

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ


«УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель Министра
Е.Л. Богдан
« 12 » _____ 2021 г.
Регистрационный № 069-0621

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ
ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИМЕДИЦИНСКОГО
КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ
ТКАНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: Поддубный Ю.А., д.м.н. Ролевич А.И., д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси Красный С.А., к.б.н. Пинчук С.В., Василевич И.Б., д.б.н., проф., акад. НАН Беларуси Волотовский И.Д.

Минский район, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод лечения стрессового недержания мочи у пациентов после хирургического удаления предстательной железы с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе смеси аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани с коллагеновым гелем 7%, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение недержания мочи у мужчин, перенесших простатэктомию.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-урологов, врачей-онкологов-хирургов, врачей-хирургов, оказывающих медицинскую помощь пациентам со стрессовым недержанием мочи, возникшим после хирургического удаления предстательной железы в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара.

1. Показание к применению

Стрессовое недержание мочи, возникшее после хирургического удаления предстательной железы (N39.4 по МКБ-10).

2. Противопоказания к применению

- 2.1.** Срок после проведения хирургического удаления предстательной железы менее 12 месяцев;
- 2.2.** острые или хронические заболевания в стадии декомпенсации;
- 2.3.** пороки развития уретры или мочевого пузыря;
- 2.4.** аутоиммунные заболевания и клинически выраженные системные заболевания соединительной ткани;
- 2.5.** острые и хронические в стадии обострения инфекционные заболевания, а также бактериурия;
- 2.6.** любые аллергические проявления в стадии выраженных реакций;
- 2.7.** активные онкологические заболевания;
- 2.8.** гиперчувствительность к любому компоненту применяемых лекарственных средств;

2.9. иные противопоказания, соответствующие таковым для использования БМКП, изделий медицинского назначения, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

2.10. С осторожностью – лучевая терапия на область везико-уретрального анастомоза в анамнезе, состояния пациента после трансплантации органов.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.

3.1. Изделия медицинского назначения и медицинская техника, необходимые для выполнения эксплантации жировой ткани.

3.2. Изделия медицинского назначения, лекарственные средства, реагенты и расходные материалы, необходимые для получения и подготовки БМКП:

3.2.1. Модифицированная питательная среда Игла Дульбекко (DMEM);

3.2.2. 0,1 % раствор коллагеназы;

3.2.3. моноклональные антитела к антигенам человека: CD105, CD90, CD29, CD44, CD45, CD34 человека;

3.2.4. L-глутамин;

3.2.5. трипсин-ЭДТА (0,25% раствор);

3.2.6. пропидиум иодид (PI);

3.2.7. флуоресцеин диацетат (ФДА);

3.2.8. бензилпенициллина натриевая соль;

3.2.9. стрептомицина сульфат;

3.2.10. фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (ФСБ);

3.2.11. диметилсульфоксид (ДМСО);

3.2.12. раствор натрия хлорида 0,9 % для инфузий;

3.2.13. среда тиогликолиевая и среда Сабуро;

3.2.14. коллагеновый гель;

3.2.15. флаконы для культур клеток стерильные;

- 3.2.16. фильтр для взвеси клеток;
- 3.2.17. пробирки стерильные полипропиленовые объемом 1-2 мл;
- 3.2.18. чашки Петри;
- 3.2.19. камера Горяева;
- 3.2.20. средства индивидуальной защиты.
- 3.2.21. ламинарный шкаф 2 класса защиты;
- 3.2.22. газопроточный CO₂-инкубатор;
- 3.2.23. термостат;
- 3.2.24. проточный цитофлюориметр;
- 3.2.25. микроскоп инвертированный;
- 3.2.26. весы аналитические;
- 3.2.27. рН-метр;
- 3.2.28. центрифуга с ротором для пробирок емкостью 15 и 50 мл;
- 3.2.29. пробирки центрифужные объемом 15 мл и 50 мл стерильные;
- 3.2.30. автоматические дозаторы переменного объема;
- 3.2.31. наконечники стерильные;
- 3.2.32. флуоресцентный микроскоп;
- 3.2.33. микробиологический анализатор;

3.3. Изделия медицинского назначения и лекарственные средства, необходимые для применения БМКП:

- 3.3.1. жесткий цистоуретроскоп (диаметр тубуса 22-24 Fr) и механизм-подъемник (Альбарран) с рабочим каналом;
- 3.3.2. пункционная (эндоскопическая) игла 22-24G, длина иглы не менее 4 мм);
- 3.3.3. готовый биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в виде суспензии;
- 3.3.4. готовый биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в смеси с коллагеновым гелем;

- 3.3.5. катетер для пункции периферической вены;
- 3.3.6. игла спинальная 24-26G;
- 3.3.7. шприцы 2 мл, 5 мл, 10 мл, 20 мл;
- 3.3.8. лидокаина гидрохлорид 1% - 2-4 мл; 2% - 2-4 мл;;
- 3.3.9. левобупивакаин 0,5% - 10 мл или бупивакаин 0,5% - 10 мл;
- 3.3.10. уретральный катетер Фолея №16/№18 Ch;
- 3.3.11. корнцанг;
- 3.3.12. салфетки стерильные;
- 3.3.13. операционное белье стерильное;
- 3.3.14. раствор натрия хлорида 0,9 % стерильный;
- 3.3.15. повидон-йод, йодискин или аналоги;
- 3.3.16. септоцид или аналоги;
- 3.3.17. хлоргексидин.

4. Технология использования предлагаемого метода

4.1. Взятие, хранение и транспортировка биологического материала.

Эксплантация жировой ткани для получения БМКП выполняется общепринятыми методами под местной анестезией путем резекции 5-15 г подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки в околопупочной, надлобковой или подвздошных областях в условиях операционной с соблюдением правил асептики. Жировую ткань помещают в стерильный флакон с транспортной средой. Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от +2 до +12 °С не более 24-х часов.

4.2. Получение и контроль качества БМКП. В стерильных условиях выполняют ферментативную обработку жировой ткани в растворе коллагеназы при постоянном перемешивании. Затем клеточную суспензию фильтруют через капроновый клеточный фильтр, осаждают центрифугированием, удаляют супернатант. Осадок (клетки) суспендируют в ростовой среде DMEM. Клетки высевают в количестве 1×10^5 кл/см² в культуральные флаконы и культивируют в течение 24 ч при температуре

37°C в CO₂-инкубаторе во влажной воздушной атмосфере при содержании CO₂ 5 %, после чего среду с неадгезировавшими клетками удаляют и после промывки в фосфатно-солевом буфере, заменяют на свежую. Полная смена ростовой среды проводится каждые 72 ч.

При образовании монослоя МСК пересевают каждые 10-12 дней, для этого монослой промывают ФСБ, обрабатывают 0,25% раствором трипсина в 0,02% растворе ЭДТА в течение 1-3 мин при температуре 37°C. Клетки высевают в культуральные флаконы в количестве 4x10³ кл/см², накапливают их необходимое количество в течение 2-3 пассажей. На конечной стадии получения БМКП суспендируют в растворе натрия хлорида 0,9 % для инфузий из расчета не менее 1x10⁶ клеток в 1 мл.

Контроль стерильности осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

Для контроля подлинности осуществляют оценку фенотипического состава БМКП с использованием моноклональных антител к молекулам CD105, CD90, CD29, CD44, CD45, CD34 меченных флуорохромами. Анализируют интенсивность флуоресценции клеток в соответствующих красителям каналах проточного цитофлуориметра. В качестве контроля используются клетки без добавления антител.

Жизнеспособность клеток анализируют методом световой микроскопии по исключению клетками красителя трипановый синий.

БМКП считают прошедшим контроль качества при экспрессии молекул CD105, CD90, CD29 – более 90%, CD44 - более 80%, CD34 - менее 5%, CD45 - менее 3%, жизнеспособности – не менее 85 %, отсутствии контаминации бактериями, микоплазмами и дрожжеподобными грибами при количественном содержании клеток не менее 1x10⁶ клеток на 1 мл.

Готовый БМКП хранится при температуре от +5 до +10°C в течение не более 12 ч и при температуре от +10 до +37°C не более 4 ч с момента изготовления.

4.3. Приготовление смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%.

Клеточный трансплантат для введения в парауретральную область пациентам изготавливают в виде смеси БМКП на основе аутологичных МСК жировой ткани согласно ТУ ВУ 100217351.004-2014 или аналога и коллагенового геля в асептических условиях не более, чем за 4 часа до использования. Для приготовления коллагенового геля стерильный гемостатический порошок вскрывают в асептических условиях и добавляют стерильный физиологический раствор до концентрации порошка 7% (w/w). Полученную массу аккуратно перемешивают до однородной консистенции. Полученный гидратированный порошок расфасовывают в стерильные пластиковые пробирки с герметично закрывающейся крышкой и хранят при температуре 4°C не более суток. Суспензию МСК жировой ткани в асептических условиях смешивают со стерильным гидратированным порошком 7% в соотношении 1:1, осторожно перемешивают до однородной консистенции. Конечная концентрация МСК в составе трансплантата – 2×10^6 клеток в 1 мл.

4.4. Применение БМКП и биотрансплантата (смеси БМКП с коллагеновым гелем 7%). Введение БМКП и биотрансплантата осуществляют в условия операционной. Перед использованием рекомендуется провести подкожную аллергопробу с 0,1-0,5 мл смеси БМКП с коллагеновым гелем.

Анестезия: спинномозговая анестезия (СМА). При необходимости дополнительно может использоваться инфильтрационная анестезия. Для инфильтрационной анестезии используют раствор лидокаина гидрохлорида 1% в объеме 1-2 мл, который вводится под проксимальный отдел уретры.

Промежуточные процедуры и обработка: головка полового члена, крайняя плоть, тело полового члена, область лобка, мошонка, промежность, внутренние поверхности бедер обрабатываются йодиксином или аналогами/хлоргексидином. Укладка пациента на операционном столе: в положении для литотомии.

Смесь БМКП с коллагеновым гелем перед использованием необходимо

перемешать путем встряхивания. БМКП (суспензию) и смесь БМКП с коллагеновым гелем из стерильных пробирок набирают в соответствующие стерильные шприцы, удаляют воздух из шприцов.

Выполняется уретроцистоскопия. Для введения биотрансплантата используется жесткий цистоуретроскоп и механизм-подъемник (Альбарран) с рабочим каналом. Под контролем зрения эндоскопическая игла вводится через рабочий канал цистоуретроскопа в уретру. В области мембранозного отдела уретры, в проекции наружного сфинктера уретры, трансуретрально в зону поперечнополосатого сфинктера вводится БМКП (суспензия) объемом 2-4 мл на глубину 4-6 мм в положении 5 и 7 часов условного циферблата. Затем 10-15 мл готовой смеси БМКП с коллагеновым гелем в равном объеме вводится в подслизистую область мембранозной уретры в положении 4, 6 и 8 часов условного циферблата, также допустимо дополнительное введение в положении 1, 11, 12 часов условного циферблата для обеспечения полной коаптации слизистой уретры. Цистоуретроскоп удаляется. Головка полового члена обрабатывается йодиксином/хлоргексидином, устанавливается катетер Фолея №14/№16 Ch на 24 часа.

5. Перечень возможных осложнений при использовании метода и путей устранения

Аллергическая реакция на растворы антисептиков, анестетики. Аллергическая реакция на компоненты биотрансплантата. Перед использованием рекомендуется провести подкожную аллергопробу. В случае возникновения аллергической реакции – использование данной методики невозможно. При возникновении аллергических реакций руководствуются протоколом оказания помощи при возникновении анафилактических состояний (Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 №50 «Об утверждении клинических протоколов «Экстренная медицинская помощь пациентам с анафилаксией», «Диагностика и лечение системной токсичности при применении местных анестетиков»).

Незначительная макрогематурия после проведения данной манипуляции не требует медицинского вмешательства. Допустимо использование транексамовой кислоты перорально или парентерально согласно рекомендациям к применению препарата.

Выраженная некупируемая макрогематурия свидетельствует о нарушении методики лечения и требует дополнительной диагностики и устранения причины кровотечения.

При возникновении острой задержки мочеиспускания в первые сутки после введения биотрансплантата рекомендуется повторная постановка уретрального катетера Фолея №14/№16 Ch на 1-2 суток с последующей оценкой состояния пациента. Более длительная задержка мочеиспускания может свидетельствовать о нарушении техники введения биотрансплантата и требует дополнительного обследования и соответствующего лечения осложнения.

Инфекционные осложнения (повышение температуры тела, цистит, уретрит, орхоэпидидимит и др.) свидетельствуют о нарушении правил асептики при транспортировке, подготовке и введении биотрансплантата или некачественном обследовании пациента перед введением биотрансплантата (наличие инфекции мочевыводящих путей пациента, в т.ч. бессимптомной бактериурии). При возникновении инфекционных осложнений руководствуются клиническим протоколом диагностики и лечения пациентов (взрослое население) с урологическими заболеваниями (Приложение 1 к Постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.09.2011 № 920 «Об утверждении некоторых клинических протоколов и признании утратившим силу отдельного структурного элемента приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19 мая 2005 г. № 274.