

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 17 » октября 2014г.

Регистрационный № 081-0814



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

инструкция по применению

Учреждения- разработчики:

ГУ «РНПЦ психического здоровья»,

ГУ «РНПЦ трансфизиологии и медицинских биотехнологий»

Авторы:

д.м.н., профессор М.П. Потапнёв, д.м.н., доцент Т.В. Докукина,  
к.м.н. Ф.П. Хлебоказов, к.м.н. С.М. Космачёва, С.И. Игнатенко,  
к.м.н. Слобина Е.Л., Махров М.В., Шамрук И.В., Королевич П.П.

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

17.10.2014

Регистрационный № 081-0814

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнёв, д-р мед. наук, доц. Т.В. Докукина, канд. мед. наук Ф.П. Хлебоказов, канд. мед. наук С.М. Космачёва, С.И. Игнатенко

Минск 2014

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) содержит метод лечения пациентов с фармакорезистентными формами симптоматической эпилепсии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) костного мозга. Она включает алгоритм отбора пациентов, забор костного мозга из гребня подвздошной кости, выделение МСК из пунктата костного мозга, их культивирование *in vitro*, наращивание клеточной массы, иммунофенотипический, бактериологический контроль аутологичных МСК, оценку иммунного статуса пациентов.

Метод предназначен для лечения аутологичными МСК симптоматической эпилепсии при неэффективности адекватной противосудорожной лекарственной терапии.

В каждом конкретном случае проводится консилиум, где определяется возможность и целесообразность лечения стволовыми клетками, а также предполагаемый эффект от такого лечения. Вся информация сообщается пациенту и в случае его согласия (письменное информированное согласие) назначается следующий этап лечения – забор костного мозга. Пациента предупреждают, что данная процедура – хирургическая операция.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Электроэнцефалограф (ЭЭГ).
2. Аппаратно-программный электроэнцефалографический комплекс для картирования ЭЭГ и видеоЭЭГ-мониторирования.
3. Комплект инструментов, необходимых для забора костного мозга.
4. Шкаф с ламинарным потоком воздуха II класса защиты.
5. Центрифуга с горизонтальным ротором для пробирок емкостью 15 и 50 мл (1500–3000 об./мин).
6. CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
7. Микроскоп световой бинокулярный.
8. Микроскоп инвентированный.
9. Холодильник с морозильной камерой (2–8°; -20°C).
10. Морозильник (-80°C).
11. Счетчик для форменных элементов крови.
12. Камера Горяева.
13. Пипеттор для серологических пипеток.
14. Флаконы для культур клеток T175 и T75.
15. Пипетки серологические однократного применения 1; 2; 5; 10 и 25 мл.
16. Пробирки центрифужные 15 и 50 мл однократного применения.
17. Криопробирки.
18. Микропробирки эппендорф.
19. Чашки для культур клеток (d = 100 мм).
20. Системы фильтрации (0,45; 0,2 мкм).
21. Среда для культур клеток *α*-MEM с рибонуклеазидами и глутамаксом.
22. Фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния.
23. Трипсин-ЭДТА 0,25% раствор.

24. Сыворотка АВ(IV), инактивированная 30 мин при 56°C.
25. Нейроиндуцированная среда: среда Neurocult-XF proliferateon medium и FGFb, EGF либо среда StemPro NSC SFM (набор; kit) и добавка к ней — Ala-Gln 200 мМ раствор.
26. Гистопак.
27. Раствор гепарина 5000 ед./мл.
28. Раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий.
29. Бензилпенициллина натриевая соль.
30. Стрептомицина сульфат.
31. 0,4% раствор трипанового синего с 0,1% раствором азиды натрия.
32. Моноклональные антитела.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Метод предназначен для лечения пациентов с фармакорезистентными формами симптоматической эпилепсии и определяется показаниями и противопоказаниями к трансплантации аутологичных МСК.

### **Критерии включения:**

- пациенты обоего пола от 18 до 55 лет, резистентные формы эпилепсии с симптомами органического поражения головного мозга, с частыми эпилептическими приступами, с появлением тяжелых постприступных состояний и эпилептических статусов, когда любые комбинации 2–3 основных противосудорожных средств, включая новейшие, не оказывают заметного влияния на частоту и тяжесть приступов.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

- воспалительные процессы (менингоэнцефалиты, в т. ч. вирусной этиологии, паразитарные заболевания);
- хронически протекающие психозы с частыми декомпенсациями, слабоумием и выраженной социальной дезадаптацией;
- наличие хронических соматических и неврологических заболеваний в стадии обострения, требующих активной терапии;
- неудовлетворительные показатели комплексного клинико-инструментального обследования.
- опухоли головного мозга;
- пациенты, серопозитивные по анти- ВГС, HBsAg и ВИЧ.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Способ предназначен для лечения фармакорезистентных форм симптоматической эпилепсии с целью полного прекращения или значительного уменьшения частоты приступов, улучшения качества жизни пациентов. В основу метода положена способность МСК формировать в костном мозге динамичную систему, реализуя свои функции через рецепторы, цитокины, молекулы адгезии. МСК проявляют высокую тропность к ткани головного

и спинного мозга, широко мигрируют за пределы ГЭБ и дифференцируются по глиальному типу.

Метод лечения с применением трансплантации аутологичных МСК костного мозга пациентам с симптоматической эпилепсией состоит из нескольких этапов:

- забор костного мозга в объеме до 50 мл путем пункции гребня подвздошной кости. Транспортировка костного мозга проводится в специальном термоконтейнере, поддерживающем температуру не ниже 4°C с учетом временных параметров (не более 2 ч от времени забора);

- МСК выделяют из фракции моноклеаров костномозгового пунктата и наращивают на протяжении 2–3 пассажей в среде  $\alpha$ -MEM с рибонуклеозидами и глутамаксом (2 мМ), 5% сыворотки АВ (IV), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина с содержанием клеток в суспензии не менее  $35,0 \times 10^6$ ;

- часть МСК 2–3 пассажей индуцируют в нейрогенном направлении в среде Neurocult-XF Proliferation medium с добавлением EGF (20 нг/мл), FGFb (10 нг/мл) и 2 мкг/мл гепарина 7 дней с содержанием клеток в суспензии не менее  $5,0 \times 10^6$ ;

- исследуют жизнеспособность клеток стандартным методом с красителем трипановым синим, жизнеспособность не менее 95%;

- мезенхимальные стволовые клетки идентифицируют по набору поверхностных антигенов: CD106, CD105, CD90, CD73, CD63, CD166, CD49a, CD29, CD44, GD2; трансплантаты содержат клетки, экспрессирующие маркеры CD90, CD105, CD45 и CD34, согласно критериям Международной ассоциации по клеточной терапии (ISCT);

- определение фенотипа интактных и нейроиндуцированных МСК, предназначенных для трансплантации, проводится с применением методов проточной иммуноцитометрии и следующих комбинаций поверхностных моноклональных антител: CD90/CD14, CD105/CD19, CD45/CD34. В качестве контрольных значений используются минимальные критерии определения МСК, принятые ISCT в 2006 г.;

- обязательно проводится иммунофенотипический, бактериологический контроль аутологичных МСК;

- отмытые неиндуцированные аутологичные МСК (АМСК), предназначенные для внутривенного введения, разводят в 20 мл физиологического раствора с добавлением 5% аутологичной сыворотки для дальнейшего введения пациенту;

- отмытые нейроиндуцированные АМСК, предназначенные для эндолумбального введения, разводят в 5 мл физиологического раствора с добавлением 5% аутологичной сыворотки для дальнейшего введения пациенту;

- к культуре аутологичных МСК прилагается аналитический паспорт с указанием даты, серии, номера и даты изготовления. Испытания соответствовали стандарту предприятия (СТП) 08-2012;

- транспортировка клеточного материала проводится в специальном термоконтейнере с поддерживаемой в нем температурой 4–37°C. Срок годности не более 2 ч с момента выдачи.

### **Клеточная трансплантация**

Все этапы данного метода выполняются после полного объяснения пациенту цели оперативного вмешательства и возможных осложнений (информация для пациента и подписание информированного согласия).

Аутоотрансплантация МСК проводится в асептических условиях путем внутривенного и эндолюмбального введения аутологичных МСК пациентам с фармакорезистентными формами эпилепсии.

С целью уменьшения риска возможных побочных эффектов аутоотрансплантация проводится в два этапа:

1 этап. Трансплантация, заключающаяся в последовательном однократном внутривенном введении культуры недифференцированных аутологичных МСК в течение 10 мин, в объеме 20 мл с количественным содержанием клеток не менее 35 млн клеток в культуре.

2 этап. Проводится через 5–7 дней после первой аутоотрансплантации. Пациента укладывают на кушетку на бок, сгибая голову и ноги (в тазобедренных и коленных суставах). Спина пациента располагается вертикально, под прямым углом к кушетке. На уровне промежутка L<sub>3</sub>–L<sub>4</sub> после обработки кожи антисептиком (70% этиловым спиртом) проводят анестезию места предполагаемой пункции 0,5% раствором новокаина; в шприц набирается 5 мл суспензии аутологичных МСК в дозе не менее 5 млн клеток в культуре. В пункционную иглу вставляют мандрен и производят прокол. После попадания в субарахноидальное пространство берут 3–5 мл спинномозговой жидкости на исследование. Канюлю шприца вставляют в павильон пункционной иглы и медленно вводят суспензию дифференцированных аутологичных МСК. После окончания манипуляции иглу извлекают. Пациент находится под наблюдением 30 мин. Затем его транспортируют в палату и помещают на кровать, укладывают на живот, с приподнятым ножным концом под углом 10–20°. В таком положении пациент находится 2–3 ч.

Показатели периферической крови определяют на следующий день после трансплантации аутологичных МСК. Эффективность лечения после трансплантации аутологичных МСК оценивают по клиническому состоянию, данным рутинной ЭЭГ, картированию ЭЭГ, видеоЭЭГ-мониторированию, психологическому исследованию (запоминание 10 слов, рассказов, таблицы Шульте, счет по Крепелину, MMSE, сравнение понятий, понимание метафор и пословиц, модифицированный восьмицветовой тест Люшера, госпитальная шкала депрессии и тревоги, тест Спилбергера–Ханина, опросник Шмишека).

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Несоблюдение последовательности проведения этапов и времени трансплантации может приводить к потере жизнеспособности аутологичных МСК. Для исключения ошибок необходимо привлекать врачей-специалистов,

имеющих опыт работы в трансфузиологии, клеточной биотехнологии и трансплантологии.