МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
«14» 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 трансфузиологии 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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, проведение иммунофенотипического, бактериологического контроля аутологичных МСК, оценку иммунного статуса пациентов.

Метод предназначен для лечения аутологичными МСК симптоматической эпилепсии при неэффективности адекватной противоэпилептической 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод предназначен для лечения пациентов с фармакорезистентными формами симптоматической эпилепсиеи 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:

- воспалительные процессы (менингоэнцефалиты, в том числе 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- Электроэнцефалограф (ЭЭГ).
- Аппаратно-програмный электроэнцефалографический комплекс для картирования ЭЭГи видеоЭЭГ-мониторирования.
- Комплект инструментов, необходимых для забора костного мозга.
- Шкаф с ламинарным потоком воздуха II-класса защиты.
- Центрифуга с горизонтальным ротором для пробирок ёмкостью 15 и 50 мл (1500-3000 об/мин).
- CO_2 –инкубатор (37°C, 5% CO_2).
- Микроскоп световой бинокулярный.
- Микроскоп инвентированный.
- Холодильник с морозильной камерой (2-8°;-20°).
- Морозильник (-80°).
- Счетчик для форменных элементов крови.
- Камера Горяева.
- Пипеттор для серологических пипеток.
- Флаконы для культур клеток Т175 и Т75.
- Пипетки серологические однократного применения 1мл,2 мл, 5мл, 10 и 25 мл.
- Пробирки центрифужные 15мл и 50мл однократного применения.
- Криопробирки.
- Микропробирки эппендорф.
- Чашки для культур клеток (d=100 мм).
- Системы фильтрации (0,45 мкм, 0,2 мкм).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ РЕАГЕНТОВ

- Среда для культур клеток *a*-MEM с рибонуклеазидами и глутамаксом.
- Фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния.
- Трипсин-ЭДТА 0,25% раствор.
- Сыворотка AB(IV), инактивированная 30 минут при 56°.
- Нейроиндуцированная среда:Среда Neurocult-XF proliferateon medium и FGFb, EGF либо Среда StemPro NSC SFM (набор; kit) и добавка к ней- Ala-Gln 200мМ раствор.
- Гистопак.
- Раствор гепарина 5000 ед./мл.
- Раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий.
- Бензилпенициллина натриевая соль.
- Стрептомицина сульфат.
- 0,4% раствор трипанового синего с 0,1% азида натрия.
- Моноклональные антитела.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод 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.

Технология применения трансплантации аутологичных МСК костного мозга пациентам с симптоматической эпилепсией

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°С с учётом временных параметров (не более 2-х часов от времени забора);

- МСК выделяют из фракции мононуклеаров костномозгового пунктата и наращивают на протяжении 2-3 пассажей в среде α-MEM с рибонуклеозидами и глутамаксом (2 мМ), 5% сыворотки АВ (IV), 100ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина с содержанием клеток в суспензии не менее $35,0x10^6$;

- 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 $5,0x10^6$;

- 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, проводятся 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, принятым ISCT в 2006 г.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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 эндолюмбального 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°С. Срок годности не более 2-х часов 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).

Аутотрансплантация МСК проводится в асептических условиях путём внутривенного и эндолюмбального введений аутологичных МСК пациентам с фармакорезистентными формами эпилепсии.

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

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

2 этап. Проводится через 5-7 дней после первой аутотрансплантации. 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_3-L_4 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 минут. Затем его транспортируют в палату и помещают на кровать,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

укладывают на живот, с приподнятым ножным концом под углом 10-20°. В таком положении пациент находится 2-3 часа.

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, счёт по Крепелину, MMSE, сравнение понятий, понимание метафор и пословиц, модифицированный восьмицветовой тест Люшера, госпитальная шкала депрессии и тревоги, тест Спилбергера-Ханина, опросник Шмишека).

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru