СПОСОБЫ КОНСЕРВАЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Аутологичная жировая ткань нашла широкое применение в косметической и реконструктивной хирургии для заполнения дефектов мягких тканей, однако использование жировой ткани имеет существенный недостаток, заключающийся в достаточно высокой степени ее резорбции после имплантации, которая может достигать 70%, что обусловливает необходимость выполнения повторных процедур, которые не только повышают длительность и стоимость лечения, но и усиливают травматизацию донорских участков.

Кроме того, жировая ткань рассматривается как ценных источник мезенхимальных стромальных клеток, которые могут быть использованы для регенерации костной, хрящевой, мышечной тканей, эндотелия и т.д. Все более широкое распространение получает использование в регенеративной медицине стромальная васкулярная фракция жировой ткани. Однако получение биоматериала для производства клеточного продукта может быть сопряжено с рядом трудностей, связанных с тяжелым общим состоянием больного, возрастным снижением содержания стволовых клеток в тканях и т.д., что определяет целесообразность заблаговременной заготовки и консервации биоматериала для последующего его использования при приготовлении клеточного терапевтического продукта.

Разработано большое количество способов криохранения жировой ткани, некоторые способы предполагают ее хранение при достаточно высоких температурах (от +1 до -18°С) и не предполагают использования криопротекторов, результаты применения подобных способов, однако, сложно признать удовлетворительными (Lidagoster M.I. et al., 2000), в ряде исследований установлена сохранность жизнеспособности клеток при кратковременном криохранении жировой ткани при температуре от минус 35°С до минус 195°С (Wolter Т.Р. et al., 2005; MacRae J.W. et. al., 2004). Однако в настоящее время установлено, что достижение удовлетворительных результатов криохранения жировой ткани возможно только при условии использования криопротекторов, контролируемого замораживания и размораживания, а также хранении жировой ткани при температурах ниже минус 95°С (Shu Ζ. et al., 2015). В настоящее время используются два типа криоконсервантов: проникающие в клетки, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), и непроникающие в клетки, такие как глицерин, трегалоза, гидроксиэтилкрахмал и др. Однако до настоящего времени не найден способ подготовки жировой ткани к криохранению, обеспечивающий полное сохранение жизнеспособности ее клеток. Снижение жизнеспособности клеток жировой ткани, в свою очередь, приводит к ухудшению результатов использования жировой ткани в клинической практике, например для липофилинга, замещения дефектов мягких тканей, а также снижает выход стромальной васкулярной фракции жировой ткани или мезенхимальных стромальных клеток. Повреждение клеток может произойти при их замораживании, вследствие цитотоксичности криопротекторов, вследствие повреждения клеточных мембран из-за внутриклеточного образования льда или чрезмерной дегидратации клеток, при размораживании замороженной ткани вследствие рекристаллизации льда, при отмывке от криопротекторов вследствие осмотического стресса, а также на этапе трансплантации вследствие гипоксии.

Известен способ подготовки жировой ткани к криоконсервированию путем добавления к липоаспирату, полученному при липосакции, криопротектора, содержащего 20% ДМСО и 20% сыворотки. Способ осуществляют следующим образом: в криопробирку помещают отмытый липоаспират, к которому капельно добавляют описанный выше криопротектор из расчета 1 мл криоконсерванта на 1 мл ткани, после чего криопробирку помещают в ротатор, где перемешивают содержимое при 4°С в течение 30 минут, после чего пробирку перемещают в замораживатель, где образцы замораживают с контролируемой скоростью до минус 180°С, замороженные образцы переносят в жидкий азот (Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. J Surg Res. 2014 Mar; 187(1): 24-35).

Способ имеет следующие недостатки:

Не обеспечивает достаточной сохранности жизнеспособности клеточной фракции жировой ткани при ее замораживании и размораживании, так как предусматривает использование ДМСО, обладающего выраженными токсическими свойствами при физиологической температуре, в высокой концентрации, что обусловливает токсическое повреждение клеток жировой ткани при их размораживании.

Использование ДМСО в высокой концентрации обусловливает необходимость длительной отмывки ткани от криоконсерванта, что обусловливает выраженное механическое повреждение ткани, удлиняет время ее тепловой гипоксии.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому способу является способ подготовки жировой ткани к криоконсервированию путем ее смешивания с криоконсервирующим раствором, содержащим 5% ДМСО, 38 мг/мл альбумина и 57 мг/мл гидроксиэтилкрахмала. Способ осуществляют следующим образом: липоаспират помещают в пробирку, содержащую фосфатный буфер, и центрифугируют 4 минуты при 500 g. Верхнюю (жир) и нижнюю (эритроциты) фракции удаляют, после чего жировую ткань переносят в мешки для криоконсервации, после чего в мешки добавляют описанный выше криоконсервант в объеме, равном объему жировой ткани. Мешки охлаждают в морозильнике при минус 80°С, положив их между двумя листами полистирола на 12 часов, после чего перемещают их в жидкий азот (Chaput В, Orio J, Garrido I, De Bonnecaze G, Espagnolle Ν, Gadelorge M, Chavoin JP, Grolleau-Raoux JL, Casteilla L, Planat V, Bourin P. A clinical scalable cryopreservation method of adipose tissue for reconstructive surgery assessed by stromal vascular fraction and mice studies. Plast Reconstr Surg. 2014 Apr; 133(4): 815-26).

Способ имеет следующие недостатки:

не обеспечивает защиты клеточной фракции жировой ткани при ее размораживании и трансплантации от гипоксического повреждения, что снижает эффективность ее применения.

Задачей настоящего изобретения является создание способа подготовки жировой ткани к криоконсервированию, обеспечивающего более высокую по сравнению с известными аналогами сохранность жизнеспособности клеточной фракции жировой ткани при ее криоконсервировании и размораживании.

Техническим результатом предлагаемого способа является повышение жизнеспособности клеточной фракции жировой ткани при ее криоконсервировании и размораживании.

Указанный технический результат достигается внесением в консервационный раствор янтарной кислоты в дозе 3 мг/100 мл консервируемой жировой ткани.

Указанная доза янтарной кислоты необходима и достаточна для получения заявленного технического результата, применение более низкой дозы не окажет достаточно выраженного антигипоксического воздействия на клетки жировой ткани, существенное увеличение дозы не вызовет значимого усиления эффекта.

Описание способа:

Способ осуществляют следующим образом: липоаспират помещают в политетрафторэтиленовый мешок, в который добавляют 10% раствор реополиглюкина из расчета 100 мл раствора реополиглюкина на 100 мл липоаспирата, липоаспират и раствор реополиглюкина перемешивают путем проглаживания мешка, после чего жидкую фракцию сливают, процедуру повторяют 3 раза. Далее, в мешок с отмытой жировой тканью добавляют диметилсульфоксид из расчета 4 г диметилсульфоксида на 100 мл жировой ткани. Общий объем диметилсульфоксида делят на 3 равные части и добавляют их к жировой ткани последовательно с интервалом в 5 минут. После этого в мешок с отмытой жировой тканью добавляют 10% раствор реополиглюкина из расчета 1,0 г реополиглюкина на 100 мл жировой ткани, 20% раствор человеческого сывороточного альбумина из расчета 0,6 г альбумина на 100 мл жировой ткани и янтарную кислоту, предварительно разведенную в растворе реополиглюкина, из расчета 3,0 мг янтарной кислоты на 100 мл жировой ткани. Далее жировую ткань переносят в мешок для криоконсервации, криомешок помещают в программный замораживатель, где он охлаждается до минус 90°С со скоростью 1°С в минуту. После заморозки мешок переносят в жидкий азот.

Для иллюстрации изобретения приведен следующий пример.

Доброволец Е., 34 лет. После подписания информированного согласия проводилась шприцевая липосакция в абдоминальной области с эстетической целью. 300 мл липоаспирата были помещены в туми-шприцы и немедленно транспортированы в лабораторию. В условиях ламинарного шкафа жировую ткань переносили в политетрафторэтиленовые мешки и отмывали путем добавления 300 мл 10% раствора реополиглюкина. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Отмытую жировую ткань разделили на 6 равных частей по 50 мл, которые перенесли в мешки для криоконсервации. В каждый мешок трижды добавили 0,67 мл диметилсульфоксида с интервалом между введениями 5 минут, затем 5 мл 10% раствора реополиглюкина и 1,4 мл 20% раствора человеческого сывороточного альбумина. В 3 мешка, помимо вышеуказанных компонентов, добавили по 1,5 мг янтарной кислоты. Янтарную кислоту разводили в растворе реополиглюкина непосредственно перед введением последнего. После этого криомешки помещали в программный замораживатель, где они охлаждались до температуры минус 90°С со скоростью 1°С в минуту. После заморозки мешки переносили в жидкий азот. Через 1 неделю, 1 месяц и 2 месяца извлекали из криохранилища по 2 криомешка с жировой тканью (один мешок с янтарной кислотой в составе криопротектора, а второй мешок без янтарной кислоты). Криомешки помещались в водяную баню при 37°С. После разморозки жировая ткань промывалась 65 мл 10% раствора реополиглюкина, после чего мешок проглаживали до равномерного перемешивания раствора и жировой ткани, после чего промывочный раствор сливали, процедуру повторяли два раза. Отмытую жировую ткань переносили в 50 мл пробирки и выделяли стромально-васкулярную фракцию клеток путем ферментативной обработки 0,15% раствором коллагеназы I типа в течение 30 минут. После этого производили подсчет и оценку жизнеспособности клеток. Данные о жизнеспособности и количестве клеток стромально-васкулярной фракции приведены в таблице 1.



Применение способа позволит повысить клиническую эффективность применения жировой ткани и полученных из нее продуктов (стромально-васкулярной фракции, мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и т.д.).

Способ подготовки жировой ткани к криоконсервированию, включающий отмывку липоаспирата, смешивание отмытой жировой ткани с криоконсервирующим раствором, содержащим диметилсульфоксид, человеческий альбумин и декстран, контролируемое замораживание и хранение в жидком азоте, отличающийся тем, что в состав криоконсервирующего раствора вводят янтарную кислоту из расчета 3 мг/100 мл жировой ткани.

<https://findpatent.ru/patent/265/2655222.html>
© , 2012-2020