

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневиц

*Д.Л. Пиневиц* 2018 г.

Регистрационный № 236-1218

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ 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., доцент Докукина Т. В., к.м.н. Хлебоказов Ф. П., д.м.н., профессор  
Потапнёв М. П., к.м.н., доцент Космачёва С. М., к.м.н. Слобина Е. Л., Махров  
М. В., Мартыненко А. И., Шамрук И. В., Королевич П. П., Гончарова Н. В.,  
Мороз Л. А.

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения пациентов с фармакорезистентной симптоматической эпилепсией с применением биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с эпилепсией.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с эпилепсией в стационарных условиях.

### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Эпилепсия (G-40 по МКБ-10).

### ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации;
- добро- и злокачественные новообразования головного мозга.

### ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.

1. Инструменты и расходные материалы для пункции костного мозга:
  - комплект инструментов, необходимых для забора костного мозга;
  - стерильная пробирка с гепарином.
2. Оборудование, инструменты и расходные материалы для приготовления БМКП:
  - ламинарный бокс с потоком воздуха II-класса защиты;
  - центрифуга с горизонтальным ротором для пробирок ёмкостью 15 мл и 50 мл (1500-3000 об/мин);

- инкубатор углекислотный (автоматическое поддержание температуры 37°C и концентрации углекислого газа 5%);
- микроскоп световой бинокулярный;
- микроскоп инвертированный;
- холодильник с морозильной камерой (от +2°C; до -20°C);
- морозильник (-80°C);
- проточный цитофлуориметр;
- счетчик для форменных элементов крови;
- камера Горяева;
- пипеттор для серологических пипеток;
- флаконы для культур клеток T175 и T75;
- пипетки серологические однократного применения 1 мл, 2 мл, 5мл, 10 мл и 25 мл;
- пробирки центрифужные 15 мл и 50 мл однократного применения, криопробирки; микропробирки эппендорф;
- чашки для культур клеток (d=100 мм);
- системы фильтрации (0,45 мкм, 0,2 мкм).

### 3. Необходимые реагенты:

- питательная среда (среда  $\alpha$ -MEM с рибонуклеазидами и глутамаксом);
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);
- трипсин-ЭДТА 0,25% раствор;
- сыворотка АВ(IV), инактивированная 30 минут при +56°C°;
- нейроиндуцированная среда: среда Neurocult-XF Proliferation medium и факторы роста (FGF $\beta$ , EGF), либо среда Stempro NSC SFM (набор; kit) и добавка к ней- ALA-GLN – 200мМ раствор;
- гистопак;
- раствор гепарина сульфата 5000 ед./мл;
- раствор натрия хлорида 0,9% для инфузий;

- бензилпенициллина натриевая соль;
- стрептомицина сульфат;
- моноклональные антитела к поверхностным маркерам МСК КМ – CD90, CD105, CD45 и CD34;
- среда Сабуро, тиогликолевая среда.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА

Метод лечения фармакорезистентной симптоматической эпилепсии включает в себя повторные введения аутологичных МСК КМ с интервалом 6 и более месяцев и состоит из следующих мероприятий:

1. Информирование пациента и получение согласия на проведение метода лечения фармакорезистентной симптоматической эпилепсии с использованием аутологичных МСК КМ проводится перед началом лечения.

2. Забор костного мозга 30-40 мл проводится путем пункции гребня подвздошной кости. Пунктат переносится в стерильные пробирки с антикоагулянтом (гепарин 50 ед/мл пунктата), содержимое тщательно перемешивается во избежание образования сгустков, после чего пробирки доставляются в специализированную лабораторию для получения БМКП в течении 1-го часа.

3. Приготовление биомедицинского клеточного продукта проводится в стерильных лабораторных условиях.

Из пунктата выделяются мононуклеары и наращиваются МСК КМ. Фракция мононуклеаров костного мозга выделяется на градиенте плотности гистопак ( $\rho=1,077$ ), отмывается от градиента плотности 2-х кратным центрифугированием в растворе фосфатно-солевого буфера. Клетки вносятся в культуральные флаконы в концентрации 300-500 тыс./см<sup>2</sup> в полной питательной среде на основе  $\alpha$ -MEM с рибонуклеозидами и глутамаксом (2 мМ), 5% сыворотки АВ (IV), 100ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Через 48 часов не прикрепившиеся к пластику клетки

удаляются. К прилипшим к пластику МСК КМ добавляется полная питательная среда. Нарращивают МСК КМ на протяжении 2-3 пассажей в полной питательной среде. Смену среды проводят через 3-4 дня, пересев клеток - при конфлюэнтности 80%.

Часть МСК КМ 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 в течение 5-7 дней.

Неиндуцированные МСК КМ, предназначенные для внутривенного введения, снимают с пластика 0,025% раствором трипсин-ЭДТА, отмывают дважды ФСБ, разводят в 20 мл физиологического раствора с добавлением 5% аутологичной сыворотки. Количество клеток не менее 35 млн в БМКП.

Нейроиндуцированные МСК КМ, предназначенные для эндолюмбального введения, снимают с пластика 0,025% раствором трипсин-ЭДТА, отмывают дважды ФСБ разводят в 5 мл физиологического раствора с добавлением 5% аутологичной сыворотки. Количество клеток не менее 5 млн в БМКП.

Контроль качества МСК КМ проводят по следующим показателям:

- подсчет количества и оценка жизнеспособности клеток под световым микроскопом в камере Горяева по исключению красителя трипанового синего. Жизнеспособность клеток не должна быть ниже 95%;
- оценка подлинности – фенотипический профиль мезенхимальных стволовых клеток определяется по выраженности/отсутствию поверхностных антигенов CD90, CD105, CD34, CD45 методом прямой иммунофлуоресценции;
- микробиологический контроль стерильности проводится после каждого посева и смены среды в процессе наращивания клеток на автоматическом анализаторе VacT/ALERT 3D и посевом на питательную среду Сабуро и тиогликолевую среду.

4. Клеточный материал транспортируется в термоконтейнере с поддерживаемой температурой от +4°C до +37°C. Срок годности БМКП не более 2-х часов с момента выдачи.

5. Пациентам с фармакорезистентной симптоматической эпилепсией аутологичные МСК КМ вводятся в асептических условиях, внутривенно и эндолюмбально.

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

I этап. Внутривенное введение культуры недифференцированных аутологичных МСК КМ в течение 10 минут, в объеме 20 мл с количественным содержанием не менее 35 млн. клеток в культуре.

II этап. Проводится через 5-7 дней после внутривенного введения. Пациенту в положении на боку под местной анестезией между остистыми отростками L<sub>3</sub> - L<sub>4</sub> производят люмбальную пункцию. Проводится забор 3-5 мл спинномозговой жидкости на исследование. Затем шприцом медленно вводится не менее 5 млн нейроиндуцированных МСК КМ в 5 мл суспензии. После окончания процедуры пациент находится под наблюдением медицинских работников 30 минут. Затем его транспортируют в палату, укладывают на живот с приподнятым ножным концом под углом 10-20°. В таком положении пациент находится 2-3 часа.

6. Повторное введение МСК КМ осуществляется в случае кратковременной ремиссии (до 3-х месяцев), уменьшения частоты приступов после первого введения аутологичных МСК КМ, улучшения клинического состояния, неполной редукции электроэнцефалографических показателей (эпилептиформная активность, индекс пароксизмальности, средняя локальная когерентность в виде эпилептического треугольника), с полным соблюдением алгоритма введения, изложенного выше.

7. Эффективность лечения оценивают через 3, 6, 12 месяцев по клиническому состоянию (частота и тяжесть приступов), данным рутинной ЭЭГ (индекс пароксизмальности), картирования ЭЭГ (данные средней локальной когерентности), видео-ЭЭГ-мониторирования (локальная и диффузная эпилептиформная активность).

## ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

Несоблюдение последовательности проведения этапов и технологии применения метода может приводить к потере жизнеспособности МСК КМ. Для исключения ошибок необходимо соблюдать правила и рекомендации, изложенные в данной инструкции.