

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2013 г.

Регистрационный № 081-0913



**МЕТОД КОТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ УСКОРЕНИЯ
ПРИЖИВЛЕНИЯ АЛЛОГЕННОГО ТРАНСПЛАНТАТА
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

Исайкина Я.И., к.б.н., Марейко Ю.Е., Алейникова О.В., член-
корреспондент НАНБ, д. м. н., профессор.

Минск, 2013

Настоящая инструкции по применению (далее – инструкция) предназначена для врачей-гематологов и врачей-трансплантологов организаций здравоохранения, других врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, у которых по протоколу лечения проводится аллогенная трансплантация костного мозга.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в случае низкого содержания фракции CD34+ клеток в аллогенном трансплантате ГСК или в случае применение аллогенных ГСК от несовместимого по HLA антигену донора, что сопряжено с задержкой приживления трансплантата.

Необходимым условием является получение письменного информированного согласия родителей или пациентов об использовании биотрансплантата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для котрансплантации.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Противопоказаний нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Проточной цитофлуориметр.
2. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD34, CD45, CD105, CD90, CD73.
3. Ламинарный шкаф 2-ого класса защиты для проведения процессинга по получению биотрансплантата МСК.

4. CO₂-инкубатор для роста культуры МСК.
5. Центрифуга.
6. Микроскоп инвертированный.
7. Культуральные флаконы на 175 см² для роста МСК.
8. Пипетки серологические на 10 и 25 мл.
9. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
10. Камера Горяева.
11. Среда для клеточных культур Дюльбекко в модификации Искова (IMDM).
12. Эмбриональная телячья сыворотка.
13. Трипсин-ЭДТА, раствор 0,25 %.
14. Фиколл- 1077 Гистопак.
15. 0,9%-ный раствор NaCl.

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Метод предназначен для лечения при проведении аллогенной трансплантации ГСК в случае содержания в трансплантате CD34⁺ клеток менее $2,5 \times 10^6$ /кг, что ограничивает использование этого коллекционного продукта для проведения трансплантации, или в случае применения аллогенного трансплантата, полученного от несовместимого по HLA антигенам донора.

Этап 1. Принятие решения о применении биотрансплантата МСК для проведения котрансплантации с ГСК в случае отнесения пациента к группе риска по значительной задержке восстановления гемопоэза в раннем посттрансплантационном периоде и приживлению ГСК донора (большой вес реципиента, агрессивная предшествующая химиолучевая терапия, несовместимость реципиента и донора по HLA антигенам и др.).

Этап 2. Получение биотрансплантата МСК из костного мозга аллогенного донора ГСК или “стороннего” донора.

2.1. Обследование потенциального донора костного мозга для МСК сразу после принятия решения о проведении котрансплантации МСК. Доноры МСК должны иметь отрицательный результат анализа на ВИЧ, вирусы гепатита С (HCV) и гепатита В (HBV), человеческий вирус Т-клеточной лейкемии (HTLV), сифилис и, желательно, совместимы по цитомегаловирусному статусу с реципиентом.

2.2. Эксфузия костного мозга в объеме 20-50 мл у донора посредством костномозговой пункции под локальной анестезией за 20 – 30 суток до срока проведения трансплантации ГСК.

2.3. Выделение популяции МСК из моноклеарных клеток костного мозга и культивирование их в IMDM в концентрации 2 – 3 x10⁶/мл.

2.4. Нарращивание эффективного для проведения трансплантации количества МСК путем проведения 2-3 пассажей (пересевов) клеток при получении 80% - 95% конфлюэнтного слоя с обязательным проведением контроля отсутствия бактериальной контаминации для клеток каждого пассажа.

2.5. Получение биотрансплантата МСК в количестве не менее 0,3 x 10⁶/кг веса пациента.

2.6. Идентификация полученных *in vitro* МСК по наличию поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73. Биотрансплантат МСК должен содержать не менее 90% клеток с поверхностными маркерами CD105, CD90 и CD73.

2.7. Исследование МСК каждого пассажа на стерильность. Для инфузии пациенту применяются только трансплантат МСК с отрицательными показателями по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

Мероприятия 2.1 – 2.7 этапа 2 осуществляются согласно общепринятым методикам.

Этап 3. Проведение котрансплантации МСК совместно с ГСК для ускорения восстановления посттрансплантационного гемопоэза у пациентов.

3.1. МСК отмывают дважды в физиологическом растворе и разводят в 20 мл физиологического раствора с 5% альбумином для дальнейшего введения пациенту.

3.2. Суспензию МСК в течение 24 часов после проведения трансплантации ГСК вводят пациенту внутривенно в течение 10 минут.

3.3. Ежедневно осуществляют анализ показателей периферической крови пациента до получения параметров, характеризующих приживание трансплантата, а именно: количество лейкоцитов в анализе периферической крови пациента должно быть $\geq 1000/\text{мкл}$ ($1 \times 10^9/\text{л}$), нейтрофилов - $\geq 500/\text{мкл}$ ($0,5 \times 10^9/\text{л}$), ретикулоцитов - $\geq 0.1\%$ в течение 3 дней.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

При четком соблюдении заданий этапов ошибки и осложнения отсутствуют.

Несоблюдение последовательности выполнения этапа 2 может привести к потере клеток в биотрансплантате МСК, к потере жизнеспособности МСК.