

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2019 г.



Регистрационный № 159-1219

МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Пономарев В.В.; д.м.н., доцент Зафранская М.М.; к.м.н., доцент Бойко А.В., д.м.н., доцент Кривенко С.И.; к.б.н., доцент Нижегородова Д.Б.; Алейникова Н.Е.; к.б.н. Дедюля Н.И.; к.б.н. Бузук Е.С.; Примакова Е.А.; Петровская Е.Г., Назарова Е.А.;

Чижик В.А.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

26.12.2019

Регистрационный № 159-1219

МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В. В. Пономарев, д-р мед. наук, доц. М. М. Зафранская, канд. мед. наук, доц. А. В. Бойко, д-р мед. наук, доц. С. И. Кривенко, канд. биол. наук, доц. Д. Б. Нижегородова, Н. Е. Алейникова, канд. биол. наук Н. И. Дедюля, канд. биол. наук Е. С. Бузук, Е. А. Примакова, Е. Г. Петровская, Е. А. Назарова, В. А. Чижик

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод клеточной терапии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с болезнью Паркинсона (БП).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-неврологов, врачей-нейрохирургов, врачей-отоларингологов, врачей-иммунологов, врачей-гематологов, врачей-трансплантологов, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с болезнью Паркинсона в стационарных и/или амбулаторно-поликлинических условиях, и/или отделениях дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Медицинские изделия:
 - 1.1. CO₂-инкубатор для культивирования стволовых клеток;
 - 1.2. микроскоп инвертированный универсальный;
 - 1.3. ламинарный бокс 2-й степени защиты с вертикальным потоком воздуха;
 - 1.4. центрифуга;
 - 1.5. проточный цитофлуориметр;
 - 1.6. анализатор микробиологический;
 - 1.7. набор автоматических дозаторов переменного объема 2–5000 мкл.
2. Расходные материалы:
 - 2.1. шприцы объемом 20 мл;
 - 2.2. игла Кассирского;
 - 2.3. стерильный операционный материал (простыни, пленки);
 - 2.4. стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл;
 - 2.5. стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл;
 - 2.6. пробирки для проточной цитофлуориметрии объемом 4 мл;
 - 2.7. стерильные культуральные пластиковые флаконы с газопроницаемыми крышками для адгезивных культур;
 - 2.8. стерильные 96-луночные культуральные планшеты;
 - 2.9. стерильные наконечники для дозаторов.
3. Реактивы:
 - 3.1. гепарин натрия (5000 МЕ/мл);
 - 3.2. градиент плотности Histopaque-1077 ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$);
 - 3.3. фосфатный буферный раствор (ФБР);
 - 3.4. культуральная среда DMEM-LG с 25 mM HEPES;
 - 3.5. культуральная среда RPMI-1640 с 25 mM HEPES;
 - 3.6. концентрат тромбоцитов лизированный, ТУ ВУ 100660677.002-2014 (регистрационное удостоверение № ИМ-7.101630);
 - 3.7. раствор, состоящий из 5 мг/мл бензилпенициллин натриевой соли, 5 мг/мл стрептомицина сульфата и 10 мг/мл неомицина;
 - 3.8. раствор 2 mM L-глутамин;

- 3.9. раствор 0,25 % трипсин-ЭДТА;
- 3.10. трипановый синий;
- 3.11. раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим;
- 3.12. камера Горяева;
- 3.13. панель моноклональных антител (МКАТ) для проточной цитометрии: CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105;
- 3.14. специализированные среды для посева на аэробную флору.
- 4. Лекарственные средства:
 - 4.1. прокаина гидрохлорид 0,25% (5,0 мл);
 - 4.2. преднизолон натрия фосфат раствор для инъекций 30 мг/1 мл.
- 5. Биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные человека ТУ ВУ 100660677.001», регистрационное удостоверение № БМКП-7.103083 или другой клеточный продукт аутологичных МСК, соответствующий требованиям, изложенным в таблице.

Таблица — Характеристика вводимого клеточного продукта

Наименование показателя	Характеристика и норма	Метод контроля
Внешний вид	Прозрачная жидкость беловатого цвета без посторонних включений	Контроль внешнего вида клеток производится визуально
Количество клеток, не менее	15×10^6	Определение количества клеток в камере Горяева с уксусной кислотой
Количество жизнеспособных клеток, %, не менее	90	Определение количества жизнеспособных клеток по исключению трипанового синего
Подлинность клеток (иммунофенотипическая характеристика)	CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , CD 13 ⁺ , CD44 ⁺ , CD 73 ⁺ , CD 54 ⁺ , CD29 ⁺ , CD9 ⁺ , CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , HLA-DR-	Определение иммунофенотипа мезенхимальных клеток в клеточном продукте по экспрессии ими поверхностных антигенов методом проточной цитофлуориметрии
Стерильность	Стерильно	Определение стерильности клеток осуществляется с использованием автоматического гемокультуратора или иным методом
Наличие Anti-CMV	Отсутствуют	Определение наличия Anti-CMV в клетках методом иммуноферментного анализа

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Болезнь Паркинсона (G20 согласно МКБ-10) на 1,5–3,0 стадии заболевания по Хен-Яру, быстро прогрессирующий тип течения со сменой стадий БП не более, чем за 4 года.

ОГРАНИЧЕНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Длительность БП более 8 лет и/или возраст пациентов более 65 лет.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Синдром паркинсонизма и паркинсонизм-плюс.
2. Острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации.
3. Онкологические заболевания.
4. Острое или обострение хронического воспалительного процесса придаточных пазух носа или полости рта.
5. Положительный результат на ВИЧ, гепатита В (HBV), гепатита С (HCV), сифилис (RW).
6. Депрессия выраженной степени (не более 19 баллов по шкале Гамильтона).
7. Алкоголизм, наркомания.
8. Беременность или кормление грудью.
9. Иные противопоказания, соответствующие таковым, для медицинского применения медицинских изделий и лекарственных средств (ЛС), используемых для реализации метода.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов:

Этап 1. Эксфузия костного мозга

Эксфузию (взятие) костного мозга выполняют в условиях операционной под местной анестезией (раствор прокаина гидрохлорид 0,25 % (5,0 мл)). 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 натрия). Объем аспирата костного мозга составляет от 30 до 100 мл.

Этап 2. Выделение и культивирование МСК

1. Фракцию мононуклеарных клеток, содержащую МСК, из пунктата костного мозга выделяют по общепринятой методике сепарации на градиенте фиколл-верографин ($\rho = 1,077$).

2. Суспензию центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре.

3. Осадок ресуспендируют в 10–15 мл среды для культивирования МСК.

4. МСК подсчитывают по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим.

5. Жизнеспособность МСК оценивают по стандартной методике по исключению трипанового синего.

6. Клеточную суспензию доводят средой для культивирования МСК до посевной концентрации (не менее 600×10^3 на 1 см^2 площади дна культурального флакона) и высевают в стерильные культуральные пластиковые флаконы.

7. Флаконы с первичной культурой помещают в CO_2 -инкубатор (37°C , 5 % CO_2 , влажность 90 %).

8. Через 24–48 ч инкубации неадгезировавшие к поверхности флакона клетки трижды смывают струей стерильного PBS, после чего флаконы заполняются специализированной средой для культивирования мезенхимальных стволовых клеток;

9. Каждые 3–4 сут производят смену $\frac{1}{2}$ объема специализированной среды для культивирования мезенхимальных стволовых клеток с визуальным контролем скорости пролиферации методом микроскопирования с использованием универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста.

10. По достижении культурами 70–80 % монослоя, культуру клеток снимают с поверхности культурального флакона с помощью раствора трипсина/ЭДТА. Для этого удаляют весь объем специализированной среды из культурального флакона. Культуру клеток 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.

11. МСК высевают в стерильные культуральные пластиковые флаконы с газопроницаемыми крышками в плотности клеток от 5×10^3 на см^2 поверхности дна флакона для получения первого пассажа.

12. По достижении первым пассажем 75–90% конфлюэнтности клетки пересевают как описано выше в пунктах 2.8-2.11 для получения последующих пассажей до достижения необходимого для терапии количества МСК.

Этап 3. Введение МСК

Суммарную дозу клеток 0,5–2,0 млн/кг массы тела пациента вводят в три этапа с интервалом 7 дней. Для введения МСК используется тандемный (интраназальный + внутривенный) метод, который предполагает:

1. Анемизацию полости носа растворами адреномиметиков (эпинефрин, оксиметазолин и др.) и местную аэрозольную анестезию 10 % раствором лидокаина. Введение взвеси МСК в дозе 5,0–10,0 млн клеток в объеме 2–5 мл субмукозно в зону обонятельного эпителия с 2-х сторон. Выполняется передняя тампонада носовой полости в течение 2-х ч с целью гемостаза.

2. Внутривенное введение МСК осуществляется через 5–10 дней после интраназального введения в два этапа с интервалом 6–11 дней между введениями. Вводится 10–30 млн клеток за одно введение. Введение начинают с предикации, состоящей из внутривенного введения 60 мг преднизолона за 3–5 мин до начала инфузии МСК. Введение однократной дозы взвеси МСК в объеме 5–20 мл выполняют шприцем внутривенно струйно медленно.

В случае негативной индивидуальной оценки переносимости интраназального введения врачом-специалистом и/или пациентом возможно только внутривенное введение МСК (п. 2, этап 3), осуществляемое в три введения с интервалом 6–11 дней между введениями для достижения суммарной дозы МСК.

Этап 4. Мониторинг клинико-неврологических показателей

Контроль соматического статуса (АД, ЧСС) и неврологических симптомов БП производят с момента введения и в течение 2-х ч после завершения введения МСК.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Контаминация бактериями, вирусами и/или грибами при несоблюдении стерильности биомедицинского клеточного продукта.
2. Инфицирование полости носа, травматизация носовой полости и частые носовые кровотечения во время интраназальной манипуляции.
3. Подкожные гематомы при внутривенном введении.