VII: Послеоперационный период

После операции кесарева сечения или метропластики в комплексном лечении применяется системная лекарственная терапия, направленная на улучшение микроциркуляции, реологических свойств крови и тканевого обмена согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь №17 от 2018 года «Медицинское наблюдение и оказание медицинской помощи в акушерстве и гинекологии».

Этап VIII: Оценка эффективности терапии с использованием метода лечения послеоперационного рубца матки с применением биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

Оценка эффективности метода лечения послеоперационного рубца матки с применением БМКП на основе МСК ЖТ проводят на 5–6 сут, 1, 2, 3, 6, 12 мес. после трансплантации БМКП. Осуществляется внешний и гинекологический осмотр с определением болезненности при пальпации матки в области рубца, УЗИ ОМТ и доплерометрия с определением состояния рубца матки, оценивается толщина, равномерность и структура, а также васкуляризация (допплерометрия) стенки матки в области рубца

Основными критериями заживления являются сроки и скорость репарации раневого дефекта.

Полноценным следует считать нижний сегмент матки при:

его толщине не менее 4–5 мм;

четко определяемом слое миометрия по всей длине бывшего разреза на матке;

отсутствии локальных истончений в указанной области.

К признакам несостоятельности рубца следует относить:

толщину ткани нижнего сегмента менее 3 мм;

неоднородность структуры ткани нижнего сегмента в виде гиперэхогенных включений;

кратерообразное истончение рубца и резкое истончение нижнего сегмента матки в области предполагаемого рубца.

В случаях неэффективности терапии с использованием метода лечения послеоперационного рубца матки с применением БМКП на основе МСК ЖТ рекомендуется релапаротомия, иссечение рубца матки, метропастика с/без применением БМКП на основе МСК ЖТ.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Общехирургические осложнения:

кровотечение и/или образование гематом;

нагноение раны, некроз краев послеоперационных ран;

гипертермический синдром.

При возникновении данных осложнений 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), клиническим протоколом диагностики и лечения пациентов с хирургической инфекцией кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях (утвержден приказом Министра здравоохранения Республики Беларусь от 28.06.2013 № 749).

2. 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).