Сравнительная оценка жизнеспособности клеток аспирированной жировой ткани. Методологические аспекты липофилинга

В.Б. КАРПЮК[1,2], д-р мед. наук, проф. П.М. ЛАВРЕШИН[1], А.А. МАРКУШИН[2]

[1]Ставропольская государственная медицинская академия, Ставрополь

[2]Южно-Российский центр пластической хирургии, Краснодар

При изучении жизнеспособности клеток аспирированной жировой ткани было установлено, что на 1 мл липоаспирата при ручном способе липосакции насчитывается от 18 до 38 тыс. клеток с жизнеспособностью 77–94 %, при вибрационном – от 30 до 68 тыс. клеток с жизнеспособностью 14–27 %. Аспират жировой ткани содержит стромальные клетки, способные к адгезии и пролиферации в условиях культуры in vitro, причем жизнеспособность клеток в 2,4–3 раза выше при использовании ручного способа липосакции, чем аппаратного вибрационного. Одним из перспективных направлений повышения эффективности липофилинга является стимуляция участия стромальных клеток в регенераторном процессе при аугментации тканей.

Ключевые слова: *липоаспират, стромальные клетки, липофилинг.*

Comparative assessment of viability of aspirated adipose tissue cells. Methodological aspects of lipofilling

V.B. KARPYUK[1,2], prof. P.M. LAVRESHIN[1], A.A. MARKUSHIN[2]

[1]Stavropol State Medical Academy, Stavropol

[2]Southern Russia Centre of Plastic Surgery, Krasnodar

The study of viability of aspirated adipose tissue cells revealed that 1 ml of lipoaspirate obtained by manual liposuction contained from 18,000 to 38,000 cells with a viability of 77–94 %. Vibrational liposuction yielded a lipoaspirate containing from 30,000 to 68,000 cells per 1 ml with 14–27 % viability. In both cases, the lipoaspirates contained stromal cells capable of adhesion and proliferation when cultured in vitro. The viability of cells obtained using manual liposuction was 2.4–3 times that of the cells collected from vibrational liposuction. It is concluded that stimulation of the involvement of stromal cells in the regenerative process during tissue augmentation is a promising way to enhance the efficacy of lipofilling.

Key words: *lipoaspirate, stromal cells, lipofilling.*

Введение

Метод инъекционной микроаутотрансплантации жировой ткани (т. н. липофилинг) широко применяется для объемно-контурной пластики лица и тела [1, 2]. При этом эффективность операции, по данным разных литературных источников, существенно различается в зависимости от методологических аспектов, таких как способ забора, обработки и введения жировых аутотрансплантатов [3–5]. Помимо

прямого объемного эффекта при пересадке жировой ткани, большое значение придают регенераторному действию популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), присутствующей в составе липоаспирата [6]. В последнее время жировую ткань рассматривают как перспективный источник клеточного материала для целей тканевой инженерии [7, 8]. В этой связи, а также учитывая интенсивное развитие новых аппаратных технологий липосакции, представляется интересным изучение пригодности утильного липоаспирата для применения в хирургии и тканевой инженерии. Цель настоящей работы – в исследовании *in vitro* сравнить жизнеспособность клеток, выделенных из аспирированной жировой ткани при ручном механическом и аппаратном вибрационном способах липосакции.

Материал и методы

Из аспирированной жировой ткани получали по 2 образца от каждого из 4 здоровых пациентов мужского пола в возрасте от 20 до 38 лет, которым проводилась липосакция области груди по эстетическим показаниям. Под эндотрахеальным наркозом после тумесцентной инфильтрации раствором Кляйна выполнялась вакуумная аспирация подкожной жировой клетчатки из грудной области: справа – ручной канюлей диаметром 4 мм при разрежении 1 атм, слева – аппаратом для вибролипосакции Lipomatic (Бельгия) через канюлю такого же диаметра и при таком же разрежении. Для анализа брали первую порцию липоаспирата объемом 100–120 мл, после чего заканчивали операцию, свободно комбинируя ручной и аппаратный методы липосакции.

В стерильных условиях липоаспират промывали физиологическим раствором, процеживали через двухслойную марлевую салфетку и отбирали 30 мл жировой ткани. Далее, в соответствии с протоколом P. Zuk [8], жировую ткань обрабатывали ферментом (0,075 %-й раствор коллагеназы I типа – при 37 °С в течение 30 мин) и центрифугировали. Осадочную стромально-васкулярную фракцию (СВФ) разводили аутологичной сывороткой крови до 10 мл и направляли в лабораторию «Генная и клеточная терапия» (г. Москва). Каждый образец распределяли на две 100-милиметровые пластиковые чашки Петри и культивировали, используя среду для культивирования AdvanceStem (HyClone) с добавлением 10 %-го коммерческого комплекта добавок и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин). Подсчет прикрепившихся и формирующих колонии клеток проводили через 7 суток культивирования с использованием счетчика клеток Countess (Invitrogen). Анализ изображения проводили на фазово-контрастном микроскопе AF6000 (Leica), оснащенном цифровой камерой, с использованием объективов ×20 и ×40.

Результаты и обсуждение

При микроскопии 7-суточной культуры СВФ обнаруживали отдельные прикрепившиеся клетки и колонии, представляющие собой конгломераты клеток из 2–5 шт. Клетки в составе колонии имеют разную морфологию. Встречаются слабо прикрепленные клетки округлой формы, хорошо распластанные полигональные фибробластоподобные клетки, веретеновидные клетки и арборизированные клетки с одним или несколькими отростками. Явных визуальных различий в морфологической картине исследуемых образцов в зависимости от способа липосакции не выявлено (см. рисунок).

Количественный анализ исследуемых популяций выявил существенные различия между образцами в зависимости от способа получения первичного материала (см. таблицу). При сравнении каждой пары образцов установлено, что при ручном способе липосакции аспират жировой ткани содержит в 2,4–3 раза больше живых клеток, чем при вибрационном способе. Хотя общее число клеток в 1,4–2,1 раза преобладает в образцах, полученных с использованием вибрационного аппарата, жизнеспособность их значительно ниже и составляет лишь 14–27 %, в отличие от 77–94 % при ручном способе.

Связанные с липоаспирацией повреждающие факторы не действуют избирательно, а затрагивают все клетки жировой ткани, поэтому, изучая жизнеспособность стромальных клеток, можно судить об общем состоянии аспирированной и подлежащей трансплантации ткани. Результаты настоящего исследования подтверждают тезис о том, что ручной способ липосакции позволяет получить более качественный

Популяция стромальных клеток жировой ткани через 7 суток культивирования. Фазово-контрастное изображение. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм
Population of stromal cells from the adipose tissue 7 days after the onset of cultivation. A phase-contrast image. Scale bar corresponds to 100 mcm

Количество и жизнеспособность стромальных клеток жировой ткани в популяции через 7 суток культивирования

Пациент п/п	Способ липосакции	Общее число клеток на 1 мл липоаспирата	Число живых клеток на 1 мл липоаспирата	Жизнеспособность, %
1	Ручной	$3{,}0 \times 10^4$	$2{,}9 \times 10^4$	77
	Вибрационный	$6{,}7 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^4$	18
2	Ручной	$2{,}1 \times 10^4$	$1{,}9 \times 10^4$	90
	Вибрационный	$3{,}0 \times 10^4$	$0{,}8 \times 10^4$	27
3	Ручной	$1{,}8 \times 10^4$	$1{,}5 \times 10^4$	83
	Вибрационный	$3{,}6 \times 10^4$	$0{,}5 \times 10^4$	14
4	Ручной	$3{,}2 \times 10^4$	$3{,}0 \times 10^4$	94
	Вибрационный	$6{,}8 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^4$	18

материал для последующей пересадки, характеризующийся более высоким содержанием живых клеток, по сравнению с аппаратным вибрационным способом [4, 9, 10]. Вибрирующая канюля активно разрушает адипоциты и межклеточные связи, что, с одной стороны, облегчает отделение стромы при фильтрации и центрифугировании липоаспирата, но, с другой стороны, значительно снижает жизнеспособность клеток при трансплантации.

Изучение аспирата жировой ткани с позиции присутствия в нем стромальных клеток позволяет по-новому взглянуть на проблему эффективности липофилинга. Известно, что после каждой пересадки аутожира ожидаемый прирост составляет 35–50 % первоначально введенного объема [1]. Мероприятия, направленные на максимальное сохранение жизнеспособности адипоцитов, такие как бережная шприцевая липоаспирация при минимальном разрежении, использование специальных канюль, особые режимы подготовки жирового трансплантата, применение липопротекторов, не решают проблему [2, 4, 5]. Несмотря на то, что морфологическая целостность пересаживаемых жировых клеток достигает 93–96 %, всегда наблюдается потеря объема в зоне липофилинга и оптимальные результаты коррекции достигаются только за счет увеличения кратности проведения процедур [11]. Возможно, это связано с низкой концентрацией камбиальных элементов в трансплантате. Жировая ткань относится к стабильному или медленно обновляющемуся типу тканей с преобладанием клеток высокодифференцированной и гибнущей части гистогенетического ряда, а рассредоточенный камбий в ней представлен редкими ММСК [12, 13]. По данным литературы, содержание ММСК в жировой ткани составляет от 5 тысяч до 2 млн на 1 мл или от 0,25 до 3 % всех ядросодержащих клеток [8, 14, 15]. По-видимому, этого недостаточно для полноценной регенерации пересаженной жировой ткани. Компенсировать потерю адипоцитов и обеспечить долгосрочный объемный эффект липофилинга могут присутствующие *in situ* в достаточном количестве ММСК. С учетом этих знаний уже разработаны методы стимуляции участия стволовых и камбиальных клеток в регенераторном процессе при аугментации тканей. Примерами могут служить стимуляция местной пролиферации ММСК с помощью вакуумной экспансии тканей до и после липофилинга груди [16], пересадка изолированной СВФ или обогащение ею традиционных жировых аутографтов [17].

Выводы

1. Жировая ткань, извлекаемая с помощью вакуум-аспирации, содержит стромальные клетки, способные к адгезии и пролиферации в условиях культуры *in vitro*.
2. Ручной способ липосакции позволяет получить более качественный материал для последующей микроаутотрансплантации, характеризующийся более высоким содержанием жизнеспособных клеток, по сравнению с аппаратным вибрационным способом липосакции.
3. Жировая ткань, подлежащая утилизации после вибрационной липосакции, может служить альтернативным источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для целей регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Литература

1. *Малахов, С.С.* Липоскульптура / С.С. Малахов, Л.И. Белоногов // Учебное пособие. – СПб. : МАПО, 2001. – 20 с.
2. *Lam, S.M.* Complimentary fat grafting / S.M. Lam, M.J. Glasgold, R.A. Glasgold. – Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – 124 p.
3. *Данищук, И.* Аутотрансплантация жировой ткани. Основы техник / И. Данищук, А. Боровиков // Вестник эстетич. медицины. – 2003. – № 2. – С. 72–77.
4. *Fournier, P.F.* Liposculpture: the syringe technique / P.F. Fournier. – Paris : Arnette, 1991. – 412 p.
5. *Moscona, R.* Viability of adipose tissue injected and treated by

different methods: An experimental study in the rat / R. Moscona [et al.] // Ann. Plast. Surg. – 1994. – Vol. 33 (5). – P. 500–506.
6. *Coleman, S.R.* Fat injection: from filling to regeneration / S.R. Coleman, R.F. Mazzola. – St. Louis : Quality Medical Pub, 2009. – 803 p.
7. *Locke, M.* Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery / M. Locke, J. Windsor, P.R. Dunbar // ANZ J. Surg. – 2009. – Vol. 79 (4). – P. 235–244.
8. *Zuk, P.A.* Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies / P.A. Zuk [et al.] // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7 – P. 211–228.
9. *Сидоренков, Д.А.* Применение методов механической липосакции для удаления избытков подкожной жировой клетчатки / Д.А. Сидоренков, Г.М. Суламанидзе, Н.О. Миланов // Анналы пласт., реконструктив. и эстет. хирургии. – 2005. – № 4. – С. 35–42.
10. *Obagi, S.* Аугментация аутогенным жиром для восстановления объема лица / S. Obagi // Минимально инвазивная косметическая хирургия лица / под общ. ред. проф. А.И. Неробеева. – М. : МЕДпресс-информ, 2007. – С. 129–142.
11. *Висаитова, З.Ю.* Объемно-контурная пластика лица методом инъекционного введения аутожира : автореф. дис. ... канд. мед. наук / З.Ю. Висаитова. – Москва, 2009. – 28 с.
12. *Данилов, Р.К.* Раневой процесс: гистогенетические основы / Р.К. Данилов. – СПб. : ВМедА им. С.М. Кирова, 2007. – 380 с.
13. Dynamics of fat cell turnover in humans / K.L. Spalding [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 453 (7196). – P. 783–787.
14. *Волчков, С.Е.* Определение оптимального источника ММСК для создания банка клеток / С.Е. Волчков, О.В. Тюмина, Л.Е. Волова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 22.
15. Способы выделения и условия культивирования стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из разных источников / О.В. Повещенко [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 5 (133). – С. 90–95.
16. *Khouri, R.K.* Breast Reconstruction and Augmentation with Brava External Expansion and Fat Grafting / R.K. Khouri, D.A. Del Vecchio // Fat Injection: From Filling to Regeneration / S.R. Coleman, F.R. Mazzola. – St. Louis : Quality Medical Pub, 2009. – P. 587–620.
17. *Карпюк, В.Б.* Применение васкулярно-стромальноклеточной фракции жировой ткани для коррекции эстетических дефектов и диспропорций челюстно-лицевой области / В.Б. Карпюк // XVI Международная конференция челюстно-лицевых хирургов и стоматологов: «Новые технологии в стоматологии» : материалы конф.; Санкт-Петербург, 16–18 мая 2011 г. – Спб., 2011. – С. 96.