

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

12.12.2015

Регистрационный № 172-1115

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА
С ПОЛНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ
СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Е.М. Скрыгина, канд. мед. наук, доц. А.Е. Скрыгин, В.В. Солодовникова, З.И. Рогова, канд. биол. наук Я.И. Исайкина

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод комплексной терапии туберкулеза с полной лекарственной устойчивостью (ПЛУ-ТБ) мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК).

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров, врачей анестезиологов-реаниматологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях, и разработана с целью повышения эффективности терапии пациентов с ПЛУ-ТБ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Проточный цитофлуориметр.
2. Набор моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD34, CD45, CD105, CD90, CD73.
3. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты.
4. CO₂-инкубатор.
5. Центрифуга.
6. Микроскоп инвертированный.
7. Культуральные флаконы на 175 см² для роста МСК.
8. Пипетки серологические — 10 и 25 мл.
9. Пробирки центрифужные — 15 и 50 мл.
10. Среда для культуры клеток Дюльбекко в модификации Искова (IMDM).
11. Эмбриональная телячья сыворотка.
12. Трипсин-ЭДТА, раствор 0,25%.
13. Фиколл-1077 Гистопак.
14. Иглы для костномозговой пункции.
15. Вакутайнеры объемом 10 мл с сухим гепарином.
16. Катетер (G16-18).
17. 0,9%-й раствор NaCl.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ПЛУ-ТБ — туберкулез с устойчивостью как минимум к изониазиду и рифампицину с одновременной устойчивостью к более чем одному инъекционному противотуберкулезному лекарственному средству (ПТЛС) и к более чем одному представителю группы фторхинолонов с/без устойчивости к другим ПТЛС.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

- беременность или лактация;
- тяжелые острые и хронические сопутствующие заболевания;
- аутоиммунные и аллергические заболевания в фазе обострения;
- пациенты, находящиеся на паллиативном лечении;
- возраст пациента до 18 или старше 65 лет.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод комплексной терапии ПЛУ-ТБ с использованием аутологичных ММСК обязательно проводится на фоне противотуберкулезной терапии согласно

клиническому руководству по лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 939 от 22.08.2012).

Пациенту с бактериологически подтвержденным диагнозом туберкулеза легких выполняются быстрые молекулярно-генетические тесты (GeneXpert, LPA), которые позволяют определить модель лекарственной чувствительности к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, аминогликозидам/циклопептидам и фторхинолонам. После получения результатов, соответствующих определению полной лекарственной устойчивости, назначают режим химиотерапии соответственно модели лекарственной чувствительности, включающий линезолид. После чего проводится забор костного мозга (КМ) общепринятыми методами в асептических условиях под местной анестезией для последующего процессинга и культивации ММСК.

Получение биотрансплантата ММСК из костного мозга пациента

Из одного или нескольких проколов подвздошной кости (со стороны задней поверхности) аспирируют 50–75 мл КМ. Аспират КМ помещают в 6/10 мл вакутайнеры с сухим гепарином и транспортируют в лабораторию.

Следующим этапом из КМ выделяются моноклеарные клетки (МНК) методом разделения их по градиенту плотности на среде Гистопак 1,077 с последующей двукратной отмывкой отсепарированной фракции клеток в 0,9%-м растворе хлорида натрия. Полученные МНК ресуспендируют в среде IMDM, содержащей 10%-ю эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), 2 мМ/л L-глутамина и 10–4 М/л 2-меркаптоэтанола, и переносят в концентрации 2–3×10⁶/мл во флакон объемом 175 см². Клетки инкубируют при 37°C в 5% CO₂. Через 48 ч производят смену среды, удаляя клетки, находящиеся в суспензии. При 80–90% покрытии поверхности флакона прикрепленными клетками среду удаляют и клетки дезадгезируют с пластика добавлением 5 мл 0,25% трипсин-ЭДТА. Через 4–5 мин действие трипсина ингибируют с помощью ЭТС. Клетки отмывают в 0,9%-м растворе хлорида натрия и в количестве 1×10⁶ помещают во флаконы объемом 175 см² (1-й пассаж). Таким образом проводят 3 пассажа, при которых ММСК наращивают *in vitro* до необходимого количества в зависимости от массы пациента ((0,6–1,6)×10⁶/кг). Клетки, снятые с поверхности культуральных флаконов последнего пассажа, дважды отмывают в физиологическом растворе, переносят в шприц в объеме 20 мл для последующей инфузии пациенту с ПЛУ-ТБ.

Перед инфузией клетки, выращенные *in vitro*, идентифицируют по наличию поверхностных маркеров CD105, CD90, CD44 (не менее 90%), характерных для ММСК и отсутствию маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD14 (не более 5%) и определяют жизнеспособность ММСК. Обязательным требованием является исследование ММСК из каждого пассажа на стерильность. Для инфузии пациенту применяется только трансплантат ММСК с отрицательными показателями по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

Для применения может быть использован биомедицинский клеточный продукт «Клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека ТУ ВУ 600395123.001-2014» или аналогичный биомедицинский клеточный продукт, полученный согласно утвержденным учреждениями здравоохранения ТУ по его

производству и отвечающий следующим органолептическим, цитологическим параметрам и показателям микробиологической чистоты:

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид	Однородная суспензия беловатого цвета без посторонних включений
Количество клеток, клеток/мл, не менее	2×10^6
Количество жизнеспособных клеток, %, не менее	90
Подлинность клеток (иммунофенотип клеток)	CD90+, CD 105+, CD73+ >90% CD 34, CD 45, CD14 <2%
Стерильность	Стерильно

Трансплантация ММСК пациентам с использованием биомедицинских клеточных продуктов осуществляется в организациях здравоохранения в порядке, установленном актами законодательства Республики Беларусь.

Срок культивирования аутологичных ММСК составляет от 18 до 37 дней. Из аутотрансплантата КМ (50 до 75 мл) в результате экспансии в среднем выделяется $240 \pm 111 \times 10^6$ МНК, что позволяет получить трансплантат ММСК в дозе $0,98 \pm 0,27 \times 10^6$ /кг массы тела пациента, что составляет $51 \pm 13,8 \times 10^6$ ММСК в культуре на выходе.

Трансплантация ММСК пациентам с ПЛУ-ТБ

Трансплантат аутологичных ММСК вводят внутривенно медленно в течение 10 мин однократно. Проводят мониторинг общего состояния пациента с определением частоты дыхания, пульса, артериального давления, температуры тела в условиях ОИТР не менее 2 ч. Затем пациентов переводят в туберкулезное отделение.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Аллергическая реакция на местный анестетик (лидокаин, новокаин) во время забора КМ.

2. Трансфузионная реакция в течение первых суток после внутривенного введения клеток, проявляющаяся повышением температуры до $37,5^\circ\text{C}$ и гриппоподобным состоянием.

Учитывая результаты исследований, при правильном выполнении всех пунктов настоящей инструкции риск возникновения осложнений чрезвычайно мал.