На правах рукописи

АБРАМЯН ШМАВОН МАИСОВИЧ

МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ТКАНЕЙ ПРИ ПЛАСТИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЯХ ПО КОРРЕКЦИИ КОНТУРОВ ЛИЦА

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Морозов Сергей Георгиевич**

Официальные оппоненты:

Власов Тимур Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, декан лечебного факультета и заведующий кафедрой патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Силина Екатерина Владимировна – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии Института цифрового дизайна и моделирования живых систем научно-технологического парка биомедицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Ведущая организация:
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Защита диссертации состоится «26» июня 2025 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01 при ФГБНУ «НИИОПП»
по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте: https://niiopp.ru/

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень разработанности темы

Впервые феномен ишемии/реперфузии (**I/R**) описан в 1881г. Von Volkmann R., когда восстановление кровообращения после длительной гипоксии привело к резкому ухудшению состояния пациента. Термин «реперфузия» предложен в 1935 году Tennant R. и Wiggers C. Проблема I/R носит полиорганный характер, затрагивает миокард, мозг, печень, почки кишечник, кожу, ткани конечностей, сосуды, клетки эндотелия т.д. [Buja M., 2024; Fan X. et al., 2024; Lee J. et al., 2022]. Проблема I/R при операциях на лице связана, в первую очередь, с реконструктивной хирургией. Операция по восстановлению контура лица (лифтинг) продолжается 3 ч и более. В это время ткани лица подвергаются ишемии, а после восстановления кровотока происходит эффект реперфузии, что вызывает гибель клеток и послеоперационные осложнения. Ранее не было работ, в которых исследованы механизмы гибели клеток лица в результате I/R при лифтинге, что делает нашу работу актуальной. Для предотвращения негативного влияние I/R были предложены разные подходы, но проблема остаётся нерешённой, до сих пор нет средств, блокирующих гибель клеток и тканей при I/R.

При I/R происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) и изменение активности антиоксидантной системы. Окислительный стресс сопровождается активацией альтернативного сплайсинга генов и экспрессией генов, связанных с I/R [Dery K. et al., 2024]. Снижается пролиферация мезенхимальных стволовых клеток, что замедляет регенерацию тканей [Bertolo A. et al., 2017]. Системная воспалительная реакция при I/R сопровождается нарушением соотношения популяций и субпопуляций клеток иммунной системы и ряда цитокинов [Артамонова З.А., 2016].

Установлена роль митохондрий при I/R, показано повышение проницаемости внешней мембраны митохондрий с потерей мембранного потенциала митохондрий $\Delta\Psi\mu$, формирование пор и выход цитохрома ***c*** в экстраклеточный матрикс (ECM), активация апоптоза и развитие митохондриального стресса. Выявлена роль митофагии (выборочной утилизации митохондрий) для поддержания гомеостаза клетки, что характерно для повреждения кератиноцитов кожи человека, установлены её сигнальные белки (PINK1, BNIP3/NIX, FUNDC1, Bcl2-L13 и др.) [Pham L. et al., 2024; D'Arcy M., 2024].

Показана роль стресса эндоплазматического ретикулума (ER) в развитии состоянии I/R, установлены белки его сигнальных путей (GRP78, PERK, IRE1α, XBP1, ATF6 и др.), активированные при I/R, показана роль микроРНК в регуляции стресса ER [Zhao K. et al., 2024]. Дисфункция митохондрий и стресс ER приводят клетки к апоптозу [Wang J. et al., 2022].

Изучена роль аутофагии в клетках кожи при I/R. При развитии макроаутофагии угнетается метаболизм, клетка прекращает деление и утилизирует часть органелл, но остаётся жизнеспособной в течение короткого времени до восстановления притока нутриентов и энергии. Если метаболизм не восстанавливается, то активируются сигналы апоптоза, которые в этом случае необратимы. Активация аутофагии защищает кератиноциты кожи человека от окислительного стресса и поддерживает их жизнеспособность [Yoon J. et al., 2017], она зависит от сигнальных путей киназы mTOR [Chu J. et al., 2023]. Активность аутофагии в клетках кожи снижена при окислительном стрессе, с возрастом и под действием УФ [Endo K. et al., 2020].

Механизмы гибели клеток при I/R являются клеточно-, ткане- и органоспецифичными. Для лица человека нет однозначно трактуемых данных по типу гибели клеток, поэтому установление их механизмов имеет фундаментальный и прикладной характер и направлено на выявления мишеней для коррекции последствий I/R при лифтинге лица. Операция лифтинга может давать осложнения, включая частичный некроз мягких тканей в области шва. Небольшие зоны некроза регистрируются практически во всех послеоперационных рубцах, чем больше область операции, тем выше вероятность развития некроза [Agarwal P. et al., 2016].

После краниофациальной пластики частичный некроз бывает в 5,7% случаев, тотальный – в 2,9%, у женщин вероятность некроза выше, чем у мужчин, и хуже приживление кожного лоскута [Heo Y. et al., 2016]. После операции на лице из-за I/R повышена активность воспаления, имеются отёк, лейкоцитарная инфильтрация, гибель клеток, повышен уровень

ПОЛ, провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1β, TNF-α и др.), активированы сигнальные пути ядерного фактора транскрипции NF-κB и HIF-1α (фактора гипоксии) [Lee J. et al., 2022]. При I/R изменяется экспрессия генов, сопряженных с апоптозом, повышается активность каспазы-3 и проапоптозных белков [Khalaf R. et al., 2024].

Диссертационная работа посвящена изучению сигналов аутофагии, апоптоза и некроза в клетках, выделенных из раны при операции по коррекции контура лица, и состоянию ишемии/реперфузии. Оценка уровня апоптоза и некроза позволит прогнозировать развитие осложнений в виде частичного некроза шва. Полученные результаты можно использовать для подготовки рекомендаций и с целью улучшения результатов оперативного вмешательства.

Цель исследования – комплексное исследование механизмов гибели клеток кожи и подкожно-жировой клетчатки, выделенных из тканей в области оперативного вмешательства при проведении операций по коррекции контуров лица у женщин.

Задачи исследования:

1. Измерить уровни экспрессия маркеров аутофагии в клетках, выделенных из операционного материала при операции коррекции контуров лица.
2. Изучить активность спонтанного и индуцированного (C2-церамид) апоптоза в первичной культуре клеток, полученных из образцов тканей при операциях лифтинга лица.
3. Определить уровень экспрессии рецепторов апоптоза, активности каспаз, экспрессии митохондриальных белков, сигнальных белков некроптоза в первичной культуре клеток, выделенных из тканей при операциях по коррекции контуров лица.
4. Исследовать энергетический статус и уровень мембранного потенциала митохондрий клеток, выделенных из операционного материала при коррекции лица, а также провести оценку эффективности применения цитопротекторов перед операциями по коррекции контура лица на данные показатели и на частоту развития осложнений в послеоперационном периоде.
5. Сравнить данные по сигналам гибели клеток кожи женщин в разных возрастных группах при лифтинге лица и в зависимости от наличия загара лица (УФ) или его отсутствия.
6. Оценить роль патологии полости рта и зубов в развитии осложнений после операции по коррекции контуров лица.

Научная новизна

Впервые в данном исследовании применили собственную усовершенствованную методику получения первичной культуры жизнеспособных клеток из операционного материала, которая позволяет изучать тонкие механизмы регуляции сигналов гибели клеток и возможность восстановления их жизнеспособности после ишемии/реперфузии.

В данной работе впервые дана комплексная оценка механизмов аутофагии, апоптоза и некроптоза в клетках, выделенных из операционного материала при лифтинге лица у женщин разного возраста с загаром и без загара, на этапах первичной ишемии, а затем, в конце операции, на этапе реперфузии, после вызванной наложением лигатуры операционной ишемии тканей.

Впервые показано, что наличие загара, полученного непосредственно перед операцией лифтинга, амплифицирует сигнальные пути гибели клеток кожи и подкожно-жировой ткани, что может негативно сказываться на течении послеоперационного периода.

Впервые изучили эффективность применения цитопротекторов в предоперационном периоде лифтинга лица, что позволило улучшить энергетический статус клеток в операционном поле и, соответственно, улучшило течение послеоперационного периода (длительность заживания, частоту осложнений, состояние рубца).

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований установлено, что операция по коррекции контуров лица сопровождается изменениями клеток, характерными для состояния ишемии/реперфузии. Показано, что в клетках кожи и подкожно-жировой ткани после восстановления кровотока (реперфузия) активируются как сигнальные пути сохранения

жизнеспособности клеток (аутофагия), так и сигналы гибели клеток. Типы гибели клеток установлены как апоптоз и некроптоз, о чём свидетельствуют белки, сопряженные с соответствующими сигнальными путями. Впервые показано, что в конце операции лифтинга лица имеются клетки с активной аутофагией, клетки, в которых необратимо активированы сигналы некроптоза, а также клетки, в которых запущены сигналы апоптоза, но на момент исследования не имели морфологических признаков этого процесса. Данные сигналы были идентифицированы по воздействию на них клеточно-проникающего С2-церамида, ускоряющего процессы активации апоптоза. Показано, что наличие загара, полученного непосредственно перед операцией лифтинга, амплифицирует сигнальные пути гибели клеток кожи и подкожно-жировой ткани, что может негативно сказываться на послеоперационном периоде. Применение препаратов, повышающих энергетический потенциал клеток, в том числе янтарной кислоты, в течение 3-х недель перед операцией, достоверно улучшало состояние клеток, обусловливало снижение уровня экспрессии белков, сопряженных с апоптозом и некрозом, активировало процессы аутофагии. Это имело положительное влияние на состояние пациента после операции. Полученные данные по экспрессии белков, сопряженных с апоптозом и некроптозом при лифтинге лица, носят фундаментальный характер. Теоретические результаты диссертационной работы используются в Учебном центре Клиники пластической и эстетической хирургии ООО «Фрау Клиник», г. Москва, для обучения хирургов основам патогенеза состояния ишемии/реперфузии.

Обоснованные выводы из диссертационной работы, касающиеся предоперационного обследования пациентов для установления риска развития послеоперационных осложнений, используются в практической деятельности Клиники пластической и эстетической хирургии ООО «Фрау Клиник», г. Москва. На основании полученных в ходе исследования результатов, касающихся применения клеточно-энергетических препаратов, разработанные схемы используются в настоящее время в Клинике в качестве дополнительного терапевтического воздействия в предоперационном периоде с целью профилактики осложнений операции по коррекции контуров лица у пациентов. Полученные в ходе работы данные по влиянию УФ на показатели экспрессии белков апоптоза позволили рекомендовать воздерживаться от операции лицам, имеющим свежий загар, и переносить операцию на несколько недель.

Внедрение результатов в практику

Результаты данного исследования внедрены в практику предоперационной подготовки пациентов в Клинике пластической хирургии и косметологии профессора Блохина и доктора Вульфа ООО «Фрау Клиник», Москва.

Разработанные модификации лабораторных методов исследования используются в ряде лабораторий ФГБНУ «НИИОПП» для научно-исследовательской работы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В завершении операции по коррекции контуров лица после ишемии развивается состояние реперфузии, которое сопровождается нарушением жизнедеятельности клеток.
2. Во время состояния реперфузии в клетках активируются сигнальные пути гибели.
3. В клетках кожи и подкожно-жировой ткани лица в результате операции лифтинга одновременно имеются клетки с разными сигналами гибели, в том числе, апоптоза и некроптоза.
4. Развитие аутофагии при состоянии реперфузии является одним из механизмов выживания клеток.
5. Состояние мягких тканей лица перед операцией лифтинга определяет возможное развитие послеоперационных осложнений.

Апробация работы проведена на межлабораторной конференции в ФГБНУ «НИИОПП». Основные положения диссертации были представлены на следующих научных конференциях и конгрессах: III конференция памяти Н.О. Миланова «Пластическая хирургия в России. Актуальные вопросы микрохирургии», 2017 г., Москва; Национальный хирургический конгресс совместно с XX юбилейным съездом РОЭХ, 2017 г., Москва;

Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит 2017 (СМБС-2017), 2017 г., Москва; Всероссийская юбилейная научно - практическая конференция «Актуальные вопросы челюстно-лицевой хирургии и стоматологии», 2017 г., Санкт-Петербург; Научно-практическая конференция «Санкт-Петербургский лимфологический форум», 2017 г., Санкт-Петербург; Международная научно-практическая конференция, посвященная 140-летию со дня рождения профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых», 2017 г., Симферополь; XX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», 2017 г., Санкт-Петербург; Всероссийская научно-практическая конференция «Боткинские чтения», 2017 г., Санкт-Петербург; Всеармейская научно-практическая конференция, посвященная 95-летию со дня рождения член-корр. РАМН, профессора Г.И. Алексеева «Актуальные вопросы военно-полевой терапии», 2017 г., Санкт-Петербург; 4-й съезд микологов России, 2017 г., Москва; Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной микробиологии: теория, методология, практика, инноватика», 2022 г., Курск; 16 Всероссийский съезд национального альянса дерматовенерологов и косметологов, 2023 г., Москва.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 17 печатных работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает разделы: введение; обзор литературы; пациенты, материалы и методы исследования; результаты и их обсуждение; заключение; выводы и список литературы, содержащий 375 источников (46 на русском и 329 на иностранных языках). Работа изложена на 183 страницах и содержит 17 рисунков и 54 таблицы.

КОНТИНГЕНТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты. В работе представлены материалы хирургического лечения 320 женщин в возрасте от 21 до 64 лет, которым в Клинике пластической и эстетической хирургии ООО «Фрау Клиник», г. Москва была проведена операция по коррекции контуров лица (лифтинг).

Сравнение результатов проводилось между группами разного возраста (21–30 лет, 31–40 лет, 41–50 лет, 51–64 года), в зависимости от наличия или отсутствия загара кожи, а также выделены группы пациентов, которым в течение 3 недель до операции лифтинга лица были назначены клеточные энергетики.

Совместно с кафедрой стоматологии Сеченовского Университета у 100 пациентов было проведено изучение состояния полости рта перед операцией лифтинга лица с оценкой влияния патологии зубов на возможные осложнения после операции.

Материалы и методы

Все лабораторные исследования были проведены согласно ГОСТам на базе Клиники пластической и эстетической хирургии ООО «Фрау Клиник», г. Москва. Все экспериментальные исследования были проведены на базе лаборатории регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП», г. Москва.

Все протоколы исследований по теме данной диссертации были разработаны совместно с дирекцией ООО «Фрау Клиник», ФГБНУ «НИИОПП» и одобрены Этическим Комитетом ФГБНУ «НИИОПП». Все операции были проведены в плановом порядке согласно утверждённому протоколу. Все пациенты подписывали форму *информированного согласия* на анонимное использование их биологического материала.

Всем пациентам проводили ***общий клинический и биохимический анализы крови*** по стандартным методикам и согласно требованиям ГОСТов. Подсчет клеток крови проводили на гематологическом анализаторе Pentra Nexus HORIBA (Horiba ABX SAS, Франция). Биохимические показатели крови определяли на автоматическом анализаторе Fuji Dri-Chem4000 (Fujifilm, Япония). ***Окислительный стресс*** в сыворотке крови оценивали с помощью коммерческого набора MILLIPLEX® kit (Merck-Millipore, Германия, Cat. No.

HØXSTMAG-18K) на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (Luminex System, Bio-Rad Laboratories, Германия). Интенсивность флуоресценции измеряли на ридере Multiplex plate reader по программе Milliplex® Analyst 5.1. Количественное ***определение генерации супероксидного аниона*** проводили на спектрофотометре с программным управлением UV-3000 (Shimadzu Corp., Япония) по методу Woodman и др. [Woodman R. et al. 1995; Black C. et al., 1991; Suzuki Y., Lehrer R.,1980] в модификации Морозова С.Г. [Елистратова И.В. и др, 2015]. ***Уровень цитокинов*** в сыворотке крови до и сразу после операции определяли с помощью коммерческих наборов MILLIPLEX® kit Human Cytokine Panel I-III (Merck-Millipore, Германия) на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corp., США).

Взятие образцов кожи. Сразу после наркоза и обработки операционного поля антисептиком из кожи в области разреза лица были выделены образцы тканей (2/1/0,5 см), отмыты в стерильном холодном PBS, перенесены в полную среду RPMI 1640 с 15% ЭТС и оставлены в холодильнике при температуре +4°С до окончания операции. Эти образцы тканей служили **контролем**. В конце операции, примерно через 3 ч, также были выделены образцы кожи и подкожно-жировой ткани, которые использовали для изучения эффекта **ишемии/реперфузии**. Все образцы тканей после окончания операции были транспортированы в переносном холодильнике в лабораторию.

Методика выделения клеток из операционного материала является модификацией Морозова С.Г. [Абрамян Ш.М., Морозов С.Г., 2016] методов Hagman D. с соавт. (2012) и Cho K. с соавт. (2014). Образцы тканей разрезали острыми ножницами на мелкие фрагменты, помещали в 100-мл флакон Карреля с буфером (раствор Хенкса с Ca^{+2} и Mg^{+2} и BSA до 0,5%). Во флакон добавляли 10-кратный раствор коллагеназы II (Sigma-Aldrich) в конечной концентрация 0,5 мг/мл, который готовили *ex temporo* перед экспериментом и стерилизовали через одноразовый фильтр диаметром 0,22 мкм. Суспензию инкубировали при $+37^0$С и 5% CO_2 при непрерывном мягком перемешивании на шейкере. Через 20 мин отбирали аликвоту 2 мкл и проверяли на световом микроскопе состояние клеточной взвеси, инкубацию суспензии продолжали до тех пор, пока не получали взвесь одиночных клеток, время инкубации не превышало 45 мин. Затем в суспензию клеток добавляли ЭДТА в конечной концентрации 10 mM и лизирующий буфер для эритроцитов (Becton Dickinson Co., США), переносили в центрифужные пробирки и отмывали дважды в полной среде RPMI 1640 центрифугированием при 200g. К осадку добавляли полную среду RPMI 1640 с 15% ЭТС, инкубировали при $+37^0$С и 5% CO_2 в течение 2 ч для восстановления рецепторного аппарата клеток, затем фильтровали через стерильную хлопковую вату для удаления погибших клеток. Жизнеспособность клеток по окраске трипановым синим составляла 95±2%. Определяли концентрацию выделенных клеток и пересчитывали число клеток на общий вес образца ткани.

Для определения ***уровня спонтанного апоптоза*** клетки кожи и подкожно-жировой ткани, выделенные из операционного материала, доводили до концентрации 10^6/мл, фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS в течение 20 мин, отмывали в PBS трехкратным центрифугированием, осадок встряхивали и окрашивали пропидиумом йодидом (PI) (Sigma) в гипотоническом буфере (H_2Odest с 0,1% цитратом натрия и 0,01% Тритоном X100 (Sigma)).

Для активации сигналов апоптоза и определения ***уровня индуцированного апоптоза*** клети, выделенные из кожи и подкожно-жировой ткани, доводили до концентрации 10^6/мл в полной среде RPMI 1640 с 5% ЭТС и инкубировали 2,5 ч при $+37^0$С и 5% CO_2 в присутствии 20 микроМ клеточно-проникающего С2-церамида (Avanti Lipids Co., USA). Затем клетки отмывали в PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS, отмывали и окрашивали PI в гипотоническом буфере [Кандалова О.В. и др. 2012].

Для ***индукции некроптоза*** из каждого образца тканей были выделены клетки, их концентрация доведена до 10^6/мл в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС, в экспериментальную пробу добавлен фактор некроза опухолей альфа (TNF-α, Sigma) 10 нМ в 10 мкл PBS, в контрольную – 10 мкл PBS. Клетки инкубировали 2 ч в термостате при $+37^0$С и 5% CO_2, затем отмывали, фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS, отмывали и окрашивали моноклональными антителами (***mAb***) к рецепторам R1 и R2 TNF-α, киназам RIPK1, RIPK3 и MLKL, к

фосфорилированным киназам (p)-RIPK3 (Ser227), (p)-MLKL (Ser358), (p)-RIPK1 (Ser166). Окраску проводили с помощью коммерческого набора Becton Dickinson по инструкции. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) по программе SimulSet. Данная методика является авторской модификацией Морозова С.Г. [Абрамян Ш.М. и др., 2022] метода Miao B. и Degterev A. (2009).

Для ***окраски клеток крови*** по 1 мл крови переносили в центрифужные пробирки, добавляли по 14 мл лизирующей жидкости для удаления эритроцитов (Becton Dickinson, США), инкубировали 5 мин при $+25^0$C, центрифугировали 10 мин при 200g и $+25^0$C. Супернатант удаляли, осадок встряхивали, добавляли полную среду RPMI 1640 и отмывали суспензию клеток центрифугированием в тех же условиях [Кандалова О.В. и др. 2012].

Для ***получения мононуклеаров крови*** осадок разводили PBS 1:1 и по 2 мл наслаивали на градиент плотности Фиколла-Верографина (1,078 г/л), центрифугировали 20 мин при ускорении 2000 g и $+25^0$C. Мононуклеары отбирали из интерфазы, отмывали средой RPMI 1640 и доводили концентрацию клеток до 10^6/мл. Окраску проводили mAb, напрямую меченными флуоресцентными красителями. Клетки отмывали в PBS, доводили до концентрации $0{,}5\times10^6$ клеток в 50 мкл, добавляли 20 мкл соответствующих mAb и инкубировали 40 минут при $+4^0$C. Клетки трижды отмывали, осадок встряхивали и фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS с 5% азидом натрия.

Для анализа популяций клеток, выделенных из операционного материала, суспензии клеток окрашивали mAb к рецепторам онкостатина M (anti-OSTM, ab156939) на адипоцитах, рецепторам эфрина (anti-Eph-R, ab5497) на эпителиальных клетках, рецепторам нейтрофилов (anti-CD66b, ab48589), лимфоцитов (anti-CD3, ab106215) и моноцитов/макрофагов (anti-CD11c, ab313900) (Abcam, США).

Клетки, окрашенные mAb, анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet с настройками, оптимальными для каждого исследования и неизменяемыми при повторных экспериментах. Для компьютерного анализа полученных данных с цитометра использовали программу WinMDI, версию 8.2.

Метод оценки фрагментации ДНК с помощью проточной цитометрии основан на включении PI в олигонуклеосомальные фрагменты ДНК. Клетки фиксировали 20 мин в 4% параформальдегиде на PBS, отмывали, к осадку добавляли 0,5 мл гипотонического буфера PI (50 мкг PI (Sigma) на 1 мл 0,1% цитратного буфера (Реахим) с 0,1% Тритоном X-100 (Sigma)), инкубировали 40 мин в темноте при $+4^0$C, отмывали и анализировали на проточном цитометре. Флуоресценция PI определялась на канале FL2-A при длине волны 585±5 нм или канале FL3-A при длине волны 610±5 нм. Низкомолекулярные фрагменты ДНК определяли в виде субдиплоидного G1 пика в гистограмме ДНК.

Измерение мембранного потенциала митохондрий $\Delta\Psi\mu$ основано на селективном встраивании красителя JC-1 в митохондрии и изменении его флуоресценции с зелёной на оранжевую в зависимости от изменения мембранного потенциала митохондрий (~ до 80–100 милливольт). Краситель JC-1 позволяет количественно определить разницу мембранного потенциала митохондрий $\Delta\Psi\mu$ по интенсивности флуоресценции (mean) образцов на соответствующих каналах [Cottet-Rousselle C. et al., 2011; Elefantova K. et al., 2018].

Процент фагоцитоза нейтрофилов определяли методом проточной цитометрии по включению в клетки меченных флуоресцеинами инактивированных стафилококков. ***Генерацию супероксидного аниона*** нейтрофилами определяли при стимуляции форболовыми эфирами (PMA и fmlp) на двулучевом спектрофотометре Hitachi по соответствующей программе [Елистратова И.В. и др. 2015].

Изучения ***влияния патологии полости зубов*** на осложнения после операции лифтинга проведено у 100 пациентов, из которых 76 потребовалась санация полости рта, остальные составили контрольную группу. С помощью стоматологических брашиков были сделаны смывы клеток дёсенной борозды зуба, требующего санации, а также здорового зуба для контроля. Брашики с адгезированными клетками прополаскивали в 1 мл стерильного PBS, после чего пробирку центрифугировали, клетки переводили в полную среду RPMI 1640 с 10%

ЭТС. Далее клетки окрашивали mAb, отмывали, фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS и анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) на каналах FL1-A, FL2-A и FL3-A при длине волны, соответственно, 488±5 нм, 530±5 нм и 605±5 нм.

Статистический анализ полученных данных выполнен по программе ANOVA и Биостат. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, данные представлены как M ±m, качественные переменные представляли абсолютными (n) и относительными (%) значениями. Статистический анализ нескольких групп с малой выборкой проводился методом множественного сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса. Для этого с помощью дисперсионного анализа сначала проверяют нулевую гипотезу о равенстве всех средних. Если она отвергается, то все средние упорядочиваются по возрастанию и сравниваются попарно. P <0,05 дается как статистически значимое различие между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

СОСТАВ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ ПРИ ЛИФТИНГЕ ЛИЦА

ЦЕЛЬ работы – определение популяций клеток в образцах тканей, выделенных из операционного материала при коррекции лица. Для этого всегда использовали идентичный метод, что позволяет провести сравнительный анализ изменения числа клеток [Абрамян Ш.М., Морозов С.Г., 2016]. Ткани, выделенные в самом начале операции, были ***контролем***, ткани, выделенные по завершению операции (~ через 3 часа), уже подвергались ***ишемии/реперфузии*** (I/R). Выделенные из тканей клетки были проанализированы на проточном цитометре. Основными популяциями были эпителиальные клетки, адипоциты, лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги (рис. 1). За 100% принято всё число событий в образце.

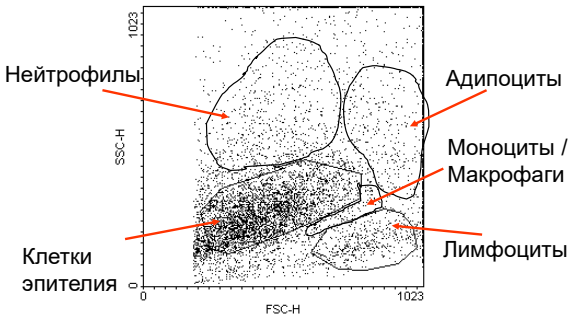

Рисунок 1. Основные популяции клеток, выделенные из подкожно-жировой ткани при операции лифтинга лица (по данным проточной цитометрии).

Таблица 1.
Процент основных популяций клеток, выделенных из операционного материала при лифтинге лица

Популяции клеток, %	**Группы пациентов**			
	21 – 30 лет, (n = 36)	**31 – 40 лет**, (n = 56)	**41 – 50** лет, (n = 72)	**51 – 64** года, (n = 62)
	контроль			
Клетки эпителия	42 ± 2	39 ± 2	36 ± 3	33 ± 2*
Адипоциты	12 ± 3	15 ± 2	18 ± 3	21 ± 2*
Нейтрофилы	15 ± 2	15 ± 1	14 ± 1	14 ± 2
Лимфоциты	11 ± 2	10 ± 1	9 ± 3	9 ± 2
Моноциты/ макрофаги	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	9 ± 1*
	ишемия/реперфузия			
Клетки эпителия	32 ± 2#	32 ± 2#	30 ± 3	28 ± 2#
Адипоциты	9 ± 3	11 ± 2	14 ± 3	16 ± 2*#
Нейтрофилы	22 ± 2#	20 ± 1#	20 ± 2#	20 ± 1#
Лимфоциты	13 ± 2	13 ± 1#	12 ± 3	11 ± 3
Моноциты/ макрофаги	10 ± 2	10 ± 2	11 ± 1#	12 ± 1#

 # P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю;

** P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*

С возрастом происходят изменения структурных, клеточных и молекулярных компонентов кожи и свойств подкожного жира, что приводит к уменьшению толщины эпидермиса и дермы [Arnal-Forné M. et al. 2024]. Это отражается в увеличении процента адипоцитов (P<0,05) и макрофагов кожи, происходящих из моноцитов (P<0,05), тенденции к снижению лимфоцитов и снижению относительного числа клеток эпителия (P<0,05) (табл. 1).

В состоянии I/R по сравнению с контролем повышен процент нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов/макрофагов (P<0,05), при этом пропорционально снижен процент клеток эпителия и адипоцитов (P<0,05), что особенно выраженно у лиц старше 50 лет (табл. 1). Это

указывают на состояние активного воспаления в тканях, что согласуется с данными по изменениям клеток иммунной системы при I/R [Артамонова З.А., 2016], а также указывает на возрастные особенности кожи, что необходимо учитывать при операции лифтинга лица.

Влияние загара (ультрафиолета, УФ) на состав клеток кожи лица

УФ вызывает повреждение ДНК кератиноцитов, деструкцию мембран клеток, секрецию провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF-α, bFGF (основной фактор роста фибробластов), MMPs (матриксные металлопротеиназы) и др.), воспаление кожи [Caiazzo G. et al., 2022] и активирует апоптоз. После УФ фибробласты молодой кожи гибнут быстрее, чем старой. Стареющие клетки накапливают мутировавшие гены, но при этом не гибнут, что является основанием для развития рака кожи [Jian J. et al., 2011].

Таблица 2.

Процент клеток, выделенных из образцов тканей при лифтинге лица пациенток с загаром

Популяции клеток, %	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 36)	**31 – 40 лет**, (n = 56)	**41 – 50** лет, (n = 72)	**51 – 64** года, (n = 62)		**21 – 30 лет**, (n = 36)	**31 – 40 лет**, (n = 56)	**41 – 50** лет, (n = 72)	**51 – 64** года, (n = 62)
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
Клетки эпителия	39 ± 2	37 ± 2	35 ± 3	32 ± 2*		28 ± 2#	28 ± 2#	26 ± 3#	24± 1*#
Адипоциты	13 ± 3	15 ± 2	18 ± 3	20 ± 2*		9 ± 1	9 ± 2#	10 ± 3#	10 ± 2#
Нейтрофилы	19 ± 1	18 ± 1	17 ± 1	18 ± 1		22 ± 2	22 ± 1#	23 ± 1#	25 ± 1#
Лимфоциты	10 ± 2	10 ± 1	9 ± 3	9 ± 2		15 ± 2#	15 ± 1#	15 ± 3#	16 ± 3#
Моноциты/ макрофаги	6 ± 2	7 ± 3	8 ± 1	8 ± 2		12 ± 1#	12 ± 2#	12 ± 1#	12 ± 1#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет.*

В контрольных образцах тканей пациенток, получивших загар не позднее, чем за 3 недели до операции лифтинга (табл. 2), повышен процент нейтрофилов (P<0,05) и немного снижен процент клеток эпителия (P>0,05) у лиц моложе 30 лет по сравнению с лицами без загара (табл. 1). После загара в состоянии I/R все основные популяции клеток достоверно изменялись по сравнению с контролем (табл. 2): возрастало число клеток иммунной системы и относительно снижалось число клеток эпителия и адипоцитов (P<0,05). В состоянии I/R у лиц с загаром старше 40 лет по сравнению с лицами до 30 лет повышен уровень нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов, что указывает на активацию воспаления в тканях кожи лица при I/R, которое отягощено после экспозиции кожи к УФ (табл. 2).

Таким образом, состав клеток кожи и подкожно-жировой ткани лица изменяется с возрастом и зависит от наличия загара на лице. В состоянии I/R достоверно повышается число нейтрофилов. макрофагов и лимфоцитов в тканях лица, что указывает на развитие воспаления в тканях. Наличие загара отягощает состояние I/R в конце операции лифтинга лица.

СИГНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ КОЖИ ЛИЦА

Аутофагия (процесс катаболизма клеточных структур) участвует в гомеостазе тканей и клеток, регуляции обмена, удалении повреждённых органелл [Hill D. et al., 2021]. Активация аутофагии способствует заживлению ран; снижение активности аутофагии связано с накоплением повреждённой ДНК в клетках кожи, старением и окислительным стрессом [Song X., et al., 2017]. В связи с этим исследование роли аутофагии в клетках кожи в состояние I/R представляется актуальным.

Цель раздела – изучение влияния состояния I/R на экспрессию белков, сопряженных с аутофагией, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных при операции лифтинга лица, и зависимости данных показателей от возраста пациентов и УФ. Для оценки активности аутофагии используют белки LC3/LAMP2, Atg5, Beclin-1, p62 [Backe S. et al., 2023].

Во всех популяциях клеток (табл. 3) экспрессии белка LC3 в контроле снижена у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05). В состоянии I/R экспрессия LC3 повышена во всех клетках по сравнению с контролем (P<0,05) и снижается с возрастом во всех

типах клеток (P<0,05). Это указывает на повышенную активацию сигналов аутофагии при I/R, которая ослабевает с возрастом. Экспрессии белков Beclin-1 и Atg-5 имеют сходные тенденции с белком LC3: в контроле снижаются с возрастом во всех типах клеток, особенно у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05). При I/R экспрессия Beclin-1 и Atg-5 достоверно выше по сравнению с контролем и также имеет тенденцию к снижению с возрастом (P<0,05) для лиц старше 40 лет по сравнению с лицами до 30 лет (табл. 3).

Для рецептора p62 также установлены достоверные различия в экспрессии для лиц старше 50 лет по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05) в контроле и повышение экспрессии p62 во всех типах клеток при I/R P<0,05) с тенденцией к снижению с возрастом (табл. 3).

Таблица 3.

Экспрессия белков аутофагии в клетках, выделенных из образцов тканей при лифтинге лица

Белки аутофагии, mean (**)	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)		**21 – 30 лет**, (n = 18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)
	клетки эпителия								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
LC3	121 ± 3	123 ± 2	119 ± 3	105 ± 3*		204 ± 3#	183 ± 4*#	171 ± 5*#	158 ± 4*#
Beclin-1	137 ± 3	135 ± 3	129 ± 4*	125 ± 3*		191 ± 4#	189 ± 5#	173 ± 3*#	165 ± 4*#
Atg-5	72 ± 2	76 ± 3	68 ± 2	62 ± 2*		109 ± 3#	101 ± 3*#	99 ± 3*#	92 ± 3*#
p62	201 ± 4	198 ± 5	162 ± 5**	144 ± 4*		254 ± 3#	248 ± 2*#	240 ± 3*#	231 ± 4*#
	адипоциты								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
LC3	108 ± 4	102 ± 5	96 ± 3*	92 ± 4*		182 ± 3#	172 ± 4*#	175 ± 6#	161 ± 3*#
Beclin-1	211 ± 4	205 ± 5	186 ± 4*	152 ± 4*		287 ± 5#	281 ± 3#	273 ± 4*#	269 ± 4*#
Atg-5	83 ± 2	85 ± 3	79 ± 3	71 ± 3*		149 ± 4#	145 ± 5#	138 ± 5*#	132 ± 4*#
p62	234 ± 5	228 ± 6	195 ± 4*	171 ± 4*		273 ± 3#	271 ± 6#	264 ± 4*#	250 ± 4*#
	лимфоциты								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
LC3	145 ± 3	139 ± 5	127 ± 4*	121 ± 4*		221 ± 4#	219 ± 2#	202± 4*#	184 ± 5*#
Beclin-1	102 ± 2	100 ± 3	89 ± 4*	81 ± 5*		185 ± 5#	181 ± 6#	170 ± 4*#	165 ± 5*#
Atg-5	63 ± 3	60 ± 4	58 ± 3	52 ± 4*		98 ± 3#	95 ± 3#	89 ± 3*#	84 ± 4*#
p62	189 ± 5	182 ± 5	173 ± 4*	165 ± 5*		234 ± 4#	236 ± 5#	227 ± 4*#	208 ± 4*#
	Нейтрофилы								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
LC3	131 ± 2	130 ± 4	122 ± 3*	116 ± 5*		185 ± 4#	183 ± 5#	172 ± 3*#	164 ± 3*#
Beclin-1	122 ± 4	124 ± 5	118 ± 4	112 ± 3*		194 ± 4#	187 ± 3#	175 ± 4*#	159 ± 3*#
Atg-5	73 ± 1	72 ± 3	69 ± 3	62 ± 2*		149 ± 3#	142 ± 3*#	128 ± 6*#	121 ± 5*#
p62	195 ± 4	192 ± 6	189 ± 4	183 ± 3*		252 ± 5#	249 ± 4#	231 ± 4*#	224 ± 5*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*
*** mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы.*

Таким образом, при состоянии ишемии/реперфузии происходит активация процессов аутофагии, что подтверждается повышением уровня экспрессии её сигнальных белков и связано с нарушением питания и оксигенации клеток во время операции лифтинга лица.

Влияние УФ на сигнальные белки аутофагии в клетках кожи лица

Изменения от УФ могут влиять на заживление операционной раны, замедление восстановления кожи после операции, появление очагов некроза в операционном шве и другие осложнения после лифтинга лица. В фибробластах кожи УФ вызывает нарушение клеточного цикла, ускорение пролиферации и миграции клеток, при этом могут быть активированы сигнальные пути аутофагии, что может защитить клетки кожи от гибели [Lim G. et al., 2020].

Цель раздела – сравнение показателей аутофагии пациентов, которые имели загар не позднее 3 недель до операции лифтинга, с показателями аутофагии пациентов без загара.

Таблица 4.

Экспрессия белков аутофагии в клетках, выделенных из тканей при лифтинге лица у пациентов с загаром и без загара

Белки аутофагии, mean (**)	**Группы пациентов** (35 – 45 лет), в группе (n = 28)			
	клетки эпителия			
	контроль		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
LC3	120 ± 2	134 ± 3*	177 ± 3#	194 ± 4*#
Beclin-1	131 ± 4	149 ± 6*	176 ± 3#	189 ± 5*#
Atg-5	72 ± 2	93 ± 4*	82 ± 1#	98 ± 3*#
p62	183 ± 4	221 ± 5*	233 ± 5#	249 ± 4*#
	Адипоциты			
	контроль		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
LC3	99 ± 3	119 ± 4*	172 ± 3#	190 ± 4*#
Beclin-1	196 ± 4	233 ± 4*	276 ± 4#	299 ± 5*#
Atg-5	83 ± 3	99 ± 2*	139 ± 2#	156 ± 3*#
p62	211 ± 5	237 ± 4*	258 ± 5#	277 ± 5*#
	Лимфоциты			
	контроль		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
LC3	132 ± 4	149 ± 4*	212 ± 3#	233 ± 5*#
Beclin-1	94 ± 2	114 ± 3*	174 ± 4#	197 ± 3*#
Atg-5	58 ± 2	73 ± 4*	91 ± 2#	115 ± 3*#
p62	178 ± 4	198 ± 4*	228 ± 4#	246 ± 5*#
	нейтрофилы			
	контроль		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
LC3	127 ± 4	143 ± 48*	175 ± 4#	203 ± 5*#
Beclin-1	121 ± 5	135 ± 3*	179 ± 4#	199 ± 3*#
Atg-5	71 ± 3	82 ± 2*	134 ± 3#	156 ± 4*#
p62	191 ± 6	209 ± 4*	237 ± 4#	259 ± 5*#

 # P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю;

** P<0,05 по отношению к лицам без загара;*

*** mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы.*

Были отобраны 2 группы пациентов по 28 человек. 35–45 лет, по принципу случай / контроль, похожих по возрасту и т.д., но отличавшихся наличием загара. Загар обусловливает более высокий уровень активности аутофагии во всех типах клеток в контроле. Состояние I/R после операции у всех пациентов во всех клетках сопровождается достоверным более высоким уровнем экспрессии белков аутофагии по сравнению с контролем, при этом у лиц с загаром показатели экспрессии белков достоверно выше, чем показатели лиц без загара (P<0,05) (табл. 4).

Таким образом, загар у пациентов за 3 недели до операции лифтинга лица повышает уровень экспрессии белков – маркёров аутофагии в клетках эпителия, адипоцитах, лимфоцитах и нейтрофилах по сравнению с показателями лиц без загара, что указывает на негативное влияние УФ на клетки кожи лица. УФ также усиливает негативное влияние I/R на клетки кожи и подкожно-жировой ткани лица.

АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ ТКАНЕЙ ЛИЦА ПРИ ЛИФТИНГЕ

Цель раздела – определение маркёров апоптоза в клетках, выделенных из тканей во время операции лифтинга. Клетки, выделенные в самом начале операции – это ***контроль***, клетки, выделенные в конце операции (~через 3 часа) – ***ишемия/реперфузия***.

В состоянии I/R может быть гибель клеток в апоптозе – генно-регулируемом процессе, занимающем несколько часов, морфологически гибель клетки можно определить только на его поздних этапах. ***Спонтанный*** апоптоз отражает число клеток, имеющих морфологические признаки гибели в момент исследования. Если для идентификации клеток с активированными сигналами апоптоза, но без морфологических проявлений гибели, требуется дополнительное воздействие, это ***индуцированный*** апоптоз, для его регистрации мы использовали С2-церамид. Апоптоз оценивали в фиксированных и пермеабилизованных клетках по окраске пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере, что позволяет окрасить всю ДНК в клетке.

В контроле (табл. 5) максимальный процент спонтанного апоптоза был в клетках эпителия, достоверных различий в зависимости от возраста не выявлено, В состоянии I/R процент спонтанного апоптоза выше, чем в контроле, для всех типов клеток (P<0,05). Процент индуцированного апоптоза в контроле выше у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами до 30

лет (P<0,05), для клеток эпителия и адипоцитов выше для лиц старше 40 лет по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05). При I/R процент индуцированного апоптоза наибольший в клетках эпителия, для каждого типа клеток выше, чем в контроле (P<0,05) (табл. 5.). Повышение числа клеток иммунной системы в апоптозе может быть связано с высоким риском развития инфекций и частичных некрозов операционного шва.

Таблица 5.

Процент апоптоза в клетках, выделенных при операции лифтинга лица

Клетки	Группы пациенток					Группы пациенток			
	21 – 30 лет, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)		**21 – 30 лет**, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)
	Процент спонтанного апоптоза, %								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
Адипоциты	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2		6,8 ± 0,2#	6,9 ± 0,2#	7,4 ± 0,2#	7,8 ± 0,3*#
Нейтрофилы	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,2 ± 0,2		9,2 ± 0,3#	9,9 ± 0,3#	10,8 ± 0,3#	12,0 ± 0,3*#
Лимфоциты	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1		5,1 ± 0,3#	5,9 ± 0,3#	6,8 ± 0,2*#	7,4 ± 0,3*#
Эпителиальные клетки	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,2	5,6 ± 0,3	6,2 ± 0,3		8,4 ± 0,3#	8,9 ± 0,3#	9,7 ± 0,2*#	10,1 ± 0,3*#
	Процент индуцированного апоптоза, %								
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
Адипоциты	12 ± 1	13 ± 3	18 ± 2*	23 ± 3*		18 ± 3#	19 ± 2#	23 ± 3#	27 ± 2*#
Нейтрофилы	9 ± 1	9 ± 2	12 ± 1	15 ± 2*		16 ± 2#	17 ± 2#	21 ± 4#	25 ± 3*#
Лимфоциты	8 ± 1	8 ± 1	10 ± 2	13 ± 1*		11 ± 2#	12 ± 3#	13 ± 2#	14 ± 2#
Эпителиальные клетки	18 ± 2	19 ± 2	24 ± 2*	28 ± 5*		24 ± 3#	26 ± 2#	29 ± 2#	34 ± 2*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет.*

Далее приведён пример регистрации уровня спонтанного и С2-церамид-индуцированного апоптоза по данным проточной цитометрии (рис. 2).

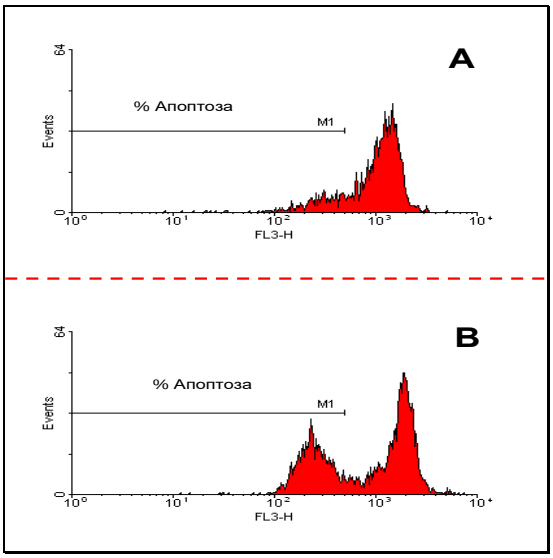

Рисунок 2. Примеры спонтанного (**A**) и индуцированного (**B**) апоптоза в гейте эпителиальных клеток.
Данные проточной цитометрии. Клетки фиксированы и окрашены пропидиумом иодидом в гипотоническим буфере, что окрашивает всю ДНК клетки. Правый пик – диплоидные клетки, левый (субдиплоидный) пик (M1) – клетки в апоптозе.

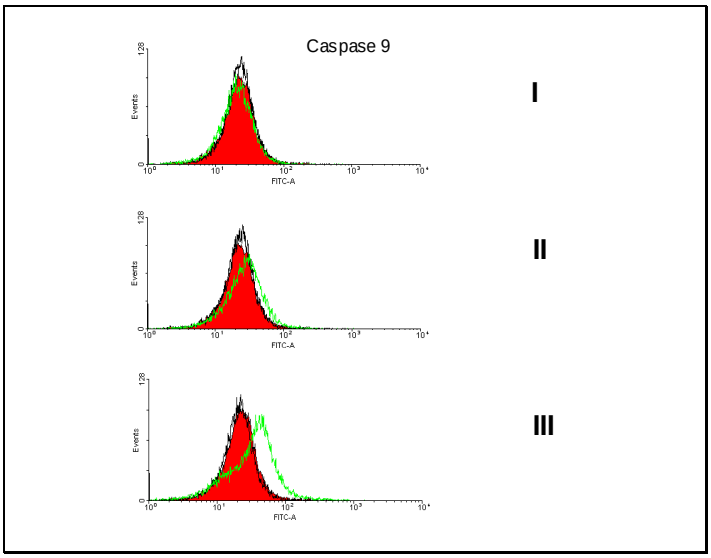

Рисунок 3. Гистограммы, отражающих уровень экспрессии каспазы-9 в лимфоцитах после обработки С2-церамидом у пациентов разного возраста.
Данные проточной цитометрии. Контроль обозначен красным пиком, гистограмма каспазы-9 показана в виде прозрачного зелёного пика. Гистограммы соответствуют показателям индивидуальных лиц в возрасте 31–40 лет (I); 41–50 лет (II); 51–64 лет (III).

Инициация апоптоза может быть при активации рецепторов апоптоза на мембране клеток при внешнем воздействии, изменении мембраны митохондрий, стрессе ER, изменении лизосом и т.д. Эти типы апоптоза различаются проведением сигналов и активацией специфических белков. Экспрессия рецепторов апоптоза на клетках, выделенных из операционной раны при лифтинге лица (табл. 6), показывает их повышение в контроле с возрастом пациентов, при I/R экспрессия всех рецепторов достоверно выше, чем в контроле, что указывает на активацию рецепторного типа апоптоза в состоянии I/R при лифтинге лица.

Таблица 6.

Экспрессия рецепторов апоптоза в клетках, выделенных из тканей при лифтинге лица

Рецепторы и каспазы	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)		**21 – 30 лет**, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
CD95, %	21 ± 2	24 ± 2	28 ± 2*	34 ± 3*		49 ± 4#	52 ± 6#	57 ± 5#	64 ± 5*#
CD95, mean(**)	108 ± 3	112 ± 4	122 ± 4*	139 ± 4*		140 ± 6#	145 ± 5#	158 ± 7*#	181 ± 9*#
TNF-R1, %	26 ± 2	29 ± 3	30 ± 3	35 ± 3*		37 ± 6#	39 ± 7#	42 ± 5#	45 ± 8#
TNF-R1, mean	75 ± 3	82 ± 3*	86 ± 3*	91 ± 2*		243 ± 9#	256 ± 11#	262 ± 10#	281 ± 11*
TNF-R2, %	20 ± 2	21 ± 2	23 ± 2	25 ± 2*		30 ± 5#	32 ± 7#	36 ± 5#	38 ± 6#
TNF-R2, mean	159 ± 4	164 ± 6	167 ± 5	170 ± 4*		189 ± 9#	193 ± 11#	197 ± 4#	211 ± 10#
Каспаза-3, mean	112 ± 4	125 ± 5*	138 ± 5*	149 ± 5*		177± 5#	186 ± 6#	194 ± 6*#	217 ± 9*#
Каспаза-2, mean	192 ± 3	204 ± 3*	209 ± 5*	223 ± 4*		241 ± 5#	267 ± 5*#	279 ± 5*#	294 ± 5*#
Каспаза-9, mean	204 ± 5	221 ± 4*	229 ± 4*	237 ± 5*		266 ± 4#	275 ± 4*#	288 ± 4*#	299 ± 6*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; *P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*

*** mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы.*

Активность каспазы-3 достоверно повышена при I/R по сравнению с контролем (табл.6), что отражает происходящие морфологические изменения в клетках при апоптозе. Активность каспаз повышена с возрастом и достоверно выше у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05) (рис. 3, табл.6). Активность каспаз -2 и -9 повышена при I/R, что указывает также на участие митохондриального типа апоптоза в состоянии I/R при лифтинге лица.

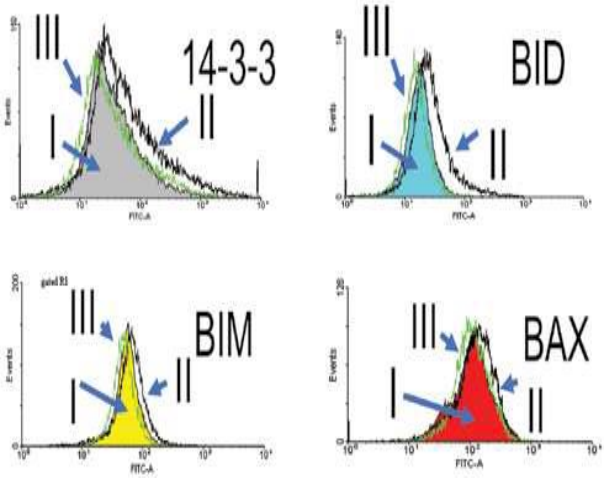

Рисунок 4. Гистограммы, отражающие экспрессию апоптозных белков митохондрий в гейте лимфоцитов у пациенток разного возраста (данные проточной цитометрии).

Окрашенные пики (I) отражают уровень экспрессии соответствующего белка в клетках пациенток до30 лет; (II) – экспрессия соответствующего белка у лиц 30 – 40 лет; (III) - экспрессия соответствующего белка у лиц старше 50 лет.

Таблица 7.

Экспрессия белков митохондрий, связанных с апоптозом, в общей популяции клеток, выделенных из тканей во время операции лифтинга лица

Белки, mean (*)	**Контроль** (n = 124)	**I/R** (n = 124)
Bad	59 ± 3	62 ± 4
Bid	48 ± 4	72 ± 4#
Bak	121 ± 3	169 ± 5#
Bax	132 ± 4	176 ± 6#
Bim	72 ± 5	98 ± 4#
14-3-3	151 ± 6	196 ± 5#
(p)**-Bax	82 ± 3	112 ± 3#
(p)-Bak	97 ± 5	134 ± 4#
(p)-Bim	109 ± 2	141 ± 5#
(p)-14-3-3	173 ± 5	206 ± 4#
tBid	62 ± 3	135 ± 6#

**mean – интенсивность флуоресценции клеток, в условных единицах.*

***(p) – фосфорилированный белок;*

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии (**I/R**) к контролю.*

Экспрессия белков Bid, Bak, Bax, Bim, 14-3-3, сопряжённых с изменением мембран митохондрий при апоптозе, достоверно выше при I/R по сравнению с контролем (табл. 7). Повышение уровня экспрессии фосфорилированных форм этих белков при I/R отражает активацию их сигнальных путей при митохондриальном типе апоптоза. Имеются возрастные особенности экспрессии апоптозных белков митохондрий (рис. 4, табл. 8). Белок Bcl-2 является антиапоптозным, его экспрессия снижается при состоянии I/R, а также с возрастом.

Таблица 8.

Экспрессия белков митохондрий в клетках тканей лица при лифтинге в зависимости от возраста

Белки мито-хондрий, mean (**)	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)		**21 – 30 лет**, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
Bcl-2	64 ± 3	55 ± 4*	48 ± 3*	41 ± 3*		295 ± 9	289 ± 11	267 ± 8*#	158 ± 9*#
Bax	98 ± 3	112 ± 5*	119 ± 3*	128 ± 4*		144 ± 6	156 ± 4*#	171 ± 5*#	192 ± 4*#
Bak	86 ± 4	105 ± 5*	111 ± 5*	119 ± 4*		132 ± 5	144 ± 3*#	159 ± 4*#	180 ± 6*#
Bid	32 ± 3	39 ± 4*	43 ± 5*	49 ± 4*		56 ± 2	64 ± 2*#	76 ± 3*#	82 ± 4*#
Bim	53 ± 3	66 ± 2*	70 ± 2*	75 ± 3*		87 ± 3	92 ± 3	104 ± 5*#	118 ± 4*#
14-3-3	130 ± 5	143 ± 2*	149 ± 5*	155 ± 4*		172 ± 5	187 ± 4	207 ± 5*#	223 ± 5*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*
*** mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы.*

Фактор транскрипции HIF-1α активируется при снижении парциального давления кислорода, отвечает за адаптацию клеток при I/R, потенцирует сукцинатоксидазное окисление и выживаемость клеток [Hsiao H. et al., 2016]. При гипоксии, стрессе, апоптозе и т.д. снижается мембранный потенциал митохондрий ΔΨμ, что можно оценить по изменению флуоресценции красителя JC-1 в клетке. При активации апоптоза уровень ΔΨμ в клетке снижается.

Таблица 9.

Экспрессия маркёра гипоксии фактора HIF-1α и уровень мембранного потенциала митохондрий ΔΨμ (по окраске JC-1) в клетках, выделенных из тканей при лифтинге лица, в зависимости от возраста

Показатели, mean (**)	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)		**21 – 30 лет**, (n = 30)	**31 – 40 лет**, (n = 34)	**41 – 50** лет, (n = 36)	**51 – 64** года, (n = 34)
	контроль					***ишемия/реперфузия***			
HIF-1α	82 ± 5	94 ± 4	109 ± 5**	121 ± 5**		135 ± 5	147 ± 4	161 ± 5**	188 ± 6**
JC-1	132 ± 5%	121 ± 4%	112 ± 4%	98 ± 5%		104 ± 5	95 ± 3	82 ± 4**	75 ± 3**

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*
*** mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы.*

Таблица 10.

Влияние загара на процент клеток в апоптозе, выделенных из тканей при лифтинге лица

Клетки	**Группы пациентов** (35-45 лет), в группе (n = 20)								
	Процент спонтанного апоптоза, %					***Процент индуцированного апоптоза, %***			
	контроль		***ишемия/реперфузия***			***контроль***		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**		**без загара**	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
Адипоциты	3,8 ± 0,2	5,6 ± 0,1 *	7,2 ± 0,2	8,9 ± 0,6 *		15 ± 1	19 ± 3	20 ± 2	24 ± 3
Нейтрофилы	4,1 ± 0,3	5,9 ± 0,2 *	10,5 ± 1,3	14,1 ± 2,1 *		11 ± 2	16 ± 2 *	17 ± 2	21 ± 2 *
Лимфоциты	2,2 ± 0,2	4,5 ± 0,3 *	6,4 ± 0,2	8,6 ± 0,4 *		9 ± 2	14 ± 2 *	12 ± 1	16 ± 2 *
Эпителиаль-ные клетки	5,4 ± 0,3	7,1 ± 0,3 *	9,4 ± 0,5	12,2 ± 1,2		23 ± 3	28 ± 3	27 ± 2	31 ± 3

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам без загара*

При I/R повышен уровень экспрессии фактора HIF-1α и снижен ΔΨμ (по окраске JC-1) по сравнению с контролем (P<0,05) (табл. 9). У лиц старше 50 лет выше интенсивность флуоресценции HIF-1α и ниже уровень ΔΨμ по сравнению с пациентами до 30 лет (P<0,05), что отражает снижение энергетического потенциала клеток с возрастом. Это необходимо учитывать при операции лифтинга для минимизации послеоперационных осложнений.

Также необходимо учитывать наличие свежего загара у пациентов перед операцией, так как это повышает процент клеток в апоптозе (табл. 10), что может оказать влияние на развитие осложнений после операции лифтинга лица.

Таким образом, установлено, что в клетках, выделенных из кожи и подкожно-жировой ткани лица, даже в начале операции, экспрессированы все необходимые компоненты сигнальных путей апоптоза, а также есть все предпосылки для активации апоптоза во время операции. В состоянии ишемии/реперфузии экспрессия рецепторов апоптоза, а также каспаз и сигнальных белков апоптоза, связанных с митохондриями, достоверно повышена по сравнению с показателями контрольных клеток, выделенных в начале операции лифтинга лица. Полученные данные необходимо учитывать при проведении операции.

ОЦЕНКА НЕКРОПТОЗА В КЛЕТКАХ КОЖИ ПРИ ЛИФТИНГЕ ЛИЦА

Поскольку известно, что в состоянии I/R часть клеток гибнет путём некроза, одним из видов которого является ***некроптоз***, то целью данного раздела работы была оценка уровня спонтанного и TNF-индуцированного некроптоза, а также экспрессии сигнальных белков некроптоза в клетках, выделенных при операции лифтинга лица.

Для измерения спонтанного некроза клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и окрашивали пропидиумом иодидом (PI) в гипотоническом буфере. Для измерения индуцированного некроза клетки предварительно инкубировали с TNF-α, отмывали, фиксировали и окрашивали PI. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе SimulSet. Пример гистограммы клеток с некрозом приведен на рисунке 5.

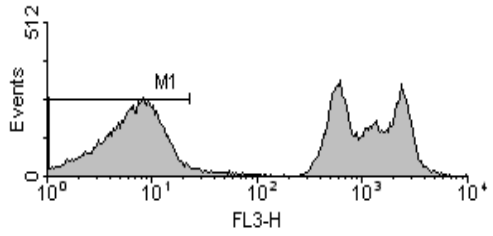

Рисунок 5. Пример гистограммы клеток с некрозом. *Пик диплоидных клеток расположен справа, пик клеток в некрозе (курсор M1) и расположен слева.*

Для уточнения процента некроза в отдельных популяциях клеток, выделенных из тканей лица, были проанализированы гейты соответствующих клеток. Так как применённый нами метод измерении на проточном цитометре выявляет все клетки, которые погибли в результате распада плазматической мембраны, невозможно вычленить среди них те, которые погибли некроптозом. В связи с этим мы указываем гибель клеток как некроз (табл. 11).

Процент клеток со спонтанным некрозом (табл. 11) существенно меньше, чем процент клеток с апоптозом (табл. 5). Измерение как спонтанного, так и индуцированного некроза в контроле не выявило достоверных различий для лиц разного возраста, хотя имелась тенденция к повышению уровня некроза с возрастом (P>0,05). В состояние I/R процент клеток со спонтанным некрозом достоверно выше, чем в контроле, для нейтрофилов и клеток эпителия показано повышение процента TNF-индуцированного некроза с возрастом (P<0,05).

Для установления типа некроза клетки были проанализированы на предмет экспрессии белков – вторичных мессенджеров сигнальных путей некроптоза (киназы RIPK1, RIPK3, MLKL, а также рецепторы TNFα-R1). Также измерен уровень экспрессии фосфорилированных

киназ ((p)-RIPK1, (p)-RIPK3, (p)-MLKL), повышение их экспрессии указывает на активацию сигналов некроптоза в клетках [Li T. et al., 2021].

Таблица 11.

Процент некроза в клетках, выделенных из тканей при операции лифтинга лица

Клетки	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)		**21 – 30 лет**, (n =18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)
	Процент спонтанного некроза, %								
	Контроль					***ишемия/реперфузия***			
Адипоциты	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3		5,0 ± 0,2#	5,3 ± 0,3#	5,3 ± 0,2#	5,5 ± 0,3#
Нейтрофилы	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4		7,8 ± 0,5#	7,9 ± 0,3#	8,3 ± 0,4#	8,5 ± 0,4#
Лимфоциты	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2		2,9 ± 0,2#	3,2 ± 0,2#	3,3 ± 0,2#	3,5 ± 0,2#
Эпителиальные клетки	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1		7,1 ± 0,4#	7,5 ± 0,4#	7,7 ± 0,5#	7,9 ± 0,4#
	Процент TNF – индуцированного некроза, %								
	Контроль					***ишемия/реперфузия***			
Адипоциты	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,3		11 ± 2#	12 ± 2#	14 ± 2#	15 ± 2#
Нейтрофилы	5,9 ± 0,4	6,2 ± 0,3	6,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3		15 ± 2#	17 ± 3#	20 ± 3#	21 ± 2*#
Лимфоциты	4,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,1 ± 0,4		8 ± 1#	9 ± 1#	9± 1#	10 ± 1#
Эпителиальные клетки	6,8 ± 0,4	7,0 ± 0,3	7,1 ± 0,3	7,3 ± 0,5		14± 1#	15± 3#	17± 2#	19± 2*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*

Таблица 12.

Экспрессия белков некроптоза в клетках, выделенных при операции лифтинга лица, в зависимости от возраста

Белки, (mean)**	**Группы пациенток**					**Группы пациенток**			
	21 – 30 лет, (n = 18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)		**21 – 30 лет**, (n =18)	**31 – 40 лет**, (n = 22)	**41 – 50** лет, (n = 24)	**51 – 64** года, (n = 20)
	Спонтанный некроптоз								
	Контроль					***ишемия/реперфузия***			
TNF-R1	713 ± 9	731 ± 8	892 ± 8*	955 ± 11*		748 ± 11#	781 ± 14*#	904 ± 21*	977 ± 18*
RIPK1	64 ± 7	67 ± 5	78 ± 7*	106 ± 4*		76 ± 4#	81 ± 5#	92 ± 4*#	118 ± 6*
RIPK3	47 ± 6	55 ± 7	59 ± 6	75 ± 4*		55 ± 5	59 ± 3	71 ± 4*#	83 ± 5*
MLKL	30 ± 4	36 ± 5	38 ± 5	56 ± 5*		42 ± 3#	47 ± 4#	59 ± 5*#	69 ± 4*#
(p)***-RIPK1	74 ± 3	78 ± 5	109 ± 4*	120 ± 5*		81 ± 7	93 ± 8	115 ± 4*	127 ± 6*
(p)-RIPK3	69 ± 5	75 ± 4	94 ± 3*	98 ± 4*		74 ± 5	85 ± 4#	99 ± 5*	105 ± 4*
(p)-MLKL	90 ± 7	101 ± 6	125 ± 3*	135 ± 4*		98 ± 6	115 ± 7*	129 ± 5*	141 ± 6*
	TNF – индуцированный некроптоз								
	Контроль					***ишемия/реперфузия***			
(p)-RIPK1	89 ± 5	95 ± 8	134 ± 5*	161 ± 6*		115 ± 6#	124 ± 5	139 ± 6*	172 ± 7*
(p)-RIPK3	77 ± 5	88 ± 4	111 ± 7*	138 ± 5*		87 ± 4	106 ± 5*	124 ± 5*	149 ± 6*
(p)-MLKL	96 ± 6	106 ± 6	138 ± 8*	185 ± 7*		119 ± 6	127 ± 7	142 ± 7*	191 ± 8*

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*
***mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы; ***(p) – фосфорилированные белки.*

Экспрессия сигнальных белков некроптоза (табл. 12) у пациентов старше 50 лет повышена по сравнению с лицами до 30 лет (P<0,05). У лиц старше 50 лет повышена экспрессия рецепторов TNFα-R1 (P<0,05), отвечающих, в том числе, за переключение сигналов апоптоза и некроза [Al-Botaty B. et al., 2022]. Уровень экспрессии фосфорилированных киназ выше у лиц старше 40 лет по сравнению с лицами до 30 лет

(P<0,05), что отражает активацию сигналов некроптоза в клетках с возрастом. При I/R уровень экспрессии маркёров некроптоза выше по сравнению с контролем (табл. 12).

Экспрессия сигнальных белков некроптоза была проанализирована в клетках пациентов без загара (n=53) по сравнению с клетками пациентов с загаром (n=31) (табл. 13). Выявлено достоверное различие для всех исследованных показателей, как для нативных, так и для фосфорилированных форм белков, что прямо указывает на активацию сигналов некроптоза в клетках, выделенных из тканей лица, под воздействием УФ.

Таблица 13.

Экспрессия белков некроптоза в клетках, выделенных при операции лифтинга лица у пациентов с загаром (n=31) и без загара (n=53)

Белки, (mean)**	**Группы пациентов** (35 – 45 лет),								
	Процент спонтанного некроптоза, %					***Процент TNF-индуцированного некроптоза, %***			
	контроль		***ишемия/реперфузия***			***контроль***		***ишемия/реперфузия***	
	без загара	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**		**без загара**	**с загаром**	**без загара**	**с загаром**
TNF-R1	843 ± 4	781 ± 4*	885 ± 9#	806 ± 9*#		*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*
RIPK1	97 ± 3	62 ± 2*	114 ± 5#	79 ± 4*#		*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*
RIPK3	68 ± 6	43 ± 5*	101 ± 4#	61 ± 3*#		*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*
MLKL	49 ± 3	32 ± 2*	78 ± 5#	44 ± 3*#		*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*
(p)***-RIPK1	119 ± 8	62 ± 3*	127 ± 5	72 ± 5*#		146 ± 4	91 ± 5*	152 ± 6	105 ± 5*#
(p)-RIPK3	94 ± 4	55 ± 2*	109 ± 6#	69 ± 5*#		124 ± 5	78 ± 4*	130 ± 4	101 ± 5*#
(p)-MLKL	139 ± 6	71 ± 4*	146 ± 4	102 ± 6*#		169 ± 5	102 ± 3*	176 ± 5	124 ± 4*#

*# P<0,05 по отношению ишемии/реперфузии к контролю; * P<0,05 по отношению к лицам моложе 30 лет;*
***mean – интенсивность флуоресценции, условные единицы; ***(p) – фосфорилированные белки. N/A – нет данных.*

Таким образом, наличие загара, полученного не позднее, чем за 3 недели до операции лифтинга лица, обусловливает угрозу развития послеоперационных осложнений, связанных с частичным некрозом операционного шва, поэтому операция не желательна сразу после загара.

В данном разделе работы проанализированы сигнальные белки некроптоза, показано участие этого типа некроза в гибели клеток при состоянии I/R. Следует подчеркнуть, что по нашим данным процент клеток в некроптозе меньше процента клеток в апоптозе, активность сигналов некроптоза также менее выражена, чем активность сигналов апоптоза. Однако наличие этого типа гибели клеток обязательно следует учитывать при проведении операции лифтинга лица, так как могут быть осложнения в виде очаговых некрозов операционного шва.

РОЛЬ ПАТОЛОГИИ ЗУБОВ В ОСЛОЖНЕНИЯХ ПОСЛЕ ЛИФТИНГА ЛИЦА

Всем пациентам перед операцией лифтинга проведена санация полости рта. Среди всех пациентов были выбраны 100 человек, 76 из них потребовалось дополнительное лечение, 24 – нет (контроль). В послеоперационном периоде у некоторых пациентов были осложнения, анализ которых был проведён в зависимости от имевшейся патологии зубов. Даже у санированных перед операцией пациентов достоверно повышена частота случаев возникновения осложнений – 56 (73,6%), по сравнению с пациентами со здоровой полостью рта – 7 (29,1%) (p<0,05) (Табл. 14).

Осложнения не были напрямую связаны с инфицированием: число случаев инфекции у пациентов с патологией полости рта 5 (6,6%), у здоровых лиц контрольной группы её не было. Осложнения, в основном, касались удлинения сроков заживления операционной раны, развития гематомы, отека мягких тканей (более выраженного и продолжительного по сравнению с обычным послеоперационным состоянием). Достоверно чаще осложнения выявлены у пациентов с пролеченным кариесом дентина – 28 (68,3%) (p<0,05), пульпитом –

11 (100%) (p<0,05), хроническим периодонтитом – 14 (93,4%) (p<0,05) по сравнению со здоровыми пациентами – 7 (29,2%).

Таким образом, наличие хронической патологии полости рта, даже после санации повреждённых зубов, оказывает негативное влияние на развитие осложнений после операции лифтинга лица, что необходимо учитывать при проведении операции.

Таблица 14.

Послеоперационные осложнения (абс., %) у пациентов экспериментальной группы (n=100), имевших патологию зубов до операции лифтинга лица (n=76) и контрольной группы (n=24)

Патология зубов	**Осложнения после лифтинга лица, %**					
	инфекция	отек тканей	гематома	частичный некроз шва	удлинение сроков заживления раны	Всего
Пульпит (n=11)	1 (9,1%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	5 (45,4%)	11 (100%)*
Кариес дентина (n=41)	3 (7,3%)	8 (19,6%)	5 (12,2%)	1 (2,4%)	11 (26,8%)	28 (68,3%)*
Хронический периодонтит (n=15)	1 (6,0%)	3 (20%)	3 (20%)	1 (6,7%)	6 (40%)	14 (93,4%)*
Клиновидный дефект (n=9)	-	1 (11,1%)	1 (11,1%)	-	1 (11,1%)	3 (33,3%)
Контроль (n=24)	-	5 (20,9%)	2 (8,3%)	-	-	7 (29,2%)

**P<0,05 при сравнении значений в группе с патологинй зубов с контрольной группой.*

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЭНЕРГЕТИКОВ НА СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ ПОСЛЕ ЛИФТИНГА ЛИЦА

Клеточные энергетики – это препараты, повышающие энергетический статус клеток, их применение было проведено до операции лифтинга лица, после операции сравнили процент осложнений у пациенток, не принимавших препараты (контроль), с показателями пациенток, которые принимали один из препаратов (янтарная кислота (n=18), коэнзим Q (n=22) и L-карнитина (n=21), 21 день)**.**

Оценивали наличие некроза мягких тканей в области послеоперационного рубца, серомы, гематомы в области рубца, тромбоза вен подкожной клетчатки, неровного рубца, инфекционных осложнений, а также длительность периода заживления раны. Показано, что прием янтарной кислоты положительно влияет на сроки заживления послеоперационной раны (на 3–5 дней, p<0,05), а также снижает риск развития гематомы и зон частичного некроза в области послеоперационного рубца (p<0,05). Прием коэнзима Q и L-карнитина достоверно повышает энергетический статус митохондрий клеток и их выживаемость: выявлен достоверно более низкий процент клеток в апоптозе (коэнзим Q – 3,9±0,8%; L-карнитин – 4,2±0,7% по сравнению с контролем – 8,2±1,3% (p<0,05)), доля клеток в некрозе <1%, что положительно влияет на сроки заживления послеоперационной раны, которые сокращались на 4±1,2 и 3±0,8 дня в группах, соответственно, по сравнению с контролем (p<0,05).

Таким образом, наш небольшой эксперимент по применению препаратов, повышающих энергетический статус клеток, указывает на возможность более широкого их применения в хирургической практике для всесторонней оценки возможного нивелирования негативных последствий ишемии/реперфузии при операциях лифтинга лица.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Число операций по коррекции контуров лица (лифтинг) возрастает с каждым годом. Это связано с тем, что лицо человека претерпевает возрастные изменения, обусловленные действием гравитации на ткани лица, гормональной регуляцией тканей и т.д. [Fede C. et al., 2016]. С возрастом появляются птоз, дряблость кожи, обвисание овала лица, морщины, что можно скорректировать при лифтинге лица. Эта операция идёт более 3 ч, после снятия лигатуры и восстановления кровотока в тканях лица происходят процессы, приводящие к гибели клеток, это состояние ишемии/реперфузии (I/R). Проблема I/R имеет многолетнюю историю, но остаётся неразрешённой до сих пор. Исследования, касающиеся механизмов I/R, направлены на создание новых препаратов или подходов к минимизации последствий I/R.

В нашей работе была проведена оценка состояние клеток кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных в самом начале операции (контроль) и по её завершению, то есть в состоянии I/R, идентифицированы клетки эпителия, адипоциты, нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги / моноциты, показано, что соотношение основных популяций клеток изменяется с возрастом. Для данной работы применены методы выделения клеток с жизнеспособностью >98%, что позволило анализировать экспрессию сигнальных белков, отвечающих за активацию аутофагии, апоптоза и некроптоза. Для их идентификации использована окраска моноклональными антителами, меченными флуоресцентными красителями, и анализ флуоресценции белков методом проточной цитометрии.

В нашей работе впервые показано, что при I/R в клетках кожи и подкожно-жировой ткани лица одновременно активированы разные механизмы гибели – апоптоз, некроптоз (есть данные литературы и по наличию ферроптоза), а также активированы процессы аутофагии, которая должна защищать клетки от гибели и сохранить их жизнеспособность. Был измерен уровень спонтанного апоптоза, то есть процент клеток, в которых на момент исследования имелся распад ДНК при сохранённой мембране клеток. Это отличие апоптоза от некроза, при котором мембрана клетки разрушается. Используемый нами метод окраски фиксированных и пермеабилизованных клеток пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере позволяет прокрашивать всю ДНК клетки, одновременно определять процент апоптоза, некроза и число живых клеток. Так было показано, что при I/R процент клеток в некрозе ниже, чем процент клеток в апоптозе, наиболее подвержены апоптозу клетки эпителия. Мы не получили различий по проценту некроза клеток в зависимости от возраста. При оценке индуцированного апоптоза, то есть, когда в клетке запущены сигналы гибели, но ещё нет морфологических проявлений, применение дополнительных стимулов позволяет выявить клетки с активированными сигналами апоптоза. Уровни спонтанного и С2-церамид-индуцированного апоптоза повышены при I/R по сравнению с контролем, что более выражено у лиц старше 50 лет. Стареющая кожа лица реагирует на операцию тяжелее, чем кожа молодых людей.

Показано негативное влияние УФ на все изученные сигнальные белки; наличие загара, полученного не позднее, чем за 3 недели до операции, ухудшало состояние клеток, что указывает на необходимость воздержаться от операции до восстановления кожи.

Совместно с коллегами из Сеченовского университета, кафедра стоматологии, мы провели исследование по влиянию хронической патологии зубов на осложнения после операции лифтинга лица. Несмотря на санацию зубов до операции, у пациентов с хроническим пульпитов и периодонтитов процент осложнений выше, чем у пациентов без патологии зубов. Важно перед операцией выявлять все возможные риски развития осложнений.

Для улучшения метаболизма клеток и снижения риска осложнений, мы провели небольшой эксперимент. Группа пациентов добровольно в течение 3-х недель до операции лифтинга лица принимала препараты, повышающие энергетический потенциал митохондрий (янтарную кислоту, коэнзим Q или L-карнитин). В послеоперационном периоде мы получили некоторое снижение числа осложнений. Для того, чтобы делать далекоидущие выводы, этих результатов недостаточно, работа должна быть продолжена. Однако полученные данные обнадёживают, что можно купировать негативные последствия ишемии/репефузии.

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что операция по коррекции лица сопровождается активацией процессов аутофагии в клетках кожи и подкожно-жировой ткани. Экспрессия белков, сопряженных с аутофагией, снижается с возрастом.
2) Показано изменение мембранного потенциала митохондрий в клетках, в которых активированы процессы аутофагии.
3) Показано, что в клетках кожи при операции лифтинга лица активированы сигнальные пути апоптоза, что отражается на повышении уровня индуцированного С2-церамидом апоптоза. Возрастные изменения кожи обусловливают более высокий риск развития послеоперационных осложнений, связанных с гибелью клеток кожи после операции.
4) Наличие загара обусловливает повышение уровня индуцированного С2-церамидом апоптоза, указывает на готовность клеток кожи к гибели при возникновении неблагоприятных факторов, в том числе ишемии, вызванной оперативным вмешательством на тканях лица.
5) Применение клеточных энергетиков в течение 21 дня до операции достоверно повышает энергетический статус митохондрий клеток и их выживаемость, что положительно влияет на сроки заживления послеоперационной раны (коэнзима Q, L-карнитина), снижает риск развития гематомы, некроза в области послеоперационного рубца (янтарная кислота).
6) Наличие хронических заболеваний зубов (кариес дентина, пульпит, хронический периодонтит, клиновидный дефект зуба) оказывает негативное влияние на состояние клеток локальной иммунной системы ротовой полости у пациентов пластических хирургов, что негативно влияет на течение послеоперационного периода после проведения операции лифтинга лица.
7) Состояние клеток подкожно-жировой клетчатки, а также активация в них сигнальных путей апоптоза, является патофизиологической основой для развития послеоперационных осложнений.

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1.Абрамян Ш.М., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Влияние возраста и загара на экспрессию вторичных мессенджеров сигнальных путей некроптоза в клетках кожи при операциях лифтинга лица // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174. - № 12. – С. 674-677.

Abramyan Sh.M., Volkova E.N., Morozov S.G. Effects of age and suntan on the expression of second messenger signaling pathways of necroptosis in skin cells during facelifting surgery // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – V. 174. - № 6. – P. 707-710.

2. Абрамян Ш.М., Кандалова О.В., Волкова Е.Н., Найденов Н.П., Морозов С.Г. Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2022. - Т. 66. - №4 - С. 107-114.

3. Абрамян Ш.М., Рожнова Е.В., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль клеток иммунной системы ротовой полости в послеоперационных осложнениях при лифтинге лица // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2018. - Т. 62. - №4 - С. 174-178.

4. Абрамян Ш.М., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Возрастные особенности экспрессии маркёров аутофагии в клетках кожи пациентов с лифтингом лица // Патогенез. - 2018. - Т. 16. - №4. - С. 174-177.

5. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Определение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток, полученных из оперативного материала при лифтинге лица // Патогенез. - 2016. - Т. 14. - №4. - С. 63-68.

Другие публикации:

1. Кандалова О.В., Абрамян Ш.М., Ключникова Д.Е. Возрастные изменения иммунной системы кожи лица и их роль в осложнениях при лифтинге лица / 16 Всероссийский съезд национального альянса дерматовенерологов и косметологов 14-16 марта 2023 г., Москва. Сборник трудов. – С. 49-50.

2. Кандалова О.В., Ключникова Д.Е., Абрамян Ш.М. Состояние иммунной системы полости рта при бактериальной и грибковой микст-инфекции / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной микробиологии: теория, методология, практика, инноватика», 19 мая 2022 г. Курск. – С. 96-101. Изд-во Курского государственного медицинского университета, 2022. – 204 с.

3. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Факторы риска развития микозов лица как осложнение после пластической хирургии головы и шеи // Успехи медицинской микологии. - 2017. - Т. XVII. Труды четвертого съезда микологов России, Москва, 12-14 апреля 2017. - С. 234-236. - Москва, Издательство Национальной академии миологии, 2017. – 486с. ISSN 2310-9467, ISBN 978-5-901-578-30-8.

4. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Особенности кожи и их роль в пластической хирургии лица / Всероссийская научно-практическая конференция БОТКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ 11-12 мая 2017 г. Сборник тезисов под ред. академика РАН Мазурова В.И. - С. 5-7. СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2017. – 319с. ISBN 978-5-9908987-3-8.

5. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. - 2017. - №1. Материалы конференции памяти акад. Н.О. Миланова «Пластическая хирургия в России, актуальные вопросы микрохирургии» 16-17 февраля 2017, Москва. - С. 70. (ISSN печатной версии 2072-8093).

6. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль лимфоцитов кожи и подкожно-жировой ткани в развитии осложнений после операции лифтинга лица // Трансляционная медицина. - 2017. - Т. 4. - №S3. Тезисы научно-практической конференции «Санкт-Петербургский лимфологический форум», 12-13 октября 2017 г. - С. 6.

7. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Сравнение числа осложнений при проведении пластических операций на лице у женщин, принимавших препараты, повышающие энергетический статус клетки / АЛЬМАНАХ института хирургии имени А.В. Вишневского. – 2017. - № 1. Тезисы Национального хирургического конгресса совместно с XX юбилейным съездом РОЭХ, 4-7 апреля 2017 г., Москва. – С. 1542-1543 (Тезисы № 1831). ISSN 2075-6895.

8. Абрамян Ш.М. Изучение молекулярных механизмов ишемии – реперфузии и её значение для пластической хирургии / Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. Тезисы XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей 22 апреля 2017, Санкт-Петербург. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2017. – Т. 20. - С. 17-18. (Всего 680 с. ISSN 2221-5654).

9. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Некоторые особенности обследования и лечения больных, перенесших тяжёлую инфекционную патологию, перед проведением пластической операции на лице / Материалы Международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых», посвященной 140-летию со дня рождения профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, 15-16 мая 2017, Симферополь. – С. 3-4. (Всего 324с. ISBN 978-5-4465-1470-0).

10. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль клеточных энергетиков в купировании некроза тканей лица / Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. - № 4(60). Приложение 1. Всеармейская научно-практическая конференция, посвященная 95-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН профессора Г.И. Алексеева «Актуальные вопросы военно-полевой терапии», 27 октября 2017 г., Санкт-Петербург. Материалы конференции. – С.97.

11. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Экспрессия белков, сопряженных с аутофагией, как прогностические маркеры развития апоптоза и воспалительного процесса в

тканях кожи лица после операции / Сборник тезисов Сеченовского Международного Биомедицинского Саммита 2017 (СМБС-2017), 16-20 июня 2017 г., С. 28-29. - М.: Изд-во ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, 2017, 106 с.

12. Абрамян Ш.М., Рожнова Е.В., Иванченко О.Б., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль одонтогенной инфекции в развитии осложнений после операций лифтинга лица / Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы челюстно-лицевой хирургии и стоматологии», 21-22 ноября 2017 года, Санкт-Петербург. – С.7 (всего 105 с.).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

M – молярность
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РНК – рибонуклеиновая кислота
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
УФ – ультрафиолет
ATG – сигнальные белки аутофагии
ATF6 – сигнальные белки стресса ER
Bak – белки апоптоза митохондрий
Bax – белки апоптоза митохондрий
Bcl2 – семейство белков апоптозе
Beclin-1 – белки аутофагии
bFGF – основной фактор роста фибробластов
Bid – белки апоптоза митохондрий
Bim – белки апоптоза митохондрий
BNIP3/NIX – белки митофпгии
BSA – бычий сывороточный альбумин
CD – кластеры дифференцировки
CD95/FAS/ – рецептор апоптоза
ECM – экстраклеточный матрикс
ER – эндоплазматический ретикулум
F(ab)2 – фрагмент иммуноглобулина, связывающий антиген
FACSC – флуоресцентно-активированный клеточный сортер
FITC – флуоресцеин изотиоцианат
fmlp – форболовый эфир
FUNDC1 – белок, сопряженный с митофпгией
g – единица гравитации
GRP78 – глюкозо-регулируемый протеин, белок стресса ER
H2Odest – дистиллированная вода
HIF-1α – фактор, связанный с гипоксией
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
I/R – ишемия/реперфузия
IRE1α – сигнальные белки стресса ER
IκB – ингибитор
JC-1 – митохондриальный краситель
L – лиганд
LAMP2 – маркёр аутофагии
LC3 – микротрубочковый-ассоциированный белок-1, легкая цепь-3
mAb – моноклональные антитела
MLKL – псевдокиназа некроптоза
MMPs – матриксные металлопротеиназы
mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) – киназа mTOR
NF-κB – ядерный фактор транскрипции
(p) – фосфорилированные белки
p62 – рецептор, сопряжённый с аутофагией
PBS – фосфатный буферный раствор
PERK – сигнальные белки стресса ER
pH – концентрация ионов водорода
PI – пропидиум йодид
PINK1 – белок, сопряженный с митофагией
PMA – форболмиристатацетат
R – рецепторы
RIPK3 – сигнальный белок некроптоза
RPMI 1640 – среда для культивирования клеток
Ser – серин
TNF-α – фактор некроза опухоли альфа
XBP1 – сигнальные белки стресса ER
ΔΨμ – мембранный потенциал митохондрий