

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Даштоян Георгий Эдуардович

**Сравнительное исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на
приживляемость жировых аутотрансплантатов в эксперименте на мелких
лабораторных животных**

3.1.9. Хирургия

3.1.16. Пластическая хирургия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Старцева Олеся Игоревна

доктор медицинских наук, доцент

Истранов Андрей Леонидович

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. История использования аутотрансплантации жировой ткани в пластической хирургии	13
1.2. Современные аспекты аутотрансплантации жировой ткани в пластической хирургии	16
1.3. Новейшие аспекты обработки жировой ткани и способы влияния на приживление жировой ткани в пластической хирургии.....	18
1.4. Классификация стволовых клеток и способы их выделения	28
1.5. Выделение и применение стволовых клеток жировой ткани в пластической хирургии	31
1.6. Исследования стволовых клеток на приживление жировой ткани в экспериментах	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Общая характеристика экспериментального исследования	38
2.2. Материалы и методы гистологического этапа исследования	41
ГЛАВА 3. МЕТОДИКА ПЕРЕСАДКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СО СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ.....	44
3.1. Технология забора жировой ткани для получения СКЖТ	44
3.2. Технология получения взвеси СКЖТ	46
3.3. Технология получения и пересадки СКЖТ с жировым аутотрансплантатом.....	47
3.4. Оценка экспериментальной модели и влияния СКЖТ на приживаемость жировых аутотрансплантатов аутотрансплантатов в эксперименте на мелких лабораторных животных	50
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
4.1. Результаты гистологического исследования жировых аутотрансплантатов ...	56
4.2. Статистический анализ полученных результатов	64

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СКЖТ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРИЖИВАЕМОСТИ ЖИРОВЫХ АУТОТРАНСПЛАНТАТОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	69
5.1. Обоснование полученных результатов сравнительного исследования влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутоотрансплантатов.....	69
5.2. Онкологическая настороженность использования мезенхимальных стволовых клеток для обогащения жировой ткани	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
ВЫВОДЫ.....	80
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	84

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пересадка собственной жировой ткани в современной практике пластических хирургов занимает значительное место и представляет собой как отдельный оперативный подход, так и возможность комбинации данного метода с другими операциями. Возможности данной методики позволяют решать многие проблемы: от восполнения различных объемных дефектов приобретенного и врожденного характера, до применения в эстетических целях при коррекции возрастных изменений мягких тканей [50,104,147].

Среди других наполнителей, успешно используемых в пластической хирургии, стоит отметить использование искусственных материалов, таких как силиконовые протезы и синтетические филлеры различных модификаций. При сохранении целостности кожных покровов силиконовые имплантаты позволяют добиться впечатляющих эстетических результатов [6], решая широкий спектр задач – восполнение объемов, реконструктивные операции для восстановления конфигурации лица и тела, дерматензия и иные гармонизирующие операции. Но при этом необходимо отметить, что любой синтетический материал, включая и инертный медицинский силикон, подразумевает под собой наличие рисков его воспалительных осложнений, повреждений имплантов и необходимости замены [31,39,49,59,78,119,138,149].

Конкурирующим методом для восполнения объемов тканей являются комплексы собственных тканей – лоскуты. С появлением ангиосомной теории Taylor в арсенале пластических хирургов появились значительные возможности лоскутных реконструкций, большим многообразием мягких тканей в виде многокомпонентного лоскута на сосудистой ножке. Такой комплекс аутоканей, являясь собственным материалом пациента, не отторгается после успешной операции и решает большинство эстетических и функциональных задач в течение одной операции [6]. В дополнение стоит отметить, что собственные ткани имеют

такие преимущества как пластичность, схожесть структуры тканей и их температуры. Но и у микрохирургической аутотрансплантации тканей есть свои существенные ограничения – высокая техническая сложность выполнения, наличие рубцов в донорской области и высокая зависимость от гемодинамических показателей организма [22,46,58,111,113,118,137].

Поиск компромиссов между снижением травматизации используемых хирургических методов и достижением максимального терапевтического эффекта при закрытии различных дефектов врожденного и приобретенного характера, контурных деформаций и дефицита мягких тканей побудил пластических хирургов к более детальному изучению пересадки собственной жировой ткани. Безопасная, малоинвазивная методика на протяжении всей долгой истории попыток ее применения проигрывала более сложным вышеупомянутым методам, имея главный существенный недостаток – непрогнозируемое и неэффективное приживление пересаженного жира. Снижение резорбции пересаженной жировой ткани и поиск возможностей повлиять на нее является краеугольным камнем при использовании данной методики и целью возросшего количества публикаций на эту тему в профессиональной научной литературе [4,10,27,35,42,54].

По данным Международного Общества Эстетической Пластической Хирургии (ISAPS), в 2017 г. было выполнено более миллиона пересадок жировой ткани исключительно в эстетических целях – аугментация молочных желез и ягодичной области, а также для коррекции возрастных и иных изменений мягких тканей лица [9]. Широкая распространенность пересадки жировой ткани раскрывает и подчеркивает высокую актуальность проблемы резорбции.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день исследовали многих стран мира (США, Европа, Япония, Китай) достигли высоких результатов в изучении клеточных технологий и различных возможностей клеточной стимуляции с целью снижения проявления резорбции и усиления приживаемости пересаженных графтов.

Одним из наиболее популярных методов стимуляции являются различные препараты аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами (АОТ) [6,69,92,94,100,105,128], регенеративный потенциал которой зависит от уровня секреции белков (факторов роста), которые высвобождаются из альфа-гранул тромбоцитов [6,10,12,13,68,69,83].

Группой ученых из США, Европы и Азии разработана современная общепринятая классификация препаратов аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, – делится на 4 класса, в зависимости от концентрации лейкоцитов и фибрина:

1. чистый обогащенный тромбоцитами фибрин (P-PRF – Pure Platelet Rich Plasma);
2. чистая аутоплазма, обогащенная тромбоцитами крови (P-PRP – Pure Platelet Rich Plasma);
3. фибрин, обогащенный тромбоцитами и лейкоцитами (L-PRF – Leucocyte and Platelet Rich Fibrin);
4. аутоплазма, обогащенная лейкоцитами и тромбоцитами крови (L-PRP – Leucocyte and Platelet Rich Plasma) [5,6,93,115].

Было доказано, что за счет широкого спектра факторов роста АОТ стимулирует образование коллагена, ускоряет регенерацию кожи и слизистых оболочек, индуцирует рост сосудов, эндотелия, обеспечивает гемостаз, уменьшает боль, обладает противовоспалительным эффектом, снижает риск инфекционных осложнений, предотвращает послеоперационные осложнения. В основе этих эффектов лежит синергетическое взаимодействие факторов роста с местными клетками, обуславливающее специфические реакции: пролиферацию, клеточную миграцию и синтез экстрацеллюлярного матрикса [5,23,62,108,130].

Наиболее перспективным методом клеточной стимуляции приживления графтов на сегодняшний день является использование стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ). Основными преимуществами данного метода является относительно простое получение самой фракции стволовых клеток, в большом количестве находящихся в жировой ткани [3,56]. Более того, Zuk P.A. et al. (2002) показали, что свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани имеют

большое сходство с подобными клетками костного мозга, но получение их значительно упрощается с применением техники вакуумной аспирации [90].

Исследования пересаженного материала позволяют предположить, что гибель адипоцитов и значительная резорбция происходят вследствие недостаточной реваскуляризации и последующего склероза [42,127]. При этом результаты доклинических и клинических исследований по применению мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани позволяют предположить, что подобного рода клеточная стимуляция повышает степень неоангиогенеза за счет мультипотентности СКЖТ и, в результате, значительно повышает выживаемость графтов [43,44,66,90,153]. Однако стоит отметить, что среди всех клинических исследований есть случаи с отрицательными результатами, где авторы не отметили никаких стимулирующих свойств СКЖТ [6,150,156]. Поэтому изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на приживаемость аутотрансплантатов является крайне актуальным и стратегически необходимым для дальнейшего развития пересадки собственного жира.

Противоречивые данные и большой интерес к данному методу лег в основу проведения нашего эксперимента с целью анализа влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов.

Цель исследования

Определить объективное влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на приживаемость пересаженных жировых аутотрансплантатов в эксперименте на мелких лабораторных животных для увеличения приживаемости жировых аутотрансплантатов в хирургической практике.

Задачи исследования

1. Разработать методику хирургической пересадки жировой в ткани в эксперименте на мелких лабораторных животных.

2. Оценить эффективность экспериментальной модели и реципиентной зоны как области для хирургической пересадки.
3. Разработать методику приготовления СКЖТ.
4. Создать модель экспериментальной хирургической пересадки жировой ткани с добавлением СКЖТ.
5. Доказать влияние СКЖТ на приживаемость жировых аутотрансплантатов в эксперименте на мелких лабораторных животных.
6. Обосновать возможность и целесообразность использования СКЖТ при хирургической пересадке жировой ткани для увеличения приживаемости аутотрансплантатов в клинической практике.

Научная новизна исследования

Проведенное комплексное исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов дает объективную оценку влияния стволовых клеток жировой ткани на приживаемость жировых аутотрансплантатов в пластической хирургии с помощью лабораторных и функциональных методов.

Разработанная экспериментальная модель эффективна для моделирования хирургической пересадки, в том числе пересадки собственной жировой ткани в экспериментах на мелких лабораторных животных.

Данное исследование позволяет проанализировать прогрессирующие механизмы адаптации пересаженного материала в сроки 1, 3 и 6 месяцев и оценить механизмы фиброза, уменьшение объема и процессы неоваскуляризации. Убедительно продемонстрировано преимущество добавления СКЖТ на всех этапах исследования в сравнении с хирургической пересадкой чистой взвеси жировой ткани.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе проведенного экспериментального исследования аутотрансплантации жировой ткани и аутотрансплантации жировой ткани, обогащенной стволовыми клетками, показаны достоинства и недостатки каждой из методик, подготовлен фундамент для дальнейших клинических исследований в пластической и реконструктивной хирургии.

Разработаны и внедрены в практику методы культивирования стволовых клеток жировой ткани, а также оптимальная концентрация для дальнейшей пересадки подготовленного материала.

Методология и методы исследования

В данном исследовании применялись клинические, инструментальные и лабораторные методы исследования, а также методы фотографирования и анкетирования. Объектом исследования являлись лабораторные животные в количестве 30 кроликов породы «Шиншилла» мужского и женского пола, которым была выполнена пересадка собственной жировой ткани в два этапа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная экспериментальная модель достоверно показала, что хирургическая пересадка собственной жировой ткани является клинически значимым и перспективным методом для хирургического восполнения дефектов мягких тканей различного расположения и этиологии, имея обширное поле для научных изысканий в возможностях воздействия на клеточном уровне.

2. Проведенное экспериментальное исследование показало, что обогащение пересаженной жировой ткани мезенхимальными стволовыми клетками позволяет не только усовершенствовать стандартную хирургическую процедуру липофилинга, но и значительно повлиять на выживаемость жировых

трансплантатов за счет усиления неоваскуляризации, снижения явлений резорбции и фиброза последних.

3. Выполнение сравнительного гистологического анализа пересаженных аутопрепаратов позволяет комплексно оценить три наиболее важных клинических показателя: явления фиброза, резорбции и остаточного объема.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема исследования соответствует паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия, а именно пунктам 4, 6 направлений исследований, и пунктам 11, 15 паспорта научной специальности 3.1.16. Пластическая хирургия.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выполненного исследования обеспечивается последовательной и логичной постановкой задач, их решением, использованием современных апробированных методов сравнительных и лабораторных исследований, а также достаточным объемом данных и количеством исследуемых лабораторных моделей в каждой отдельной группе. В работе используются методы статистического анализа (тест Манна-Уитни для сравнения двух групп, ранговый дисперсионный анализ Краскала-Уоллеса и тест Тьюки для сравнения трех и более групп) и критической оценки, которые прямо коррелируют с данными мировой научной литературы.

Основные положения диссертационной работы были обсуждены и доложены: в школе реконструктивной и эстетической хирургии «Комплексный подход в реконструктивной и эстетической хирургии» (г. Нижний Новгород, 7–6 февраля 2015 г.); в учебном центре компании Clovermed в рамках курса «Пересадка собственного жира от основ до клинического применения» (г. Москва, 16 сентября 2015 г.); на Национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (г. Москва, 3–5 декабря 2015

г.); в рамках обучающего курса по пересадке жировых аутотрансплантатов «Аутотрансплантация жира и эстетическая хирургия груди. Симбиоз будущего» в клинике «Семейная», на базе кафедры пластической хирургии ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, НОКЦ «Пластическая хирургия» НИО (г. Москва, 2 декабря 2016 г.); в рамках конгресса «Инновационная школа эстетической медицины» (г. Москва, 2–3 июля 2021 г.).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (г. Москва, 10.11.2022, протокол №7).

Внедрение результатов исследования

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в лечебный процесс клиники онкологии, реконструктивной хирургии и радиологии УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор лично занимался проведением экспериментального исследования пересадки собственной жировой ткани с применением мезенхимальных стволовых клеток и принял участие в оценке экспериментальных данных. Прооперированно 30 лабораторных животных в виде кроликов породы «Шиншилла», получены и изучены гистологические материалы, проведена статическая оценка полученных результатов.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 3 работы, в том числе 2 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в зарубежном научном издании, индексируемом в международных базах (Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы: всего 99 страниц машинописного текста. Работа содержит 6 таблиц и 27 рисунков. Список литературы включает 161 источник (16 отечественных, 145 зарубежных авторов).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История использования аутотрансплантации жировой ткани в пластической хирургии

Аутотрансплантация жировой ткани на сегодняшний день является крайне актуальной хирургической процедурой и очень популярной темой для научных исследований в сфере пластической хирургии. Высокий интерес вызван широкой областью применения как в эстетической, так и в реконструктивной областях пластической хирургии, а практическая значимость направления не вызывает никаких сомнений – оно дает возможность использования собственной жировой ткани в виде объемного филлера для контурной пластики тела во всех аспектах: закрытие дефектов врожденного и приобретенного характера, решение эстетических задач, связанных с потерей объема мягких тканей, а также альтернативой использования искусственных материалов [10,15].

Впервые собственная жировая ткань была использована как материал для пересадки в конце девятнадцатого века. Немецкий хирург Gustav Neuber (1850–1932) в 1893 году выполнил пересадку фрагмента жировой ткани пациенту в области нижнего края орбиты с целью коррекции последствий остеомиелита [120]. Спустя два года Victor Czerny (1842–1916) пересадил блок жировой ткани из ягодичной области в молочную железу для восстановления симметрии после односторонней мастэктомии по поводу фибронокистозного мастита [60].

Стоит отметить, что именно в те времена параллельно приобретали популярность более «практичные» и «доступные» методы коррекции контурных деформаций, а именно введение безоболочечных аллогенных материалов. Доктора рекламировали эти процедуры как простые местные инъекции, не требующие каких-либо хирургических вмешательств. Однако введенный парафин в тканях мигрировал, вызывая инфицирование окружающих тканей и образование «парафином». Более того, были зафиксированы случаи легочной эмболии [82]. Это напоминает практику применения жидкого силикона для инъекций с

последовавшими деструктивными побочными эффектами в 60-х годах прошлого века [6,109].

Немецкий хирург Eugene Hollander (1867–1932) в 1910 году предложил инъекции жира как более натурального филлера. Собирая у «здоровых пациентов» жировую ткань, он смешивал ее с плотным жиром, забранным у баранов, для снижения риска резорбции трансплантата. Полученный материал нагревали до температуры крови, доводили до жидкого состояния и вводили в реципиентную область для коррекции деформаций контуров тела, атрофических изменений лица или рубцов после мастэктомии [6]. В результате автор наблюдал ответную реакцию организма в виде болезненных высыпаний, которая проходила через некоторое время. Данная техника была опубликована в 1912 году [85].

В 1919 году челюстно-лицевой и пластический хирург Erich Lexer (1867–1937) опубликовал работу “Die freien Transplantationen”, посвященную клиническому применению пересадки жировой ткани для коррекции посттравматических деформаций лица, гемифасциальной микросомии, асимметрии молочных желез и контрактуры Дюпюитрена. В своих наблюдениях он обратил внимание на необходимость снижения повреждения жировой ткани во время забора и имплантации для более успешного приживления [10]. Lexer E. первым использовал жир для реконструкции области орбиты как подготовительного этапа протезирования, а также для коррекции втянутых рубцов на лице после огнестрельных ран у солдат во время I мировой войны [6,99].

Подобного рода эксперименты послужили высокому интересу и энтузиазму, с которым хирурги восприняли пересадку собственной жировой ткани как самостоятельную процедуру [3]. Но в 30-х годах прошлого века, с возрастающим количеством операций и по мере накопления опыта, многие хирурги стали отмечать значительную (до 50–70%) резорбцию жировой ткани, непрогнозируемость получаемого результата, а также присутствие осложнений в виде некрозов, кист и свищей. В результате подобные сложности реабилитации

так и не позволили пересадке жира добиться широкого клинического применения [10].

В 1950 году L.A. Peer (1898–1977) исследовал структуру аутогенной жировой ткани, пересаженной год назад, и сообщил, что 50% адипоцитов разрушаются и погибают после пересадки. Результаты показали, что вместо некоторых фрагментов пересаженной ткани образовалась фиброзная ткань и кисты. Причиной гибели частей пересаженного материала он считал их недостаточное кровоснабжение. Прежде всего это затрагивало клетки, расположенные в центре аутоотрансплантата. При этом, несмотря на значительные потери жировой ткани, частично она сохранялась. Неизменными оставались те участки, которые соседствовали с кровеносными сосудами и получали питание от них. Через 4 дня в свободном аутоотрансплантате появляется новое кровообращение за счет образования сосудистых анастомозов между реципиентной областью и жировым трансплантатом. Если этого не происходит, периферийные участки с хорошей диффузной перфузией сохраняются, а центральные и внутренние зоны погибают, образуя масляные кисты и некрозы [10,127].

В 1976 году гинеколог Giorgio Fischer предложил новый подход к пересадке жира – он «изобрел» полую канюлю для забора жировой ткани. В инструмент было встроено подвижное лезвие, разрушающее жировую ткань при механических поступательных движениях. Первые самостоятельные попытки столь агрессивного подхода завершались большой кровопотерей и анемией, асимметриями и другими непредсказуемыми результатами [109]. При всей противоречивости данного подхода, именно в таком варианте возникли первые предпосылки вакуумной липоаспирации.

Всего через год, в 1977 году, французские врачи Pierre Fournier и Yves-Gerard Illouz изменили парадигму подхода к липосакции и представили новую усовершенствованную процедуру по забору жировой ткани – с применением полой канюли с тупым, а не заостренным концом. В результате использования такой канюли повреждение основных кровеносных сосудов и соседствующих

нервных волокон значительно уменьшилось, снизились кровотечения, значительно легче и проще стал для хирурга сам процесс липосакции. Доктора также отметили сокращение времени послеоперационного восстановления и сопутствующего дискомфорта. С тех пор тандем Illouz – Fournier изменил парадигму и явился новой точкой отсчета в истории тогда еще совсем молодой процедуры [6,75]. Изобретение и широкое распространение техники липосакции в 1980-х помогло возродить и популяризировать идею пересадки собственной жировой ткани. Одним из первых, в 1985 году, Pierre Fournier описал подробно описал всю процедуру липофиллинга. Полужидкий жир, полученный в результате липосакции, мог быть повторно введен в места, где имелся недостаток объема – и это вновь привлекло внимание и возобновило интерес его коллег к введению взятого у того же пациента жира [6,74].

Практически в то же время, в 1985 году, американский дерматолог Jeffrey Klein разработал революционную «туменесцентную» технику для проведения липосакции. Эта техника позволила проводить операцию полностью под местной анестезией и использовать при этом канюли гораздо меньшего диаметра. Он значительно облегчил подготовительный этап: благодаря введению рассчитанного количества специального анестезирующего раствора за 30 минут до операции достигалась значительная вазоконстрикция и расщипление жировой ткани, что здорово облегчило проведение самой операции и последующую реабилитацию [98].

1.2. Современные аспекты аутотрансплантации жировой ткани в пластической хирургии

В 1997 году пластическим хирургом из Нью-Йорка Sydney Coleman была разработана концепция аутотрансплантации жировой ткани, которая получила название Lipostructure. При ее выполнении для аспирации использовались тупые канюли диаметром 3 мм, соединенные с 10 мл шприцом под низким отрицательным давлением для предотвращения повреждения адипоцитов.

Аспирированная жировая ткань подвергалась центрифугированию для выделения и очистки жировых трансплантатов от компонентов крови, водных растворов, разрушенных клеток и масла. Завершающим этапом было ретроградное введение туннельным методом мелких частиц жира в реципиентную область, где им было бы обеспечено удовлетворительное питание. Для этого использовалась канюля 18G. Следование этому принципу, привело к значительному улучшению результатов липофилинга и приживаемости жировых ауто трансплантатов [6,51].

В 1998 году в Марселе был организован первый курс по ауто трансплантации жировой ткани под руководством профессора Guy Magalon и приглашенного лектора S.R. Coleman [103]. Это способствовало более быстрому и легкому распространению данной техники в Европе. Основными показаниями к липофилингу главным образом были: деформации контуров тела, послеожоговые рубцы, заболевание Ромберга, гемифасциальная микросомия и хронические воспаления нижних конечностей. Впоследствии, в 2004 году в своей книге “Structural Fat Grafting” Coleman S.R. подробно разъяснил принципы структурной пересадки жира для достижения длительного результата с применением методики в различных анатомических областях [6,53].

Ауто трансплантация жировой ткани сегодня – крайне актуальная процедура с широкой областью применения как в эстетической, так и в реконструктивной областях пластической хирургии, а практическая значимость сегодня не вызывает никаких сомнений – она дает возможность использования собственной жировой ткани в виде объемного филлера для контурной пластики тела при абсолютно различных запросах: закрытие дефектов врожденного и приобретенного характера, решение эстетических задач, связанных с потерей объема мягких тканей, а так же альтернативой использования искусственных материалов [15]. По сообщениям Американского общества пластических хирургов, в период с 2007 по 2013 год только в области эстетической хирургии применение ауто трансплантации жировой ткани выросло на 40%, что позволяет сделать вывод об положительных общемировых тенденциях. Во многом это объяснимо благодаря значительным преимуществам собственной жировой ткани –

возможности получения большого объема пластичного материала, относительной простоте использования в виде инъекций, а также отсутствие значительного иммунного ответа и аллергических реакций. Более того, данная методика позволяет проводить кратные оперативные подходы, минимизировать риски и получать перманентный эффект [15].

Широкая полемика вокруг данной методики и множество критических взглядов обусловлено обилием разнообразных подходов к пересадке собственной жировой ткани – технике забора, обработке и последующему введению жировой ткани, что определяет приживляемость пересаженного материала и качество полученного результата [89]. Важно отметить, что каждому из этапов проведения аутотрансплантации жировой ткани в научной литературе уделяется достаточно внимания, однако общепринятых стандартов проведения данной операции на сегодняшний день нет [15]. В свою очередь снижение резорбции в послеоперационном периоде является краеугольным камнем и целью научных изысканий последних лет [15,140]. Наиболее вероятными причинами значительной резорбции пересаженного материала считаются недостаточная васкуляризация и недостаточная реципиентная емкость. Эти негативные факторы снижают доставку питательных веществ и кислорода к трансплантату, что приводит к ишемии, деструкции и последующей резорбции [42]. Возможность повлиять на этот механизм сегодня исследуют во многих странах мира (США, Европа, Япония, Китай) и основной целью исследований является клеточная стимуляция и создание идеальных условий для неоваскуляризации пересаженного аутотрансплантата [69,92,94,100,105,128].

1.3. Новейшие аспекты обработки жировой ткани и способы влияния на приживание жировой ткани в пластической хирургии

Метод инъекционного введения аутожира – липофилинг – явился логическим следствием внедрения в клиническую практику идей и техник

липосакции и вызвал интерес практикующих пластических хирургов своей перспективностью.

В настоящее время в клинической практике доминирует метод, описанный и популяризируемый S.R. Coleman, при выполнении которого аспирированная жировая ткань подвергается центрифугированию для выделения и очистки жировых трансплантатов [52]. При этом S.R. Coleman не рекомендует промывать липоаспират, так как механическое воздействие промывания вызывает образование ретикулярного фиброза и соединительно-тканых перемычек в ответ на повреждение и может разрушить хрупкую архитектуру жировой ткани. Он также придерживается мнения, что при любой возможности следует избегать открытого отстаивания жировой ткани, так как при гистологическом исследовании наблюдается цитоплазматический лизис более 50% адипоцитов, которые контактировали с воздухом в течение 15 мин [53]. После этапа экстракции липоаспирата шприцы с жиром по 10, 20 мл закрывают колпачками для предотвращения разбрызгивания во время центрифугирования. Для очистки жировой ткани шприцы с жиром помещают в центрифугу и центрифугируют со скоростью 3000 об./мин в течение 3 мин. Khouri R.K. et al. (2012) придерживаются мнения, что соотношение меньшего количества оборотов и более длительного времени центрифугирования (1500 об./ мин в течение 3 мин) позволяет снизить риск разрушения адипоцитов [38].

Для обработки жировых трансплантатов больших объемов Khouri R.K. создал ручную центрифугу. Для очистки жировой ткани 4 шприца с липоаспиратом объемом 20 или 60 мл, устанавливают в центрифугу и вращают со скоростью 200–600 об/мин в течение 3 минут [161].

Вследствие центрифугирования в шприце образуется три слоя: верхний слой – с наименьшей плотностью – состоит из внеклеточного масла, средний слой – из непосредственно очищенной жировой ткани, и нижний слой представляет собой воду, кровь и разные водные элементы (лидокаин). Верхний масляный слой удаляется путем впитывания в салфетку, нижний слой (вода) сливается. В результате в шприце остается чистая жировая ткань, готовая для введения в

необходимые участки. Из шприцев 10–60 мл жир переносится в шприцы объемом 1–5 мл для введения в реципиентную область [2,52,54].

Обработка жира путем центрифугирования проводится многими хирургами, однако целесообразность проведения этой процедуры является спорной [2,142]. Ullmann Y. et al. провели интересный эксперимент на мышах: он разделил мышей на две группы и провел трансплантацию жировой ткани, подвергшейся центрифугированию (1 группа) и обработанной физиологическим раствором (2 группа). Спустя 16 недель клинически каких-либо существенных различий объема трансплантатов в обеих группах не было выявлено. При этом гистологическое исследование биоптатов выявило менее выраженный процесс фиброза в жировой ткани, которая была обработана физиологическим раствором [2,65]. Малаховская В.И. и соавт. (2009) в своих научных исследованиях при сравнительном анализе морфологической картины образцов жира, подвергшихся центрифугированию и обработанных физиологическим раствором, убедились, что площадь поврежденных адипоцитов при первом варианте несколько выше. Однако степень достоверности ($p < 0,05$) не позволяет утверждать о преимуществах какого-либо из приведенных выше вариантов [2].

Итальянские ученые Votti G. et al. (2011) придерживаются мнения, что промывание жира, как один из методов его обработки, более эффективно, а простое отстаивание жира не может гарантировать приемлемой его очистки. Итальянские коллеги не имеют ничего против центрифугирования жира, т. к. они не согласны с распространенным мнением о том, что жировая ткань в процессе такой обработки чрезмерно травмируется, но они убеждены, что незачем прибегать к таким сложностям для получения достаточного количества материала (центрифугирование требует специального инструментария и увеличивает операционное время). Опыт хирургов показывает, что просто отмытый жир ничем не хуже центрифугированного [17]. Для промывания только что собранный «грязный» жир помещается в контейнер, который, в свою очередь, погружается в солевой раствор [14]. В солевой раствор также можно добавить инсулин. Выдерживание жировых клеток в растворе, насыщенном инсулином, уменьшает

резорбцию, так как инсулин является антилиполитическим веществом. Не вынимая контейнер из раствора, его осторожно встряхивают до тех пор, пока находящийся внутри него жир не станет ярко-желтого цвета. После этого контейнер вынимается из раствора и опять встряхивается или помещается на вибрирующую платформу, что позволяет очистить жир от остатков моющего раствора и «тканевого мусора». Наконец, контейнер помещают на ватную прокладку, с помощью которой его промокают и высушивают. После этого очищенная жировая ткань помещается в шприцы с извлеченным поршнем объемом 10 мл. Затем жир через специальный переходник, перемещается в шприцы для введения в реципиентную область [14,17].

Достижения в области клеточных технологий позволили иначе взглянуть и повлиять на данную проблему. Среди известных методов мы выделяем два основных направления клеточной стимуляции, которые имеют наибольшую практическую значимость – пролиферативно-стимулирующее действие обогащенной тромбоцитами аутоплазмы и стимуляцию приживаемости аутрансплантатов жировой ткани ее обогащением стволовыми клетками [44,68].

Препараты обогащенной плазмы, вне сомнения, представляют большой практический интерес и высокую эффективность в ауотрансплантации жировой ткани при восполнении объемных дефектов различного характера и локализации, а также для решения эстетических задач, связанных с возрастными и гравитационными изменениями мягких тканей [16,21,76]. Улучшение выживаемости жировых трансплантатов обусловлено высвобождением высокого числа факторов роста, содержащихся в α -гранулах тромбоцитов – тромбоцитарного (PDGF) и эпидермального факторов роста, трансформирующего фактора роста (TGF) - / β , инсулиноподобного фактора роста и других, которые в свою очередь стимулируют пролиферацию и дифференциацию клеток, обеспечивающих неоваскуляризацию [11,134].

Обширный спектр факторов роста, обеспечиваемый обогащенной плазмой, ускоряет регенеративные процессы слизистых оболочек и кожи, стимулирует образование коллагена и рост сосудистых структур, обеспечивает гемостаз,

уменьшает боль и обладает противовоспалительным эффектом, снижает риски послеоперационных осложнений и воспалительных реакций [5]. Перечисленные эффекты обеспечиваются взаимодействием факторов роста с местными клетками, приводя к специфическим реакциям: пролиферации, клеточной миграции и синтезу экстрацеллюлярного матрикса [6,62,108,130]. В настоящее время исследователям известно более 30 факторов роста, которые содержатся в альфа-гранулах тромбоцитов. Для пластической хирургии и регенеративной медицины особый интерес представляют некоторые из них: тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и фактор роста эпителия (EGF) [6,152].

Согласно исследованиям, полное выделение всех факторов роста тромбоцитами происходит через час после активации препарата и затем продолжается в течение недели [107]. Факторы роста взаимодействуют со специфическими рецепторами, которые имеют в своем строении различные клетки – остеокласты, фибробласты, эндотелиальные и эпидермальные клетки, а также мезенхимальные стволовые клетки [130,144]. При этом они активируют внутриклеточные сигнальные пути, индуцирующие механизмы репарации тканей, в основе которых пролиферация и дифференциация клеток [6,29,77,79]. В то же время в регуляции хемотаксиса и миграции клеток активно участвуют адгезивные белки – тромбоспондин, фибрин и другие [6,8,93].

Проангиогенные факторы (VEGF, TGF- β 1, HGF, bFGF, PDGF-A, -B, -C, ангиопоэтин и др.) способствуют неоваскуляризации – образованию новых сосудистых сетей, индуцируя миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [6,28,68,158].

Изучая пролиферативные процессы, вызванные тромбоцитарными факторами роста, в научной литературе были высказаны опасения в вопросах онкологической настороженности. Однако, такие опасения на данный момент не имеют доказательной базы. Наоборот, Marx R.E. et al. (2001) подтвердили, что факторы роста активируют цитоплазматический белок, который инициирует

нормальную экспрессию генов, в отличие от патологической экспрессии при онкологических заболеваниях. Факторы роста влияют на клеточную мембрану, а не на ядро клетки. По своей сути – это кровяной сгусток, который можно обнаружить в любой нормальной ране, особенно в процессе ее эпителизации [6,107].

Клиническое применение препаратов аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, имеет значительную доказательную базу, подтверждающую эффективность использования данных препаратов как в эстетической, так и в реконструктивной хирургии [6]. Ускорение процессов реабилитации мягких тканей было отмечено в различных публикациях при проведении широкого спектра пластических операций – фейслифтинга, блефаропластики, ринопластики и других [105,106,135,145]. Помимо мягких тканей, препараты обогащенной аутоплазмы улучшают приживаемость костных имплантатов [63,130].

Наибольшее распространение препараты обогащенной аутоплазмы получили при использовании в сочетании с пересадкой жировой ткани [21,34,45,55,96,154]. Авторы отмечают редукцию отеков, экхимозов и гематом, снижение болевого синдрома и ускорении реабилитации в целом. Данные эффекты связаны, предположительно, с индукцией биоактивными компонентами АОР биологических механизмов, лежащих в основе регенерации поврежденной ткани – гемостаза, ангиогенеза и тканевого анаболизма, а также модуляции воспаления [6,7].

В 2009 году Cervelli V. et al. опубликовали собственное исследование пересадки жировой ткани, где добавляли обогащенную тромбоцитами аутоплазму с целью восполнить объемные контуры лица. Суть исследования заключалась в сравнительном исследовании двух групп: из 25 пациентов в первой группе с использованием жировой ткани, насыщенной препаратами аутоплазмы с тромбоцитами, против контрольной группы из 10 пациентов с классической пересадкой жировой. Пересадка жировой ткани выполняли в область щечной, скуловой и периорбитальной зон с целью восполнения объема. Полученные результаты исследователи анализировали при помощи сравнительных

фотографий в до- и послеоперационном периоде, а также использовали 3D-режим компьютерной томографии для лучшей визуализации анатомических структур. Наблюдения в течение года после операции показали значительную разницу в клиническом результате – сохранение жировой ткани до 70% в основной группе и 31% в контрольной группе [34].

Те же исследователи опубликовали свой опыт лечения хронических язв нижних конечностей, где исследовали 2 группы пациентов с различным подходом. В основной группе проводилось лечение препаратами обогащенной тромбоцитами аутоплазмы, в контрольной – препаратами гиалуроновой кислоты с коллагеном. Авторы отметили, что 16 из 20 хронических язв эпителизировались в течение первых трех месяцев при использовании жировой ткани с препаратами аутоплазмы. За тот же срок в контрольной группе реэпителизация происходила и 2 из 10 пациентов с аналогичными проблемами. Cervelli V. et al. (2009) сделали вывод о том, что метод пересадки жировой ткани наиболее предпочтителен для лечения пациентов с подобными проблемами, в особенности в комбинации с препаратами аутоплазмы с тромбоцитами [45].

Gentile P. et al. (2013) провели контролируемое исследование, при котором использовали пересадку жировой ткани для реконструкции молочной железы, в которой принимали участие 100 пациентов в возрасте от 19 до 60 лет. Пациенты были разделены на две группы – основную и контрольную (по 50 пациентов). В основной группе производили пересадку жировой ткани средним объемом в пределах 120 мл, обогащенной аутоплазмой с тромбоцитами, в другой проводили пересадку чистой жировой ткани. Через год исследования показали, что разница в приживаемости аутотрансплантатов практически в два раза превышает в основной группе по сравнению с контрольной – 69% к 39% соответственно [40].

Однако, в противовес обширному положительному опыту в научной литературе есть исследования, отрицающие положительный эффект при использовании обогащенной плазмы. Salgarello M. et al. в 2011 году опубликовали исследование применения обогащенной плазмы при пересадке собственной жировой ткани в хирургии молочной железы. Они проанализировали две группы

пациентов на сроках до, через 3 и 6 месяцев после операции. Первая группа (основная) состояла из 17 пациентов, которым провели пересадку собственной жировой ткани, обогащенной препаратами АОТ. Вторая группа (контрольная) состояла из 25 пациентов, которым проводили стандартную пересадку чистой жировой ткани. Полученные результаты были проанализированы при помощи стандартного фотопротокола на до- и послеоперационном периодах, а также с помощью данных ультразвукового исследования мягких тканей. По окончании исследования ученые сделали вывод, что полученные эстетические результаты не имеют значительной клинической разницы [143].

Стоит отметить, что Por Y.C. et al. (2009) в лабораторном исследовании на 24 мышцах также не отметили статически значимой разницы между введением жировой ткани в классическом варианте и при использовании того же материала, обогащенного аутоплазмой [131].

Препараты АОТ, вне сомнения, представляют большой практический интерес для применения в пластической хирургии. Результаты доклинических и клинических исследований по применению различных препаратов АОТ в пластической хирургии позволяют предположить, что последние являются эффективными в аутотрансплантации жировой ткани для восполнения объемных дефектов различной локализации врожденного и приобретенного характера, а также для решения эстетических задач, связанных с возрастными изменениями мягких тканей [6,104,131,132,154,159]. Однако, несмотря на обширный положительный опыт применения препаратов АОТ в аутотрансплантации жировой ткани, среди всех клинических исследований есть случаи с отрицательными результатами [143]. Поэтому изучение влияния препаратов АОТ на приживаемость жировой ткани и исследование количественного и качественного состава различных препаратов АОТ на сегодняшний день является достаточно актуальным [6].

Таким образом, результаты доклинических и клинических исследований использования препаратов аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, позволяют сделать выводы о положительном влиянии на стимуляцию различных

регенеративных механизмов для решения эстетических и реконструктивных задач, но также оставляют ряд вопросов о стандартизации получения АОТ и определении наиболее эффективного типа для применения в клинической практике [10].

Многочисленные исследования в смежных специальностях выявили высокую эффективность применения стволовых клеток жировой ткани в лечении сахарного диабета, цирроза печени, сердечно-сосудистых заболеваний и ишемий нижних конечностей. Также стволовые клетки жировой ткани успешно использовались при лечении аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит), рассеянного склероза и восстановлении костных тканей [10,80,87,123,124]. Относительная доступность их получения и перспективы прикладного применения клеточных технологий в вопросах реконструкции и восполнения дефектов мягких тканей побудили пластических хирургов к изучению влияния стволовых клеток на приживление жировых аутотрансплантатов [10]. Помимо, собственно, адипоцитов, жировая ткань состоит из стромальной сосудистой фракции (ССФ) – стромальных клеток, которые в основном располагаются вокруг кровеносных сосудов. Poznanski W.J. et al. (1973) впервые выделили и описали наличие в ССФ большой популяции преадипоцитов, обладающих свойствами зрелых мезенхимальных стволовых клеток и присутствующих в организме на протяжении всей жизни [133]. Основной практический интерес обусловлен способностью этих клеток к дифференцировке в клетки различных видов – адипоциты, остеобласты, хондроциты, миоциты, эндотелиальные клетки, гемопоэтические клетки, гепатоциты и нервные клетки [47,81,133]. Более того, обладая широким спектром и комбинацией клеточных поверхностных CD маркеров, ССФ представляет собой не единую популяцию, а довольно большой источник разнообразных клеток предшественников, включая зрелые эндотелиальные клетки (ECs) [12,13,90]. По данным проточной цитометрии, свежая изолированная ССФ, полученная как путем липосакции, так и путем иссечения жировой ткани, состоит из значительной популяции клеток предшественников, проявляющихся сильной

экспрессией CD 34 и KDR. Однако, ССФ также содержит популяцию CD31, CD51/61 и vWF положительных клеток, демонстрируя контаминацию зрелыми эндотелиальными клетками (ECs) [12,13].

Исследователи Wosnitza M. et al. (2007) в своей работе показали, что экспрессия CD31 и CD51/61 была выражена сильнее в клетках ССФ, полученных путем липосакции (до 40% CD 31+) и выделение ECs в липоаспирате было гораздо больше, чем в иссеченной жировой ткани. Они также провели сравнительный анализ особенностей дифференцирования поверхностных маркеров CD 31+ и CD 31-, используя CD31 магнитные частицы Dynabeads, с активированной поверхностью для разделения клеток из неочищенной ССФ жировой ткани. В результате было сделано заключение, что фракция CD 31- состоит из клеток-предшественников адипоцитов – преадипоцитов, а фракция CD 31+ обладает свойствами эндотелиальных клеток [12,13,129].

Таким образом, ССФ представляет собой не единую клеточную фракцию, а смесь из различных клеток с разной экспрессией поверхностных белков антигенов. Среди них CD31-, S100+ (тип клеток, который обладает способностью дифференцироваться в адипоциты, также, как и в эндотелиальные клетки-предшественники и зрелые эндотелиальные клетки, в зависимости от вовлеченных индуцирующих факторов дифференцирования) и CD31+, CD34 +, S100- (клеточная фракция с фенотипом эндотелиальных клеток, которая может конвертироваться в жировую ткань, при соответствующих условиях дифференцирования) [10].

Данные результаты открыли новые возможности в инженерии жировой ткани и потенциально позволили улучшить ее васкуляризацию и рост. Использование мультипотентных клеток ССФ провели Matsumoto D. et al. (2006), которые оценили эффективность трансплантации мышам и крысам жировой ткани человека, не обогащенной и обогащенной стволовыми клетками, и проследили судьбу пересаженных трансплантатов. Трансплантаты жировой ткани, обогащенной стволовыми клетками, по сравнению с небогащенной, имели больший вес и более крупные размеры, были лишены центральной зоны некроза и

лучше васкуляризованны, что подтвердило высокий адипогенетический и ангиогенетический потенциал данного вида клеток. Также авторы отметили более низкую выживаемость и частичную атрофию трансплантата в группе с низким содержанием стволовых клеток в пересаженном липоаспирате [10,16,44].

Созданы и продолжают разрабатываться методы обогащения жировой ткани факторами роста, усиливающими неоваскуляризацию и выживаемость жировых трансплантатов. Исследования влияния стволовых клеток взрослого организма и факторов роста находятся еще на начальном этапе, поэтому должны быть проведены обширные доклинические и клинические исследования эффективности и безопасности данных методов в пластической хирургии и регенеративной медицине [10].

1.4. Классификация стволовых клеток и способы их выделения

На сегодняшний день функции жировой ткани человеческого организма широко изучены. Жировая ткань представляет собой не только метаболический резервуар для хранения и образования высокоэнергетичных субстратов, но и участвует в процессах метаболизма гормонов [100]. Более детально изучить строение жировой ткани удалось Rodbell M. (1964), который, используя методы механического измельчения, протеолитического расщепления и дифференциального центрифугирования, выделил две фракции жировой ткани: собственно зрелые адипоциты и более плотную клеточную массу, которой впоследствии дал термин стромально-сосудистой фракции (ССФ) [141]. ССФ гетерогенна и представлена клетками крови, фибробластами, перицитами, эндотелиальными клетками и преадипоцитами. Дальнейшие исследования показали, что именно стромально-сосудистая фракция является огромным резервуаром мезенхимальных стволовых клеток, способных к дифференциации в разных направлениях, в зависимости от окружающих условий, а уже в 2001 году Zuk P.A. et al. отметили, что свойства так называемых Adipose Derived Stem Cells

(ADSCs) имеют большое сходство с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга [10,20,117,133].

Стволовые клетки являются ранними типами клеток в последовательной цепи строго упорядоченных процессов, таких как пролиферация клеток, их миграция, дифференцировка, созревание и апоптоз. Данные процессы обеспечивают образование и поддержание клеточных линий тканей взрослого человека, в которых данные присутствуют. Для описания свойств стволовых клеток используется понятие «потентности», ограничивающее возможные варианты дифференцировки данного типа клеток (Рисунок 1.1). Поли-, мульти- и олигопотентные СК обладают более ограниченной способностью к дифференцировке, чем тотипотентные [114]. Хотя эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают почти неограниченными возможностями дифференцироваться в лабораторных и естественных условиях, их применение ограничено этическими, правовыми и политическими соображениями, а также научными и клиническими вопросами безопасности и эффективности [10].

Тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстра-эмбриональные типы клеток, к которым относятся только оплодотворенный ооцит и бластомеры 2–8 стадии. Плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона – эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином [10].

КЛАССИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПО ИХ СПОСОБНОСТИ К ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ



Рисунок 1.1 – Классификация стволовых клеток [10]

Таким образом, тканеспецифические стволовые клетки взрослого организма, а именно мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (Рисунок 1.2), предлагают альтернативные подходы, позволяющие решить многие из этих проблем. В свете данных факторов комитетом Международного общества клеточной терапии термин «мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки» (ММСК) должен быть зарезервирован только за клетками, проявляющими активность стволовых клеток по четко установленным критериям:

- 1) адгезивность к пластику при культивировании в стандартных условиях;
- 2) экспрессия специфических поверхностных антигенов;
- 3) способность дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, хондробласты, миоциты и адипоциты [10,90].

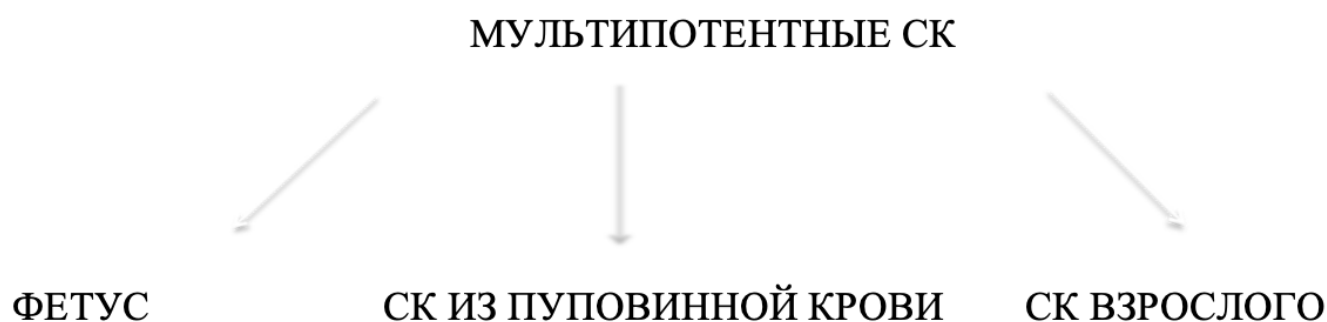


Рисунок 1.2 – Классификация мультипотентных стволовых клеток [10]

Сравнительный анализ показал, что МСК из костного мозга и СКЖТ не отличаются по морфологии, иммунному фенотипу и способности к дифференциации. В то же время СКЖТ более доступны для выделения и использования в клинике. В то время, как в костном мозге взрослого человека на 50 000–1 000 000 клеток приходится всего 1 мезенхимальная СК, в жировой ткани содержание СК составляет 1 на 30–1000 клеток [35]. Жировую ткань, таким образом, можно считать привлекательным альтернативным источником стволовых клеток, т. к. она может быть собрана в больших количествах как из фрагментов жировой ткани, так и методом липосакции [10].

1.5. Выделение и применение стволовых клеток жировой ткани в пластической хирургии

В клинической практике вопрос выбора лучшего метода для забора липоасpirата остается нерешенным [44]. После иссечения жировой ткани цельными кусками необходимо проводить измельчение забранного материала вручную, удаление фрагментов соединительной ткани, являющихся возможных источником эндотелиальных клеток и фибробластов, а также ферментативное расщепление. Данные манипуляции приводят к увеличению времени оперативного подхода и не всегда представляются возможными [10].

При использовании вакуумной аспирации техника получения клеток упрощается, т. к. создаются более однородные фрагменты тонко измельченной ткани, что предпочтительнее для более эффективного ферментативного расщепления. И, как следствие, измельченная жировая ткань после липоасpirации содержит сосуды и соединительную ткань [81]. Аспират, полученный при липосакции жировой ткани, представляет собой тонко измельченную жировую ткань, состоящую, в основном из жизнеспособных клеток. В аспирате могут обнаруживаться В- и Т-лимфоциты, тучные клетки, НК-клетки, макрофаги, моноциты, стволовые кроветворные клетки и предшественники эндотелиальных клеток [10].

D. Matsumoto et al. (2006) показали, что в аспирированном жире содержание СКЖТ уже вдвое меньше, чем в интактной жировой ткани. Это объясняется тем, что СКЖТ локализуются преимущественно вокруг кровеносных сосудов, расположенных в соединительной ткани, которая в липоасpirате (вследствие техники липосакции) практически отсутствует [44].

СК жировой ткани выделяют вручную, путем отмывания в физиологическом растворе на фосфатном буфере, для удаления клеток крови, обработки коллагеназой (что облегчает последующее выделение разных типов клеток) и центрифугированием, для получения осадка, состоящего из сосудистой стромы и СК. Этот осадок ресуспендируют в культуральной среде и оставляют на

ночь в пластиковом флаконе, для отделения прилипающих клеток. Пластик служит подложкой для прикрепления и выращивания этих клеток. Для лучшего прикрепления клеток поверхность пластика покрывают коллагеном или другими белками межклеточного матрикса. В условиях *in vitro* время удвоения популяции СКЖТ составляет 48–96 ч., в зависимости от состава среды культивирования и номера пассажа. Кинетика роста СКЖТ и возможности дифференцировки клеток при долговременном культивировании значительно не изменяются [10].

В настоящее время разработано оборудование, позволяющее автоматизировать процедуру выделения стромально-васкулярной клеточной фракции (СВКФ) (TissueGenesis, Inc., Honolulu, Hawaii; GenesisBiosystems, Lewisville, Texas; CytoriTherapeutics, Inc., SanDiego, Calif.). В 2008 году компания Cytori (США) зарегистрировала в Европейском Союзе устройство для липоаспирации, запатентовала методики по выделению из части жира СВКФ, обогащению этими клетками оставшегося жира и дальнейшего введения его пациентам. СВКФ представляет собой не единую клеточную фракцию, а смесь из различных клеток, содержащих в себе мезенхимальные стволовые клетки [10].

Состав стромально-васкулярной клеточной фракции (СВКФ):

- преадипоциты <10% (дифференцирование адипоцитов);
- эндотелиальные клетки <10% (ангиогенез);
- жировые стволовые клетки <10% (дифференцирование в разные виды клеток);
- фибробласты <5% (формирование экстрацеллюлярного матрикса);
- перициты <5% (стабилизация кровеносных сосудов);
- моноциты, макрофаги <40%;
- другие клетки – 20% [10].

Использование предложенной компанией технологии позволяет в течение часа выделить стволовые клетки из аспирата жировой ткани пациента. Затем клеточная суспензия, без этапа культивирования, вновь смешивается с жировым аспиратом и вводится пациенту. При этом, в то время как большинство основанных на стволовых клетках методов коррекции занимают по времени несколько дней или недель, при использовании данной технологии, достаточное

количество клеток может быть получено из жировой ткани в течение одной хирургической процедуры без необходимости каких-либо дальнейших манипуляций с этими клетками. Этот факт позволяет проводить оперативное вмешательство достаточно быстро, в условиях клиники, при этом пациент получает свои собственные (выделенные и обработанные) клетки, не покидая не только клинику, но даже и операционную [1,10].

Американские ученые, совместно с испанскими коллегами, зарегистрировали аналогичный аппарат для выделения СВКФ GID SVF-1, который позволяет непосредственно в операционной сразу после липосакции, через 60 минут, получить концентрированную клеточную фракцию в закрытой стандартизированной системе. Эффективность использования данного аппарата сегодня активно изучается.

1.6. Исследования стволовых клеток на приживление жировой ткани в экспериментах

Matsumoto D. et al. (2006) выдвинули предположение, что стволовые клетки жировой ткани должны повышать выживаемость аутотрансплантатов и снижать риск фиброза, обызвествления и образования ложных кист. Авторы сравнили жировую ткань человека, полученную путем аспирации и иссечения, по числу выделенных из нее прилипающих клеток и гистологическим характеристикам. Кроме того, они оценили эффективность трансплантации мышам и крысам жировой ткани человека, не обогащенной и обогащенной стволовыми клетками, и проследили путь стволовых клеток из обогащенного трансплантата. Первая часть исследования была проведена на материале, полученном от троих пациентов во время липосакции и абдоминальной пластики живота. У каждого пациента жировую ткань брали из одного и того же участка липосакцией и иссечением. Обе фракции полученного при липосакции аспирата были подвергнуты гистологическому исследованию. Для выделения сосудистой стромы, содержащей стволовые клетки из аспирата и иссеченных фрагментов жировой ткани,

использовали модификацию метода, описанного в 2002 г. Zuk P.A. et al. [90]. Сосудистую строму выделяли из одинаковых по массе образцов жировой ткани, полученной путем липосакции и иссечения. Во второй части исследования аспират жировой ткани человека под местной анестезией вводили под кожу спины мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Для инъекций использовали аспират жировой ткани с добавлением сосудистой стромы, содержащей стволовые клетки и выделенной из того же аспирата. Через 4 недели трансплантированную жировую ткань выделяли и готовили из нее гистологические препараты для окрашивания гематоксилином и эозином. Трансплантаты жировой ткани, обогащенной стволовыми клетками, по сравнению с необогащенной, имели больший вес и более крупные размеры, были лишены центральной зоны некроза и лучше васкуляризованы. Эти данные свидетельствуют о более высокой выживаемости трансплантатов жировой ткани, обогащенной стволовыми клетками, по сравнению с необогащенной. Третья часть исследования была посвящена наблюдению за стволовыми клетками после их трансплантации. Мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом вводили стволовые клетки свежесодержанной сосудистой стромы жировой ткани человека, а крысам – измельченную жировую ткань крыс. Наблюдение показало, что клетки сосудистой стромы дифференцируются в клетки эндотелия сосудов и обеспечивают неоваскуляризацию трансплантатов. Таким образом, обогащение жировой ткани стволовыми клетками может приводить к уменьшению некроза в центре трансплантата и способствовать разрастанию сосудов по периферии трансплантата. Кроме того, авторы высказали предположение, что значительная часть СК, лежащих вблизи крупных кровеносных сосудов, при липосакции не захватывается. По-видимому, из-за изкого содержания стволовых клеток в необогащенном аспириате приготовленные из него трансплантаты имеют более низкую выживаемость после операции и подвергаются частичной атрофии [44].

В 2010 году Zhu M. et al. в доклинических исследованиях на мышах выявили, что обогащенный стромально-васкулярной клеточной фракцией липографт сохранялся в объеме, больше чем в 2 раза превышавшем объем

к выводу, что использование клеточных технологий не дает никаких преимуществ в процессе приживления и васкуляризации графтов, лишь удлиняя и усложняя сам процесс операции [150].

Liu W.H. et al. (2015) также не отметили стимулирующих свойств клеточной стимуляции при пересадке жировой ткани. В своей работе они исследовали анатомические особенности области молочных желез при помощи МРТ-исследования – оценивали объем больших грудных мышц и самих молочных желез – и далее проводили аутотрансплантацию жировой ткани с целью увеличения объема мягких тканей. Во всех случаях хирурги во время операции выделяли стромально-васкулярную клеточную фракцию с мезенхимальными стволовыми, которую в дальнейшем смешивали с пересаживаемыми жировыми графтами. Оценивая результаты спустя шесть месяцев, авторы пришли к выводу, что величина резорбции во всех случаях достигала 40–60% и не показала разительных отличий от рутинных методов пересадки жировой ткани, описанных в мировой литературе [156].

Тем не менее, исследования влияния стволовых клеток взрослого организма и факторов роста находятся еще на начальном этапе, поэтому должны быть проведены обширные доклинические и клинические исследования эффективности и безопасности данных методов в пластической хирургии и регенеративной медицине. Созданы и продолжают разрабатываться методы обогащения жировой ткани факторами роста, усиливающими неоваскуляризацию и выживаемость жировых трансплантатов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы провели экспериментальное исследование в период 2015 по 2016 год на базе Центрального вивария ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России совместно с Институтом регенеративной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Для создания экспериментальной модели мы использовали кроликов. По данным исследователей, кролики являются универсальной экспериментальной моделью, которая позволяет эффективно изучать возможности пересадки жировой ткани в аспекте клеточного потенцирования. Связано это с особенностями отложения жировой клетчатки при небольших размерах самого животного – она в значительной степени сконцентрирована в области холки, что облегчает хирургический доступ и дает возможность аспирировать большое количество материала (Рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Область забора жирового аутотрансплантата предварительно очищали от шерсти и обрабатывали растворами антисептиков; далее выполняли прокол и вакуумную аспирацию жирового аутотрансплантата

Более того, в этих локальных отложениях обнаруживается значительное количество мезенхимальных стволовых клеток, необходимых для изучения. Также стоит отметить, что использование мелких лабораторных животных имеет экономическое значение [151].

В ходе формирования дизайна исследования и экспериментальной модели стали возникать вопросы о возможности объективной оценки результатов эксперимента. В частности, возник вопрос универсальности реципиентной зоны – технически доступной для пересадки значительного количества жирового аутотрансплантата с возможностью формирования папулы, хорошо кровоснабжаемой зоной, а также удобной для объективной гистологической оценки пересаженного аутотрансплантата и окружающих его границ [15]. Изучая модель кролика, мы пришли к выводу, что ушные раковины хорошо отвечают указанным требованиям, а также хорошо зарекомендовали себя при проведении схожих исследований (Рисунок 2.2).



Рисунок 2.2 – Реципиентную область для пересадки аутотрансплантатов также предварительно очищали от шерсти и обрабатывали растворами антисептиков

2.1. Общая характеристика экспериментального исследования

Материалом для изучения и получения препаратов нами были отобраны лабораторные животные в количестве 30 кроликов породы «Шиншилла» мужского и женского пола, в возрасте от 1 до 2 лет (в среднем 1,4 года), весом от 2 до 2,5 кг, без признаков известных инфекционных и вирусных заболеваний.

Во время проведения эксперимента соблюдались положения Национального Исследовательского Консилиума по использованию лабораторных животных.

Операции проводили под общей анестезией с сохранением дыхательной функции путем внутримышечного введения 1,0–1,2 мл раствора Золетила (из расчета 15 мг/кг) и Рометара (из расчета 2 мг/кг).

Исследование включило в себя 3 серии экспериментов, в каждой из которой использовали по 10 животных.

Животных подготавливали к проведению оперативного вмешательства путем голодания в течение 8 часов до операции, также нами предварительно была проведена подготовка операционного поля в условиях анестезии.

Исследование проводили в 3 этапа:

- 1-й этап (получение липоасpirата и культивирование СКЖТ в лаборатории):
 - забор жировой ткани из донорской области (задняя поверхность шейного отдела, правая сторона R) для выделения СКЖТ;
 - культивирование СКЖТ в течение 30 дней.
- 2-й этап (получение материала и его пересадка в реципиентную область):
 - забор жировой ткани из контрлатеральной донорской области (задняя поверхность шейного отдела – левая сторона L) и обработка липоасpirата;
 - пересадка обработанной жировой ткани БЕЗ СКЖТ в реципиентную область подкожно (ушная область – левая сторона L);
 - пересадка обработанной жировой ткани + СКЖТ в реципиентную область подкожно (ушная область – правая сторона R) (Рисунок 2.3).
- 3-й этап (гистологический этап):
 - гистологическая и статистическая оценка аутотрансплантата после операции в сроки 1, 3, 6 месяцев [15].

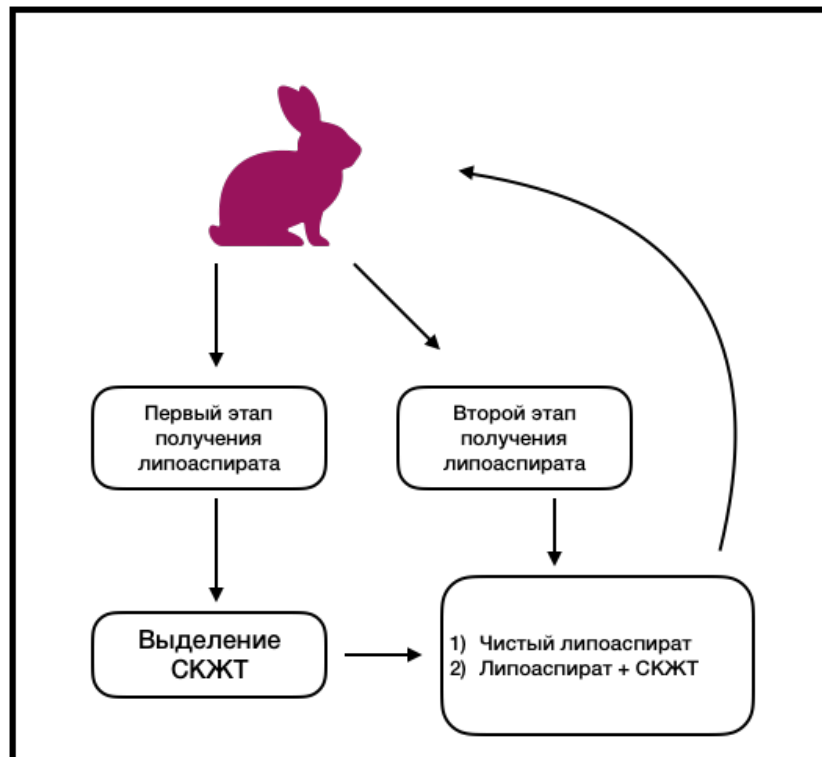


Рисунок 2.3 – Схема первого и второго этапов экспериментального исследования: на данных этапах мы проводили выделение и культивирование стволовых клеток из жировой ткани, а также дальнейшую пересадку в каждую реципиентную зону в зависимости от состава графта

Для сравнительной качественной оценки пересаженного материала нами было выделено три группы лабораторных животных, в соответствии со сроками наблюдений:

- в 1 группу включены 10 кроликов со сроками наблюдения 1 месяц после операции: 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани с СКЖТ, и 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани без добавления СКЖТ;
- в 2 группу включены 10 кроликов со сроками наблюдения 3 месяца после операции: 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани с СКЖТ, и 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани без добавления СКЖТ;
- в 3 группу включены 10 кроликов со сроками наблюдения 6 месяцев после операции: 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани с СКЖТ,

и 5 кроликов, перенесших аутотрансплантацию жировой ткани без добавления СКЖТ (Таблица 2.1) [15].

Таблица 2.1 – Распределение лабораторных животных в эксперименте на группах [15]

Группа	I		II		III		ВСЕГО
	А	Б	А	Б	А	Б	
Состав трансплантата	СКЖТ	ЖТ	СКЖТ	ЖТ	СКЖТ	ЖТ	
Сроки наблюдения	1 мес	1 мес	3 мес	3 мес	6 мес	6 мес	
Количество наблюдений	5	5	5	5	5	5	30

Таким образом, мы сформировали 3 группы по 10 кроликов, в каждой из которых оценивали приживаемость жировых аутотрансплантатов при помощи и без клеточного потенцирования, что в свою очередь дало нам возможность оценить потенциал влияния мезенхимальных стволовых на пересаженный материал как на каждом отдельном сроке, так и оценить тенденцию в целом.

2.2. Материалы и методы гистологического этапа исследования

Гистологическое исследование было выполнено в лаборатории экспериментальной патоморфологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Изучали две группы животных на разных сроках после введения жировой ткани в реципиентную зону:

1. Первая группа – имплантация жировой ткани из задней поверхности шейного отдела животного в реципиентную область без МСК.

2. Вторая группа – имплантация подкожной жировой клетчатки из задней поверхности шейного отдела в реципиентную область вместе с МСК [15].

Через 1, 3, 6 месяцев животных выводили из опыта, вырезали фрагмент ушной раковины в области имплантации жира. После фиксации в 10% нейтральном формалине заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мк окрашивали гематоксилином и эозином. Просматривали на микроскопе Leica DM4000 B LED и фотографировали камерой LEICA DFC 7000T (Рисунок 2.4).



Рисунок 2.4 – Микроскоп LEICA DM 4000 B LED, использовавшийся для оценки фиксированных гистологических материалов

Проводилась также фазово-контрастная микроскопия и микроскопия темного поля.

При гистологическом исследовании оценивались следующие параметры:

- 1) уменьшение объема жировой ткани;
- 2) резорбция жировой ткани макрофагами и гигантскими клетками;
- 3) прорастание жировой ткани соединительной тканью.

Оценку осуществляли по бальной системе:

0 баллов – нет отличий от интактной ушной раковины.

1 балл – минимальные отличия от интактной ушной раковины,

2 балла –умеренные изменения,

3 балла – выраженные изменения,

4 балла – максимальные изменения.

Таким образом, целью гистологического этапа исследования было оценить прогрессию различных параметров приживления жировой ткани на разных этапах исследования, присвоив им соответствующую балльную оценку.

ГЛАВА 3. МЕТОДИКА ПЕРЕСАДКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СО СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Разработка методики пересадки жировой ткани и получения взвеси стволовых клеток проводилась совместно с Институтом Молекулярной Медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. Основные практические этапы забора и пересадки жировой ткани проводились по технике S.R. Coleman в собственной модификации под экспериментальную работу. Лабораторный этап получения стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ) позволил получить концентрацию взвеси СКЖТ, соответствующую последних мировым стандартам.

3.1. Технология забора жировой ткани для получения СКЖТ

Первым этапом осуществляли забор жировой ткани для выделения в последующем взвеси стволовых клеток (Рисунок 3.1, Рисунок 3.2).



Рисунок 3.1 – Этап подготовки операционного поля – донорские и реципиентные зоны



Рисунок 3.2 – Этап забора жировой ткани: забор жировой ткани проводится путем вакуумной липоаспирации

Положение животного на животе. В асептических условиях операционной центрального вивария, под медикаментозной седацией (Золетил 0,4 мл + Рометар 0,8 мл внутримышечно) проводилась механическая чистка донорской области животного. Далее, после 3-кратной обработки операционного поля бетадином, через отдельный прокол производилась инфильтрация донорской области 3 мл 0,9% раствора NaCl с адреналином в разведении 100000:1 с дальнейшей экспозицией в течение 15 минут. Для забора жирового материала использовалась канюля типа Mercedes 2 мм с наконечником Luer-Lock и аспирационной шприцевой системой B Braun 10 cc syringe [15]. Полученный аспират объемом до 1 мл в стерильных условиях помещался в специальную транспортировочную среду и отправлялся на культивирование стволовых клеток в течение 30 дней. Прокол ушивали отдельным узловым швом нитью Prolene 5/0.

3.2. Технология получения взвеси СКЖТ

Выделение и культивирование СКЖТ проводили по известному протоколу [47], в соответствии с которым фрагмент жировой ткани отмывали фосфатно-буферным раствором и инкубировали при 37⁰ С с коллагеназой 2-го типа (Life Technologies) 30 минут. Далее фермент был нейтрализован полной питательной средой, состоящей из DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина (Life Technologies) (Таблица 3.1) [15].

Таблица 3.1 – DMEM-протокол для выделения и культивирования стволовых клеток жировой ткани (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS – сыворотка крупного рогатого скота; TGF-В1 – трансформирующий фактор роста В1) [15]

Среды	Базальная среда	Сыворотка	Добавление
Среда (Control medium)	DMEM	10% сыворотка крупного рогатого скота (FBS)	1% антибиотик
Хондрогенная среда (Chondrogenic medium)	DMEM	1% сыворотка крупного рогатого скота (FBS)	10 нг/мл TGF-В1, 6,25 мг/мл инсулин, 6,25 мг/мл трансферрин, 1% антибиотик

После дальнейшего лизиса эритроцитов (лизирующий раствор 160 мМ NH₄Cl) взвесь фильтровали через сито с размерами ячеек 100 мкм. Полученную суспензию клеток в полной питательной среде переносили в культуральный флакон (T175, Life Technologies) и помещали в СО₂-инкубатор для получения адгезивной культуры клеток. Через 24 часа удаляли неприкрепившиеся фрагменты и продолжали культивирование со сменой питательной среды каждые 72 часа. Для получения суспензии СКЖТ применяли 0,25% раствор трипсина/версена (Life Technologies), проводили центрифугирование при 350g в течение 5 мин., добавляли физиологический раствор. Суспензия аутологичных

СКЖТ кролика содержала 3×10^5 клеток в 200 мкл физиологического раствора [15].

3.3. Технология получения и пересадки СКЖТ с жировым аутотрансплантатом

Третьим этапом производили повторный забор жировой ткани, которая разделялась на две фракции. Одну из фракций смешивали с взвесью стволовых клеток, выращенных в лабораторных условиях в Институте Молекулярной Медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России после первого этапа, и вводили в область ушных раковин (Рисунок 3.3).

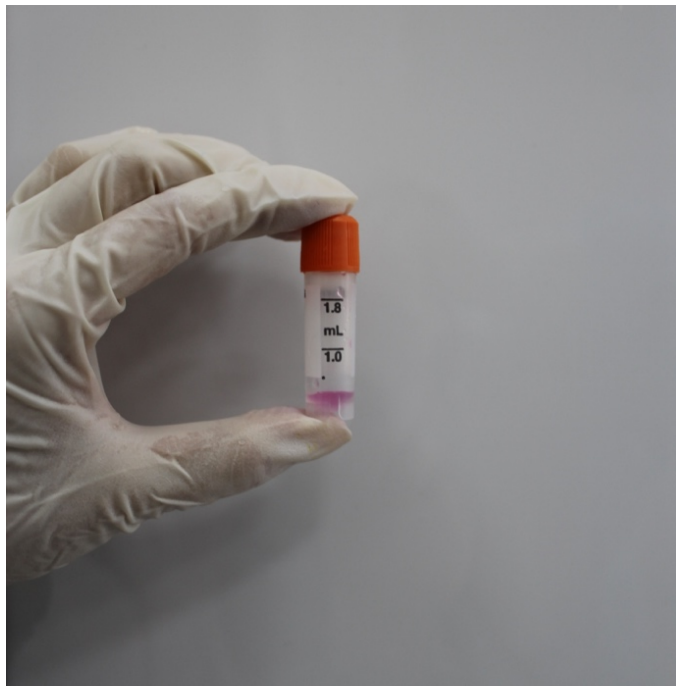


Рисунок 3.3 – Взвесь стволовых клеток, полученная в НИИ Молекулярной медицины для проведения второго этапа исследования

В асептических условиях операционной Центрального вивария под медикаментозной седацией (Золетил 0,4 мл + Рометар 0,8 мл внутримышечно) проводили механическую чистку донорской и реципиентной областей животного. Далее, после 3-кратной обработки операционного поля бетадином, через отдельный прокол производили инфильтрацию донорской области 3 мл 0,9 %

раствора NaCl с адреналином в разведении 100000:1 с дальнейшей экспозицией в течение 15 минут. Для забора жирового материала из донорской области использовалась канюля типа Mercedes 2 мм с наконечником Luer-Lock и аспирационной шприцевой системой B Braun 10 cc syringe.

Полученный липоаспират объемом до 6 мл центрифугировался в течение 20 секунд со скоростью 1300 RPM. Далее очищенный липоаспират разделяли на 2 шприца по 2 мл, в один из которых добавлялась взвесь культивированных мезенхимальных стволовых клеток (Рисунок 3.4).



Рисунок 3.4 – Этап смешивания липоаспирата с взвесью стволовых клеток

Далее через отдельные проколы в реципиентные зоны специальными канюлями диаметром 1,5 мм вводили полученный аспират по технике S.R. Coleman до тугого наполнения (Рисунок 3.5).



Рисунок 3.5 – Этап введения жировой ткани: введение липоасpirата по технике S.R. Coleman в реципиентную зону

Проколы ушивали отдельными узловыми швами нитью Prolene 5/0 (Рисунок 3.6, Рисунок 3.7).

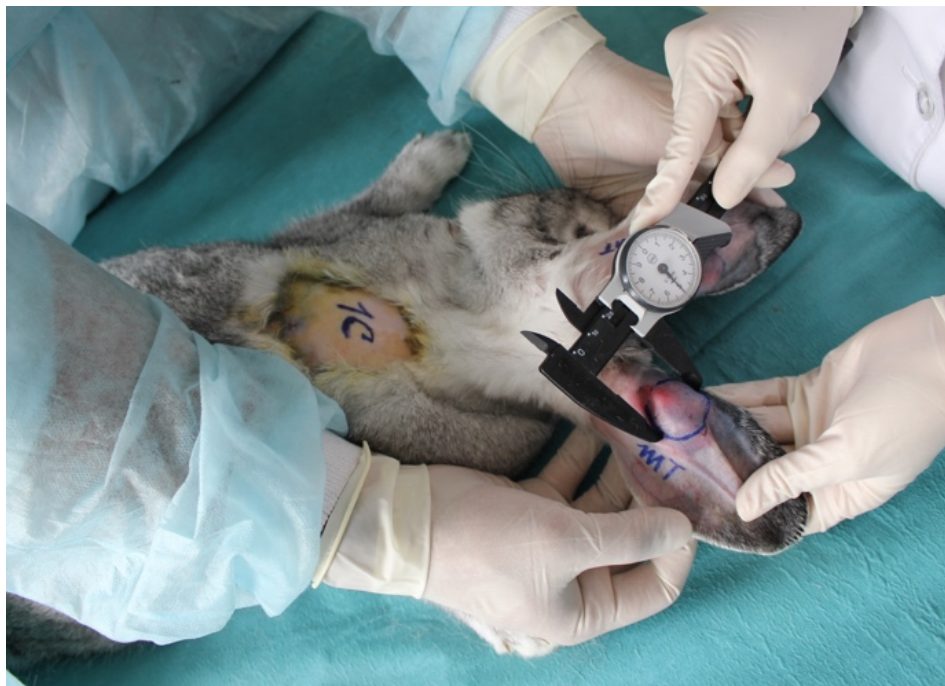


Рисунок 3.6 – Контроль размеров пересаженного липоасpirата: полученный липоасpirат введен до тугого наполнения, диаметр папулы 2,5 см



Рисунок 3.7 – Контроль объемов пересаженного липоасpirата в обе реципиентные зоны: оценивали объем папулы и ее наполнение, а также отсутствие ретроградного выведения пересаженного аутоотрансплантата через сделанные проколы

Контроль пересаженного материала: справа очищенный липоасpirат, слева – с добавлением взвеси мезенхимальных стволовых клеток.

3.4. Оценка экспериментальной модели и влияния СКЖТ на приживаемость жировых аутоотрансплантатов аутоотрансплантатов в эксперименте на мелких лабораторных животных

Аутоотрансплантация жировой ткани является технически очень деликатной манипуляцией и требует особого внимания на каждом этапе ее проведения. Наличие большого количества микроэтапов критически влияет на жизнеспособность и выживаемость адипоцитов. Ниже они представлены в хронологическом порядке проводимой хирургической манипуляции.

1. Выбор вида лабораторной модели и донорской зоны

В современной научной литературе проводится большое количество исследований на лабораторных моделях, целью которых является изучение различных аспектов. Выбирая экспериментальную модель, мы проанализировали

предшествовавший опыт коллег и остановились на модели кролика. Torres F.C. et al. (2007) в своей научной работе задались целью изучить возможность использования Новозеландских кроликов как идеальную экспериментальную модель для получения и дальнейшего изучения мезенхимальных стволовых клеток. Авторы пришли к выводу, что кролики является отличной экспериментальной моделью с точки зрения большой концентрации локализованной жировой ткани, ее легкой технической доступности, низкого количества осложнений и возможности выделения значительного количества мезенхимальных стволовых клеток [151]. Mazzetti M.P. et al. (2010) в своем эксперименте также показали, что кролики являются показательной моделью для получения большого количества мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани [136].

Оценивая реципиентную зону, мы исходили из соображений значительного кровоснабжения для улучшения приживаемости аутотрансплантатов. Многие авторы в своих исследованиях утверждают, что хорошая васкуляризация имеет определяющее значение для успешной трансплантации. При этом стоит отметить, что на сегодняшний день нет понимания «оптимального» слоя для введения жировой ткани. Так, многие авторы небезосновательно заявляют о подходящих для аутотрансплантации качествах мышечной ткани и ее значительного кровоснабжения [84,121,122]. Однако, некоторые ученые отметили наличие негативных последствий при пересадке жировой в ткани в мышечные слои – в основном, лизис аутотрансплантата за счет значительных гематом [36,116].

Ушная раковина кролика имеет значительную плотность расположения кровеносных сосудов, что успешно было оценено в исследовании Liu B. et al. (2013), которые проводили научную работу по пересадке жировой ткани с использованием клеточной стимуляции [154] (Рисунок 3.8).



Рисунок 3.8 – Демонстрация значительной плотности кровеносных сосудов в ушных раковинах кролика

2. Инфильтрационная/местная анестезия

Пересадка жировой ткани часто подразумевает использование местной анестезии, и в современной литературе имеется множество данных о влиянии местных анестетиков на выживаемость жировых аутотрансплантатов. В 1995 году Moore J.H. et al. опубликовали результаты своего исследования, целью которого была оценка влияния способа забора жировой ткани, а также влияния лидокаина на жизнеспособность жирового аутотрансплантата. Первый вывод заключался в том, что ручная липоаспирация не влечет отрицательного влияния на жизнеспособность жировых клеток. Лидокаин, напротив, подавлял транспорт глюкозы и тормозил их рост в культуре. Однако, эти эффекты местного анестетика полностью нейтрализовались после отмывания самого аутотрансплантата [160]. Исследуя влияние большинства известных анестетиков, Macrae J.W. et al. (2003) не отметили существенного негативного воздействия на жизнеспособность трансплантатов [86]. Показательное исследование провели Shoshani O., Zipori D.(2015), где исследовали путем гистологической оценки два вида липоаспирата. В первом случае забор жира производился после предварительного введения физиологического раствора, а во втором – после

инфильтрации физиологическим раствором с добавлением 0,06% лидокаина и адреналина 1:1000000. В результате авторы не обнаружили значительных различий между группами [148].

Основываясь на имеющемся опыте специалистов, мы не рассматривали применение инфильтрационной анестезии как значительный фактор влияния на приживаемость жировых аутооттрансплантатов.

3. Получение жировой ткани

Выбранный нами метод получения жировой ткани путем липоаспирации также имеет под собой научные основания. Основной вопрос, которой мы перед собой ставили: влияет ли выбранный нами метод на выживаемость адипоцитов? В научной литературе этому вопросу уделяется значительное внимание [9]. Так, важное значение при механической липоаспирации играет отрицательное давление, что изучил в своей работе Har-Shai Y. et al. (1999) – давление в 1 атмосферу и более негативно сказывается на сохранности адипоцитов, нежели при ручной аспирации в 0,2 атмосферы [26]. В тот же момент Katz A.J. et al. пришли к аналогичному выводу и подтвердил негативное влияние высокого отрицательного давления [64]. Немного ранее, в 1994 году, аналогичные данные о пагубном воздействии отрицательного давления опубликовали Niechajev I., Sevcuk O. (1994) [122].

Влияет ли тип канюли на выживаемость жировых аутооттрансплантатов? Ученые подробно изучили и этот вопрос. Чем меньше диаметр рабочей канюли, тем в меньшей степени повреждается ядро адипоцита – к такому выводу пришли Campbell G. et al. (1987), изучая структуру клеток под микроскопом [41]. Значимую разницу в количестве жизнеспособных адипоцитов в своем исследовании продемонстрировали Ozsoy Z. et al. (2006) с соавторами – 4-мм канюли оказались значительно предпочтительнее для забора аутооттрансплантата в сравнении с 2-мм или 3-мм [126]. Pu L.L.Q. et al. (2008) сравнили 2 способа получения жировой ткани в своем исследовании – классическим методом забора и авторским методом S.R. Coleman. Авторы пришли к выводу, что оба метода

позволяют получить жизнеспособную жировую ткань, но количество и качество адипоцитов выше при использовании метода S.R. Coleman [33].

Таким образом, современные данные позволяют сделать заключение, что ручной метод получения по технике S.R. Coleman является наиболее актуальным в разрезе сохранения жизнеспособности жировых аутотрансплантатов.

4. Введение жировой ткани

Наиболее актуальным и предпочтительным методом введения жировой ткани нам представляется метод по S.R. Coleman, который рекомендует использовать тупые канюли 17–20 G с одним дистальным отверстием. Подсоединять их необходимо к шприцам от 1 до 10 мл. Тупая канюля позволяет создать необходимый слой для введения жира, при этом минимально травмируя реципиентную область и снижая риск повреждения кровеносных сосудов. Использование шприцов небольшого объема повышает точность введения и снижает риски травматизации стенок адипоцитов за счет меньшего отрицательного давления. Все инъекции жировых аутотрансплантатов осуществляются ретроградно, послойно в трехмерной плоскости крест-накрест [9,52,53,54].

Не менее важным аспектом жизнеспособности вводимого аутотрансплантата является соотношение количества введенной жировой ткани и реципиентной емкости. Эти факторы неизменно влияют на приживаемость аутотрансплантатов – ведь всегда происходит некоторая резорбция. Некоторые авторы рекомендуют прибегать к гиперкоррекции при пересадке в расчете на дальнейшую резорбцию, тем самым пытаясь прийти к более прогнозируемому результату [25,52,122]. Иные коллеги, напротив, считают, что гиперкоррекция может приводить к избыточному давлению в реципиентной зоне и, как следствие, недостаточному кровоснабжению пересаженного материала. А для лучшей приживаемости адипоцитов рекомендуют проводить пересадку несколькими сессиями с интервалами от 3 до 6 месяцев [27,37].

В своей работе мы руководствовались рекомендациями S.R. Coleman и других авторов, прибегая к незначительной гиперкоррекции ввиду хорошего

кровообращения ушных раковин и технической сложности объективно оценить результат при проведении нескольких сессий пересадки.

5. Влияние СКЖТ на приживаемость жировых аутотрансплантатов

Непредсказуемость получаемого результата и низкий процент выживаемости пересаженного аутотрансплантата приводит к необходимости более детального изучения механизмов приживаемости и процессов резорбции. Так, исследователи стремились улучшить получаемые результаты путем клеточной стимуляции факторами роста – эритропоэтином [70], инсулином [32], макрофагами [24]. Большое количество исследований показывают, что препараты аутоплазмы также в значительной степени положительно влияют на приживание жировых аутотрансплантатов [40,104,143].

Использование клеточной стимуляции, основанной на свойствах стволовых клеток, нам представляется наиболее актуальным и перспективным в разрезе современных возможностей. Основные исследования в данной области нацелены на выделение стромально-васкулярной клеточной фракции (СВФ), включающей в себя эндотелиальные клетки, фибробласты, перициты, макрофаги и различные фенотипы мезенхимальных стволовых клеток [139]. И есть убедительные факты о положительном влиянии СВФ на приживаемость жировых аутотрансплантатов [48,90,117]. Вместе с тем СКЖТ, могут быть выделены из СВФ путем культивирования, так как в отличие от остальных являются адгезивными [92]. Возможность культивирования чистой взвеси СКЖТ и отсутствие значительных данных об их влиянии на приживаемость жировых аутотрансплантатов явилось значительным основанием для проведения данной экспериментальной работы.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Результаты гистологического исследования жировых аутотрансплантатов

В контрольной группе животных, где трансплантировалась суспензия жировой ткани из холки кроликов без добавления МСК, к 1 месяцу после операции в тканях раковины обнаруживали жировую ткань без четких границ, без признаков тканевого отторжения и без некроза, что свидетельствовало о полном приживлении трансплантата. Однако уже на этот срок у 3 из 5 животных отмечались признаки разной степени резорбции жировой ткани макрофагами и гигантскими многоядерными клетками, а также прорастание трансплантата соединительной тканью (Рисунок 4.1) [15].

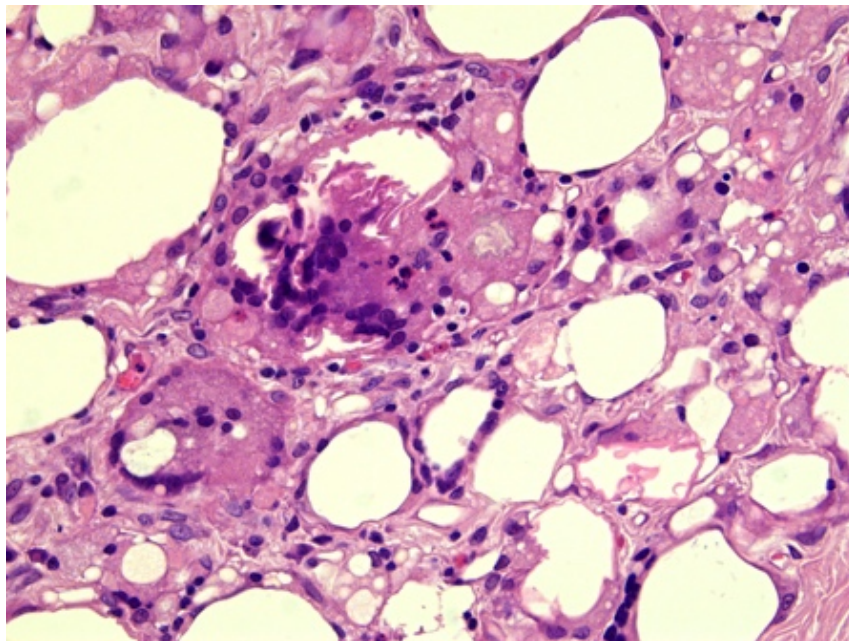


Рисунок 4.1 – Контрольная группа, 1 месяц. Прорастание жировой ткани имплантата соединительной тканью. В центре – многоядерная гигантская клетка, отмечается также лимфо-макрофагальная инфильтрация и скопление бесструктурного жира. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 400

При фазово-контрастной микроскопии выявляются коллагеновые волокна растущей соединительной ткани и многочисленные крупные и мелкие жировые капли, оставшиеся после резорбции жировой ткани (Рисунок 4.2) [15].

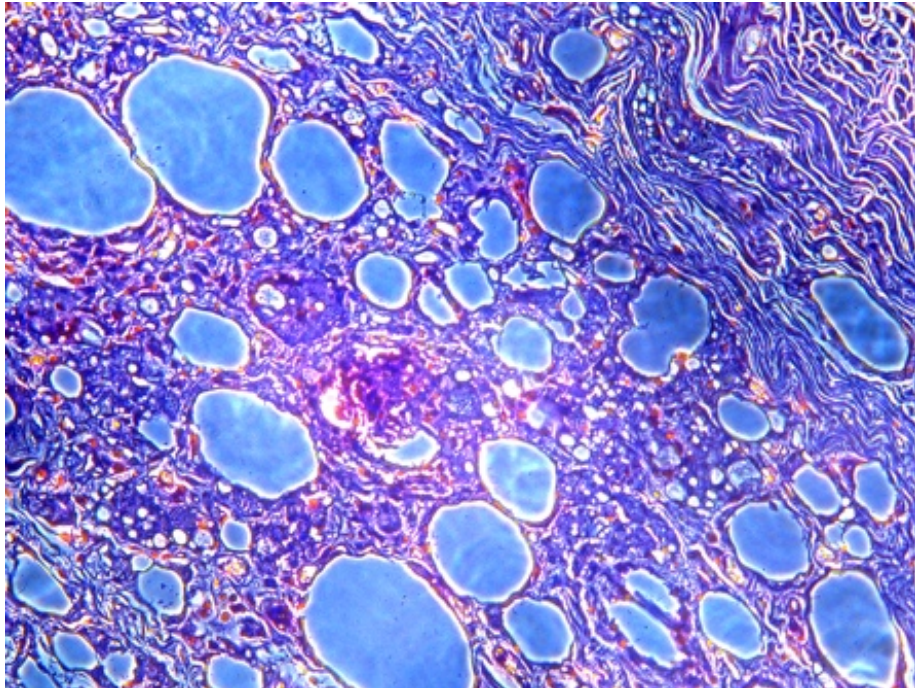


Рисунок 4.2 – Контрольная группа, 1 месяц. При фазово-контрастной микроскопии отчетливо видны мелкие жировые капли в жировой ткани, пророщенной соединительной тканью. Ув. x 200

К 3 месяцам после операции значительно усилилась как резорбция жира, так и замещение его фиброзной соединительной тканью. Объем жировой ткани резко сокращался (Рисунок 4.3) [15].

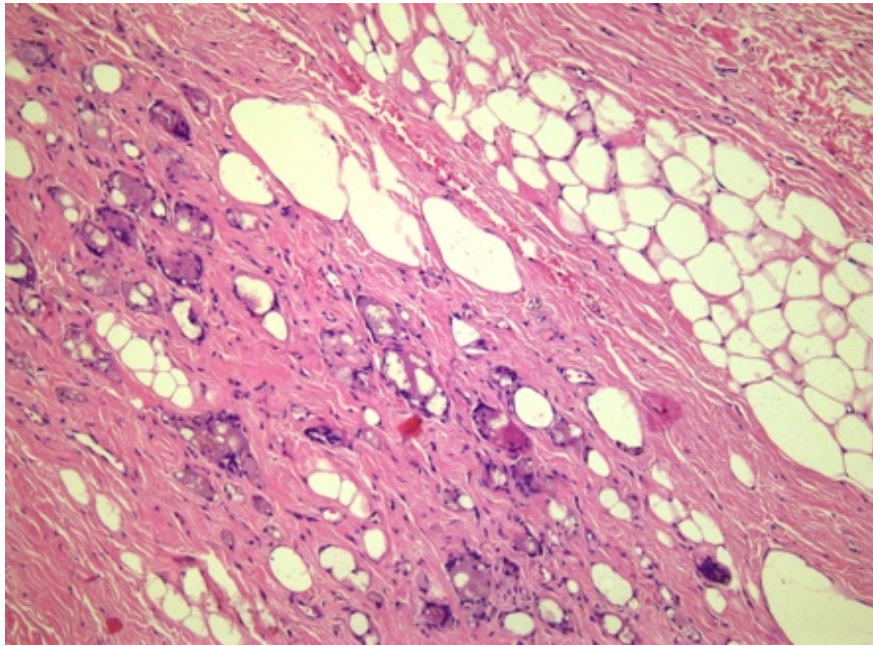


Рисунок 4.3 – Контрольная группа, 1 месяц. Прорастание тканей жирового имплантата фиброзной соединительной тканью с отдельными гигантскими клетками. Окраска гематоксилином и эозином, ув. x 100

Через 6 месяцев в 4 из 5 случаев жир в ушной раковине уже не обнаруживался. В заместившей его фиброзной соединительной ткани выявлялись признаки обратного развития фиброза (инволюции), у части животных оставались олеогранулемы – гранулемы из фагоцитирующих жир клеток (Рисунок 4.4) [15].

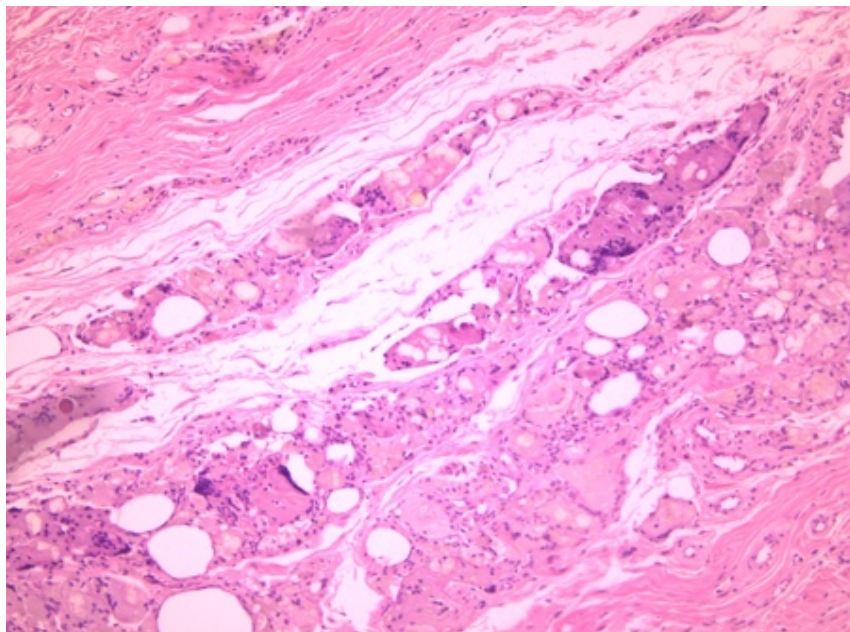


Рисунок 4.4 – Контрольная группа, 6 месяцев. Крупная олеогранулема в фиброзной ткани, заместившей жир. Окраска гематоксилином и эозином, ув. x 200

В опытной группе животных, в которой в жировой ткани аутотрансплантата добавлялись МСК, уже к 1 месяцу только у 2 из 5 животных отмечались незначительные признаки резорбции жира, прорастания соединительной ткани и уменьшение объема трансплантата (Рисунок 4.5) [15].

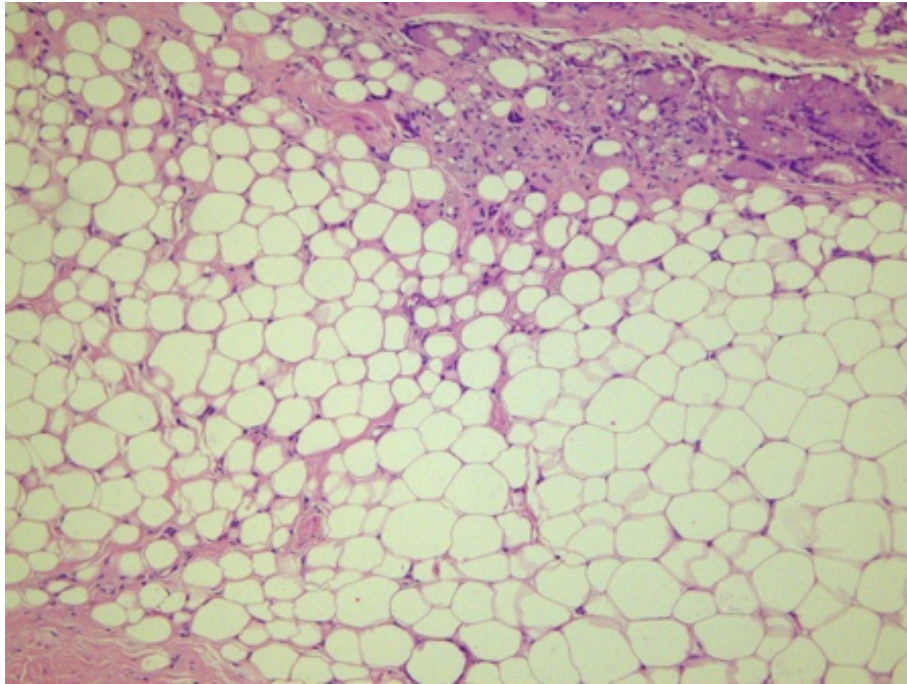


Рисунок 4.5 – Опыт, 1 месяц. Большой участок жировой ткани, внизу – очаг резорбции жира. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 100

В 3 случаях объем жировой ткани почти не уменьшался, резорбция и прорастание соединительной ткани было минимальным. Отмечалась неоваскуляризация области трансплантата, что, возможно, связано с действием сосудистых факторов МСК. В частности, образование новых сосудов происходило в соединительно-тканых септах, разделяющих участки жировой ткани. Улучшенное кровоснабжение и питание жировой ткани, по-видимому, явилось причиной ее замедленной инволюции (Рисунок 4.6) [15].

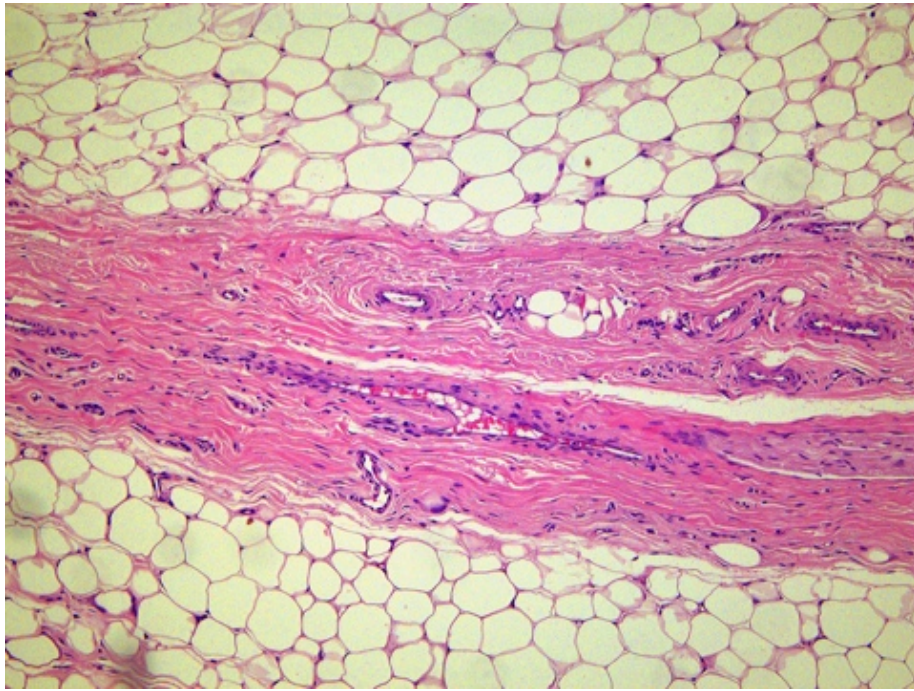


Рисунок 4.6 – Опыт, 1 месяц. Неоваскуляризация в соединительнотканых тяжах. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 100

Через 3 месяца продолжалась васкуляризация области трансплантации (Рисунок 4.7) [15].

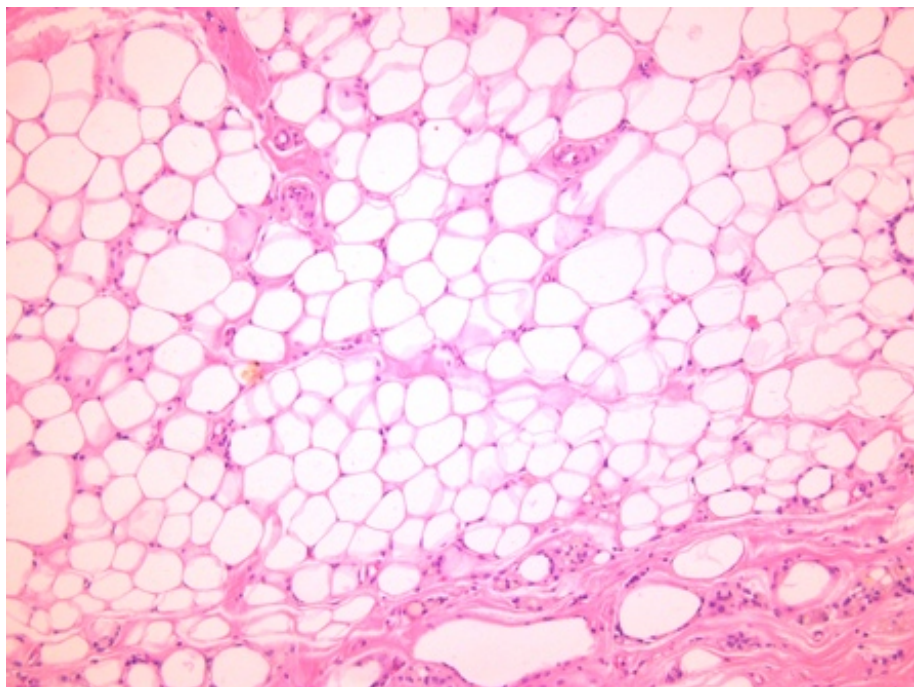


Рисунок 4.7 – Опыт, 3 месяца. Усиленная васкуляризация жировой ткани. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 200

Объем жировой ткани у 3 из 5 животных почти не менялся, резорбция жира и замещение его соединительной тканью были слабо выражены (Рисунок 4.8) [15].

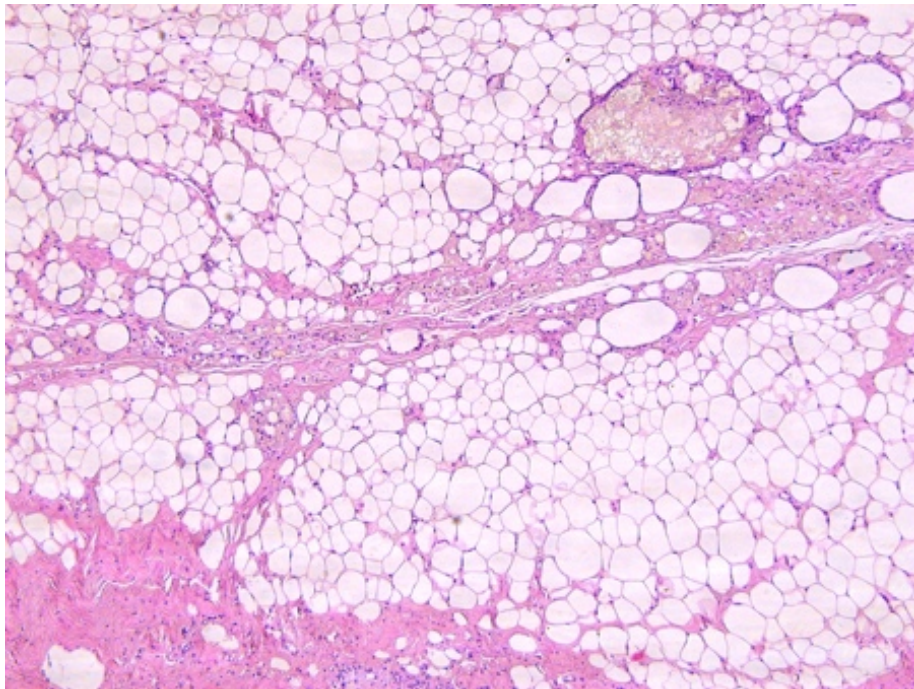


Рисунок 4.8 – Опыт, 3 месяца. Большое количество жировой ткани и очаг резорбции жира. Окраска гематоксилином и эозином, ув. x 50

Только у 2-х кроликов отмечалось уменьшение объема, резорбция и фиброз жирового аутотрансплантата.

Через 6 месяцев содержание жировой ткани в ушной раковине уменьшается, но остается значительно больший ее объем, чем в контрольной группе на этот срок (Рисунок 4.9) [15].

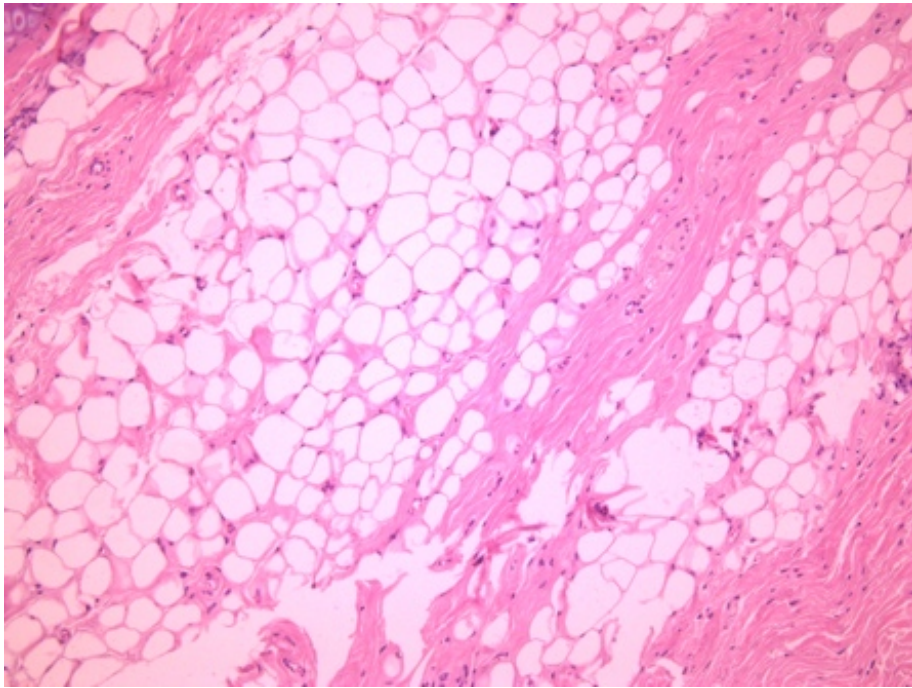


Рисунок 4.9 – Опыт, 6 месяцев. Относительно крупные конгломераты жировой ткани. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 100

Отмечается еще большее новообразование сосудов как в соединительно-тканых перегородках, так и в самой жировой ткани. Только у одного животного жировая ткань почти исчезает (Рисунок 4.10) [15].

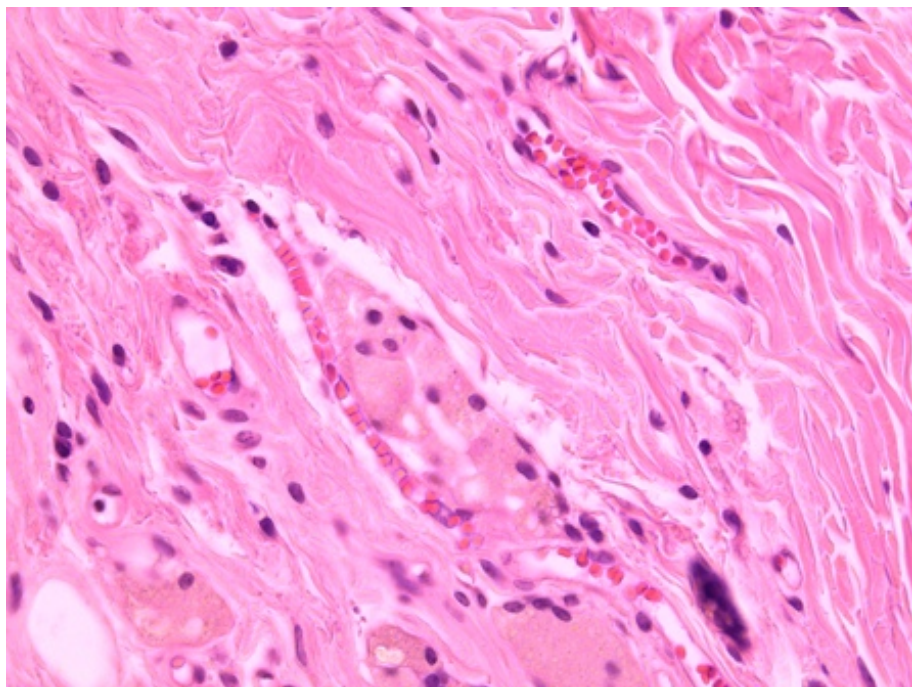


Рисунок 4.10 – Опыт, 6 месяцев. Большое количество микрососудов с эритроцитами в просвете. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 400

Таблица 4.1 – Бальная оценка морфологических признаков изменения ушной раковины: контроль – пересадка аутотрансплантата без обогащения, опыт – пересадка аутотрансплантата, обогащенного стволовым клетками

	Уменьшение объема		Резорбция		Фиброз		Сумма	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1 месяц								
1a	1	1	1	1	1	1		
2a	2	2	2	2	2	2		
3a	3	2	3	2	3	2		
4a	1	1	0	1	1	0		
5a	2	1	2	2	1	1		
Сумма баллов гр.	9	7	8	8	8	6	25	21
3 месяца								
1b	4	2	3	3	4	2		
2b	4	2	1	2	4	2		
3b	3	1	2	2	4	1		
4b	4	1	2	2	3	1		
5b	3	2	2	2	3	2		
Сумма баллов гр.	18	8	10	11	18	8	46	27
6 месяцев								
1c	4	2	1	1	2	2		
2c	4	2	1	2	2	3		
3c	3	2	3	2	2	3		
4c	4	3	1	3	4	2		
5c	4	2	3	2	3	3		
Сумма баллов гр.	19	11	9	10	13	13	41	34

Представленная Таблица 4.1 бальной оценки подтверждает положительное влияние мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость пересаженного аутотрансплантата. Стоит отметить, что на ранних сроках (1 месяц) проявления резорбции, фиброза и общего уменьшения не столь значительны, как на более отдаленных сроках. При этом в некоторых случаях и в опытной группе отмечалась значительная потеря пересаженного материала, что требует более детальной оценки.

4.2. Статистический анализ полученных результатов

Нормальность распределения значений параметров в исследуемых группах для оценки достоверности полученных результатов оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Так как распределение отличалось от нормального, данные представлены в виде медиан Me , верхних и нижних квартилей $Q1$ и $Q2$ вариационного ряда. Для выявления меж- и внутригрупповых различий использовали двусторонние непараметрические тесты: тест Манна-Уитни для сравнения двух групп, ранговый дисперсионный анализ Краскала-Уоллеса и тест Тьюки для сравнения трех и более групп. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$.

В контрольных группах уменьшение объема через 6 месяцев после операции было статистически значимо по сравнению с 1 месяцем ($p < 0,05$). В опытных группах объем значимо не уменьшался ($p = 0,09$) и достоверно отличался от контрольных значений через 3 месяца ($p = 0,008$) и 6 месяцев после операции ($p < 0,001$) (Таблица 4.2, Рисунок 4.11).

Таблица 4.2 – Уменьшение объема жировых аутотрансплантатов

Срок операции	после	Контроль		Опыт		Значимость различий
		N	Me (Q ₁ ; Q ₃)	n	Me (Q ₁ ; Q ₃)	
1 месяц		5	2,0 (1,0; 2,25)	5	1,0 (1,0; 2,0)	$p_{ок} = 0,397$ $p_{к1-6} < 0,05$
3 месяца		5	4,0 (3,0; 4,0)	5	2,0 (1,0; 2,0)	$p_{ок} = 0,008$
6 месяцев		5	4,0 (3,75; 4,0)	5	2,0 (2,0; 2,25)	$p_{ок} < 0,001$

Примечание: $p_{ок}$ – достигнутая значимость различий между контрольной и опытной группой; $p_{к1-6}$ – достигнутая значимость различий между контрольными группами через 1 и 6 месяцев после операции

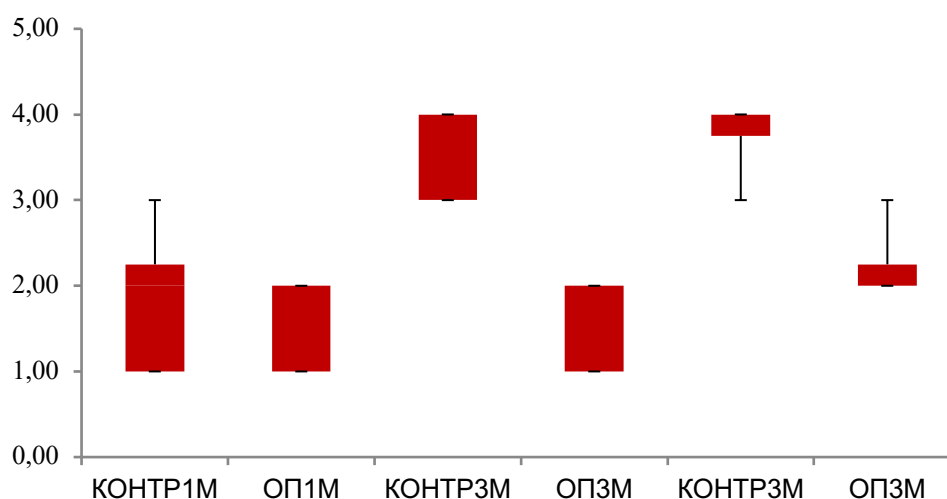


Рисунок 4.11 – Балльная оценка уменьшения объема в контрольных и опытных группах. Представлены верхние и нижние квартили вариационного ряда (боксы), а также максимальные и минимальные значения. По оси абсцисс – группы, по оси ординат – величина балльной оценки. КОНТР – контрольные группы (красные), ОП – опытные группы (голубые). 1М, 2М, 3М – соответственно 1, 3 и 6 месяцев после операции

Степень резорбции в опытных и контрольных группах статистически значимо не различалась на всех сроках исследования (Таблица 4.3, Рисунок 4.12).

Таблица 4.3 – Балльная оценка резорбции жировых аутрансплантатов

Срок операции	после	Контроль		Опыт		Значимость различий
		n	Me (Q ₁ ; Q ₃)	n	Me (Q ₁ ; Q ₃)	
1 месяц		5	2,0 (0,75; 2,25)	5	2,0 (1,0; 2,0)	$p_{ок} = 1,000$
3 месяца		5	2,0 (1,75; 2,25)	5	2,0 (2,0; 2,25)	$p_{ок} = 0,690$
6 месяцев		5	1,0 (1,0; 3,0)	5	2,0 (1,75; 2,25)	$p_{ок} = 0,690$

Примечание: $p_{ок}$ – достигнутая значимость различий между контрольной и опытной группой

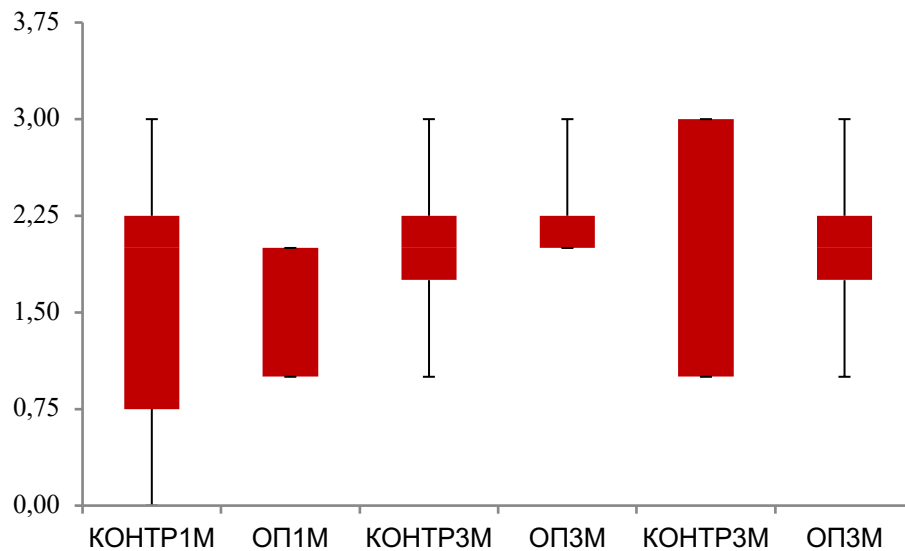


Рисунок 4.12 – Балльная оценка резорбции в контрольных и опытных группах. Обозначения те же, что на Рисунке 4.11

Выраженность фиброза в контрольных группах через 3 месяца после операции была значимо больше, чем через 1 месяц ($p < 0,05$). В экспериментальной группе степень фиброза достоверно возростала только через 6 месяцев после операции ($p < 0,05$). Через 3 месяца после операции выраженность фиброза в опытной группе была значимо меньше, чем в контрольной ($p = 0,008$), через 6

месяцев различия в степени фиброзирования в опытной и контрольной группе были недостоверными ($p = 0,690$) (Таблица 4.4, Рисунок 4.13).

Таблица 4.4 – Балльная оценка фиброзирования жировых аутотрансплантатов

Срок операции	после	Контроль		Опыт		Значимость различий
		n	Me (Q ₁ ; Q ₃)	n	Me (Q ₁ ; Q ₃)	
1 месяц		5	1,0 (1,0; 2,25)	5	1,0 (0,75; 2,0)	$p_{ок} = 0,486$ $p_{к1-3} < \mathbf{0,05}$ $p_{о1-6} < \mathbf{0,05}$
3 месяца		5	4,0 (3,0; 4,0)	5	2,0 (1,0; 2,0)	$p_{ок} = \mathbf{0,008}$
6 месяцев		5	1,0 (2,0; 3,25)	5	3,0 (2,0; 3,0)	$p_{ок} = 0,841$

Примечание: $p_{ок}$ – достигнутая значимость различий между контрольной и опытной группой; $p_{к1-3}$ – достигнутая значимость различий между контрольными группами через 1 и 3 месяца после операции; $p_{о1-6}$ – достигнутая значимость различий между опытными группами через 1 и 6 месяцев после операции

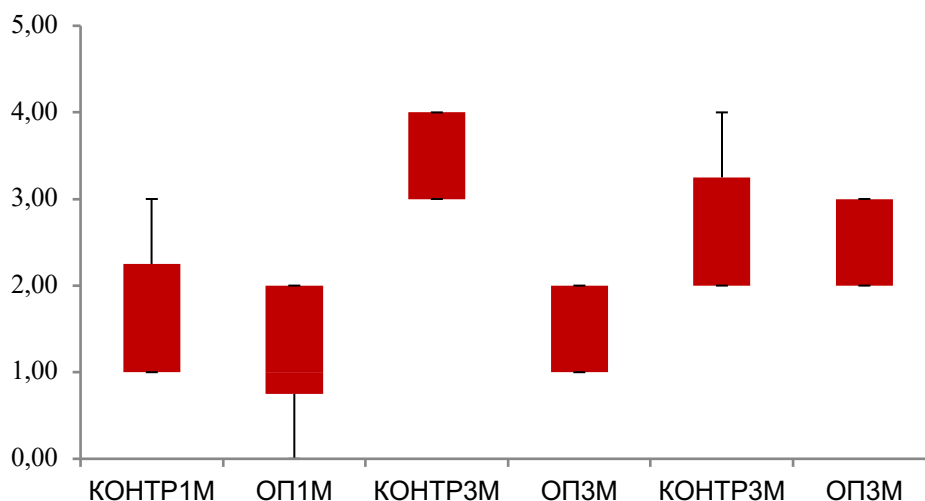


Рисунок 4.13 – Балльная оценка фиброзирования в контрольных и опытных группах. Обозначения те же, что на Рисунке 4.11

Таким образом, в результате проведенных исследований достоверно доказано положительное влияние стволовых клеток на приживание жировых аутотрансплантатов. Исследование жировой ткани на сроках 30 дней после

пересадки позволяет сделать следующие заключения: в контрольной группе, где выполнялась аутотрансплантация чистой жировой ткани, в ткани имплантата постепенно усиливались фиброзные процессы. Жировая ткань частично заместила фиброзным компонентом. Скопление незрелых адипоцитов на этих же сроках значительно выше, в сравнении с более долгими сроками. При этом в опытной группе явления фиброза на всех сроках значительно ниже. Соединительная ткань лишь в небольшой степени замещала жировую, там меньше скапливались незрелые адипоциты, значительно усиливалась васкуляризация и, в конечном итоге, лучше сохранялась жировая ткань трансплантата.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СКЖТ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРИЖИВАЕМОСТИ ЖИРОВЫХ АУТОТРАНСПЛАНТАТОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

5.1. Обоснование полученных результатов сравнительного исследования влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов

Проведенное нами исследование представляет широкую картину патоанатомических механизмов, происходящих на разных сроках, что позволяет сделать многочисленные выводы и предположения, подтверждения которым мы нашли в различных современных международных исследованиях.

На сроках 30 дней после пересадки в обеих ушных раковинах сохранялось значительное количество пересаженного материала, однако уже имелись признаки механизмов резорбции – мы отмечали признаки инфильтрации области макрофагами и гигантскими клетками, а также прорастанием трансплантата соединительной тканью [15]. Исходя из гистологической картины, можно сделать косвенные выводы о том, что основные механизмы реваскуляризации происходят ранее. Это подтверждается исследованием команды специалистов во главе с Nishimura T. (2009), где они пересаживали собственную жировую ткань мышей для дальнейшей гистологической оценки механизмов реваскуляризации и уменьшения объема графтов на различных временных промежутках – 2, 7, 30, 90 и 180 днях. Авторы пришли к выводу, что пересаженные графты получают часть необходимого «питания» из интерстициальной жидкости в первые 4 дня, но продолжают находиться в состоянии выраженной гипоксии на этих сроках. Это состояние, в свою очередь, запускает механизмы ангиогенеза с выработкой таких факторов роста, как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – мощного специфического митогена, выделяемого опухолевыми клетками, макрофагами, кератиноцитами и гладкомышечными клетками. Авторы считают, что VEGF

является основным фактором, способствующим реваскуляризации, несмотря на наличие иных факторов роста, подтверждая это количеством вновь генерируемых сосудов в сравнении с экспрессией VEGF [112].

В контрольной группе на сроках 30 дней отмечается значительное улучшение выживаемости графтов, а также снижение воспалительных и резорбционных механизмов. Снижение воспалительной реакции связано с паракринными свойствами МСК, которые синтезируют медиаторы, уменьшающие признаки воспаления. Что же касается снижения резорбции пересаженного материала, то здесь стоит отметить наличие двух основных теорий позитивного воздействия МСК. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что в условиях апоптоза и ишемии МСК делятся, мигрируют и дифференцируются в адипоциты и сосудистые клетки в качестве компенсации изменений, происходящих в процессе ремоделирования реципиентной области [67,88,91,110,155]. Однако, представление о том, что пересаженные стволовые клетки обладают способностью самостоятельно дифференцироваться для замены поврежденных адипоцитов, эндотелиальных клеток и остеобластов постепенно оспаривается. Более поздние исследования утверждают, что для восстановления перфузии в ишемизированных тканях МСК высвобождают растворимые медиаторы паракринным способом [19,61]. Предполагается, что эти медиаторы и ангиогенные факторы, а не сами МСК, могут быть главным образом ответственны за трофический, регенеративный и противовоспалительный эффект, проявляющийся в тот момент, когда МСК находятся в ишемизированных гипоксией тканях. Благодаря экспрессии трофических факторов и иммуномодулирующих медиаторов, включая сосудистый эндотелиальный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста-1, повышается ангиогенез, плотность капилляров и, следовательно, выживаемость трансплантата [18,48,95,146,153]. Хотя оба механизма подтверждены рядом исследований *in vitro* и в клинических исследованиях, наука все еще находится в стадии изучения и остается противоречивой, поскольку до сих пор не ясно, является ли этот

ангиогенетический эффект результатом собственной дифференцировки МСК или изменением микросреды тканей.

В контрольной группе на 3-х месяцах после пересадки жировой ткани отмечалось резкое уменьшение объема пересаженного материала, а уже на 6 месяцах жировой ткани практически не определялось в 4 из 5 случаев. Мы связываем это с продолжающимся апоптозом – запрограммированной гибелью клеток, вызванной генетически преобразованными сигналами. Хотя ранняя потеря объема может объясняться явлениями острого некроза, апоптоз должен быть причиной потери объема в более поздний период. Апоптотические клетки наблюдались с 30-го дня, что может объяснить длительное снижение количества адипоцитов. Далее мертвые клетки и липидные капли были удалены макрофагами, что объясняет продолжающуюся потерю пересаженного материала. В условиях стабильной ишемии тканей апоптоз индуцируется цитокинами, инсулином, кортикостероидами и повышением температуры [30]. Клинические исследования потери веса среди онкологических больных на поздних стадиях показали, что оно вызвано фактором некроза опухоли- α , выделяемым опухолевыми клетками, которые запускают механизмы апоптоза адипоцитов [30].

На отдаленных сроках в контрольной группе остается более значимое количество пересаженных графтов с более выраженной капиллярной плотностью. Это подтверждает клиническую эффективность применения СКЖТ с целью позитивного влияния на механизмы реваскуляризации и снижения резорбции.

5.2. Онкологическая настороженность использования мезенхимальных стволовых клеток для обогащения жировой ткани

Согласно статистике членов Американского общества пластических хирургов, в США в 2016 году было выполнено более 30000 трансплантаций жировой ткани с реконструктивными целями. Учитывая современные тенденции возросшего внимания исследователей к клеточному потенцированию, вероятно, количество подобных операций будет увеличиваться, а вместе с тем все более

остро будет возникать вопрос онкологической безопасности. Основные исследования данного аспекта в мировой научной литературе связаны с реконструктивно-пластическими операциями среди пациенток, перенесших онкологию молочной железы.

Ранние серии исследований, в которых рассматривались и эстетические, и реконструктивные случаи пересадки жировой ткани показали, что заболеваемость раком груди не увеличилась [73]. Однако в них рассматривались различные подгруппы, включая пациентов с органосохраняющими операциями и повышенными рисками рецидивов, с недостаточным количеством онкологических данных, что затрудняет объективную оценку. Однако в более поздних исследованиях онкологическая безопасность трансплантации жировой ткани подтвердилась в сериях работ среди пациентов с перенесенным раком молочной железы и прошедших реконструкцию молочной железы. Kronowitz S.J. et al. (2016) с соавторами сообщили о сравнительном исследовании большой группы пациентов – 719 наблюдений реконструкции с использованием пересадки жировой ткани и контрольной группы из 670 наблюдений без использования трансплантации жира. Авторы не обнаружили значительных различий в частоте локорегиональных рецидивов или системных заболеваний. В группе липотрансфера было проведено 305 профилактических мастэктомий, в том числе у пациентов с известными мутациями BRCA, и не было выявлено первичного рака груди после отсроченной трансплантации жира [101].

Ученые из Европейского института онкологии сообщили о полученных результатах трансплантации жира в область груди, где во всех исследованиях, за исключением одной работы, не выявлено связи между повышенными рисками рецидива или развитием метастатических процессов и аутоотрансплантацией жировой ткани [71,72,102,157]. В наиболее поздней публикации Petit J.Y. et al. (2017) исследовали 322 случая лечения интраэпителиальных неоплазий в течение 7 лет, и сообщили об отсутствии статических различий в локорегиональном рецидиве [72].

В отличие от случаев радикального иссечения, органосохраняющие операции подвержены повышенному риску рецидива под воздействием клеток-предшественников из жировой ткани или цитокинов в трансплантате обработанной ткани [57]. Juhl A.A. et al. (2018), напротив, сообщили о позитивных изменениях при оценке лабораторных изображений среди 42 пациентов, перенесших отсроченную трансплантацию аутологичного жира после органосохраняющих операций на молочной железе. Среди клинически важных наблюдений они отметили высокий уровень кист (85 процентов) и кальцификатов (21 процент) при последующих исследованиях [97]. Hanson S.E. et al. (2020) опубликовали данные ретроспективного исследования за период с 2006 по 2012 год, в котором проанализировали 72 случая отсроченной трансплантации жировой ткани после органосохраняющих резекций молочной железы. Авторы не нашли значимых различий в частоте формирования кист, некрозов, кальцификатов и рецидивов [125].

Таким образом, несмотря на значительное количество публикаций, в настоящее время в научной литературе нет завершенных рандомизированных проспективных исследований, касающихся использования мезенхимальных стволовых клеток с целью обогащенной пересаживаемой жировой ткани, что оставляет вопрос открытым и крайне актуальным. Но уже сейчас можно сделать весомые выводы о безопасности и крайней востребованности аутотрансплантации жировой ткани [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пересадка жировой ткани является крайне актуальным методом восполнения недостатка объемов мягких тканей и коррекции контурных дефектов в силу нескольких ключевых факторов, играющих решающую роль в рутинной хирургической практике – пересаживаемый материал легок в получении, доступен для забора в значительных количествах и является аутогенным, что исключает за собой все потенциальные риски при использовании искусственных материалов. Это объясняет широкое применение данной методики и развитие различных техник обработки и пересадки собственного жира в нынешней практике пластических хирургов. Между тем, с распространением данного метода, специалисты отметили довольно частое формирование локальных кальцификатов, нередко принимаемых за признаки озлокачествленных процессов, а также значительную степень резорбции пересаженного материала [9].

Гистологические исследования механизмов резорбции предполагают, что триггером дегенеративных изменений, в том числе разрушения ядер и мембран адипоцитов, является поздняя реваскуляризация, происходящая не ранее, чем через 48 часов с момента пересадки аутографтов. Впоследствии происходит образование жировых кист и кальцификатов, которые подвергаются постепенной резорбции клетками лейкоцитарного ряда. Признаки данных механизмов хорошо прослеживаются и описаны в полученных нами гистологических средах как на ранних (1 месяц), так и на более поздних сроках (3, 6 месяцев) в виде тотальной резорбции пересаженных аутотрансплантатов [10].

Одним из возможных методов воздействия на механизмы реваскуляризации является клеточная терапия. Среди известных методов мы выделяем два основных направления клеточной стимуляции, которые имеют наибольшую практическую значимость, – пролиферативно-стимулирующее действие обогащенной тромбоцитами аутоплазмы и стимуляцию приживаемости аутотрансплантатов жировой ткани ее обогащением стволовыми клетками. При

проведении данного эксперимента нами оценены возможности использования мезенхимальных стволовых клеток при пересадке собственной жировой ткани. Исследования показывают, что мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга и стволовые клетки жировой ткани не отличаются по морфологии, иммунному фенотипу и способности к дифференциации. В то же время СКЖТ более доступны для выделения и использования в клинике. В то время как в костном мозге взрослого человека на 50 000–1 000 000 клеток приходится всего одна мезенхимальная стволовая клетка, в жировой ткани содержание СК составляет 1 на 30–1000 клеток [35]. Жировую ткань, таким образом, можно считать привлекательным альтернативным источником СК, поскольку она может быть собрана в больших количествах как из фрагментов жировой ткани, так и методом липосакции [10].

Многочисленные исследования в смежных специальностях выявили высокую эффективность применения стволовых клеток жировой ткани в лечении сахарного диабета, цирроза печени, сердечно-сосудистых заболеваний и ишемий нижних конечностей. Также СКЖТ успешно использовались при лечении аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит), рассеянного склероза и восстановлении костных тканей. Относительная доступность получения СКЖТ и перспективы прикладного применения клеточных технологий в вопросах реконструкции и восполнения дефектов мягких тканей, а также неоднозначность получаемых результатов среди научных исследований побудили нас к изучению влияния СКЖТ на приживление жировых аутотрансплантатов [10]. Нами установлено достоверное положительное влияние прогениторных клеток на механизмы приживления и сохранения объема пересаженных графтов [15].

Материалом для изучения и получения препаратов нами были отобраны лабораторные животные в количестве 30 кроликов породы «Шиншилла», в возрасте от 1 до 2 лет (в среднем 1,4 года). Данные лабораторные животные являются универсальной экспериментальной моделью для пересадки жировой ткани, т. к. имеют необходимые преимущества – небольшой размер, технически

легкодоступные локальные жировые отложения, а также удобную для объективной оценки реципиентную зону в виде ушных раковин.

Исследование включало в себя 3 серии экспериментов, в каждой из которых использовали 10 кроликов. Первым этапом проводилось получение липоаспиарата и культивирование стволовых клеток жировой ткани в лаборатории. Выведение и культивирование СЖКТ проводили по специальному протоколу [47], в соответствии с которым через 30 дней получали суспензию стволовых клеток количеством 3×10^5 клеток в 200 мкл физиологического раствора. Далее в 2 этапа проводилась пересадка собственной жировой ткани в область ушных раковин. Для более точной сравнительной оценки в ушные раковины каждого лабораторного животного вводился материал по отработанной технологии – в правую ушную раковину чистую жировую ткань, в левую – жировую ткань, обогащенную мезенхимальными стволовыми клетками [15]. Полученные материалы были разделены на три группы, основываясь на разных сроках динамической гистологической оценки – один, три, шесть месяцев. Также нами были выделены две подгруппы – контрольная (без добавления стволовых клеток) и опытная (с добавлением стволовых клеток).

Через 1, 3, 6 месяцев кроликов выводили из опыта, вырезали фрагмент ушной раковины в области имплантации жира и далее проводили подготовку гистологического материала. После фиксации в 10% нейтральном формалине заливали в парафин. Далее парафиновые срезы толщиной 4–5 мк окрашивали гематоксилином и эозином для дальнейшей оценки на микроскопе Leica DM4000 В LED. Помимо классической оценки под увеличением нами были проведены также фазово-контрастная микроскопия и микроскопия темного поля.

Гистологическая оценка включала в себя следующие параметры:

- 1) уменьшение объема жировой ткани;
- 2) резорбция жировой ткани макрофагами и гигантскими клетками;
- 3) прорастание жировой ткани соединительной тканью.

Оценку осуществляли по бальной системе:

0 – нет отличий от интактной ушной раковины;

- 1 – минимальные отличия от интактной ушной раковины;
- 2 – умеренные изменения;
- 3 – выраженные изменения;
- 4 – максимальные изменения.

При динамическом гистологическом изучении Контрольной группы нами полностью были подтверждены основные известные принципы и механизмы приживления и резорбции пересаженной жировой ткани. На этапе первого месяца нами были отмечены незначительные проявления склеторических изменений в пересаженных материалах – в основном, краевые фибротические изменения и замещение соединительной тканью. При этом основной объем пересаженного материала сохранялся. Но в дальнейшем, на этапах трех и шести месяцев, признаки фиброза и резорбции крайне прогрессировали, а в некоторых случаях нами было отмечено формирование олеогранулем, которые впоследствии эвакуировались макрофагальными клетками. Все упомянутые механизмы в значительной степени повлияли на качество и общий объем пересаженного материала, в некоторых случаях снижая его до незначительных остаточных объемов [15].

В подавляющем большинстве наблюдений в Опытной группе добавление взвеси мезенхимальных стволовых клеток в пересаживаемый материал крайне положительно влияло на все 3 оцениваемых аспекта. На этапе первого месяца сравнительная оценка не показала значительной разницы между Контрольными и Опытными группами. Но уже на этапе трех и шести месяцев при оценке ишемизированных участков жировой ткани прослеживались плюрипотентные качества мезенхимальных стволовых клеток, а именно: возможность дифференцироваться в преадипоциты и адипоциты, регенерируя собственно жировую ткань; в эндотелиальные клетки сосудов, тем самым стимулируя процессы неоангиогенеза; стимулировать выброс факторов роста в окружающие ткани, снижая эффекты гипоксии и ишемии. Это подтверждает непосредственное участие мезенхимальных стволовых клеток в стимуляции выживаемости аутотрансплантата посредством неоангиогенеза, а также поддержание объема

адипоцитов посредством перерождения в данные типы клеток на ранних стадиях, компенсируя их потерю в ишемизированных участках. Более того, нам представляются верными предположения коллег о влиянии факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), выделяемыми мезенхимальными стволовыми клетками, исходя из увеличения общей капиллярной плотности в пересаженных графтах [15].

Полученные нами результаты подробного изучения влияния мезенхимальных стволовых клеток на пересаженный липоаспират были проанализированы с использованием статической обработки. В результате проведенного исследования было достоверно доказано положительное влияние прогениторных клеток на приживание жировых аутотрансплантатов и снижение механизмов резорбции. Исследование жировой ткани на сроках 30 дней после пересадки позволяет сделать следующие заключения: в контрольной группе, где выполнялась аутотрансплантация чистой жировой ткани, в ткани имплантата постепенно усиливались фиброзные процессы. Жировая ткань частично заместила фиброзным компонентом. Скопление незрелых адипоцитов на этих же сроках значительно выше, в сравнении с более долгими сроками. При этом в опытной группе явления фиброза на всех сроках значительно ниже. Соединительная ткань лишь в небольшой степени замещала жировую, там меньше скапливались незрелые адипоциты, значительно усиливалась васкуляризация и, в итоге, лучше сохранялась жировая ткань трансплантата.

Результаты проведенного экспериментального исследования показали, что обогащение пересаженной жировой ткани мезенхимальными стволовыми клетками позволяет не только усовершенствовать стандартную процедуру липофилинга, но и значительно повлиять на выживаемость жировых трансплантатов за счет усиления неоваскуляризации, снижения явлений резорбции и фиброза последних. Применение в пластической хирургии и регенеративной медицине инновационных клеточных технологий может позволить достичь стабильных результатов в коррекции дефектов мягких тканей лица и тела в результате однократного проведения пересадки жировой ткани [15].

Тем не менее, необходимо дальнейшее изучение и проведение обширных доклинических и клинических исследований с целью увеличения эффективности исследуемого метода и расширение знаний в технических аспектах, таких как симультанное использование различных стимулирующих факторов роста, исследование их оптимальных концентраций, а также более точное понимание реципиентной емкости и плотности пересаживаемого материала.

Анализ результатов проведенного исследования влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов позволил сделать выводы и сформулировать практические рекомендации.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная экспериментальная модель достоверно показала, что пересадка собственной жировой ткани является клинически значимым и перспективным хирургическим методом для восполнения дефектов мягких тканей различного расположения и этиологии, имея обширное поле для научных изысканий и возможностей воздействия на клеточном уровне.
2. Проведенное исследование показало, что разработанная экспериментальная модель позволяет эффективно оценить процессы приживаемости жировых аутотрансплантатов в разрезе всех исследуемых факторов. Однако, некоторые неудачные случаи приживления жировой ткани в реципиентной зоне связаны, на наш взгляд, с отсутствием значительного количества жировой прослойки в ушной раковине, что является неблагоприятным условием для процессов реваскуляризации.
3. Разработанная методика выделения мезенхимальных стволовых клеток позволяет получить жизнеспособные клетки собственной жировой ткани с целью их дальнейшей транспортировки и хирургической пересадки.
4. Разработанная модель позволила наглядно продемонстрировать, что хирургическая пересадка собственной жировой ткани с использованием СКЖТ является клинически значимым и перспективным методом, однако выделение СКЖТ в лабораторных условиях требует времени и диктует необходимость этапности исследования.
5. Сравнительный гистологический анализ препаратов пересаженной жировой ткани необходимо оценивать, исходя из трех наиболее важных клинических показателей – явлений фиброза, резорбции и остаточного объема. Использование стволовых клеток жировой ткани достоверно оказало положительное влияние на все указанные механизмы.
6. Применение в пластической хирургии и регенеративной медицине инновационных клеточных технологий может позволить достичь стабильных

результатов в коррекции дефектов мягких тканей лица и тела в результате однократного проведения пересадки жировой ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Аутотрансплантацию жировой ткани следует применять как эффективный и относительно доступный метод хирургического восполнения дефицита мягких тканей в тех случаях, когда требуется восполнить ограниченный объем. Однако для улучшения приживаемости стоит учитывать концепцию “fat-to-fat” для получения более эффективного результата.
2. Наиболее точным и прогнозируемым методом культивирования мезенхимальных стволовых клеток является лабораторный. Однако он требует значительного времени, что резко снижает его практическое применение в хирургической практике.
3. Использование СКЖТ при пересадке жировой ткани оказывает достоверное положительное влияние на все механизмы приживления пересаженного материала, что подтверждает целесообразность их использования в хирургической практике с целью стимуляции приживляемости аутотрансплантатов.
4. Гистологическое исследование определило значительную разницу в механизмах приживления аутотрансплантатов на всех этапах исследования, что подтверждает актуальность их применения при проведении подобных операций. Однако для более точной оценки патогенетических механизмов стоит внедрить практику клеточного типирования.
5. Для эффективной очистки жировой ткани рекомендован метод центрифугирования 1300 об/мин в течение 1,5 минут, что позволяет сохранить жизнеспособность адипоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОТ – аутоплазма, обогащенная тромбоцитами

ЖТ – жировая ткань

СВКФ – стромальная васкулярная клеточная фракция

СКЖТ – стволовые клетки жировой ткани

ФР – факторы роста

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

EGF – фактор роста эпителия

FGF – фактор роста фибробластов

IGF – инсулиноподобный фактор роста

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TGF – трансформирующий фактор роста

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

HGF – фактор роста гепатоцитов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемьев, А.А. Липофилинг с обогащением жира стволовыми клетками. Обзор / А.А. Артемьев // Пластическая хирургия и косметология. – 2010. – № 2. – С. 205–207.
2. Влияние различных режимов обработки аспирированной жировой ткани на ее морфологическую структуру / В.И. Малаховская, З.Ю. Висаитова, Е.И. Гоуфман, А.А. Гусев // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2009. – № 2. – С. 10–15.
3. Даштоян, Г.Э. Исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов: актуальность, эффективность, онконастороженность / Г.Э. Даштоян, О.И. Старцева // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2022. – № 8. – С. 164–173.
4. Дзампаева, И.Р. Обоснование применения структурного липофилинга при лечении пациентов с врожденными и приобретенными дефектами и деформациями челюстно-лицевой области : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.14 «Стоматология» / Дзампаева Илона Руслановна; ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2018. – 240 с.
5. Епифанова, М.В. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, в лечении эректильной дисфункции: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.23 «Урология» / Епифанова Майя Владимировна; ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. – Москва, 2016. – 167 с.
6. Захаренко, А.С. Влияние аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, на приживаемость жировых аутотрансплантатов в пластической хирургии: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 «Хирургия» / Захаренко Анна Сергеевна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2018. – 134 с.

7. Зорина, А.И. Применение аутологичного жира, обогащенного стромально-васкулярной клеточной фракцией, для коррекции дефектов мягких тканей (краткий обзор исследований) / А.И. Зорина, В.Л. Зорин // Вестник эстетической медицины. – 2012. – Т. 11. – № 4. – С. 60.
8. Зорина, А.И. PRP в эстетической медицине / А.И. Зорина, В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2013. – № 6. – С. 10–21.
9. Кириллова, К.А. Использование жировых аутотрансплантатов с добавлением аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в пластической хирургии молочных желез: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 «Хирургия» / Кириллова Кира Анатольевна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2018. – 140 с.
10. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: современный взгляд, актуальность и перспективы применения в пластической хирургии / О.И. Старцева, Д.В. Мельников, А.С. Захаренко, К.А. Кириллова, С.И. Иванов, Е.Д. Пищикова, Г.Э. Даштоян // Исследования и практика в медицине. – 2016. – Т. 3. – № 3. – С. 68–75.
11. Мультиспиральная компьютерная томография в оценке жировых аутотрансплантатов в области молочных желез / О.И. Старцева, Н.С. Серова, Д.В. Мельников [и др.] // Российский электронный журнал лучевой диагностики. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 181–189.
12. Перспективы клинического применения стволовых клеток жировой ткани в пластической хирургии и регенеративной медицине. Часть 1 / Н.О. Миланов, О.И. Старцева, А.Л. Истранов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2014. – № 4. – С. 70–76.
13. Перспективы клинического применения стволовых клеток жировой ткани в пластической хирургии и регенеративной медицине. Часть 2 / Н.О. Миланов, О.И. Старцева, А.Л. Истранов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2014. – № 5. – С. 71–74.
14. Пластическая и эстетическая хирургия : последние достижения / пер. с англ.

под ред. А. М. Боровикова ; ред.: М. Эйзенманн-Кляйн, С. Neuhann-Lorenz. – Москва: Практическая медицина, 2011. – 446 с. – Текст: непосредственный.

15. Сравнительное исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость живых аутотрансплантатов путем гистологической оценки в эксперименте на мелких лабораторных животных / О.И. Старцева, Д.И. Мельников, А.Л. Истранов, А.В. Люндуп, М.Е. Крашенинников, А.Б. Шехтер, Г.Э. Даштоян, А.С. Захаренко, К.А. Кириллова, М.Е. Синельников // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2018. – № 4. – С. 12–17.
16. Факторы, влияющие на выживаемость жировых трансплантатов / Н.О. Миланов, О.И. Старцева, Д.В. Мельникова [и др.] // *Вестник службы крови России.* – 2015. – № 1. – С. 62–71.
17. A clinical trial in facial fat grafting: filtered and washed versus centrifuged fat / G. Botti, M. Pascali, C. Botti [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2011. – № 127 (6). – P. 2464–2473.
18. Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia / H. Thangarajah, I.N. Vial, E. Chang [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – № 27 (1). – P. 266–274.
19. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors and enhancing vessel maturation / K. Rubina, N. Kalinina, A. Efimenko [et al.] // *Tissue Eng Part A.* – 2009. – № 15 (8). – P. 2039–2050.
20. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure / M.J. Oedayrajsingh-Varma, S.M. van Ham, M. Knippenberg [et al.] // *Cytherapy.* – 2006. – № 8 (2). – P. 166–177.
21. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical evaluation for cell-based therapies in patients with scars on the face / P. Gentile, B. De Angelis, M. Pasin [et al.] // *J Craniofac Surg.* – 2014. – № 25 (1). – P. 267–272.
22. Al Maksound, A. Combined TRAM flap with latissimus dorsi myocutaneous flap for reconstruction of a largebreast post-radiation induced necrosis / A. Al Maksound, M.

- Moneer, A.K. Barsoum // *J Surg Case Rep.* – 2017. – № 2017 (5). – P. rjx079.
23. Allogeneic cell therapy using umbilical cord MSCs on collagen scaffolds for patients with recurrent uterine adhesion: a phase I clinical trial / Y. Cao, H. Sun, H. Zhu [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2018. – № 9 (1). – P. 192.
24. Alternatively activated M2 macrophages improve autologous Fat Graft survival in a mouse model through induction of angiogenesis / K.D. Phipps, S. Gebremeskel, J. Gillis [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2015. – № 135 (1). – P. 140–149.
25. Amar, R.E. [Adipocyte microinfiltration in the face or tissue restructuration with fat tissue graft] / R.E. Amar // *Ann Chir Plast Esther.* – 1999. – № 44 (6). – P. 593–608.
26. An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects / Y. Har-Shai, E.S. Lindenbaum, A. Gamliel-Lazarovich [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 1999. – № 104 (4). – P. 945–954.
27. Analysis of lipocyte viability after liposuction / M.T. Boschert, B.W. Beckert, C.L. Puckett, M.J. Concannon // *Plast Reconstr Surg.* – 2002. – № 109 (2). – P. 761–765.
28. Andia, I. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies / I. Andia, M. Sánchez, N. Maffulli // *Expert Opin Biol Ther.* – 2012. – № 12 (1). – P. 7–22.
29. Andia, I. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates / I. Andia, M. Abate // *Regen Med.* – 2013. – № 8 (5). – P. 645–658.
30. Apoptosis of human adipocytes in vitro / J.B. Prins, N.I. Walker, C.M. Winterford, D.P. Cameron // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1994. – № 201 (2). – P. 500–507.
31. Arepalli, S.R. Allergic reaction to platinum in silicone breast implants / S.R. Arepalli, S. Bezabeh, S.L. Brown // *J Long Term Eff Med Implants.* – 2002. – № 12 (4). – P. 299–306.
32. Augmentation of adipofascial flaps using the long-term local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1 / E. Yuksel, A.B. Weinfeld, R. Cleek [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2000. – № 106 (2). – P. 373–382.
33. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study / L.L.Q. Pu, S.R. Coleman, X. Cui [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2008. – № 122 (3). – P. 932–937.

34. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery / V. Cervelli, L. Palla, M. Pascali [et al.] // *Aesthetic Plast Surg.* – 2009. – № 33 (5). – P. 716–721.
35. Basic science review on adipose tissue for clinicians / S.A. Brown, B. Levi, C. Lequex [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2010. – № 126 (6). – P. 1936–1946.
36. Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest / J.F. Lalikos, Y.Q. Li, T.P. Roth [et al.] // *J Surg Res.* – 1997. – № 70 (1). – P. 95–100.
37. Bircoll, M. Autologous fat transplantation / M. Bircoll // *Plast Reconstr Surg.* – 1987. – № 79 (3). – P. 492–493.
38. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study / R.K. Khouri, M. Eisenmann-Klein, E. Cardoso [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2012. – № 129 (5). – P. 1173–1187.
39. Breast Augmentation and Reconstruction from a Regenerative Medicine Point of View: State of the Art and Future Perspectives / L.E. Visscher, M. Cheng, M. Chhaya [et al.] // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2017. – № 23 (3). – P. 281–293.
40. Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma / P. Gentile, C. Di Pasquali, I. Bocchini [et al.] // *Surg Innov.* – 2013. – № 20 (4). – P. 370–376.
41. Campbell, G. Cell behaviour during postembryonic pattern regulation in the insect abdomen (*Oncopeltus fasciatus*). I. Regeneration of segment borders / G. Campbell, P. Shelton // *Development.* – 1987. – № 101 (2). – P. 221–235.
42. Carpaneda, C.A. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants / C.A. Carpaneda, M.T. Ribeiro // *Aesthetic Plast Surg.* – 1994. – № 18 (1). – P. 17–19.
43. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells / K. Yoshimura, K. Sato, N. Aoi [et al.] // *Aesth Plast Surg.* – 2008. – № 32 (1). – P. 48–55.
44. Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adiposederived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection / D. Matsumoto, K. Sato, K. Gonda [et al.] //

Tissue Eng. – 2006. – № 12 (12). – P. 3375–3382.

45. Cervelli, V. Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers / V. Cervelli, P. Gentile, M. Grimaldi // *Aesthetic Plast Surg.* – 2009. – № 33 (3). – P. 340–345.

46. Cho, M.J. Predictors, Classification, and Management of Umbilical Complications in DIEP Flap Breast Reconstruction / M.J. Cho, S.S. Teotina, N.T. Haddock // *Plast Reconstr Surg.* – 2017. – № 140 (1). – P. 11–18.

47. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue / J.I. Huang, P.A. Zuk, N.F. Jones [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2004. – № 113 (2). – P. 585–594.

48. Circulation Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells / A. Miranville, C. Heeschen, C. Sengenès [et al.] // *Circulation.* – 2004. – № 110 (3). – P. 349–355.

49. Clinical experience with a fourth-generation textured silicone gel breast implant: a review of 1012 Mentor MemoryGel breast implants / W.G. Stevens, S.J. Pacella, A.J. Gear [et al.] // *Aesthet Surg J.* – 2008. – № 28 (6). – P. 642–647.

50. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells / G. Rigotti, A. Marchi, M. Galie [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2007. – № 119 (5). – P. 1409–1422.

51. Coleman, S.R. Facial recontouring with lipostructure / S.R. Coleman // *Clin Plast Surg.* – 1997. – № 24 (2). – P. 347–367.

52. Coleman, S.R. Structural fat grafts: the ideal filler? / S.R. Coleman // *Clin Plast Surg.* – 2001. – № 28 (1). – P. 111–119.

53. Coleman, S.R. Structural Fat Grafting [Text] / S.R. Coleman. – Quality Medical Publishing, St. Louis, 2004. – 400 p.

54. Coleman, S.R. Structural fat grafting: more than a permanent filler / S.R. Coleman // *Plast Reconstr Surg.* – 2006. – № 118 (3 Suppl). – 108S–120S.

55. Coleman, S.R. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy / S.R. Coleman, A.P. Saboeiro // *Plast Reconstr Surg.* – 2007. – № 119 (3). – P. 775–785.

56. Comparative analysis of the effect of mesenchymal stem cells on viability of

autologous fat transplants by histologic examination of resorption, fibrosis, volume decrease and revascularization of fat grafts: in vivo experiment / O.I. Starceva, D.V. Melnikov, A.L. Istranov, A.V. Lundup, M.E. Kreshennikov, A.B. Shehter, G.E. Dashtoyan, M.Y. Sinelnikov, A.S. Zaharenko, K.A. Kirillova // *Eurasian Journal of Biosciences*. – 2018. – № 12 (2). – P. 303–312.

57. Comparison of breast and abdominal adipose tissue mesenchymal stromal/stem cells in support of proliferation of breast cancer cells / K. Kim, L.E. Escalante, B.A. Dollar [et al.] // *Cancer Invest*. – 2013. – № 31 (8). – P. 550–554.

58. Cost analysis of postmastectomy reconstruction: A comparison of two staged implant reconstruction using tissue expander and acellular dermal matrix with abdominal-based perforator free flaps / B.N.N. Tran, A. Fadayomi, S.J. Lin [et al.] // *J Surg Oncol*. – 2017. – № 116 (4). – P. 439–447.

59. Current Trends in Breast Augmentation: An International Analysis / P.I. Heidekrueger, S. Sinno, D.A. Hidalgo [et al.] // *Aesthet Surg J*. – 2018. – № 38 (2). – P. 133–148.

60. Czerny, V. Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipom / V. Czerny // *Arch f klin Chirurgie*. – 1895. – № 50. – P. 544–550.

61. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy / D.J. Prockop, M. Brenner, W.E. Fibbe [et al.] // *Cytherapy*. – 2010. – № 12 (5). – P. 576–578.

62. Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels / L. Weiser, M. Bhargava, E. Attia, P.A. Torzilli // *Tissue Eng*. – 1999. – № 5 (6). – P. 533–544.

63. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting / T. Oyama, S. Nishimoto, T. Tsugawa, F. Shimizu // *J Oral Maxillofac Surg*. – 2004. – № 62 (5). – P. 555–558.

64. Emerging approaches to the tissue engineering of fat / A.J. Katz, R. Llull, M.H. Hedrick, J.W. Futrell // *Clin Plast Surg*. – 1999. – № 26 (4). – P. 587–603.

65. Enhancing the survival of aspirated human fat injected into nude mice / Y. Ullmann, M. Hyams, Y. Ramon [et al.] // *Plast Reconstr Surg*. – 1998. – № 101 (7). – P. 1940–1944.

66. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating

- fat cells / Y. Ramon, O. Shoshani, I.J. Peled [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2005. – № 115 (1). – P. 197–201.
67. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells / M. Brzoska, H. Geiger, S. Gauer, P. Baer // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – № 330 (1). – P. 142–150.
68. Eppley, B.L. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing / B.L. Eppley, J.E. Woodell, J. Higgins // *Plast Reconstr Surg.* – 2004. – № 114 (6). – P. 1502–1508.
69. Eppley, B.L. Platelet-Rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery / B.L. Eppley, W.S. Pietrzak, M. Blanton // *Plast Reconstr Surg.* – 2006. – № 118 (6). – P. 147e–159e.
70. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice / S. Hamed, D. Egozi, D. Kruchevsky [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – № 5 (11). – P. e13986.
71. Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study / J.Y. Petit, M. Rietjens, E. Botteri [et al.] // *Ann Oncol.* – 2013. – № 24 (6). – P. 1479–1484.
72. Fat Grafting after Invasive Breast Cancer: A Matched Case-Control Study / J.Y. Petit, P. Maisonneuve, N. Rotmensz [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2017. – № 139 (6). – P. 1292–1296.
73. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years / E. Delay, S. Gatson, G. Tousson, R. Sinna // *Aesthet Surg J.* – 2009. – № 29 (5). – P. 360–376.
74. Fournier, P.F. Microlipoextraction et microlipoinjection / P.F. Fournier // *Rev Chir Esthet Lang Fr.* – 1985. – № 10. – P. 36–40.
75. Fournier, P.F. Collagen autologue: liposculpture match nigue / P.F. Fournier // Paris: Arnette. – 1989. – P. 277–279.
76. Fréchette, J.P. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing / J.P. Fréchette, I. Martineau, G. Gagnon // *J Dent Resistant.* – 2005. – № 84 (5). – P. 434–439.

77. Freymiller, E.G. Platelet-rich plasma: evidence to support its use / E.G. Freymiller // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2004. – № 62 (8). – P. 1046.
78. Gabriel, A. The Evolution of Breast Implants / A. Gabriel, G.P. Maxwell // *Clin Plast Surg.* – 2015. – № 42 (4). – P. 399–404.
79. Garg, A. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants / A. Garg // *Dent Implantol Update.* – 2000. – № 11 (3). – P. 17–21.
80. Garcia-Olmo, D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease / D. Garcia-Olmo, M. Garcia-Arranz, D. Herreros // *Expert Opin Biol Ther.* – 2008. – № 8 (9). – P. 1417–1423.
81. Gimble, J.M. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells / J.M. Gimble, F. Guilak // *Curr Top Dev Biol.* – 2003. – № 58. – P. 137–160.
82. Goldwyn, R.M. The paraffin story / R.M. Goldwyn // *Plast Reconstr Surg.* – 1980. – № 65 (4). – P. 517–524.
83. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex, and platelet count / G. Weibrich, W.S. Kleis, G. Hafner, W.E. Hitzler // *J Craniomaxillofac Surg.* – 2002. – № 30 (2). – P. 97–102.
84. Guerrerosantos, J. Long-term outcome of autologous fat transplantation in aesthetic facial recontouring: sixteen years of experience with 1936 cases / J. Guerrerosantos // *Clin Plast Surg.* – 2000. – № 27 (4). – P. 515–543.
85. Hollander, E. Die kosmetische Chirurgie. [Text] In: *Handbuch der Kosmetik* / E. Hollander; Hrsg. V. Max Joseph. – Leipzig: Veit & Comp, 1912.
86. Human adipocyte viability testing: a new assay / J.W. Macrae, S.S. Tholpady, A.J. Katz [et al.] // *Aestet Surg J.* – 2003. – № 23 (4). – P. 265–269.
87. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis / E. Gonzalez-Rey, M.A. Gonzalez, N. Varela [et al.] // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – № 69 (1). – P. 241–248.
88. Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model / A.M. Altman, Y. Yan, N.

- Matthias [et al.] // *Stem Cells*. – 2009. – № 27 (1). – P. 250–258.
89. Human adipose stem cells: current clinical applications / P. Gir, G. Oni, S.A. Brown [et al.] // *Plast Reconstr Surg*. – 2012. – № 129 (6). – P. 1277–1290.
90. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian [et al.] // *Mol Biol Cell*. – 2002. – № 13 (12). – P. 4279–4295.
91. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo / Y. Cao, Z. Sun, L. Liao [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – № 332 (2). – P. 370–379.
92. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers / J.B. Mitchell, K. McIntoch, S. Zvonic [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – № 24 (2). – P. 376–385.
93. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes / D.M. Dohan Ehrenfest, T. Bielecki, A. Mishra [et.al.] // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2012. – № 13 (7). – P. 1131–1137.
94. In the use of autologous platelet-rich plasma gel in gynecologic, cardiac, and general, reconstructive surgery beneficial? / P.A. Everts, M.M. Hoogbergen, T.A. Weber [et al.] // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2012. – № 13 (7). – P. 1163–1172.
95. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis / K. Kondo, S. Shintani, R. Shibata [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2009. – № 29 (1). – P. 61–66.
96. Jin, R. Does platelet-rich plasma enhance the survival of grafted fat? An update review / R. Jin, L. Zhang, Y.G. Zhang // *Int J Clin Exp Med*. – 2013. – № 6 (4). – P. 252–258.
97. Juhl, A.A. Autologous fat grafting after breast conserving surgery: Breast imaging changes and patient-reported outcome / A.A. Juhl, S. Redsted, T. Engberg Damsgaard // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. – 2018. – № 71 (11). – P. 1570–1576.
98. Klein, J.A. Tumescence technique for local anesthesia improves safety in large-volume liposuction / J.A. Klein // *Plast Reconstr Surg*. – 1993. – № 92 (6). – P. 1085–1098.

99. Lexer, E. Die freien Transplantationen [Text] / E. Lexer. – Stuttgart: Ferdinand Enke, 1919.
100. Lindros, B. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine / B. Lindros, R. Suuronen, S. Miettinen // *Stem Cell Rev and Rep.* – 2011. – № 7 (2). – P. 269–291.
101. Lipofilling of the Breast Does Not Increase the Risk of Recurrence of Breast Cancer: A Matched Controlled Study / S.J. Kronowitz, C.C. Mandujano, J. Liu [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2016. – № 137 (2). – P. 385–393.
102. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patient / J.Y. Petit, E. Botteri, V. Lohsiriwat [et al.] // *Ann Oncol.* – 2012. – № 23 (3). – P. 582–588.
103. Magalon, G. Training course on fat reinjection “Autologous Fat Grafts”, presented with S.R. Coleman / G. Magalon, R. Amar. – Marseille, France, May, 1998.
104. Magnetic resonance imaging and ultrasound evaluation after breast autologous fat grafting combined with platelet-rich plasma / V. Fiaschetti, C.A. Pistolese, M. Fornari [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2013. – № 132 (4). – P. 498e–509e.
105. Man, D. The use autologus platelet-rich plasma (platelet gel) and autologus platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery / D. Man, H. Plosker, J.E. Winland-Brown // *Plast Reconctr Surg.* – 2001. – № 107 (1). – P. 229–237.
106. Mandel, M.A. Minimal suture blepharoplasty: closure of incisions with autologous fibrin glue / M.A. Mandel // *Aesthetic Plast Surg.* – 1992. – № 16 (3). – P. 269–272.
107. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? / R.E. Marx // *Implant Dent.* – 2001. – № 10 (4). – P. 225–228.
108. Marx, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use / R.E. Marx // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2004. – № 62 (4). – P. 489–496.
109. Mazzola, R.F. History of fat grafting: from ram fat to stem cells / R.F. Mazzola, I.C. Mazzola // *Clin Plast Surg.* – 2015. – № 42 (2). – P. 147–153.
110. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type / M. Sasaki, R. Abe, Y. Fujita [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – № 180 (4). – P. 2581–2587.

111. Meta-analysis of the safety and factors contributing to complications of MS-TRAM, DIEP, and SIEA flaps for breast reconstruction / X.L. Wang, L.B. Liu, F.M. Song, Q.Y. Wang // *Aesthetic Plast Surg.* – 2014. – № 38 (4). – P. 681–691.
112. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts / T. Nishimura, H. Hashimoto, I. Nakanishi, M. Furukawa // *Laryngoscope.* – 2000. – № 110 (8). – P. 1333–1338.
113. Microsurgical breast reconstruction in thin patients: the impact of low body mass indices / K.E. Weichman, N. Tanna, P.N. Broer [et al.] // *J Reconstr Microsurg.* – 2015. – № 31 (1). – P. 20–25.
114. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // *Cytotherapy.* – 2006. – № 8 (4). – P. 315–317.
115. Mishra, A. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma / A. Mishra, T. Pavelko // *Am J Sports Med.* – 2006. – № 34 (11). – P. 1774–1778.
116. Mojallal, A. [The effect of different factors on the survival of transplanted adipocytes] / A. Mojallal, J.L. Foyatier // *Ann Chir Plast Esthet.* – 2004. – № 49 (5). – P. 426–436.
117. Multiline-age cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.] // *Tissue Eng.* – 2001. – № 7 (2). – P. 211–228.
118. Nahabedian, M.Y. Breast reconstruction: a review and rationale for patient selection / M.Y. Nahabedian // *Plast Reconstr Surg.* – 2009. – № 124 (1). – P. 55–62.
119. Nanayakkara, P.W. Silicone Gel Breast Implants: What We Know About Safety After All These Years / P.W. Nanayakkara, C.J. de Blok // *Ann Intern Med.* – 2016. – № 164 (3). – P. 199–200.
120. Neuber, G. Über die Wienderanheilung vollständig vom Körper getrennter, die ganze Fettschicht enthaltender Hautstücke / G. Neuber // *Zbl f Chir.* – 1893. – № 30. – P. 16.
121. Nguyen, A.L. The development and application of a new affinity partitioning

system for enzyme isolation and purification / A.L. Nguyen, J.H. Luong // *Enzyme Microb Technol.* – 1990. – № 12 (9). – P. 663–668.

122. Niechajev, I. Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies / I. Niechajev, O. Sevcuk // *Plast Reconstr Surg.* – 1994. – № 94 (3). – P. 496–506.

123. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis / N.H. Riordan, T.E. Ichim, W.P. Min [et al.] // *J transl Med.* – 2009. – № 7. – P. 29.

124. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells / K. Mesimäki, B. Lindroos, J. Törnwall [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Surg.* – 2009. – № 38 (3). – P. 201–209.

125. Oncologic Safety and Surveillance of Autologous Fat Grafting following Breast Conservation Therapy / S.E. Hanson, S.K. Kapur, P.B. Garvey [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2020. – № 146 (2). – P. 215–225.

126. Ozsoy, Z. The role of cannula diameter in improved adipocyte viability: a quantitative analysis / Z. Ozsoy, Z. Kul, A. Bilir // *Aestet Surg J.* – 2006. – № 26 (3). – P. 287–289.

127. Peer, L.A. Transplantation of Tissues [Text] / L.A. Peer. – Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins Co, 1955.

128. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin [et al.] // *Circulation.* – 2004. – № 109 (5). – P. 656–663.

129. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation / M. Wosnitza, K. Hemmrich, A. Groger [et al.] // *Differentiation.* – 2007. – № 75 (1). – P. 12–23.

130. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts / R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt [et al.] // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* – 1998. – № 85 (6). – P. 638–646.

131. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse / Y.C. Por, V.K. Yeow, N. Louri [et al.] // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* –

2009. – № 62 (8). – P. 1030–1034.

132. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats / S. Nakamura, M. Ishihara, M. Takikawa [et al.] // *Ann Plast Surg.* – 2010. – № 65 (1). – P. 101–106.

133. Poznanski, W.J. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture / W.J. Poznanski, I. Waheed, R. Van // *Lab Invest.* – 1973. – № 29 (5). – P. 570–576.

134. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts / N. Kakudo, T. Minakata, T. Mitsui [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2008. – № 122 (5). – P. 1352–1360.

135. Powell, D.M. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study / D.M. Powell, E. Chang, E.H. Farrior // *Arch Facial Plast Surg.* – 2001. – № 3 (4). – P. 245–250.

136. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells / M.P. Mazzetti, I.S. Oliveira, R. Miranda-Ferreira [et al.] // *Acta Cir Bras.* – 2010. – № 25 (1). – P. 24–27.

137. Quilting suture in the donor site of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap inbreast reconstruction / L.A. Rossetto, E.B. Garcia, L.F. Alba [et al.] // *Ann Plast Surg.* – 2009. – № 62 (3). – P. 240–243.

138. Quinlan, C.S. Risk Factor Analysis for Capsular Contracture, Malposition, and Late Seroma in Subjects Receiving Natrelle 410 Form-Stable Silicone Breast Implants / C.S. Quinlan, R. Lynham, J.L. Kelly // *Plast Reconstr Surg.* – 2017. – № 140 (3). – P. 499e.

139. Ramakrishnan, V.M. The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications / V.M. Ramakrishnan, N.L. Boyd // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2018. – № 24 (4). – P. 289–299.

140. Research progress of stem cells on glaucomatous optic nerve injury / Y.S. Zhou, J. Xu, J. Peng [et al.] // *Int J Ophthalmol.* – 2016. – № 9 (8). – P. 1226–1229.

141. Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis / M. Rodbell // *J Biol Chem.* – 1964. – № 239. – P. 375–380.

142. Rohrich, R.J. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis

of the role of centrifugation and harvest site / R.J. Rochrich, E.S. Sorokin, S.A. Brown // *Plast Reconstr Surg.* – 2004. – № 113 (1). – P. 391–395.

143. Salgarello, M. Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art / M. Salgarello, G. Visconti, A. Rusciani // *Plast Reconstr Surg.* – 2011. – № 127 (6). – P. 2176–2185.

144. Sánchez, A.R. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review / A.R. Sánchez, P.J. Sheridan, L.I. Kupp // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2003. – № 18 (1). – P. 93–103.

145. Sclafani, A. Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds / A.P. Sclafani // *J Cosmet Dermatol.* – 2010. – № 9 (1). – P. 66–71.

146. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells / J. Rehman, D. Traktuev, J. Li [et al.] // *Circulation.* – 2004. – № 109 (10). – P. 1292–1298.

147. Serra-Renom, J.M. Use of fat grafts enriched with platelet growth factors for facial lipofiling in ritlectomy / J.M. Serra-Renom, J.L. Muñoz Del Olmo, C. Gonzalo Caballero // *Cir Plas Ibero-Latinoam.* – 2006. – № 32 (3). – P. 191–197.

148. Shoshani, O. Stress as a fundamental theme in cell plasticity / O. Shoshani, D. Zipori // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – № 1849 (4). – P. 371–377.

149. Silicone breast implant rupture: a review / C. Hillard, J.D. Fowler, R. Barta, B. Cunningham // *Gland Surg.* – 2017. – № 6 (2). – P. 163–168.

150. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study / H.H. Peltoniemi, A. Salmi, S. Miettinen [et al.] // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2013. – № 66 (11). – P. 1494–1503.

151. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source / F.C. Torres, C.J. Rodrigues, I.N. Stocchero, M.C. Ferreira // *Aesthetic Plast Surg.* – 2007. – № 31 (5). – P. 574–578.

152. Stiles, C.D. The molecular biology of platelet-derived growth factor / C.D. Stiles // *Cell.* – 1983. – № 33 (3). – P. 653–655.

153. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention / M. Zhu, Z. Zhou, Y. Chen [et al.] // *Ann Plast Surg.* – 2010.

– № 64 (2). – P. 222–228.

154. The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet-rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation / B. Liu, X.Y. Tan, Y.P. Liu Y [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2013. – № 19 (1). – P. 1–14.

155. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: Immunohistochemical and ultrastructural evaluation / A.C. Uysal, H. Mizuno, M. Tobita [et al.] // *Plast Reconstr Surg*. – 2009. – № 124 (3). – P. 804–815.

156. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases / W.H. Liu, F.Q. Song, L.N. Ren [et al.] // *J Cell Mol Med*. – 2015. – № 19 (3). – P. 511–520.

157. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: A multicenter study. Milan-Paris-Leon experience of 646 lipofilling procedures / J.Y. Petit, V. Lohsiriwat, K.B. Clough [et al.] // *Plast Reconstr Surg*. – 2011. – № 128 (2). – P. 341–346.

158. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds / K. Kazakos, D. Lyras, D. Verettas [et al.] // *Injury*. – 2009. – № 40 (8). – P. 801–805.

159. Tiryaki, T. Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: A preliminary report / T. Tiryaki, N. Findikli, D. Tiryaki // *Aesthetic Plast Surg*. – 2011. – № 35 (6). – P. 965–971.

160. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine / J.H. Moore Jr, J.W. Kolaczynski, L.M. Morales [et al.] // *Aesthetic Plast Surg*. – 1995. – № 19 (4). – P. 335–339.

161. WIPO Patent Application WO/2009/003135. System and method for continuous processing of lipoaspirate: Application Number PCT/US2008/068418; Filing Date: June 26, 2008; Publication Date: December 31, 2008 / Khouri R.K., Kuru M. // URL: <https://www.sumobrain.com/patents/wipo/System-method-continuous-processing-lipoaspirate/WO2009003135A1.html> (дата обращения: 26.01.2023)