

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневич

30.11.2018

Регистрационный № 098–0918

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И
ГОРТАНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ
ВЫСТИЛКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Чекан В.Л., канд. мед. наук Гончаров А.Е., канд. мед. наук Стринкевич Э.А., канд. биол. наук Антоневиц Н.Г.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения хронических стенозов трахеи и гортани (ХСТГ) с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) – аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение ХСТГ.

Инструкция предназначена для врачей-оториноларингологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ХСТГ в стационарных условиях.

1 Показания к применению

Стеноз верхнего отдела трахеи (J38.6 по МКБ-10), стеноз под собственно голосовым аппаратом после медицинских процедур (J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса с наличием или без наличия трахеостомы/ларингостомы, в том числе после хирургических вмешательств по восстановлению просвета гортани и трахеи

2 Противопоказания к применению

Абсолютные противопоказания: злокачественные новообразования, беременность во все сроки, гиперчувствительность к человеческому сывороточному альбумину, иные противопоказания, соответствующие таковым для применения изделий медицинского назначения и лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в инструкции. Относительные противопоказания: острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации.

3 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники

1. изделия медицинского назначения и медицинская техника, необходимые для выполнения биопсии слизистой оболочки средних носовых ходов;

2. транспортная среда – DMEM с антибиотиками (гентамицин сульфат в концентрации 100 мкг/мл, амфотерицин Б в концентрации 10 мкг/мл);

3. изделия медицинского назначения, реагенты и расходные материалы, необходимые для подготовки аутологичных МСК ОВ в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

- среда бессывороточная для культивирования МСК с хепесом и глутамином,
- раствор трипсина 0,25% в растворе Версена,
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния,
- раствор Версена,
- раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий.
- раствор человеческого альбумина 10%, стерильный,
- аминоактиномицин Д,
- моноклональные антитела к антигенам человека CD90, CD105, CD45, CD31,
- среда тиогликолиевая,
- среда Сабуро,
- гентамицина сульфат, раствор 0,4%,
- флаконы для культур клеток T12,5, T25, T75, T175,
- наконечники сериальные однократного применения 1–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл,
- пипетки серологические однократного применения 1, 2, 5, 10 и 25 мл,
- пробирки центрифужные 15 мл и 50 мл однократного применения,
- чашки Петри,
- средства индивидуальной защиты.

4. медицинская техника, необходимая для подготовки аутологичных МСК ОВ в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций:

- ламинарный шкаф 2В класса защиты,
- инкубатор углекислотный,
- термостат,
- проточный цитофлюориметр,
- микроскоп инвертированный,
- центрифуга с горизонтальным или угловым ротором для пробирок емкостью 1,5–50 мл (1500–3000 об./мин),
- автоматические дозаторы переменного объема (0,5–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл и 0,5–5 мл),
- пипеточный дозатор,
- гемоцитометр с сеткой Горяева,
- холодильник бытовой с морозильной и холодильной камерами (+2–8°C; -20°C).

4 Технология использования метода

4.1 Забор, хранение и транспортировка материала

Забор биоптатов ткани обонятельной выстилки слизистой оболочки носа из области средней носовой раковины проводят под местной анестезией, размер биоптатов может составлять от 5 до 20 мм³. Ткань помещают в стерильный флакон с 5 мл транспортной среды. Флакон с тканью транспортируют и хранят при +4 °С не более 24 ч.

4.2 Получение и контроль качества аутологичных МСК ОВ

Подготовка аутологичных МСК ОВ осуществляется в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или медицинских научных организаций.

1. Биоптат ткани ОВ размеров 5–20 мм³ промывают в фосфатном

буфере с гентамицином. После 2–3 кратной промывки ткань измельчают острым скальпелем на фрагменты размером 0,5 – 1 мм³, которые затем переносят в пластиковый культуральный флакон площадью 12,5 см², добавляют ростовую среду. Культивирование проводят в стандартных условиях в СО₂-инкубаторе (5% СО₂) при +37°С и влажности 95%, осуществляют смену всей ростовой среды каждые 2–3 дня.

2. С использованием фазово-контрастного микроскопа оценивают процесс формирования монослоя. Выселение из эксплантов ткани ОВ эпителиеподобных клеток происходит на 2–5 сутки, фибробластоподобных клеток ОВ – в течение 7–14 суток. При достижении 50–70% конфлюентности монослоя в первичной культуре (21–25 сутки), появлении очагов многослойности в участках с фибробластоподобными клетками осуществляют 1-й пассаж первичной культуры. Клетки снимают трипсином, подсчитывают и высевают в новые культуральные флаконы в концентрации 20 тыс./см².

3. Дальнейший пересев субкультур проводят аналогично п. 2, при конфлюентности монослоя 80–90%. Рассевают клетки в концентрации 5–10 тыс./см². Осуществляют накопление биомассы фибробластоподобных клеток – МСК ОВ, на протяжении 3–6 пассажей.

4. Контроль морфологии МСК ОВ проводят на протяжении всех сроков культивирования. МСК ОВ при росте в монослойной культуре имеют фибробластоподобную морфологию. Оценивают наличие значительной примеси клеток иных популяций (эпителиеподобные и др.), видимых признаков микробной контаминации, цитодеструкции монослоя. При изменении клеточной морфологии, нарушении архитектоники монослоя: открепления клеток от культуральной поверхности, деструкции, клетки не используют для производства БМКП.

5. Контроль стерильности осуществляют согласно инструкции по

применению «Методы контроля контаминации микроорганизмами культур мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови» рег.№ 167-1208, утв. МЗ РБ 25.12.2010.

6. Для контроля подлинности клеток осуществляют оценку фенотипического состава клеточной культуры с использованием моноклональных антител к CD90, CD105, CD45, CD31, меченных флюорохромами. С целью определения жизнеспособности клетки окрашивают зондом – аминоактиномицином Д. Учет результатов проводят методом проточной цитометрии. Клетки считают прошедшими контроль качества при экспрессии CD90 – более 90%, CD105 – более 90%, CD31 – менее 3%, CD45 – менее 3%, жизнеспособности – более 90%.

7. На конечной стадии производства БМКП монослой клеток снимают трипсином, отмывают центрифугированием в 0,9% растворе хлорида натрия 10 минут при 200g для осаждения клеток. Повторяют процедуру отмывания клеток в 0,9% растворе хлорида натрия 2 раза. Клетки суспендируют в растворе 10% альбумина в концентрации 1×10^7 /мл, суспензию МСК ОВ разливают по 1 мл в стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл (1 единичная доза БМКП – 20 млн. клеток).

К каждой единице БМКП прилагается аналитический паспорт, в котором приводится информация о соответствии МСК ОВ предъявляемым требованиям по количеству содержащихся МСК ОВ, показателям подлинности, жизнеспособности и микробиологической чистоты.

4.3 Применение аутологичных МСК ОВ

При первом применении МСК ОВ для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа проводят кожный тест, для чего вводят подкожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл взвеси клеток. Через 30 минут при отсутствии системных и местных реакций используют оставшуюся взвесь МСК ОВ.

Во время оперативного вмешательства по восстановлению просвета дыхательных путей после удаления рубцовой и грануляционной ткани трахеи и/или гортани по периметру всей площади дезэпителизованного участка инсулиновым шприцем вводят подслизисто единичными инъекциями по 100–200 мкл суспензию МСК ОВ. На участок площадью до 2 см² используют 1 единичную дозу БМКП – 20 млн. клеток в 2 мл. В послеоперационном периоде проводится фиброскопический контроль восстанавливаемого участка.

Допускаются отечность, инфильтрация, болезненность, гиперемия, зуд в месте введения МСК ОВ, субфебрилитет в течение 1–3 суток после применения.

Через 4–6 недель выполняют эндоскопический осмотр области гортани и трахеи для определения эффективности проведенного лечения.

5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Отсутствуют.