

Качество и жизнеспособность аутологичной жировой ткани, забранной с применением различных техник: сравнительное клиническое исследование

Hanna Luze, MD¹; Johanna Einsiedler, BSc; Sebastian Philipp Nischwitz, MD; Raimund Winter, MD; Dagmar Kolb, PhD; Lars-Peter Kamolz, MD; Petra Kotzbeck, PhD; Thomas Rappl, MD

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Непредсказуемость результатов аутотрансплантации жира, связанная с процессами его резорбции, представляет собой основное препятствие для врачей и пациентов. Считается, что большее количество жизнеспособных адипоцитов приводит к сохранению большего объема пересаженной ткани. В то время как некоторые неблагоприятные факторы, сопровождающие трансплантацию, изучали довольно широко, другие показатели исследовали в меньшей степени или вовсе игнорировали.

Цель. Цель настоящего исследования заключалась в изучении особенностей процесса сбора жировой ткани как первичной причины травматизации клеток и определении факторов риска, связанных с их низкой выживаемостью.

Методы. В исследование были вовлечены 39 мужчин и женщин, проходивших добровольную плановую липосакцию или абдоминопластику. В ходе исследования был проведен анализ 47 образцов липоаспирата, полученного с применением различных техник липо-

Aesthetic Surgery Journal 2022, Vol 42(12) 1416–1424 © Все права принадлежат авторам 2022. Опубликовано издательством Oxford University Press от имени организации The Aesthetic Society. Все права защищены. Для получения разрешения на использование, пожалуйста, обратитесь по адресу: journals.permissions@oup.com

<https://doi.org/10.1093/asj/sjac192> www.aestheticsurgeryjournal.com

Oxford University Press

Дата решения о публикации: 9 июня 2022 года, статья опубликована онлайн 27 июля 2022 года до публикации в печатном издании.

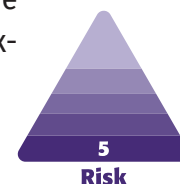
Доктора Luze и Nischwitz являются ординаторами, доктора Winter и Rappl – пластическими хирургами, доктор Kamolz профессором отделения пластической, эстетической и реконструктивной хирургии Департамента хирургии Медицинского университета города Грац, Австрия (Division of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, Medical University of Graz, Graz, Austria). Госпожа Einsiedler является студенткой докторантуры, а доктор Kotzbeck – молекулярным биологом Объединенного центра регенеративной медицины COREMED компании Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH (Cooperative Centre for Regenerative Medicine, Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH) в городе Грац, Австрия. Доктор Kolb – профессор Исследовательского центра ультраструктурного анализа при Медицинском университете города Грац, Австрия (Core Facility Ultrastructure Analysis, Medical University of Graz, Austria).

Автор, ответственный за переписку: Доктор Hanna Luze, отделение пластической, эстетической и реконструктивной хирургии Департамента хирургии Медицинского университета города Грац, Австрия (Division of Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, Medical University of Graz, Austria), адрес: Auenbruggerplatz 29/2, 8036 Graz, Austria. E-mail: hanna.luze@medunigraz.at; Instagram: [@dr_hannaluze](https://www.instagram.com/dr_hannaluze)

сакции. Чтобы выяснить отличия в экспрессии различных маркеров адипоцитов были проведены выделение РНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Кроме того, чтобы определить степень повреждения клеток при использовании различных техник сбора липоасpirата, была выполнена сканирующая электронная микроскопия образцов.

Результаты. Статистически значимо более низкая экспрессия рецептора гамма (γ), активируемого пролифератором пероксисом, была выявлена у субъектов с более высоким индексом массы тела (ИМТ). Тенденция к более низкой экспрессии перилипина 1 наблюдалась в образцах липоасpirата, забранного супервлажной техникой с применением ультразвука, по сравнению с сухой техникой и просто супервлажной техникой. Самая низкая степень повреждения клеток, согласно снимкам, полученным методом сканирующей электронной микроскопии, была у липоасpirата, забранного с применением супервлажной техники и ультразвука, что достоверно отличало этот метод от двух других.

Выводы. Оптимизировать результаты пересадки аутологичной жировой ткани можно сосредоточившись на процессе забора липоасpirата как главном факторе риска, влияющем на жизнеспособность адипоцитов. Ультразвуковую липосакцию можно считать уместным методом забора.



УРОВЕНЬ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ: 5

Аутотрансплантация жира (AFG) является эффективным методом увеличения мягких тканей тела [1]. Несмотря на то что такой малоинвазивный подход имеет множество преимуществ, озабоченность вызывает значительное различие клинических результатов из-за резорбции пересаженного трансплантата [1]. Согласно признанной теории выживаемости клеток, большее количество пересаженных жизнеспособных адипоцитов предполагает больший объем прижившегося жирового трансплантата [2].

Чтобы обеспечить оптимальный процент сохраненных клеток, крайне важно использовать наиболее мягкую технику забора трансплантата [1, 3, 4]. Имеются доказательства, что различные факторы, такие как механический стресс, недостаток кровоснабжения, воспаление или нефизиологическая температура во время забора, влияют на выживаемость адипоцитов [1, 3, 4]. Несмотря на многочисленные исследования, четкого консенсуса в отношении оптимальной техники забора липоасpirата, обеспечивающей высокую выживаемость тканей, до настоящего времени опубликовано не было [1].

Как правило, аутологичный жир для трансплантации получают при липосакции подкожно-жировой клетчатки, и состоит он главным образом из зрелых адипоцитов и клеток стромально-васкулярной фракции (SVF). Несмотря на то что адипоциты составляют только 20 % всех клеток жирового трансплантата, начальный объем собранного аспирата в основном соответствует объему адипоцитов [3]. Оставшиеся 80 % клеток стромально-васкулярной фракции представляют собой гетерогенную смесь фибробластов, лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, эндотелиальных клеток, пирицитов и, что более важно, стволовых клеток жирового происхождения (ADSC) [1, 3]. Зрелые адипоциты – очень хрупкие клетки, которые склонны к

апоптозу или некрозу во время или непосредственно после трансплантации, что влияет на потерю объема на начальном этапе приживления [3]. Именно клетки стромально-васкулярной фракции переживают жесткие условия, такие как ишемия или воспаление, и могут пролиферировать и дифференцировать в новые адипоциты после трансплантации [3]. Как начальная потеря объема из-за апоптоза адипоцитов, так и формирование адипоцитов за счет клеток стромально-васкулярной фракции являются важными механизмами сохранения объема и его увеличения в долгосрочной перспективе [3], поэтому основной фокус данного исследования направлен на обеспечение наилучшей выживаемости и функциональности адипоцитов, и SVF-клеток за счет выявления факторов риска и определения благоприятных техник забора [1, 3].

Некоторые механические аспекты липосакции, такие как размер используемых канюль, изучены довольно широко, тогда как другие параметры, потенциально способные отрицательно влиять на выживаемость аутологичного жирового трансплантата, исследовали меньше или вовсе игнорировали [1, 3]. Такие переменные, как использование тумесцентного раствора, ультразвуковая и силовая липосакция, место забора и некоторые характеристики самого пациента, также могут оказывать значительное влияние как на первичную выживаемость адипоцитов и клеток стромально-васкулярной фракции во время липосакции, так и на способность SVF-клеток к дифференцировке после нее [3]. Поэтому данный проект направлен на изучение качества и жизнеспособности аутологичного жирового трансплантата, забранного с применением различных техник, и на определение факторов риска, влияющих на выживаемость клеток, связанных с процессом хирургического вмешательства и особенностями самого пациента.

МЕТОДЫ

Поисковое исследование

Исследование проводили в медицинском университете города Грац (Graz), Австрия, в сотрудничестве с Объединенным центром регенеративной медицины COREMED —Cooperative Centre for Regenerative Medicine компании Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH в городе Грац, Австрия, в период с января по октябрь 2021 года. Письменное информированное согласие было получено от всех вовлеченных в исследование участников, в число которых вошли 39 здоровых мужчин и небеременных женщин в возрасте от 18 до 70 лет, проходивших добровольную плановую липосакцию или абдоминопластику. Критериями исключения были хирургическое вмешательство в области забора трансплантата (в том числе липосакция) в прошлом или неспособность в полной мере понимать суть процедур в ходе исследования и предоставить информированное согласие.

Во время липосакции у каждого субъекта, применяя одну из техник, собирали образцы аспирата в объеме 10–20 мл. У участников, проходивших абдоминопластику, забор образцов производили с кожного эксплантата (лоскута), используя сухую технику. Кроме того, фиксировали такие показатели, как как возраст, пол, вес, индекс массы тела, место забора. Забор аспирата проводили тремя разными методами:

- Сухая техника – ручной забор при помощи одноразовых канюль типа Tulip Premium (GEMS Carraway Harvester производства BONDIMED Aesthetics GmbH; Ohlsdorf, Австрия).

- Супервлажная техника (SW) (1 мл инфильтрата, 1 мл аспирата) с использованием раствора с добавлением лидокаина и силовой липосакции с помощью канюли Mercedes диаметром 3 мм с тремя отверстиями. Увлажняющий раствор равномерно распределяли в области предполагаемого воздействия.

- Супервлажная техника в сочетании с ультразвуковой (3-е поколение) (SWU) (VASER, Sound Surgical Technologies, Inc; Louisville, CO). После установки кожных портов для защиты краёв кожи в местах разрезов использовали систему VASER в непрерывном режиме (С) при уровне энергии 50 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ПАРАМЕТРЫ

Сканирующая электронная микроскопия

Для анализа методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) жировые клетки фиксировали, используя 2,5%-й раствор глутальдегида и 2%-й параформальдегида, pH 7,4, в течение двух часов при комнатной температуре. Затем образцы фиксировали в 2%-м растворе тетроксид осмия опять же при комнатной температуре в течение двух часов, после чего дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации (30–96 % и 100 % [об./об.] этиловый спирт). После этого производили сушку в критической точке (BalTec CPD; BalTec AG, Päfkon, Switzerland) и наносили напыляющее покрытие (BalTec Sputter Coater 500). Далее образцы помещали на держатели, покрытые двойным слоем проводящей углеродной пленки. Изображения получали при помощи сканирующего электронного микроскопа Sigma 500VP FE-SEM с СЭМ-детектором (Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH; Oberkochen, Germany) с ускоряющим напряжением 5кВ. По три репрезентативных снимка для каждого образца липоаспирата 200, 100 и 20 мкм (итого 9 изображений) отбирали для оценки степени повреждения жировых клеток. Два эксперта независимо друг от друга слепым методом определяли степень повреждения клеток, затем вычислялось среднее значение. Таким образом, для каждого образца липоаспирата средние значения рассчитывали на основе 18 отдельных проб. Поскольку в настоящее время отсутствует стандартизированная система оценки степени повреждения клеток, мы разработали свою: степень 1 – повреждение клеток незначительно или отсутствует, ретикулярные волокна коллагена и мембраны клеток интактны; степень 2 – незначительное повреждение клеток (неопределяемое на макроскопическом снимке повреждение мембраны с отсоединением липидных капель от тела клетки) у < 50 % адипоцитов; степень 3 – повреждение клеток от незначительного до значительного (неопределяемое и определяемое на макроскопическом снимке повреждение мембраны с отсоединением липидных капель от тела клетки и разрыв адипоцитов) у > 50 % адипоцитов.

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК выделяли из липоаспирата при помощи лизирующего реагента QIAzol, набора для выделения РНК RNeasy и набора RNase-Free DNase (Qiagen; Düsseldorf, Germany) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию выполняли при помощи набора iScript Reverse

Transcription Supermix (Bio-Rad; Hercules, CA), а полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR) – при помощи системы CFX384 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad) с использованием смеси для генотипирования «Мастер микс TaqMan». Используя наборы TaqMan (Applied Biosystems; Waltham, MA), проводили анализ экспрессии следующих генов: рецептор гамма (γ), активируемый пролифератором пероксисом (PPARG) Hs01115513_m1; ССАТ/энхансер-связывающего белка α (CEBPA) Hs00269972_s1; кластер дифференцировки 36 (CD36) проба Hs00354519_m1; белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4) Hs01086177_m1; перилипин 1 (PLIN1) Hs00160173_m1; адипонектин (ADIPOQ) Hs00605917_m1; транспортер глюкозы семейства 2 тип 4 (SLC2A4) Hs00168966_m1; CAV1 Hs00971716_m1; Hs01007018_m1 и SQSTM1 Hs00177654_m1. Ген TBP выступал в качестве «гена домашнего хозяйства», производился расчет относительной экспрессии.

Таблица 1. Демографические характеристики пациентов, чья жировая ткань была исследована методом сканирующей электронной микроскопии

Идентификационный номер (ID) участника	Возраст (гг)	ИМТ (кг/м ²)	Пол (М/Ж)	Никотиновая зависимость (ДА/НЕТ) (пачка/лет)	Диабет (ДА/НЕТ)	Место забора образца	Техника D/SW/SWU
S16	37	26,17	Ж	ДА (15 пачка/лет)	НЕТ	Живот	D
S21	29	30	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SWU
S22	27	30	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	SWU
S22	27	30	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SWU
S23	27	29,04	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SW
S24	62	22,52	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SW
S25	27	38,97	М	НЕТ	НЕТ	Грудь	SWU
S26	52	38,97	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SW
S27	52	26,68	Ж	НЕТ	НЕТ	Верхняя часть ног	SWU
S28	56	22,22	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	D
S31	52	23,39	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	SW
S32	39	20,96	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	D
S32	39	20,96	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	SW
S33	68	25,71	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	SW
S34	30	23,01	Ж	НЕТ	НЕТ	Живот	SW
S35	37	24,84	Ж	ДА (11,25 пачка/лет)	НЕТ	Верхняя часть ног	SWU

D – сухая техника; SW – супервлажная техника; SWU – супервлажная техника + ультразвук

Статистический анализ

Поскольку исследование носило поисковый характер и имело небольшой объем выборки в каждой группе, формальный расчет объема выборки не производился. Данные анализировали при помощи программы GraphPad Prism version 9.0.2 (GraphPad Software, Inc; San Diego, CA). Для СЭМ групповое различие анализировали с использованием непараметрического знакового рангового критерия Уилкоксона, поскольку условия, необходимые для параметрического t-теста, с уверенностью гарантировать было нельзя. Результаты экспрессии генов анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа, а затем критерия Тьюки, если сравнивали более двух групп и данные были нормально распределенными. Критерий Краскела-Уоллиса, а затем тест множественных сравнений Данна проводили для ненормально распределенных данных при сравнении более двух групп. Чтобы определить статистическую разницу между двумя группами использовали U-критерий Манна – Уитни. Результаты были представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD). Двухсторонние p-значения < 0,05 считались статистически значимыми.

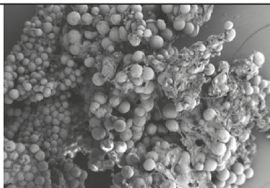
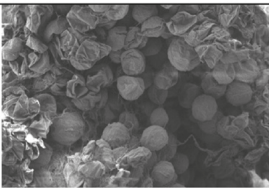
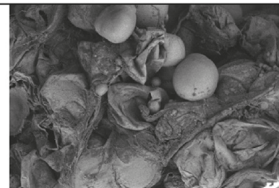
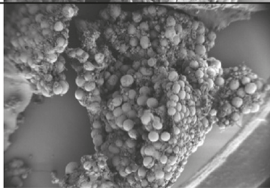
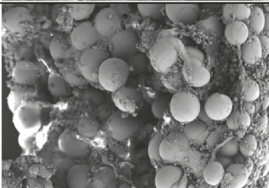
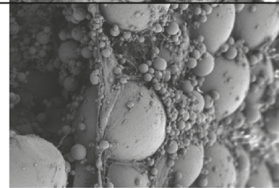
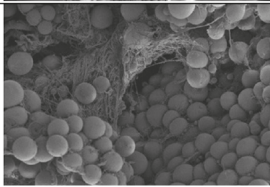
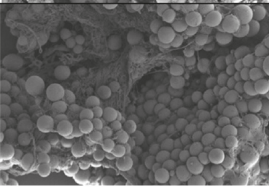
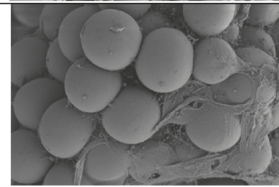
Пол (м/ж)	Возраст (лет)	ИМТ (кг/м ²)	Техника D/SW/SWU	Область забора образцов	200 мкм	100 мкм	20 мкм
ж	56	22,2	D	Живот			
ж	52	38,9	SW	Верхняя часть ног			
ж	27	30	SWU	Верхняя часть ног			

Рисунок 1. Оценка степени повреждения клеток при использовании разных техник забора жировой ткани на основе СЭМ-исследования. Среднее значение степени повреждения сухого липоасpirата [стандартное отклонение] составило 2,77 [0,23], в то время как степень повреждения образцов липоасpirата, собранного SW-техникой (n = 7), составила 1,86 [0,84]. Образцы липоасpirата, забранного SWU-техникой (n = 6), получили среднее значение 1,13 [0,47], то есть самую низкую степень повреждения клеток

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование были вовлечены 39 субъектов (36 женщин и трое мужчин) в возрасте от 24 до 71 лет (средний возраст [стандартное отклонение] составлял 42,17 [12,89] лет) со средним индексом массы тела (ИМТ) 28,5 [5,75] кг/м². Девять участников были курильщиками со стажем 1,5–30 пачка/лет. Один из субъектов страдал сахарным диабетом II типа.

Сорок семь образцов липоасpirата были собраны с применением разных техник из следующих участков тела: верхняя часть ног ($n = 21$), живот ($n = 18$), нижняя часть ног ($n = 6$), грудь ($n = 2$). Забор липоасpirата проводили сухой техникой у 17 участников, супервлажной (SW) – у 15 и супервлажной техникой с ультразвуком (SWU) – у 15 субъектов. Демографические характеристики пациентов, чья жировая ткань была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), приведены в таблице 1. Не отмечалось ни тяжелых, ни легких неблагоприятных событий. Поскольку исследование не предполагало анализа послеоперационных клинических параметров вовлеченных в исследование субъектов, контрольное наблюдение не проводилось.

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ (СЭМ)

СЭМ и оценку степени повреждения клеток проводили в отношении 16 образцов липоасpirата. Сухой липоасpirат ($n = 3$) соответствовал среднему значению 2,77 [0,23], в то время как образцы липоасpirата, собранного SW-техникой ($n = 7$), имели среднее значение 1,86 [0,84], что показывало более низкую степень повреждения клеток. Образцы липоасpirата, собранного SWU-техникой ($n = 6$), имели среднее значение 1,13 [0,47], то есть самую низкую степень повреждения клеток среди трех техник.

Различия в степени повреждения клеток были статистически значимыми: в липоасpirате, извлеченном методом SW, он был значительно ниже, чем при использовании сухой техники ($p = 0,0001$). При применении SWU-техники степень повреждения клеток была статистически значимо ниже, чем при использовании сухой и супервлажной ($p < 0,0001$). Образцы изображений, полученных при СЭМ-анализе липоасpirата, собранного разными техниками, приведены на рисунке 1.

Экспрессия генов в жировой ткани и клеточные маркеры в образцах липоасpirата

Статистически значимая низкая экспрессия рецептора гамма (γ), активируемого пролифератором пероксисом (PPARG), была выявлена у субъектов с более высоким ИМТ ($p = 0,02$), как показано на рисунке 2. В образцах липоасpirата, полученного с использованием сухой ($p = 0,09$) и SW техник ($p = 0,11$), наблюдалась тенденция к более высокой экспрессии PLIN1, чем при SWU. Не было обнаружено статистически значимых различий между экспрессией PPARG, СЕВРА, ADIPOQ, транспортера глюкозы типа 4 (GLUT4), FABP4 и CD36 в образцах липоасpirата, полученного разными техниками забора. Когда образцы анализировали по отдельности, в зависимости от области забора (живот или ноги), несколько маркеров достигли уровня статистической значимости и соответствовали тенденциям.

Была выявлена тенденция к более низкой экспрессии PLIN1 в липоасpirате, полученном из области живота методом SW ($p = 0,09$). Статистически значимо более низкая экспрессия PLIN1 была обнаружена в образцах липоасpirата, полученного из области ног с использованием SWU, по сравнению с сухой ($p = 0,0012$) и супервлажной техниками ($p = 0,0022$). Общая экспрессия маркеров адипоцитов отображена на рисунке 3. Была обнаружена тенденция к более

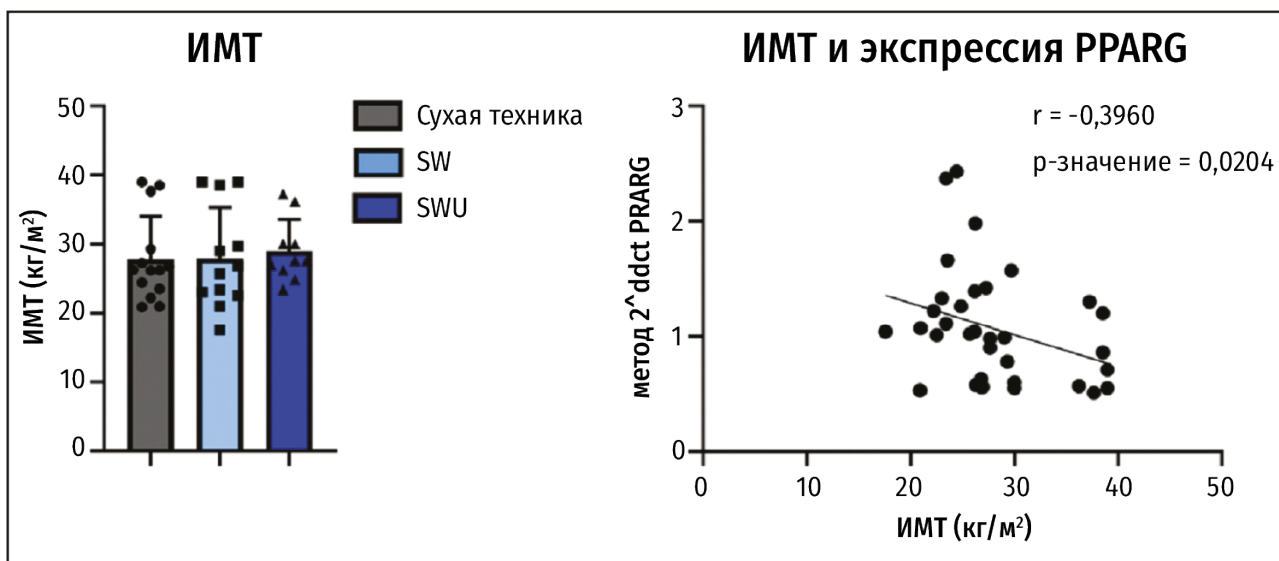


Рисунок 2. ИМТ в когорте участников исследования и корреляция с экспрессией PPARγ. Статистически значимо низкая экспрессия PPARγ была выявлена у субъектов с более высоким ИМТ ($p = 0,02$). PPARγ – рецептор гамма (γ), активируемый пролифератором пероксисом

низкой экспрессии GLUT4 в образцах липоасpirата, собранного из области ног методом SWU, по сравнению с супервлажной ($p = 0,0517$) и сухой техниками ($p = 0,1585$).

Статистически значимо более высокий уровень экспрессии FABP4 был отмечен в образцах, взятых из области ног методом SWU, по сравнению с образцами, полученными при помощи сухой техники ($p = 0,0365$). На рисунке 4 показана экспрессия маркеров адипоцитов в липоасpirате, взятом из участков на животе и ногах. Статистически значимой разницы в экспрессии маркеров аутофагии SQSTM1/p26 и CAV не было отмечено в образцах липоасpirата, независимо от техники забора (Рисунок 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Пересадка аутологичного жира (AFG) стала быстро распространяться в качестве метода увеличения объема мягких тканей, однако отсутствие консенсуса и стандартов этой процедуры, а также непредсказуемость результатов ограничивают ее применимость [2, 4]. Имеется свидетельство, что значительное повреждение собранных адипоцитов может быть важным фактором того, что после пересадки сохраняется меньший объем трансплантата [5]. В данном проекте мы смогли собрать ценные фундаментальные данные для определения стандартной техники AFG в будущем.

Степень повреждения клеток при различных методах забора аспирата

Уменьшение травматизации клеток при заборе и обработке жира для AFG считается важным условием выживаемости клеток трансплантата [5, 6]. Несмотря на продолжающиеся дебаты относительно идеального метода забора, сохраняющего максимальное количество жизнеспособных

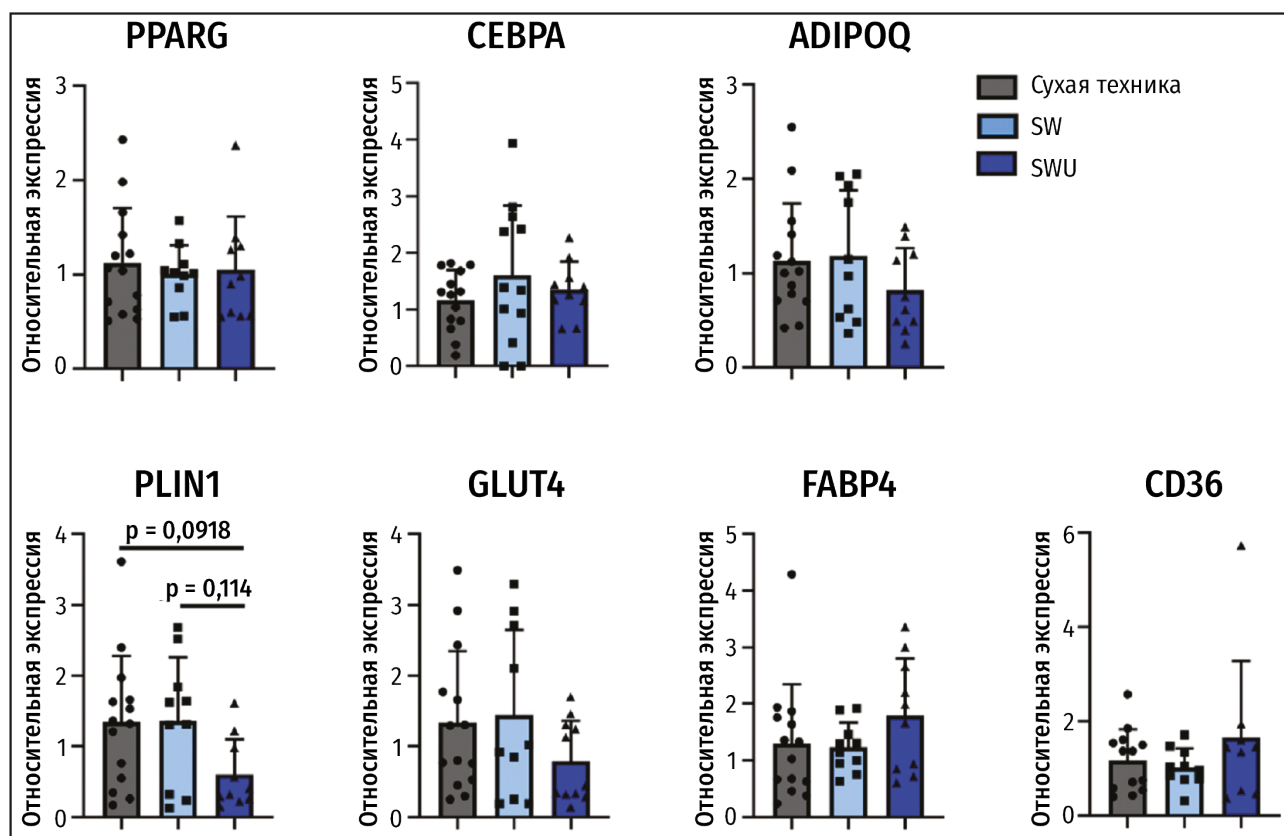


Рисунок 3. Общая экспрессия маркеров адипоцитов. Тенденция к более высокой экспрессии PLIN1 в образцах липоасpirата, полученного сухим ($p = 0,09$) и SW методами ($p = 0,11$) по сравнению с SWU-методом. Не было обнаружено статистически значимых различий между экспрессией PPARG, CEBPA, ADIPOQ, транспортер глюкозы тип 4 (GLUT4), FABP4, and CD36 в образцах липоасpirата, полученного разными техниками забора.

PLIN1 – перилипин 1; PPARG – рецептора гамма (γ), активируемого пролифератором пероксисом; CEBPA – ССАТ/энхансер-связывающего белка α ; ADIPOQ, адипонектин; GLUT4 – транспортер глюкозы тип 4; FABP4 – белок, связывающий жирные кислоты 4; CD36 – кластер дифференцировки 36; SW – супервлажная техника; SWU – супервлажная техника + ультразвук

собных адипоцитов, до сих пор не определено, какой из них является наилучшим [5]. Супервлажная техника (SW), при которой используют большие объемы раствора (в соотношении аспирата и раствора 1:1), была предложена Fodor и соавторами [7]; ее преимуществом является низкая кровопотеря, особенно при большом объеме удаляемого жира [8]. По этой причине такой подход является стандартной практикой в нашем отделении. Несмотря на то что для увеличения объема тканей аутологичным жиром обычно требуются умеренные объемы трансплантата, можно применять влажную и супервлажную техники, поскольку они потенциально приводят к меньшему стрессу во время забора. Результаты данного исследования подтвердили более низкий стресс от механического повреждения при SW: повреждение клеток, согласно СЭМ-анализу, было статистически значимо более низким, чем при использовании сухой техники. Интересно, что повреждение клеток можно и далее уменьшать, если супервлажную технику совмещать с ультразвуковой липосакцией: в то время как липоасpirат, собранный методом SW, имел значение степени повреждения 1,86, в образцах, собранных с применением SWU, оно доходило до 1,13. Ультразвуковая липосакция может быть подходящим методом забора при аутотрансплантации жира. Предыдущий анализ *in vitro* человеческой под-

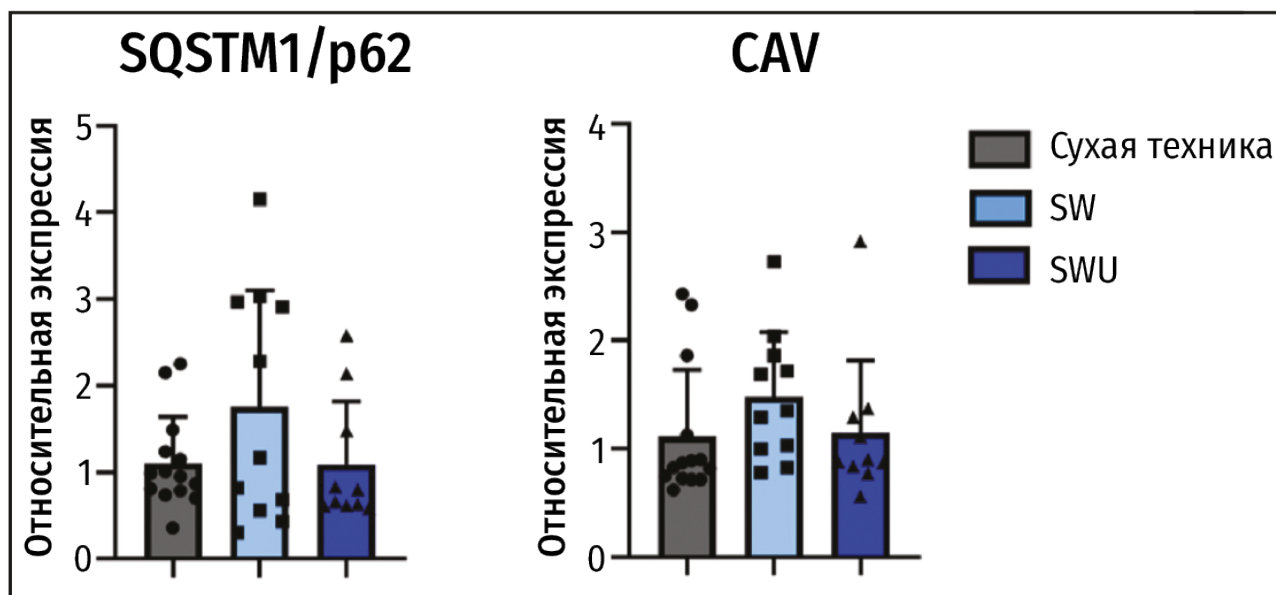


Рисунок 5. Общая экспрессия маркеров аутофагии SQSTM1/p26 и CAV.

Не было отмечено статистически значимых различий в экспрессии SQSTM1/p26 и CAV в липоаспирате, собранном разными методами

тов в липоаспирате, собранном техникой SWU, предполагая, что SWU-техника эффективна и потенциально подходит для AFG [11]. К тому же мы не только пришли к выводу, что SWU является потенциально подходящей техникой, но также смогли показать видимую разницу качества SW и SWU-аспираата. В отличие от предыдущих исследований, мы продемонстрировали, что SWU-аспираат может быть лучшего качества, поскольку СЭМ-анализ показывал низкую степень повреждения клеток при использовании этой техники. Однако влияние клинических особенностей и техники забора жировой ткани на приживаемость и потенциальное превосходство над другими техниками еще предстоит изучать. Тем не менее мы считаем эти выводы важным новым аспектом в вопросе определения оптимальной техники забора липоаспираата для аутоотрансплантации, обеспечивающей минимальную механическую травму.

Экспрессия генов адипоцитов и поверхностные маркеры клеток в липоаспирате

На настоящий момент исследований, проводившихся у людей, по изучению экспрессии маркеров адипоцитов в жировой ткани, забранной из различных участков тела разными техниками, недостаточно, а имеющиеся не в полной мере сопоставимы с данным проектом. С другой стороны, клеточный эффект местной анестезии, применяемой при AFG совместно с сосудосуживающими средствами или без них, широко изучается, но доказательства противоречивы [12]. В 2012 году Weichman и соавторы заявляли, что местная анестезия не имеет значительного влияния на долгосрочную выживаемость пересаженного жира, что противоречит первоначальной гипотезе, высказанной в 1995 году Moore и соавторами, предполагавших, что лидокаин ингибирует рост адипоцитов [12]. В настоящее время лидокаин как местный анестетик является наиболее используемым препаратом, применяемым для анестезии как донорского участка, так и трансплантата [13], и мы в нашем отделении

также применяем его для анестезии донорского участка.

При этом сообщалось, что лидокаин обладает цитотоксическим действием, поэтому был поднят вопрос о том, что его применение в процессе сбора липоасpirата при AFG может быть сомнительным [14]. Эти результаты были в основном получены в ходе исследований *in vitro*, в частности, экспериментов, в которых лидокаин показывал зависимое от дозировки отрицательное влияние на пролиферацию и жизнеспособность фибробластов и ADSC [13, 15]. Несмотря на предположение, что введение одной дозы местного анестетика может не оказывать влияния на эффективность объема ADSC в клинических условиях [15], экспрессия маркеров адипоцитов может изменяться и может служить индикатором качества собранного липоасpirата [16]. Клинические исследования относительно данного вопроса ограничены поисковыми, с небольшим объемом выборки [14]. В отличие от экспериментов *in vitro*, недавнее клиническое исследование не показало влияния лидокаина на относительное распределение, количество клеток или жизнеспособность ADSC, преадипоцитов, зрелых адипоцитов или лейкоцитов в стромально-васкулярной фракции [14]. Наши результаты конкурируют с этими выводами: статистически важных различий в экспрессии маркеров аутофагий SQSTM1/p26 и CAV в липоасpirате, который мы собирали разными техниками, отмечено не было. Также не наблюдалось статистически значимых различий в отношении экспрессии маркеров адипоцитов PPARG, CEBPA, ADIPOQ, GLUT4, FABP4 и CD36, но была выявлена тенденция к более высокой экспрессии PLIN1 в липоасpirате, собранном сухим и супервлажным методами, по сравнению с SWU. Мы также выявили различие в профилях экспрессии подкожно-жировой клетчатки в различных частях тела, из которых производится забор аспирата. Как было показано и в предыдущих исследованиях, эти отличия значений в профилях экспрессии предполагают различие подкожно-жировой клетчатки [17] в зависимости от участка забора, потенциально влияющую на результат AFG. При анализе результатов по образцам, взятых из разных частей тела, четко статистически значимо более низкая экспрессия PLIN1 была обнаружена в липоасpirате, забранном в области ног методом SWU по сравнению с сухим методом ($p = 0,0012$) и SW ($p = 0,0022$). PLIN1 известен как маркер, который выделяет живые адипоциты в липоасpirате [18, 19], и более низкая экспрессия PLIN1 связана с более высоким уровнем липолиза у людей [20]. Интересно, что в недавнем доклиническом исследовании на мышах сообщалось об улучшении приживаемости трансплантатов, экспрессирующих более высокий уровень генов, связанных с липолизом [21]. В целом мы смогли показать, что разные методы забора предполагают разное количество жизнеспособных адипоцитов и по-своему воздействуют на процесс экспрессии и функциональности гена адипоцитов, что в свою очередь потенциально влияет на результат AFG.

Хотя статистической значимой разницы в экспрессии маркера адипоцитов PPARG при разных методах забора липоасpirата обнаружено не было, статистически значимо более низкая экспрессия была выявлена у субъектов с более высоким индексом массы тела. Тем не менее имеющиеся свидетельства относительно экспрессии PPARG в жировой ткани пациентов с ожирением показывают противоречивые результаты [22]. Тогда как в некоторых исследованиях сообщалось о повышенной экспрессии PPARG у пациентов с ожирением по сравнению с пациентами контрольной группы, авторы других исследований наблюдали уменьшенную его экспрессию или даже отсутствие каких-либо различий [22]. Несмотря на все научные усилия изучить эту тему, конкретная роль PPARG в ожирении человека оста-

ется неоднозначной [22]. С другой стороны, роль, которую играет PPARG в метаболизме жира и адипогенезе, также широко изучали *in vitro* [23]. Считается, что активация PPARG происходит на ранней стадии адипогенеза и обеспечивает дифференцировку жировой ткани [23]. Насколько нам известно, до настоящего времени исследований у людей относительно влияния экспрессии PPARG на уровень сохранения клеток при AFG не проводилось. Исходя из роли этого гена в дифференцировке жировой ткани, более высокая экспрессия может быть благоприятной. Результаты доклинического анализа, полученные Guan и соавторами, показывают, что более высокая экспрессия PPARG ассоциируется с более высоким процентом сохраненных жизнеспособных клеток [24]. Поскольку экспрессия PPARG была статистически значимо выше у субъектов с более низким индексом массы тела, долгосрочный результат при AFG у этой группы пациентов может быть лучше. Хотя аутотрансплантация противопоказана лицам с недостатком массы тела, клиническое исследование, проведенное Chiu, показало, что у пациентов с недостатком веса (индекс массы тела < 18,5 кг/м²) можно добиваться той же степени увеличения груди при AFG, как и у субъектов с нормальным весом [25]. Поэтому мы считаем измерение этого маркера ценным фактором для будущих исследований с большей контрольной группой, чтобы выяснить не только четкую корреляцию с ИМТ, но и вероятность улучшения процента сохранения жизнеспособных клеток в случае высокой экспрессии.

Ограничения

Настоящее исследование, целью которого было выявление связанных с пациентом и самой процедурой факторов, негативно влияющих на результат, имеет некоторые ограничения. Небольшой объем выборки может давать завышенный результат по тем параметрам, которые являются не очень репрезентативными и универсальными, а также может быть причиной того, что не удалось достигнуть статистической достоверности в различиях некоторых параметров, несмотря на подтвержденные тенденции. Хотя исследование преследовало цель измерения экспрессии нескольких маркеров гибели клеток в липоаспирате, экспрессия была ниже того уровня, при котором возможно их выявление. Поэтому можно сделать только косвенные выводы относительно повреждения клеток в липоаспирате, в частности, на основе сканирующей электронной микроскопии. Кроме того, нельзя сделать уверенных заявлений относительно повреждения клеток и того, влияет ли жизнеспособность адипоцитов или регенеративных клеточных популяций на более высокий уровень сохранения объемов.

Из-за неравного количества мужчин и женщин среди участников (3 против 36) невозможно сделать выводы относительно зависимости экспрессии маркеров адипоцитов от половой принадлежности субъекта. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение гендерных различий, для определения универсальной техники для широкого применения при AFG у мужчин и женщин. Кроме того, индивидуальный подход конкретного хирурга к работе может не в полной степени распространяться на всю популяцию пациентов. Таким образом, различия индивидуальных (зависящих от хирурга) факторов могут рассматриваться в качестве ограничения исследования.

ВЫВОДЫ

Оптимизировать результаты AFG можно, если сосредоточиться на процессе сбора липоасpirата как главном факторе риска, влияющем на жизнеспособность адипоцитов за счет механического воздействия. В данном проекте мы сделали вывод, что SWU-техника является подходящей при заборе аспирата для аутотрансплантации жира, и потенциально лучшей по сравнению с другими за счет более низкой травматизации клеток. Кроме того, результаты нашего исследования показали, что разные техники забора ассоциированы с разной степенью выживаемости адипоцитов и разной степенью потенциального вмешательства в процесс экспрессии и функциональности генов адипоцитов. Мы считаем эти выводы новым важным аспектом вопроса определения оптимальной техники забора для AFG. Необходимы дальнейшие исследования для изучения клинической значимости наших выводов и определения преимущества одной техники липоасpirации перед другими.

Раскрытие информации

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов относительно исследования, авторства и публикации данной статьи.

Финансирование

Авторы не получали финансовой поддержки исследования, авторства и публикации данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ismail T, Bürgin J, Todorov A, et al. Low osmolality and shear stress during liposuction impair cell viability in autologous fat grafting. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2017;70(5):596-605. doi: 10.1016/j.bjps.2017.01.023
2. Chen X, Wu Y, Liu G. Influence of recipient site on the function and survival of fat grafts. *Ann Plast Surg.* 2019;82(1):110-115. doi: 10.1097/SAP.0000000000001683
3. Lunger A, Ismail T, Todorov A, et al. Improved adipocyte viability in autologous fat grafting with ascorbic acid-supplemented tumescent solution. *Ann Plast Surg.* 2019;83(4):464-467. doi: 10.1097/SAP.0000000000001857
4. Condé-Green A, Wu I, Graham I, et al. Comparison of 3 techniques of fat grafting and cell-supplemented lipotransfer in athymic rats. *Aesthet Surg J.* 2013;33(5):713-721. doi: 10.1177/1090820X13487371
5. Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Grignafni E, Raposio E. Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting. *Ann Med Surg.* 2017;20:49-60. doi: 10.1016/j.amsu.2017.06.059
6. Coleman S. Structural fat grafting. *Aesthet Surg J.* 1998;18(5):386-388. doi: 10.1016/S1090-820X(98)70098-6
7. Fodor PB. Editorial. Wetting solutions in aspirative lipoplasty: a plea for safety in liposuction. *Aesthetic Plast Surg.* 1995;19(4):379-380. doi: 10.1007/BF00451665
8. Klein JA. Tumescent technique for local anesthesia improves safety in large-volume liposuction. *Plast Reconstr Surg.* 1993;92(6):1085-1098; discussion 1099. discussion 1099-1100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pubmed/8234507

9. Duscher D, Atashroo D, Maan ZN, et al. Ultrasound-assisted liposuction does not compromise the regenerative potential of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(2):248-257. doi: 10.5966/sctm.2015-0064
10. Doornaert M, Colle J, De Maere E, Declercq H, Blondeel P. Autologous fat grafting: Latest insights. *Ann Med Surg (Lond).* 2018;37:47-53. doi: 10.1016/j.amsu.2018.10.016
11. Schafer ME, Hicok KC, Mills DC, Cohen SR, Chao JJ. Acute adipocyte viability after third-generation ultrasound-assisted liposuction. *Aesthet Surg J.* 2013;33(5):698-704. doi: 10.1177/1090820X13485239
12. Moore JH, Kolaczynski JW, Morales LM, et al. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast Surg.* 1995;19(4):335-339. doi: 10.1007/BF00451659
13. Gugerell A, Kober J, Schmid M, Nickl S, Kamolz LP, Keck M. Botulinum toxin A and lidocaine have an impact on adipose-derived stem cells, fibroblasts, and mature adipocytes in vitro. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2014;67(9):1276-1281. doi: 10.1016/j.bjps.2014.05.029
14. Grambow F, Rutkowski R, Podmelle F, et al. The Impact of lidocaine on adipose-derived stem cells in human adipose tissue harvested by liposuction and used for lipotransfer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2869. doi: 10.3390/ijms21082869
15. Kubrova E, Su M, Galeano-Garces C, et al. Differences in cytotoxicity of lidocaine, ropivacaine, and bupivacaine on the viability and metabolic activity of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Am J Phys Med Rehabil.* 2021;100(1):82-91. doi: 10.1097/PHM.0000000000001529
16. Bian Y, Deng C, Li W, Lei Z, Li Y, Li X. A comparative study on the biological characteristics of human adipose-derived stem cells from lipectomy and liposuction. *PLoS ONE.* 2016;11(9):e0162343. doi: 10.1371/journal.pone.0162343
17. Passaro A, Miselli MA, Sanz JM, et al. Gene expression regional differences in human subcutaneous adipose tissue. *BMC Genomics.* 2017;18(1):202. doi: 10.1186/s12864-017-3564-2
18. Zhang K, Chen X, Zhang P, Liu G. Perilipin2 is an earlier marker than perilipin1 for identifying adipocyte regeneration in fat grafts. *Aesthet Surg J.* 2021;41(6):NP646-NP652. doi: 10.1093/asj/sjaa360
19. Kato H, Mineda K, Eto H, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(3):303e-313e. doi: 10.1097/PRS.0000000000000066
20. Grahn THM, Zhang Y, Lee M-J, et al. FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(2):296-301. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.113
21. Niu X, Lai Z, Chen X, Lu F, Gao J, Yuan Y. A short-term highfat diet improved the survival of fat grafts in mice by promoting macrophage infiltration and angiogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi: 10.3389/fcell.2022.856839
22. Torres J-L, Usategui-Martín R, Hernández-Cosido L, et al. PPAR- γ gene expression in human adipose tissue is associated with weight loss after sleeve gastrectomy. *J Gastrointest Surg.* 2022;26(2):286-297. doi: 10.1007/s11605-021-05216-6
23. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism—novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 2010;584(15):3242-3249. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.010
24. Guan J, He Y, Wang X, et al. Identification of high-quality fat based on precision centrifugation in lipoaspirates using marker foats. *Plast Reconstr Surg.* 2020;146(3):541-550. doi: 10.1097/PRS.00000000000007063
25. Chiu C-H. Autologous fat grafting for breast augmentation in underweight women. *Aesthet Surg J.* 2014;34(7):1066-1082. doi: 10.1177/1090820X14540679