МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____Д.Л. Пиневич

«27» июня 2018 г.

Регистрационный № 242-1218

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛЬТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии», государственное научное учреждение «Институт физиологии» Национальной академии наук Беларуси, государственное учреждение образования Белорусская медицинская академия последипломного образования, государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» г.Минска

Авторы: д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Шанько Ю.Г.; д.м.н., профессор, академик НАН Беларуси Кульчицкий В.А.; д.м.н., профессор, академик НАН Беларуси Смеянович А.Ф., Новицкая В.В.; д.м.н., доцент Зафранская М.М.; д.м.н., доцент Кривенко С.И.; к.б.н. Пашкевич С.Г.; к.б.н. Стукач-Токальчик Ю.П.; к.б.н., доцент Пархач Л.П.; к.б.н., Денисов А.А.; к.м.н., доцент, Танин А.Л.; Черныш Е.Ю.; Замаро А.С.; к.б.н., доцент, Нижегородова Д.Б.; Игнатович Т.В.; Дедюля Н.И.; Бузук Е.С.; Марченко С.В.; Шабалина Ю.С.; Комликов С.Ю.; Нехай М.А., Гончаров В.В.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод лечения инсульта (I64 согласно МКБ10) с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение инсульта согласно клинического протокола «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями нервной системы (взрослое население)», утвержденного Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 18.01.2018 №8.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-нейрохирургов, врачей-неврологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с инсультом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление.

БМКП – биомедицинский клеточный продукт.

ЖТ – жировая ткань.

ЛС – лекарственные средства.

МКАТ – моноклональные антитела.

МРТ – магнитно-резонансная томография.

аМСК – аутологичные мезенхимальные стволовые клетки.

МШР – модифицированная шкала Рэнкина.

ШКГ – шкала комы Глазго.

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

NIHSS – шкала инсульта Национальных институтов здравоохранения.

PBS – фосфатный буферный раствор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инсульт с уровнем сознания 8-15 баллов по ШКГ, с тяжестью неврологической симптоматики от 4 баллов и более по шкале NIHSS, с уровнем независимости и инвалидизации пациента от 2 баллов и более по МШР.

ОГРАНИЧЕНИЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Возраст пациента с инсультом менее 18 лет и более 70 лет.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Противопоказания, соответствующие таковым к проведению хирургического лечения.
2. Гипогликемия менее 2,7 ммоль/л, гипергликемия более 22,2 ммоль/л.
3. Эпилепсия.
4. Онкологические заболевания (Grade III-IV).
5. Беременность или кормление грудью.
6. Иные противопоказания, соответствующие таковым для медицинского применения медицинских изделий и ЛС, используемых для реализации метода.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БИОМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА, ИЗЛОЖЕННОГО В НАСТОЯЩЕЙ ИНСТРУКЦИИ

1. Медицинские изделия, соответствующие таковым для проведения хирургических операций.

2. Стойка эндоскопическая для проведения нейрохирургических операций с набором оптических тубусов.

3. Накидки, обеспечивающие стерильность аппаратуры при ее работе.

4. Аппарат искусственной вентиляции легких для проведения анестезиолого-реанимационного пособия.

5. ЛС для проведения эндотрахеального и/или внутривенного наркоза и местной анестезии (спрей).

6. Иглы для люмбальной пункции.

7. Носорасширитель.

8. Гемостатический материал местного применения (коллагеновая губка, серджисел или др.).

9. Контейнер для доставки клеточного материала в стерильных условиях с наличием хладоэлемента (далее – контейнер).

10. CO_2 -инкубатор для культивирования стволовых клеток.

11. Микроскоп инвертированный универсальный.

12. Ламинарный бокс 2-й степени защиты с вертикальным потоком воздуха.

13. Центрифуга.

14. Проточный цитофлюориметр.

15. Анализатор микробиологический.

16. Раствор коллагеназы I типа.

17. Фосфатный буферный раствор.

18. Раствор трипсина-ЭДТА.

19. Среда культуральная DMEM.

20. Концентрат тромбоцитов лизированный, ТУ BY 100660677.002-2014 (регистрационное удостоверение № ИМ-7.101630).

21. Флаконы культуральные полипропиленовые стерильные с газопроницаемыми крышками.

22. Трипановый синий.

23. Раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим.

24. Камера Горяева.

25. Панель МКАТ для проточной цитометрии: CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105.

26. Специализированные среды для посева на аэробную флору.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение биологического материала.

Получение биологического материала (жировая ткань) у пациента осуществляется под эндотрахеальным или внутривенным наркозом. Выполняется линейный (дугообразный) разрез мягких тканей в параумбиликальной области. С помощью скальпеля, ножниц, коагуляции (монополярной либо биполярной) выделяется участок подкожно-жировой клетчатки объемом 40-60 $см^3$ на кожном лоскуте, по возможности единым блоком, отсекается от окружающих тканей и изымается. Кожный лоскут отделяется и удаляется. Выделенный биологический материал помещается в стерильный контейнер, который маркируется и транспортируется при комнатной температуре в течение 5 часов от момента получения материала в лабораторию для сепарации аМСК.

2. Выделение и культивирование аМСК ЖТ.

2.1. Гомогенизированные фрагменты ЖТ смешивают с равным объемом стерильного PBS и центрифугируют в течение 10 минут при 1500 об./мин при комнатной температуре. Образовавшийся поверх PBS слой отмытой фрагментированной ЖТ собирают в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл.

2.2. Полученную суспензию смешивают с равным объемом 0,045 % (или 0,06 %) раствором коллагеназы I типа в PBS и инкубируют в течение 60 минут при температуре 37^0С и легком помешивании.

2.3. Фермент нейтрализуют добавлением к смеси равного объема среды Игла в модификации Дульбекко, содержащей 10% концентрата тромбоцитов лизированного.

2.4. Полученную смесь центрифугируют в течение 10 минут при 4000 об./мин при комнатной температуре.

2.5. Осадок собирают и ресуспендируют в 50 мл среды Игла в модификации Дульбекко.

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

2.7. Осадок ресуспендируют в 10-15 мл среды для культивирования МСК.

2.8. Подсчет клеток производят по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим.

2.9. Оценку жизнеспособности клеток проводят по стандартной методике по исключению трипанового синего.

2.10. Клеточную суспензию доводят средой для культивирования МСК до посевной концентрации (не мене $600x10^3$ на 1 $см^2$ площади дна культурального флакона) и высевают в культуральные флаконы.

2.11. Флаконы с первичной культурой помещают в CO_2-инкубатор (37^0C, 5% CO_2, 90% влажность).

2.12. Через 24-48 часов инкубации неадгезировавшиеся к поверхности флакона клетки трижды смывают струей стерильного PBS, после чего флаконы заполняются специализированной средой для культивирования МСК.

2.13. Каждые 3-4 суток производят смену ½ объема специализированной среды для культивирования МСК с визуальным контролем скорости пролиферации методом микроскопирования с использованием универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста.

2.14. По достижении культурами 70-80% монослоя клетки снимают с поверхности культурального флакона с помощью раствора трипсина/ЭДТА. Для этого удаляют весь объем специализированной среды из культурального флакона. Клетки заливают раствором трипсина/ЭДТА и инкубируют при 37^0С в течение 5-7 минут. Контроль слущивания клеточного монослоя регистрируют визуально с использованием универсального инвертированного микроскопа с применением фазового контраста.

2.15. Клетки высевают во флаконы пластиковые стерильные для адгезивных культур с газопроницаемыми крышками в плотности от 5×10^3 на 1 $см^2$ поверхности дна флакона для получения первого пассажа.

2.16. По достижении первым пассажем 75-90% конфлюэнтности клетки пересевают, как описано выше для получения последующих пассажей до достижения необходимого для терапии количества МСК.

Для лечения пациентов также используются БМКП «Клетки мезенхимальные человека ТУ BY 100660677.001», регистрационное удостоверение № ИМ-7.101480, регистрационный номер: Мн-7.117650-1402 от 29.05.2014 г. или другой БМКП, соответствующий требованиям, изложенным в таблице.

Таблица - Характеристика используемого БМКП

Наименование показателя	Характеристика и норма	Метод контроля
Внешний вид	Прозрачная жидкость беловатого цвета без посторонних включений	Контроль внешнего вида клеток проводится визуально.
Количество клеток, клеток/кг, не менее	от $0,5\times10^6$ до $2,0\times10^6$	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)	CD 90+, CD 105+, CD 13+, CD 44+, CD 73+, CD 54+, CD 29+, CD 9+, CD 34-, CD 45-, 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 гемокультиватора
Наличие Anti-CMV	Отсутствуют	Определение наличия Anti-CMV в клетках методом иммуноферментного анализа

2. Введение аМСК.

Введение аМСК проводится под эндотрахеальнм и/или внутривенным наркозом с местной интраназальной анестезией (спрей). На стороне инсульта в полость носа вставляется носорасширитель и вводится оптический тубус эндоскопа. Под эндоскопическим контролем аМСК вводятся под слизистую полости носа шприцем через люмбальную иглу. При расположении участка нейродеструкции в области больших полушарий головного мозга периневральное введение аМСК осуществляется в области рецепторных окончаний обонятельных нервов (верхняя и средняя носовые раковины). При расположении участка нейродеструкции в области задней черепной ямки периневральное введение аМСК осуществляется в области рецепторных окончаний тройничных нервов (нижняя носовая раковина) или в пространство Меккеля, в котором расположен узел Гассера и волокна тройничного нерва. После введения аМСК на место прокола слизистой укладывается гемостатический материал местного применения на 20-30

минут. Полость носа тампонируется марлевой турундой, смоченной хлоргексидином, сроком на 20-30 минут. Пациент выводится из наркоза и продолжает лечение в условиях стационара.

3. Кратность введения МСК.

Выполняется последовательное введение не менее трех доз аМСК на 10-14 сутки, 15-19 сутки, 20-24 сутки от момента получения биологического материала.

4. Мониторинг качества лечения.

Проводится через каждые 24 часа от начала введения БМКП: проводится оценка уровня сознания по ШКГ, неврологической симптоматики по шкале NIHSS, уровня независимости и инвалидизации пациента по МШР. МРТ-исследование выполняется через 3-6 месяцев после окончания лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Носовое кровотечение – тампонада носа.