

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ В.А. Ходжаев

05.11. 2010 г.

Регистрационный № 097-0910

МЕТОД КОТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ  
ГЕМОПОЭЗА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии

АВТОРЫ:

Я.И. Исайкина, канд. биол. наук, О.В.Алейникова, чл.-кор. НАНБ, д-р. мед. наук, проф.

Минск 2010

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в случае низкого содержания фракции CD34<sup>+</sup> клеток в продукте афереза мобилизованной периферической крови пациента со злокачественным новообразованием.

Сокращение срока приживления трансплантата ГСК и восстановление нормального гемопоэза у пациента после аутотрансплантации ГСК существенно снижает риск развития тяжелых инфекций. В протоколе, принятом на Генеральной Ассамблее европейской группы по трансплантации костного мозга (ЕВМТ), отмечено, что для успешного приживления трансплантата пороговой дозой должна являться трансфузия CD34<sup>+</sup> клеток  $\geq 2 \times 10^6$ /кг массы тела пациента, а содержание ЯСК составлять  $\geq 2 \times 10^8$ /кг. Это ограничивает возможность использования для трансплантации при злокачественных новообразованиях трансплантата ГСК с низким содержанием CD34<sup>+</sup> клеток, тогда как у 10–30% пациентов содержание их количества в аутотрансплантате после мобилизации и афереза  $< 2 \times 10^6$ /кг (Lemoli, 2003).

Мы предлагаем применение способа использования котрансплантации МСК для восстановления гемопоэза после аутотрансплантации ГСК по новому назначению, а именно в тех случаях, когда при слабом ответе на мобилизацию стволовых клеток из костного мозга в периферическую кровь колониестимулирующим фактором или при большом весе пациента после коллкции ГСК в трансплантате наблюдается количество CD34<sup>+</sup> клеток менее  $2 \times 10^6$ /кг, ограничивающее использование этого коллекционного продукта для трансплантации ГСК. Получен патент № 11932 Республики Беларусь от 24.02.2009 на «Способ восстановления гемопоэза при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток».

### ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Сепаратор клеток крови.
2. Проточный цитофлуориметр.
3. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD34, CD45, CD105, CD90, CD73.
4. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты для проведения процессинга ГСК и культуральных работ по получению биотрансплантата МСК.
5. CO<sub>2</sub>-инкубатор для роста культуры МСК.
6. Программируемый замораживатель.
7. Центрифуга.
8. Криохранилище для биологического материала на -196°C.
9. Вакуумный аспиратор.
10. Культуральные флаконы на 175 см<sup>2</sup> для роста МСК.
11. Пипетки серологические на 10 и 25 мл.

12. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
13. Камера Горяева.
14. Г-КСФ (препараты «Нейпоген» или «Граноцид»).
15. Среда для клеточных культур Дюльбекко в модификации Искова.
16. Эмбриональная телячья сыворотка.
17. Трипсин-ЭДТА.
18. Гистопак.
19. L-глутамин.
20. 2-меркаптоэтанол.
21. Раствор Хенкса.
22. Физиологический раствор.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ**

Способ предназначен для лечения при проведении аутологичной трансплантации ГСК, когда в связи со слабым ответом на мобилизацию стволовых клеток G-CSF фактором или в связи с большим весом пациента в аутологичном трансплантате периферических стволовых клеток доза CD34+ клеток составляет менее  $2 \times 10^6$ /кг, что ограничивает использование этого коллекционного продукта для проведения трансплантации.

### **Схема выполнения способа:**

**Этап 1.** Заготовка и хранение трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) у пациентов со злокачественными новообразованиями.

1. Мобилизация периферических стволовых клеток (ПСК) у пациентов с использованием Г-КСФ (препараты «Нейпоген» или «Граноцид»), по следующей схеме: Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг в сутки вводили подкожно в зависимости от массы тела пациента или донора в течение 5–10 дней, при ежедневным контроле количества лейкоцитов в периферической крови. Лейкаферез проводился, при условии  $L \geq 30 \times 10^6$ /мл.

2. Аферез ПСК на сепараторе клеток крови типа «CS-3000+» (Baxter, США).

3. Процессинг лейкоконцентрата, включающий плазмоэкстракцию и, при необходимости, седиментацию эритроцитов.

4. Определение основных характеристик трансплантата ПСК: количества ядросодержащих клеток на гематологическом анализаторе и CD34+ клеток методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSscan (Becton Dickinson, США) с применением моноклональных антител (Becton Dickinson, США).

4. Замораживание трансплантата ПСК с применением программируемого замораживателя и хранение в криохранилище с жидким азотом.

**Этап 2.** Принятие решения о применении биотрансплантата мезенхимальных стволовых клеток (МСК)

1. Решение о применении МСК в качестве котрансплантата для приживления ГСК и восстановления гемопоэза после аутологичной трансплантации принимается только в случае, когда количество CD34+ клеток на кг веса пациента  $\leq 2,0 \times 10^6$ , то есть ниже рекомендуемой пороговой дозы.

2. Решение отказа от повторной мобилизации и коллкции ПСК или эксфузии костного мозга в большом объеме для увеличения числа ГСК.

3. Получение письменного информированного согласия родителей или пациентов о приготовлении и дальнейшем использовании биотрансплантата МСК для приживления трансплантата ГСК и восстановления гемопоэза после трансплантации.

**Этап 3.** Получение биотрансплантата МСК из костного мозга пациентов со злокачественными новообразованиями. На технологию получения трансплантата МСК получен патент № 11560 Республики Беларусь от 27.10.2008 г. на «Способ экспансии мезенхимальных стволовых клеток» [9].

1. Эксфузия костного мозга в объеме 20-50 мл у пациентов посредством костномозговой пункции под локальной анестезией за 30 – 50 дней до планируемой трансплантации ПСК.

2. Выделение популяции МСК из мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга и культивирование их в Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM) в концентрации  $2 - 3 \times 10^6$  /мл.

3. Нарращивание эффективного для проведения котрвнсплантации 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.

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

5. Исследование жизнеспособности клеток стандартным методом с красителем трипановым синим. Жизнеспособность не менее 95%.

6. Идентификация полученных методом экспансии в культуре МСК на проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, характерных для МСК и отсутствию маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD14. Биотрансплантат МСК содержит не менее 90% клеток с поверхностными маркерами CD105, CD90 и CD73.

7. Обязательным требованием является исследование трансплантата МСК на стерильность по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

**Этап 4.** Проведение котрансплантации МСК совместно с ГСК для восстановления посттрансплантационного гемопоэза у пациентов.

1. Отмытые дважды в физиологическом растворе клетки разводят в 20 мл физиологического раствора для дальнейшего введения пациенту.

3. Перед проведением аутологичной трансплантации ГСК пациенту проводят кондиционирование, при котором блок полихимиотерапии соответствует протоколу для каждой нозологии.

4. Суспензию культивированных МСК в 20 мл физиологического раствора в течение 1 часа после проведения трансплантации ПСК вводят пациенту внутривенно в течение 10 минут.

5. Анализ показателей периферической крови пациента осуществляется ежедневно.

6. Приживление трансплантата характеризуется количеством лейкоцитов в анализе периферической крови пациента  $\geq 500/\text{мкл}$  ( $0.5 \times 10^9/\text{л}$ ), количеством ретикулоцитов  $\geq 0.1\%$  в течение 3 дней.

Выполнение всех этапов способа осуществляется врачами, имеющими соответствующую квалификацию.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СПОСОБА**

При четком соблюдении заданий этапов и выполнении заготовки ПСК и костного мозга ошибки и осложнения отсутствуют. Несоблюдение последовательности этапов может приводить к потере клеток в биотрансплантате МСК, к потере жизнеспособности клеток ГСК и МСК. Для исключения ошибок необходимо привлекать специалистов, имеющих опыт работы в трансфузиологии, клеточной биотехнологии и трансплантологии.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ СПОСОБА**

1. Вовлечение костного мозга в опухолевый процесс у пациентов с солидными опухолями и гемобластозами.
2. Высокое содержание ядродержащих клеток в трансплантате ГСК (более  $5 \times 10^8/\text{кг}$ ), что является гарантией быстрого восстановления гемопоэза в раннем посттрансплантационном периоде.

### **УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА**

1. Отсутствие противопоказаний.
2. Желание пациента.