

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

04.06.2011 г.

Регистрационный № 200-1210

МЕТОД ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С И ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

д-р мед. наук, проф. Алейникова О.В., д-р. мед. наук, проф. Цыркунов В.М.,

канд. мед. наук, доц. Лукашик С.П., канд. мед. наук, доц. Романова О.Н.,

канд. биол. наук Исайкина Я.И., канд. мед. наук Шиманский А.Т., Млявая Т.Ф.

Гродно, Минск 2011

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспаратаминотрансфераза
АФП – альфа-фетопротеин
ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
ПЦР – полимеразная цепная реакция
УЗИ – ультразвуковое исследование
ЩФ – щелочная фосфатаза

Инструкция разработана с целью повысить эффективность лечения и качество жизни пациентов с хроническим гепатитом С на стадии вирусного цирроза печени. Метод может быть применен для лечения пациентов с хронической HCV-инфекцией на стадии цирроза печени, а также в предтрансплантационном периоде, предшествующем органной пересадке печени в специализированных центрах трансплантации органов, когда пациенты находятся в листе ожидания, а также внедрен в других профильных (гепатологических, инфекционных) центрах, обладающих правом проведения (сертификацией) клеточных технологий.

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. Наборы моноклональных антител для проведения иммуногистохимических реакций с определением Ki-67 Antigen, Proliferating Cell Nuclear Antigen, CD34 Class II, Human Actin (Smooth Muscle)
4. Ламинарный шкаф 2-ого класса защиты для проведения процессинга ГСК и культуральных работ по получению биотрансплантата МСК
5. CO₂-инкубатор для роста культуры МСК
6. Центрифуга
7. Вакуумный аспиратор
8. Лапароскоп
9. Мобильный аппарат для проведения УЗИ в условиях операционной.
10. Специальные иглы для биопсии печени с получением достаточного материала для гистологического исследования
11. Специальные длинные иглы для введения мезенхимальных стволовых клеток чрезкожно в печень
12. Культуральные флаконы на 175 см² для роста МСК
13. Пипетки серологические на 10 и 25 мл
14. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл
15. Камера Горяева

16. Среда для клеточных культур Дюльбекко в модификации Искова,
17. Эмбриональная телячья сыворотка
18. Трипсин-ЭДТА
19. Гистопак
20. L-глутамин
21. 2-меркаптоэтанол
22. Раствор Хенкса
23. Физиологический раствор

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- Отсутствие эффективности от применения стандартных и пегилированных интерферонов при наличии у пациентов:
 - хронического активного гепатита С и стадии хронизации более 2 баллов (Knodell R.G., 1981)
 - цирроз печени, вирусной этиологии (класс тяжести А, В по Чайлд-Пью)
- Рецидив гепатита С после отмены противовирусной терапии и прогрессирование фиброза на фоне базисной терапии

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

- Декомпенсированный цирроз печени при выраженных нарушениях гемостаза.
- Наличие тяжелой сопутствующей патологии (патология сердца, легких, почек в стадии декомпенсации).
- Гепатоцеллюлярная карцинома, а также опухоли других локализаций.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Целью применение МСК у пациентов с установленной стадией цирроза печени является усиление регенераторных процессов в печени, остановка фиброгенеза и его регресс, усиление иммуномодуляторных процессов в печени.

СХЕМА ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА:

Этап 1. Обследование пациентов с хронической HCV-инфекцией в стационарных условиях.

1. Выполнение общего анализа крови.
2. Выполнение биохимического анализа (глюкоза, билирубин, АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ, общий белок, альбумины, фракции глобулинов (α, β, γ), холестерин, железо, АФП, креатинин, мочевины).
3. Выполнение гемостазиограммы.
4. Выполнение ПЦР крови с определением РНК HCV, вирусной нагрузки, серотипа вируса.

5. Выполнение УЗИ гепатобиллиарной системы, поджелудочной железы, селезенки.

6. Выполнение пункционной биопсии печени. Биопсия печени выполняется в VIII межреберье справа по переднеподмышечной линии чрезкожно под контролем УЗИ в бессосудистой зоне. Пункцируется зона в проекции соединения 6,7,8 сегментов.

7. Комплексная морфологическая оценка биоптата печени с определением:

- активности и стадии патологического процесса в печени
 - а. гистохимических показателей: маркеров клеточной пролиферации (Ki-67 антиген; ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA, proliferating cell nuclear antigen); маркеры фиброза (α -smooth muscle actin, α -SMA; CD34+)
- электронная микроскопия ткани печени
- ПЦР ткани печени.

8. Получение письменного информированного согласия пациентов о приготовлении и использовании биотрансплантата МСК для лечения ХГС и цирроза печени.

Этап 2. Получение биотрансплантата МСК из костного мозга пациентов с ХГС и циррозом печени.

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

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

3. Нарращивание эффективного для проведения трансплантации 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 40×10^6 клеток.

5. Идентификация полученных методом экспансии в культуре МСК на проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73. Биотрансплантат МСК содержит не менее 90% клеток с поверхностными маркерами CD105, CD90 и CD73.

6. Бактериологический контроль трансплантата МСК.

Этап 3. Проведение трансплантации МСК в паренхиму печени пациентов.

1. Отмытые дважды в физиологическом растворе клетки разводят в 5 мл физиологического раствора для дальнейшего введения пациенту.

2. Введение мезенхимальных клеток осуществляется под контролем лапароскопа либо УЗИ путем последовательных пункций печени чрезкожно в зону предварительно проведенной пункционной биопсии на площади до 5-7 см. Для этого суспензию культивированных МСК в 5 мл физиологического

раствора вводят пациенту по 0,5 – 1 мл взвеси клеток в 3 - 5 точках в зависимости от количества трансплантата МСК на глубину 2-2,5 см.

3. Анализ показателей пациента (клинических, лабораторных, биохимических, УЗИ органов брюшной полости) осуществляется через 24 часа после трансплантации МСК в ткань печени, затем 1 раз в месяц в динамике терапии с проведением итоговых (результатирующих) исследований через 6 месяцев после трансплантации МСК в ткань печени (лабораторные, биохимические, морфологические исследования).

Выполнение всех этапов способа осуществляется врачами, имеющими соответствующую квалификацию.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При четком соблюдении заданий этапов и выполнении заготовки костного мозга ошибки и осложнения отсутствуют. Несоблюдение последовательности этапов может приводить к потере клеток в биотрансплантате МСК, к потере жизнеспособности клеток ГСК и МСК.

При выполнении пункционной биопсии и трансплантации аутологичных МСК в ткань печени возможно развитие кровотечений. Для исключения осложнений и ошибок необходимо на всех этапах инвазивных вмешательств выполнять контрольные исследования крови, УЗИ органов брюшной полости, а также привлекать специалистов, имеющих опыт работы в трансфузиологии, клеточной биотехнологии и трансплантологии.