



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

**Adipocytolyse door subcutane injectie
van Lipostabil**

Literatuurstudie

Briefrapport 360007001/2010

dr. L.A.G.J.M. van Aerts



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Adipocytolyse door subcutane injectie van Lipostabil

Literatuurstudie

Briefrapport 360007001/2010
dr. L.A.G.J.M. van Aerts

Afkortingen	4
Samenvatting	5
1 Inleiding	6
1.1 Vraagstelling en reikwijdte van deze studie	6
1.2 Terminologie	6
1.3 Samenstelling, gebruik en dosering van Lipostabil	6
2 Methode	8
3 Resultaten	9
3.1 Werkingsmechanisme	9
3.2 <i>In vitro</i> studies	9
3.2.1 Muizenadipocyten	9
3.2.2 Humane adipocyten	10
3.2.3 Humane fibroblasten	11
3.2.4 Humane keratinocyten	11
3.2.5 Humane skeletspiercellen	11
3.2.6 Humane vasculaire gladde spiercellen	12
3.2.7 Humane endotheelcellen	12
3.2.8 Humane renale epitheelcellen	12
3.2.9 Conclusies ten aanzien van <i>in vitro</i> studies	12
3.3 <i>Ex vivo</i> studies	12
3.3.1 Varkenshuid en spierweefsel	12
3.3.2 Vetweefsel van konijn	13
3.3.3 Humaan vetweefsel	13
3.3.4 Conclusies ten aanzien van <i>ex vivo</i> studies	13
3.4 <i>In vivo</i> studies	14
3.4.1 Rat	14
3.4.2 Muis	15
3.4.3 Konijn	16
3.4.4 Kat	16
3.4.5 Mens	16
3.4.6 Conclusies ten aanzien van de <i>in vivo</i> studies	19
4 Discussie en conclusies	21
5 Referenties	23
Bijlage 1 Doseringvoorschrift voor 'injectie lipolyse'	25

Afkortingen

AP	alkaline fosfatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartaat aminotransferase
ChE	choline esterase
CRP	C-reactive proteïn
DC	natriumdeoxycholaat
FFA	vrije vetzuren
GDH	glutamaatdehydrogenase
GGT	γ -glutamyltransferase
IL-6	interleukine-6
IL-8	interleukine-8
IL-10	interleukine-10
LC ₅₀	concentratie waarbij de viabiliteit van cellen met 50% afneemt
LDH assay	assay om celviabiliteit te meten waarbij lekkage van lactaat dehydrogenase wordt gemeten
mRNA	messenger RNA
MTS assay	een gemodificeerd MTT assay
MTT assay	assay om celviabiliteit te meten, waarbij 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, een geel tetrazol, wordt gereduceerd tot het paarse formazan in levende cellen
PC	fosfatidylcholine
RNA	ribonucleotide nucleic acid
TNF- α	tumor necrose factor- α

Samenvatting

Op verzoek van de Inspectie voor de Gezondheidszorg heeft het RIVM een literatuurstudie uitgevoerd naar de preklinische veiligheidsaspecten van adipocytolyse door subcutane injectie van Lipostabil, vaak aangeduid als 'injectie lipolyse'. De hoofdbestanddelen van Lipostabil zijn fosfatidylcholine (PC) en natriumdeoxycholaat (DC). De werking van Lipostabil berust niet op bevordering van de lipolyse (enzymatische vetafbraak) door PC maar op cytolyse als gevolg van de detergentende eigenschappen van DC. Deze chemische eigenschap van DC is niet specifiek voor vetcellen. Ook andere celtypen lyseren door blootstelling aan DC.

De weefselschade die ontstaat, leidt tot een acute ontstekingsreactie in het vetweefsel (panniculitis) en uiteindelijk tot vorming van bindweefsel (fibrose).

Gewoonlijk blijven deze effecten beperkt tot het vetweefsel waar Lipostabil is geïnjecteerd. Echter wanneer DC in voldoende concentratie doordringt tot het omliggende spier- of huidweefsel, kunnen deze weefsels ook beschadigd raken.

1 Inleiding

Injectie van Lipostabil wordt voor cosmetische doeleinden toegepast om subcutaan vet te laten verdwijnen. De behandeling wordt vaak aangeduid met de term 'injectie lipolyse'. Er zijn bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg ernstige bijwerkingen gemeld naar aanleiding van deze toepassing van Lipostabil. Dit was aanleiding voor de inspectie het RIVM te verzoeken de veiligheid van Lipostabil nader te onderzoeken.

1.1 Vraagstelling en reikwijdte van deze studie

De Inspectie voor de Gezondheidszorg heeft het RIVM verzocht een overzicht te verschaffen van de toxicologische effecten van PC bevattende preparaten, in het bijzonder Lipostabil, bij het gebruik voor 'injectie lipolyse', voor zover dit op basis van preklinische gegevens middels een literatuuronderzoek mogelijk is. Klinische studies naar werkzaamheid en veiligheid van 'injectie lipolyse' worden in dit rapport buiten beschouwing gelaten. Experimentele data uit onderzoek verricht in humaan weefsel worden echter wel betrokken in deze literatuurstudie.

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen het project V/360007 'Toezichtondersteuning bij inspecties GMT'

1.2 Terminologie

De behandeling waarbij subcutaan vetweefsel wordt geïnjecteerd met als doel de omvang van het vetweefsel te laten slinken wordt vaak aangeduid als 'injectie lipolyse'. De term lipolyse komt uit de fysiologie. Onder *lipolyse* wordt de enzymatische afbraak van triglyceriden (lipiden) in glycerol en vrije vetzuren verstaan. Aanvankelijk werd verondersteld dat de injectie van PC-bevattende oplossingen dit fysiologische proces van lipolyse bevordert en zo leidt tot het slinken van vetweefsel. Echter, zoals uit de literatuur die in dit rapport wordt aangehaald blijkt, is de behandeling gebaseerd op het laten verdwijnen van vetweefsel door de celmembranen van vetcellen te vernietigen met het detergent DC dat in de geïnjecteerde oplossing aanwezig is. Hierbij treedt lysis van de vetcellen op. Het is daarom juister om van *adipocytolyse* te spreken [12]. Andere termen die voor de behandeling zijn voorgesteld zijn *injectie adipolyse* of *adipolytische therapie* [17].

De behandeling wordt ook wel geschaard onder de bredere term *mesotherapie*. De term mesotherapie heeft echter een andere herkomst en betekenis. Mesotherapie werd voor het eerst geïntroduceerd door Pistor in 1952 en behelst de injectie van kleine hoeveelheden van substanties voor medische of cosmetische doeleinden. Bij mesotherapie wordt vaak gebruik gemaakt van *intradermale* injectie [17].

1.3 Samenstelling, gebruik en dosering van Lipostabil

Volgens een doseringsschema ontvangen van de Inspectie voor de Gezondheidszorg worden in Nederland de volgende preparaten gebruikt voor adipocytolyse:

1. Lipostabil. Dit is een preparaat dat in Nederland niet als geneesmiddel is geregistreerd. Lipostabil N 5 ml (50 mg/mL) (Artegodan GmbH, Duitsland) bevat 250 mg fosfolipiden uit soja (93% PC), 126,50 mg DC, 45 mg benzylalcohol, 18 mg natriumchloride 15 mg ethanol, 12,65 mg natriumhydroxide, 0,75 mg DL,- α -tocopherol (vitamine E) en 4539 mg water [10]. Lipostabil wordt gebruikt voor adipocytolyse in het gelaat (bijlage 1). De dosering varieert per regio van 1,2 mL tot 5 mL. Per sessie wordt niet meer dan 10 mL aanbevolen. In Duitsland is Lipostabil wel als geneesmiddel geregistreerd, maar niet voor de indicatie adipocytolyse. In de artsenbijsluiters ('[Fachinformation](#)') van Lipostabil N wordt uitsluitend intraveneuze toepassing voor de profylaxis en behandeling van vetembolie toegestaan en is de sub-cutane injectie nadrukkelijk gecontraïndiceerd.
2. Lipostabil aangevuld met NaCl 0,9%, buflomedil en Polybion in een mengverhouding van 100:100:5:2 (v/v) (bijlage 1). Dit mengsel wordt in andere lichaamsregio's ingespoten in hoeveelheden van 0,4-0,5 mL per 1,5 cm en afhankelijk van de regio in hoeveelheden variërend van 2 tot 60 mL per regio en maximaal 100 mL per sessie. Buflomedil is in Nederland geregistreerd als Loftyl® tabletten en is bestemd voor de symptomatische behandeling van patiënten met chronisch perifere vaatziekte (stadium 2) (claudicatio intermittens). Buflomedil is een vaso-actieve verbinding en hoewel het werkingsmechanisme niet vast staat, geven resultaten van studies in dierproefmodellen en bij de mens aan, dat buflomedil een effect heeft op de microcirculatie en op de rheologische eigenschappen van het bloed ([Nederlandse IB-tekst RVG13909](#)). Omdat buflomedil een vaste stof is, maar in het doseringsvoorschrift van Lipostabil/NaCl een mengverhouding in volumina wordt vermeld en niet vermeld wordt welke concentratie van buflomediloplossing gebruikt dient te worden, is het onduidelijk welke eindconcentratie er in het te injecteren preparaat aanwezig is. Polybion is een vitamine B-complex preparaat. Polybion Forte van Merck Private Ltd. ampullen voor injectie bevat Pyridoxine:4mg/ml, Cyanocobalamin:8mcg/ml, Nicotinamide:40mg/ml, Riboflavin (Vitamin B2):4mg/ml en Thiamine HCl (Vitamin B1):10mg/ml.

In dit rapport zal vooral ingegaan worden op de hoofdbestanddelen van Lipostabil: PC en DC, waarvan de molaire ratio in dit product 1 is.

In het doseringsvoorschrift zoals hierboven samengevat wordt Lipostabil voor toediening in het gelaat onverdund toegepast, maar in andere lichaamsdelen als een 50% verdunning. De reden voor dit verschil is onbekend en roept wel vragen op omtrent de juistheid van het voorschrift. In de literatuur wordt melding gemaakt van onverdund Lipostabil, maar ook 50% verdund. Soms wordt er in een publicatie verwezen naar de concentraties van de gebruikte stoffen in de stockoplossingen in plaats van de concentratie in de oplossing die feitelijk wordt geïnjecteerd (bv. [23]). In oudere publicaties wordt gesproken van een PC oplossing en wordt de DC concentratie niet vermeld. Kennelijk in de veronderstelling dat PC de actieve stof is en DC slechts een hulpstof is, waarvan het vermelden daarom niet vermeld zou hoeven te worden. Dit maakt dat er enige onzekerheid kan bestaan omtrent de feitelijke concentraties PC en DC in de oplossingen die gebruikt zijn in de studies die in dit rapport zijn beschreven.

2 Methode

Een literatuuronderzoek werd uitgevoerd. Voor het verzamelen van relevante literatuur werd een query uitgevoerd in PubMed en in Scopus met de volgende syntax:

(Phosphatidylcholine OR deoxycholate OR mesotherapy) AND lipolys*.

In Pubmed werd gezocht in *All fields* en werd de gehele database doorzocht tot 14 oktober 2010. Deze query leverde 266 hits op. Op basis van titel werden 33 referenties geselecteerd als mogelijk relevant.

In Scopus werd gezocht in de velden *Title*, *Abstract* en *Keywords* in de Health Sciences en de Life Sciences databases in de periode 2000 tot 14 oktober 2010. Deze query leverde 179 hits op. Hieruit werden op basis van titel 25 additionele mogelijk relevante referenties geselecteerd.

De 58 mogelijk relevante referenties werden aangevraagd en meer nauwgezet bekeken op relevantie en additionele referenties die van belang zouden kunnen zijn.

Omdat gedurende de studie is gebleken dat lipolyse feitelijk een onjuist gebruik van deze term is voor deze toepassing van Lipostabil, is er nog een additionele search gedaan met de volgende syntax:

deoxycholate AND (cytolysis OR adipocytolysis OR adipolysis OR inflammation OR panniculitis). In Scopus werd gezocht in de velden *Title*, *Abstract* en *Keywords* in de Health Sciences en de Life Sciences databases in de periode 2005 tot 17 december 2010. Deze search leverde 78 hits op. Hieruit werden op basis van titel 3 additionele mogelijk relevante referenties geselecteerd. Eenzelfde search in Pubmed leverde nog 1 mogelijk relevante referentie op.

3 Resultaten

3.1 Werkingsmechanisme

Aanvankelijk werd verondersteld dat PC de actieve stof is en dat deze stof na injectie in het vetweefsel de lipolyse door vetcellen bevordert en daardoor de het volume van de cellen en dus het weefsel afneemt zonder dat deze cellen vernietigd worden. DC zou enkel een hulpstof zijn die nodig is om het PC in oplossing te houden.

Latere studies toonden echter aan dat DC leidt tot adipocytolyse en dat PC geen adipocytolyse veroorzaakt en ook niet leidt tot de veronderstelde lipolyse [12,17].

De detergerende eigenschappen van DC zijn terug te voeren op de aanwezigheid van zowel een hydrofiele als een hydrofobe zijde in het molecuul. Hierdoor kan de stof gemakkelijk intercalleren in de fosfolipiden dubbellaag van de celmembraan en de eigenschappen en stabiliteit hiervan verstoren. Wanneer DC wordt vermengd met PC kunnen zich gemengde micellen vormen, en mogelijk ook vesicles (blaasjes), waarbij net als bij de celmembraan sprake is van een dubbellaag. De verschijningsvorm is echter afhankelijk van de concentraties van de verschillende stoffen en de fysisch-chemische omstandigheden. Of deze verschillende verschijningsvormen een verschillend cytolytisch vermogen hebben is niet onderzocht [4].

3.2 *In vitro* studies

3.2.1 *Muizenadipocyten*

Klein et al. [10] verrichtten een aantal mechanistische studies met behulp van 3T3-L1 cellen. 3T3-L1 is een preadipocyten cellijn, welke als een adipocytenmodel gebruikt kan worden door in het laboratorium de adipogenese te induceren. Als positieve controle voor lipolyse werd de β -agonist isoproterenol gebruikt. Als positieve controle voor cytolyse werd het detergens Triton X-100 gebruikt. Als experimentele groepen werden oplopende concentraties PC, Lipostabil of DC gebruikt. Meting van glycerol als maat voor lipolyse toonde alleen een positief effect voor isoproterenol en 1.0 mg/mL PC, maar voor geen enkele Lipostabil groep. Hoewel 1.0 mg/ml PC een verhoging van glycerol liet zien, was dit niet het geval voor de hogere of lagere PC concentratie. De auteurs concluderen in hun rapport dat PC geen lipolytisch effect veroorzaakt. Meting van celviabiliteit met behulp van het MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, een geel tetrazol, wordt gereduceerd tot het paarse formazan in levende cellen) toonde sterke afname in de Triton X-100, DC (0.15 mg/mL) en Lipostabil groepen na een incubatie van 4 uur. PC had echter geen effect op de viabiliteit. Wanneer de integriteit van de celmembraan werd onderzocht door kleuring met propidium jodide bleken de adipocyten na incubatie met PC intact te zijn, terwijl incubatie met DC dosisafhankelijk tot verlies van celmembraanintegriteit leidde.

De 3T3-L1 cellijn werd ook gebruikt door Gupta et al. [6]. Zij vergeleken de effecten van oplopende concentraties PC oplossing en DC. De PC oplossing bevatte PC en DC (stokoplossing: 100 en 42 mg/mL, respec-

tievelijk). De viabiliteit van de cellen na 24, 48 of 72 uur gemeten met het MTT assay, nam dosisafhankelijk af zowel met de PC oplossing als met DC. Vergelijking van de concentratie-effect curves toonde dat het effect gezien in de PC oplossing vrijwel geheel toegeschreven kan worden aan het in de PC oplossing aanwezige DC. Hoewel bij lage concentratie de PC oplossing na 72 uur iets effectiever was, was het cytolytisch effect bij hogere concentraties, inclusief die, die klinisch worden toegepast van beide oplossingen nagenoeg gelijk.

3.2.2 *Humane adipocyten*

Palumbo et al. [14] isoleerden primaire adipocyten uit buikvet van personen met een normaal gewicht of een licht overgewicht die een buikoperatie ondergingen. De cellen werden geïncubeerd met DC (5, 7 en 9% (w/v)), PC (5%), een combinatie van beide stoffen (5% PC/7% DC) of een 'farmaceutisch preparaat' dat klinisch wordt toegepast. Na 24 uur was de viabiliteit, zoals microscopisch waargenomen in een Burker's kamer na kleuring met Oil-Red-O en haematoxiline in de DC groep met 80% afgenomen, het farmaceutische preparaat gaf een afname te zien van 65%. Cellen die geïncubeerd waren met PC of de PC/DC combinatie daarentegen lieten slechts een afname van minder dan 20% zien en verschilden niet significant van de onbehandelde controle. Dit beeld werd ook weerspiegeld na dubbelkleuring met acridine-oranje en ethidium bromide, waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen levende en apoptotische en necrotische cellen. De farmaceutische formulering en DC veroorzaakten dosisgerelateerde celdood.

Janke et al. [8] isoleerden preadipocyten en adipocyten van patiënten die abdominoplastie of liposuctie ondergingen. *In vitro* werd het effect van Lipostabil op viabiliteit middels kleuring met acridine orange onderzocht. Onverdund veroorzaakte Lipostabil >90% celdood binnen 90 s in de preadipocyten, terwijl *in vitro* gedifferentieerde immature adipocyten na 15 min voor >90% dood waren. Wanneer Lipostabil 1:8 werd toegevoegd was na 30 min >50% van de cellen dood, ongeacht het celtype.

Duncan et al. [5] isoleerden humane preadipocyten van patiënten die abdominoplastie of liposuctie ondergingen en kweekten deze in het laboratorium op tot primaire adipocyten. Zij onderzochten het cytolytisch effect van verschillende componenten in klinische formuleringen die voor adipocytolyse worden gebruikt door het meten van lactaat dehydrogenase (LDH) lekkage. Zowel een veel gebruikte klinische formulering waarin 50 mg/mL PC en 42 mg/mL DC aanwezig is, als een 1% DC en een 2,4% DC oplossing leidden tot cytotoxiciteit. PC (5%) in minerale olie, isuprel (0.08%), lokaal anestheticum (5%) en benzylalcohol veroorzaakten geen cytotoxiciteit.

Kythera Biopharmaceuticals, een bedrijf dat een product met DC ontwikkelt voor gebruik bij adipolyse sponsorde een studie aan de Harbor-University of California [22]. De onderzoekers testten de cytolytische activiteit van DC (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06 en 0.1% in fosfaatbuffer) op primaire humane adipocyten. De viabiliteit werd getest met het MTS assay (een gemodificeerd MTT assay). Ook werd het effect van pre-incubatie met verschillende concentraties albumine (0,7, 1,3 en 4%) op het cytolytisch vermogen van DC onderzocht.

De concentratie waarbij de viabiliteit van de cellen in 1 uur met 50% afnam (LC_{50}) was 0.045% (1.0 mM).

Pre-incubatie met albumine verhoogde de LC_{50} van DC voor adipocyten dosisafhankelijk: 1,3% albumine verdubbelde de LC_{50} (na 45 minuten) van 0,05% naar 0,1% en 4% albumine beschermde de adipocyten tegen het cytolytische effect van 0,1% DC.

Thuangtong et al. [22] veronderstellen dat verschillende weefsels *in vivo* een verschillende gevoeligheid voor het cytolytische effect van DC hebben door de aanwezigheid van beschermende weefselfactoren, waarbij zij vooral aan interstitieel albumine en andere DC-bindende eiwitten denken. Daarom onderzochten zij het effect van pre-incubatie van een 1% DC oplossing met verschillende varkensweefsels (spier, huid, vet) op het adipocytolytisch vermogen van de DC oplossingen. Hieruit bleek dat onder de omstandigheden van hun *in vitro* experiment vetweefsel nauwelijks een beschermend effect had, terwijl huid en spierweefsel het adipocytolytisch vermogen van een 1% DC oplossing sterk verminderde.

3.2.3 *Humane fibroblasten*

Gupta et al. [6] vergeleken het cytolytische effect van PC oplossing (welke naast PC ook DC bevat) en DC op 3T3-L1 adipocyten met het effect op normale voorhuidfibroblasten. Ook in fibroblasten werd gezien dat het cytolytische effect van de PC oplossing grotendeels is toe te schrijven aan DC. De gevoeligheid van fibroblasten was niet significant afwijkend van die van adipocyten.

Thuangtong et al. [22] vergeleken het cytolytisch vermogen van oplopende concentraties DC *in vitro* voor humane primaire adipocyten (zie hierboven) met het cytolytisch effect op primaire humane dermale fibroblasten. Er werd geen duidelijk verschil gevonden. De LC_{50} voor fibroblasten was 0,055%, terwijl dit voor adipocyten 0,045% was.

3.2.4 *Humane keratinocyten*

Rotunda et al. [18] waren de eersten die aantoonde dat DC de belangrijkste actieve component is van formuleringen waarin zowel PC als DC aanwezig zijn. Zij gebruikten in hun experiment humane keratinocyten. Celviabiliteit werd gemeten met het MTS assay. LDH lekkage werd gemeten om de integriteit van de celmembraan te evalueren. Hun experiment toonde dat zowel de PC formulering als DC vanaf een concentratie van 0.05% leidde tot verlies van celviabiliteit en vermindering van de integriteit van de celmembraan.

Thuangtong et al. [22] vonden bij *in vitro* blootstelling aan oplopende concentraties DC voor humane keratinocyten een lagere LC_{50} waarde (0,015%) dan voor adipocyten (0.045%).

3.2.5 *Humane skeletspiercellen*

Janke et al. [8] vergeleken het effect van Lipostabil op primaire humane adipocyten met het effect op primaire skeletspiercellen ('myotubes'). De gevoeligheid van spiercellen lag tussen die van preadipocyten en adipocyten in met >90% celdood na 6 min.

Gupta et al. [6] gebruikten foetale skeletspiercellen om het cytolytische effect van PC oplossing en DC te onderzoeken. De spiercellen bleken gevoeliger voor het cytolytische effect dan adipocyten.

Thuangtong et al. [22] vonden dat *in vitro* het cytolytisch vermogen van oplopende concentraties DC voor humane primaire skeletspiercellen vergelijkbaar was met die gevonden voor humane dermale fibroblasten en adipocyten.

3.2.6 *Humane vasculaire gladde spiercellen*

Deze cellen werden getest door Janke et al. [8]. De gevoeligheid voor het cytolytische effect van Lipostabil was vergelijkbaar met die van skeletspiercellen (na 6 min >90% celdood).

3.2.7 *Humane endotheelcellen*

Gupta et al. [6] gebruikten neonatale humane dermale microvasculaire endotheelcellen om het cytolytische effect van PC oplossing en DC te onderzoeken. De endotheelcellen bleken gevoeliger voor het cytolytische effect dan adipocyten.

3.2.8 *Humane renale epitheelcellen*

Deze cellen werden getest door Janke et al. [8] de gevoeligheid voor het cytolytische effect van Lipostabil was vergelijkbaar met die van skeletspiercellen (na 6 min >90% celdood).

3.2.9 *Conclusies ten aanzien van in vitro studies*

Uit bovenstaande *in vitro* studies blijkt dat het cytolytische vermogen van Lipostabil of vergelijkbare preparaten waarin zowel PC als DC aanwezig is, toegeschreven moet worden aan DC. PC heeft geen cytolytisch vermogen bij de klinisch gebruikte concentraties. De toevoeging van PC aan DC kan het cytolytisch vermogen van DC wel enigszins beïnvloeden, maar bij klinische concentraties lijkt PC geen effect te hebben op het cytolytische vermogen van DC.

Een andere belangrijke conclusie die hier getrokken kan worden is dat de cytolytische eigenschappen van Lipostabil of vergelijkbare preparaten die DC bevatten niet specifiek is voor adipocyten. Er zijn wel verschillen in gevoeligheid, maar daarbij zijn de volwassen adipocyten eerder minder gevoelig dan andere celtypen zoals preadipocyten, spiercellen, endotheelcellen, renale epitheelcellen en keratinocyten. Bovendien blijken alle celtypen die tot nu toe onderzocht zijn te lyseren wanneer ze worden blootgesteld aan de klinisch gangbare concentraties DC. De studies van Thuangtong et al. [22] tonen dat eiwitbinding van DC (in het bijzonder aan albumine) het cytolytisch vermogen van een relatief lage concentratie DC (0,1%) remt.

3.3 ***Ex vivo studies***

3.3.1 *Varkenshuid en spierweefsel*

Rotunda et al. [18] gebruikten vers geïsoleerde huid en spierweefsel van het varken om de effecten van PC/DC oplossing (50/47,5 mg/ml), DC (5%) en de detergentia Empigen en Triton-X 100 te onderzoeken. Celviabiliteit in vetweefsel werd kwalitatief geëvalueerd middels het MTS assay. Cytolyse werd getest door de fluorescentie te meten in een calceïne release assay. Haematoxyline-eosine kleuring werd toegepast om de histologie van huid en spierweefsel te onderzoeken 1 uur na injectie met PC/DC oplossing, DC of de detergentia Empigen of Triton X-100.

In tegenstelling tot de negatieve controle (fosfaatbuffer) nam de celviabiliteit van vetcellen vergelijkbaar af met PC/DC, DC, Empigen of Triton X-100. Er werd ook een vergelijkbaar verlies van calceïne fluorescentie gezien voor deze behandelingen, wat aangeeft dat de cellen door deze behandelingen lyseren. Histologie liet zien dat de celmembranen van adipocyten vervagen en verdwijnen en dat de normale lobulaire structuur van het vetweefsel eveneens vervaagt na injectie van de reagentia, maar niet na injectie van fosfaatbuffer. In spierweefsel werd de normale vezelstructuur van dit weefsel vernietigd. Kernkleuring nam af en hyaline necrose kon worden waargenomen na injectie met PC/DC oplossing, DC of de detergentia. Er werden geen veranderingen gezien in de dermis, de epidermis of andere naastliggende structuren, behalve in het weefsel dat met Empigen werd behandeld, waar er verminderde kernkleuring van fibroblasten werd gezien en versterkte hyalinekleuring van collageen.

3.3.2 *Vetweefsel van konijn*

Gupta et al. [6] injecteerden vers geïsoleerd vetweefsel van konijnen met 2 mL PC/DC oplossing (100/42 mg/mL), DC (21 mg/mL) of een normale zoutoplossing. Na 24 uur waren de adipocyten die behandeld waren met PC/DC of DC gezwollen en hadden onregelmatige celmembranen.

3.3.3 *Humaan vetweefsel*

Palumbo et al. [14] namen meerdere biopten van subcutaan vetweefsel van 4 patiënten die buikchirurgie ondergingen. De biopten (3 cm Ø) in kweekmedium geplaatst en werden onbehandeld gelaten (controle) of werden geïnjecteerd met 300 µL PC (5%, gesonificeerd), 300 µL DC (7 of 9%) of met 300 µL mix van PC (5%) en DC (7%). De histologische veranderingen werden na 24, 48 en 72 uur onderzocht.

Injectie van DC veroorzaakte dosisafhankelijk gevouwen en onderbroken celmembranen en een verlies van de normale weefselstructuur bij 9%. PC- geïnjecteerd vetweefsel vertoonde net als de controlepreparaten een normale architectuur. De combinatie van PC en DC veroorzaakte evenmin een verstoring van de weefselstructuur, hetgeen de auteurs doet veronderstellen dat PC een beschermend effect heeft. Hoewel de auteurs schrijven dat de scanning electronenmicroscopische opnamen dit beeld bevestigen, laat de figuur waarnaar ze verwijzen wel een verstoorde structuur zien van het weefsel dat met 'pharmaceutical formula' is behandeld. Aangenomen kan worden dat daarmee de PC/DC mix of een vergelijkbaar mengsel wordt bedoeld.

3.3.4 *Conclusies ten aanzien van ex vivo studies*

In de *ex vivo* studies wordt wederom gezien dat DC in staat is normale structuur van het vetweefsel te verstoren en te leiden tot verlies van

celviabiliteit en membraanintegriteit. Dit wordt ook gezien bij de PC/DC oplossingen, maar de gerapporteerde resultaten lopen hier wel uiteen. Waar Rotunda et al. [18] al na 1 uur in de varkenshuid een sterk effect waarnemen, vinden Palumbo et al. [14] in humane biopten geen effect, zelfs na 72 uur niet. Dit terwijl een 'farmaceutische formulering' die vermoedelijk ook uit een mengsel van PC en DC bestond, wel een duidelijk verstrend effect op het weefsel had. Palumbo et al. [14] rapporteerden ook een verminderd effect van het PC/DC mengsel in hun *in vitro* experimenten (zie hierboven), terwijl alle andere onderzoekers wel een duidelijk cytolytisch effect van een PC/DC oplossing rapporteerden.

3.4 *In vivo* studies

3.4.1 Rat

Schuller-Petrovic et al. [20] onderzochten de locale en systemische effecten van subcutane injectie van Lipostabil in het buikgebied na eenvoudige en meervoudige doses in mannelijke Sprague-Dawley ratten (450-500g).

In een eerste ('acuut') experiment werd 50, 300 of 600 μL geïnjecteerd ($N=3/\text{dosis}$) en werden de weefsels na 1 week onderzocht. In een tweede ('chronisch') experiment werden de ratten op dag 0, 7 en 28 geïnjecteerd en werden de weefsels onderzocht op dag 30. Als positieve controle werd Triton X-100 gebruikt. Als negatieve controle werd een oplossing gegeven die alle componenten van Lipostabil bevatte, behalve PC en DC. Deze controle formulering werd aan dezelfde ratten toegediend op een plaats 5 cm verwijderd van de Lipostabil injectieplaats. Deze 21 ratten (acuut + chronisch) werden gebruikt voor onderzoek naar membraanintegriteit (calceïne fluorescentie) en celviabiliteit (MTT assay). Daarnaast werden 8 ratten op beide plaatsen met de controleoplossing geïnjecteerd (600 μL). Deze ratten vormden de controlegroep voor de systemische (klinisch chemische en immunologische¹) parameters die werden onderzocht. Voor histopathologie werden additionele ratten geïnjecteerd ($N=1/\text{dosis}$).

Na eenmalige toediening was de celviabiliteit een week later dosisafhankelijk afgenomen van 10% bij 50 μL tot 17% bij 600 μL Lipostabil. De membraanintegriteit nam met ongeveer 15% af na 300 of 600 μL Lipostabil. Na herhaalde toediening en meting 2 dagen na de laatste dosis waren deze parameters sterker afgenomen: ongeveer 50% afname van membraanintegriteit en 30-50% afname van celviabiliteit na 300 of 600 μL . Na herhaalde toediening van de negatieve controleoplossing (600 μL) was ook een kleine afname (ongeveer 10%) te zien voor zowel membraanintegriteit als celviabiliteit.

Histopathologisch onderzoek na herhaalde toediening van Lipostabil toonde bij de laagste dosis: fibroplasie, oedeem, aanwezigheid van histiocyten en fibrose net onder het spierweefsel. Na toediening van de 300 μL dosis was er ook fibrose in het spierweefsel en sommige spierweefsels waren verdwenen. Bij de hoogste dosis (600 μL), was er sprake van uitgebreide vetnecrose, bloedingen, een diffuus ontstekingscellen-

¹ totaal bilirubine, alkaline fosfatase (AP), γ -glutamyltransferase (GGT), choline esterase (ChE), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamaatdehydrogenase (GDH; samen zeggen deze enzymen iets over de leverstatus), triglyceriden, vrije vetzuren (FFA) (deze reflecteren de lipiden status), C-reactive protein (CRP), en interleukin-8 (IL-8; markers voor ontsteking)

infiltraat in het vetweefsel en necrotische regio's in de spier met infiltratie van neutrofielen. Rondom necrotische gebieden bevonden zich veel schuimcellen. Ook de wanden van kleine vaten vertoonden necrose. Op de plaatsen waar de controleoplossing was geïnjecteerd waren geen afwijkingen te zien na 50 of 300 µL. Na toediening van 600 µL waren nu en dan kleine gebieden van traumatische vetnecrose te zien. Ook daar waren histiocyten aanwezig. Deze veranderingen waren echter minimaal.

Klinisch chemische veranderingen werden alleen gezien na herhaalde toediening en meting na 2 dagen. De belangrijkste klinisch chemische parameters die veranderden betroffen die, die het vetmetabolisme betreffen: choline-esterase, triglyceriden en vrije vetzuren waren respectievelijk 2,3-, 4- en 2-voudig verhoogd. Andere parameters waren niet of weinig veranderd of beneden de detectiegrens.

Het experiment met de herhaalde toediening werd nogmaals uitgevoerd, maar daarbij werd DC in controleoplossing gebruikt in plaats van Lipostabil (dit is dus een samenstelling die overeenkomt met Lipostabil zonder PC). De effecten op membraanintegriteit, celviabiliteit en histopathologie kwamen sterk overeen met die gezien na toediening van Lipostabil, hetgeen onderbouwd dat DC de feitelijke actieve component van Lipostabil is. De auteurs beschrijven voor dit laatste experiment naast de al genoemde vetnecrose, panniculitis en fibrose, ook necrose van klieren, haarfollikels en epidermaal weefsel.

In een onderzoek naar de farmacokinetiek van DC injecteerden Thuangtong et al. [22] het subcutane vetweefsel tussen de schouderbladen in Sprague-Dawley ratten met ³H-gelabeld DC (1 mL/kg van een 1% DC (150 µCi/mL) oplossing). Het grootste deel van de radioactiviteit werd binnen 48 uur teruggevonden in de darminhoud. Relevante concentraties worden ook in de dunne darm en de lever gevonden. De plasmaconcentraties zijn laag. Van andere weefsels wordt door de auteurs gerapporteerd dat de waarden beneden de detectiegrens waren, maar er wordt niet vermeld welke weefsels zijn onderzocht. Er wordt ook niets vermeld over de injectieplaats. De auteurs concluderen dat het geïnjecteerde DC snel redistribueerd wordt naar de normale galzuurpool en vervolgens fecaal wordt uitgescheiden.

3.4.2 *Muis*

Thuangtong et al. [22] onderzochten het adipolytisch vermogen van DC in obese muizen. Injectie van 200 µL 1% DC in het subcutane vet bij de bil op dag 1, 3 en 5 veroorzaakte (20 dagen na de eerste injectie) vernietiging van adipocyten, infiltratie met 'schuimige' histiocyten en aanwezigheid van vrije lipidedruppeltjes.

Om hun hypothese te onderbouwen dat DC vooral vetweefsel beschadigt en ander weefsel grotendeels ongemoeid laat, injecteerden ze de staart met 100 µL 0,5% DC (eenmalig). In de staart zijn kleine hoeveelheden vet aanwezig, maar is dit weefsel nauw omringd door spier- en dermaal weefsel. Na 20 dagen was er wel sprake van vetnecrose met infiltratie van ontstekingscellen, maar was het spier- en huidweefsel niet aangetast. Deze resultaten geven wel enige evidentie voor hun hypothese, maar van belang is wel dat de gebruikte DC concentratie beduidend lager was dan die, die in klinisch gebruikte preparaten wordt gebruikt. In dit experiment was de DC concentratie 0,5%; in Lipostabil is die 2,5%.

3.4.3 *Konijn*

Rittes et al. [15] injecteerden vetweefsel op de rug van konijnen (10/groep) met een PC oplossing² (0.8 mL) plus lidocaïne (0.2 mL) of een fysiologische zoutoplossing met lidocaïne gedurende 4 opeenvolgende dagen. Vier dagen na de laatste injectie werd het weefsel histologisch onderzocht met haematoxyline-eosine kleuring. De met PC (/DC) oplossing behandelde weefsels vertoonden sterke necrose en ontstekingsreacties met vooral neutrofiële cellen, maar ook met macrofagen, histiocyten en lymfocyten.

Een vergelijkbare studie werd uitgevoerd door Salles et al. [19]. Zij injecteerden vetweefsel op de rug van het konijn wekelijks gedurende 5 opeenvolgende weken met een PC/DC oplossing (N=7) of een fysiologische zoutoplossing (N=5) en analyseerden het weefsel histologisch 3, 7, 14 en 21 dagen na de laatste injectie. Ook in deze studie werd een ontstekingsreactie gezien, evenals fibrose. In tegenstelling tot andere studies werd in deze studie geen necrose beschreven. De afbeeldingen van de microscopische opnamen van de weefselcoupes laten echter voorbeelden van ontstekingscelinfiltraat en fibrose zien, waarbij het vetweefsel grotendeels of geheel is verdwenen. De fibrose was volgens de auteurs maximaal op dag 14 na de laatste injectie.

3.4.4 *Kat*

Duncan et al. [5] onderzochten de effecten van verschillende formuleringen in katten. Twaalf katten (3,51 tot 12,8 kg) werden gerandomiseerd over 3 groepen. De katten uit de 3 groepen ondergingen respectievelijk 1, 2 of 3 injectiesessies. De tijd tussen de sessies werd in hun rapport niet vermeld. De totale duur van het experiment was 3 maanden. De injecties werden gegeven in 3 buikregio's (13 injecties van 100 µL, in een 0,8 cm grid). Formulering A bevatte 50 mg/ml PC en 42 mg/ml DC. Formulering B was een zoutoplossing als controle en formulering C waren de PC/DC concentraties half zo laag als in formulering A.

Voor beide PC/DC formuleringen beschrijven de auteurs macroscopisch het ontstaan van harde klompjes ('nodules'). Microscopisch werd vetnecrose waargenomen, waarbij adipocytolyse, infiltratie van polymorfonucleaire leukocyten, lymfocyten en macrofagen, angiogenese en verdikking van bindweefselbanden werd gezien. Deze effecten namen in frequentie en omvang toe afhankelijk van het aantal behandelingsessies. Er trad echter geen confluerende vetnecrose op. De reacties waren alle zeer lokaal.

Tien van de 12 katten verloren gewicht tijdens de studie (gemiddeld 0,75 kg), maar dit was te veel om toe te schrijven aan volumevermindering van vetweefsel. Voedselinname werd niet gemeten.

3.4.5 *Mens*

Schuller-Petrovic et al. [20] onderzochten het weefsel van een 50-jarige vrouw die liposuctie onderging. Er werden in de buik op verschillende

² De PC concentratie werd niet gegeven. verondersteld moet worden dat DC ook in de oplossing aanwezig was, maar dat wordt niet vermeld.

plaatsen injecties gegeven van 0,2, 0,4, 0,8 en 1,6 mL Lipostabil. Deze injecties werden op dezelfde plaats herhaald na 14 en 30 dagen. Elf dagen na de laatste injectie werden bipten genomen voor histologisch onderzoek.

Bij de laagste dosis werd beginnende adipocytolyse en een geringe ontstekingsreactie gezien. Na herhaalde toediening van 0,4 mL was sprake van meer uitgebreide vernietiging van vetcellen en panniculitis en enkele kleine vetcysten. Na 0,8 mL was de adipocytolyse en panniculitis nog uitgebreider en waren er veel schuimcellen rondom microcysten aanwezig. De hoogste dosis veroorzaakte ernstige panniculitis, substantiële vetnecrose, vernietiging van kleine vaten en thrombusvorming. Ook waren aanzienlijke delen van het vetweefsel vervangen door bindweefsel.

Duncan et al. [5] onderzochten de temporele ontwikkeling van de effecten die optreden in subcutaan vetweefsel van 6 vrouwen die abdominoplastie ondergingen door ze respectievelijk 1 uur, 1 dag, 1 week, 2 weken, 3 weken en 4 weken vóór de operatie te injecteren met 400 µL PC/DC (50/42 mg/mL) oplossing, of (op een andere locatie) met 400 µL DC (42 mg/mL) oplossing per injectieplaats. Een zoutoplossing fungeerde als negatieve controle. Elke injectieplaats bevond zich in 1,5 cm grid dat aangebracht was in het gebied dat later verwijderd zou worden. In totaal werd per behandeling 26 mL geïnjecteerd. Tijdens de operatie werden 1 cm² bipten genomen en histologisch onderzocht.

De auteurs beschrijven de effecten in kwalitatieve zin. Ze brengen daarbij een duidelijk onderscheid aan tussen de DC en PC/DC oplossing. Eén uur of 1 dag na injectie vertonen de DC injectieplaatsen een sterke vetnecrose, in tegenstelling tot de PC/DC injectieplaatsen, waar dit pas na 1 week optrad. Ook de ontstekingsreacties traden onmiddellijk en intens op in de DC injectieplaatsen. Na 2 weken waren op de PC/DC injectieplaatsen alle elementen van vetnecrose aanwezig: ontsteking, neovascularisatie, adipocytolyse en macrofageninfiltratie. Ook werd verdikking van bindweefselbanden gezien. Het microscopisch beeld van de DC injectieplaatsen vertoonde een 'moth-eaten' beeld. Na 1 maand vertoonden de PC/DC injectieplaatsen een verdeeld beeld, terwijl in de DC injectieplaatsen een sterke afname van vetcellen en uitgebreide fibrose lieten zien. De auteurs beschrijven ook effecten in de dermis, waar PC/DC een geleidelijke ontstekingsreactie veroorzaakt, welke gekenmerkt wordt door 'steriele cellulitis', en een overwicht van polymorphonucleaire leukocyten. Ook andere structuren zoals zweetklieren, haarfollikels en zenuwen vertonen tekenen van ontsteking. In de DC injectieplaatsen waren de ontstekingsverschijnselen sterker en traden eerder op. Ook werd hier en daar necrose van zweetklieren, vaatwanden en zenuwen gezien en trad er degeneratie van de basale dermis op.

Bechara et al. [2] injecteerden 14 lipomas in 5 patiënten met 1-4,6 mL Lipostabil. Het volume/aantal injecties was evenredig met de grootste straal van het lipoom. De lipomen werden vervolgens verwijderd voor histologisch en immunohistologisch³ onderzoek na respectievelijk 4, 10, 24 of 48 uur, of 10, 30 of 60 dagen. Als controle dienden 5 onbehandelde lipomas.

³ antilichamen tegen CD3 (T-cellen), CD4 (T-helpercellen), CD8 (T-suppressorcellen), granzyme B (T-suppressorcellen), CD20 (B-cellen), CD68 (macrofagen) en myeloperoxidase (neutrofiële granulocyten)

Na 4 uur waren kleine gebiedjes te zien met kleinere en onregelmatige vetcellen. Daarna nam het aantal vervormde en vernietigde vetcellen steeds verder toe met na 10 dagen grote gebieden met vernietigde en vervormde vetcellen. Na 30 en 60 dagen waren duidelijk verdikte bindweefselbanden en een dikker kapsel te zien.

Het immunohistologisch onderzoek liet zien dat al na 4 uur een panniculitis op gang komt welke tot 48 uur gedomineerd wordt door de aanwezigheid van neutrofiele granulocyten. Na 10 dagen is dit ontstekingsinfiltraat voor de helft overgegaan in macrofagen en T-lymfocyten. Na 30 en 60 dagen zijn de neutrofielen verdwenen en zijn er vooral macrofagen aanwezig en daarnaast maar op het laatst in afnemende mate lymfocyten. De auteurs voeren aan dat het proces sterke gelijkenis vertoont met 'factitial panniculitis', een ontsteking van het vetweefsel die optreedt na het inbrengen van een lichaamsvreemde stof, zoals beschreven voor povidon, meperidine, pentazocine, vitamine K, siliconen en polymethylmethacrylaat microbolletjes.

In een vervolgstudie onderzochten Bechara et al. [3] het cytokine mRNA profiel in 9 onbehandelde en 9 met Lipostabil (1-3,5 mL) geïnjecteerde lipomas in 7 vrijwilligers. De lipomas werden 48 uur na injectie verwijderd en het cellulaire RNA van het vetweefsel werd geëxtraheerd. Het mRNA voor TNF- α , IL-6, IL-8 en IL-10 was verhoogd in de Lipostabil behandelde lipomas vergeleken met de onbehandelde. Gelet op de bekende eigenschappen van deze cytokines ondersteunen deze resultaten de eerdere histologische en immunohistologische bevindingen en tonen daarmee aan dat injectie van Lipostabil in vetweefsel leidt tot een acute ontstekingsreactie, panniculitis.

Yagima Odo et al. [23] onderzochten de effecten van subcutane injecties van 10 mL 0,5% en 1,25% DC verdeeld over 50 vlakjes van 2x2 cm in de buikregio van vrijwilligers (10/groep). Alle oplossingen (inclusief controle) bevatte 0,9% natriumchloride, 2,94% propyleenglycol, 0,185% benzylalcohol en 0,2% lidocaïne. De vrijwilligers ondergingen 4 injectiesessies (eens elke 2 weken) en 3 en 6 maanden na aanvang van de studie werden bipten genomen voor histologisch onderzoek waarbij ontsteking, vetnecrose en fibrose semi-kwantitatief werd gescoord.

Zowel 3 als 6 maanden na aanvang van de studie kon dosisafhankelijk een ontstekingsreactie worden waargenomen, met een lymfomononucleair infiltraat. Vetnecrose was na 3 maanden duidelijk aanwezig, maar na 6 maanden was fibrose beeldbepalend.

Klinische chemische parameters gemeten 2 uur, 1 dag, 2, 4 of 6 weken of 6 maanden na de eerste injectie lieten geen afwijkend beeld zien.

Naast de hiervoor vermelde publicaties verschenen er nog een aantal case studies die het geschetste beeld bevestigen.

Rose & Morgan [16] onderzochten één en twee weken na injectie van PC/DC oplossing (50/21 mg/mL) in subcutaan vetweefsel in de zij het histologisch beeld. Na één week vonden ze een ontstekingsinfiltraat dat vooral bestond uit plasma cellen, lymfocyten, neutrofielen en macrofagen. Na twee weken domineerden lymfocyten en histiocyten. De laatsten bestonden uit normale epiliptoïd gevormde cellen, met vet gevulde schuimcellen en meerkernige vethoudende reuscellen. Kopera et al. [11] injecteerden bij een 34-jarige patiënt een lipoma (berekende volume 2,542 cm³ met 3 x 0,5 mL Lipostabil per sessie. In totaal werd de behandeling drie maal uitgevoerd met tussenperioden van 3 weken. Na 6

weken was het volume van het lipoom met 35,6% afgenomen. Het lipoom werd verwijderd en histopathologie toonde fibrose, ontsteking, granulomateuze veranderingen en degeneratie van het vetweefsel. Het ontstekingsinfiltraat bestond vooral uit lymfocyten, waarnaast ook veelkernige en schuimige histiocyten. Neutrofielen en eosinofielen ontbraken.

Hasenschwandtner et al. [7] beschrijven een behandeling van een patiënte die in de buikregio 200 0,5 mL injecties ontving. De oplossing bestond uit een mengsel van PC, NaCl oplossing buflomedil en vitamine B-complex. Het is niet geheel duidelijk of de genoemde concentraties de eindconcentraties of de concentraties in de samenstellende oplossingen betreft. Vermoedelijk bevatte de PC oplossing ook DC, maar dat wordt niet vermeld. Na 3 dagen begonnen de vetcellen te vervloeien en op te lossen en was er sprake van neovascularisatie. Na 10 dagen wordt vernietiging van vetcellen gezien. Na 28 dagen is er nog steeds sprake van vernietiging van vetcellen en zijn 'lipofagen' aanwezig.

Andere case studies melden meer persistente veranderingen zoals granuloma annulare [21], traumatisch neuroma [13], granulomateuze panniculitis [9] en een ingekapselde persistente vetnecrose [1].

3.4.6 *Conclusies ten aanzien van de in vivo studies*

Uitbreiding van de studies naar de *in vivo* situatie bij zowel dier als mens laat zien dat het acute effect ook dan plaatsvindt. Toediening van Lipostabil of een vergelijkbaar mengsel van PC en DC veroorzaakt beschadiging van vetcellen, waardoor deze binnen enkele uren tot dagen lyseren. Wanneer alleen DC wordt toegediend treedt dit effect ook op. Schuller-Petrovic et al. [20] vergeleken een PC/DC oplossing met een DC oplossing in de rat en vinden weinig of geen verschil. Duncan et al. [5] onderzochten beide oplossingen bij de mens en zien wel een sterkere acute reactie wanneer alleen DC wordt gebruikt.

Een belangrijk verschil met de *in vitro* en *ex vivo* studies is dat in de *in vivo* studies het verloop van het proces na de acute effecten van cytolyse bestudeerd kon worden. Hieruit is gebleken dat er door de weefselbeschadiging die het gevolg is van deze behandeling een acute panniculitis ontstaat die gekenmerkt wordt door een infiltratie van mononucleaire leukocyten. Na enige tijd (dagen tot weken) worden T-lymfocyten en macrofagen bij dit proces betrokken. De laatste worden in de loop der tijd steeds meer beeldbepalend en hebben kennelijk een grote rol bij het opruimen van celdebris, waardoor deze cellen vaak het uiterlijk van schuimcellen hebben en veel met lipiden gevulde vacuoles bevatten. De T-cellen hebben waarschijnlijk vooral een regulerende rol in het ontstekingsproces. De acute panniculitis gaat zo geleidelijk over in een min of meer chronische reactie die nog enkele maanden kan aanhouden. Tijdens dit langduriger proces wordt in toenemende mate bindweefsel gevormd in de vorm van weefselbanden en kapsels, waarbij microcysten worden gevormd.

Naast destructie van vetweefsel werd ook beschadiging van omliggend weefsel waargenomen, waaronder dermaal weefsel met daarin ingebedde structuren en spierweefsel. Of dit gebeurt en de mate waarin dit gebeurt heeft vermoedelijk te maken met 'lekken' van de reagentia vanuit het vetweefsel naar de omliggende weefsel. Dit zou kunnen optreden wanneer er hogere concentraties of grotere volumina worden gebruikt of wanneer

er te dicht bij deze omliggende structuren wordt geïnjecteerd. Ook andere structuren die zich in of nabij het vetweefsel bevinden, zoals bloedvaten en zenuwen, kunnen beschadigd raken wanneer ze in aanraking komen met de reagentia. Een grotere mate van eiwitbinding van DC in spier- of huidweefsels zou een beschermende factor kunnen zijn in die weefsels, zoals verondersteld wordt door Thuangtong et al. [22]. Of dit ook een relevant effect is voor de DC concentratie die in Lipostabil aanwezig is, is niet bekend.

Er is maar 1 farmacokinetisch experiment verricht in de rat [22]. De resultaten van dat experiment waarbij alleen DC werd toegediend suggereren dat DC na subcutane injectie vrij snel (binnen enkele dagen) grotendeels geredistribueerd wordt naar de normale galzuurpool en via de feces wordt uitgescheiden. Dit impliceert dat de processen die zich later afspelen een reactie van het lichaam op de initiële schade die door DC is veroorzaakt zijn, namelijk een ontstekingsreactie en fibrose.

4 Discussie en conclusies

Het gebruik van Lipostabil en andere vergelijkbare preparaten waarin PC en DC is verwerkt, is in zwang geraakt om onderhuids vetweefsel te laten slinken. Bij introductie van deze techniek was er geen enkele wetenschappelijke onderbouwing voor de werkzaamheid en veiligheid van deze preparaten voor deze toepassing. Geleidelijk aan zijn er in de literatuur publicaties verschenen waarin onderzoek naar de werking en veiligheid van PC/DC oplossing wordt beschreven. Deze onderzoeken zijn doorgaans mechanistisch of beschrijvend van aard en zijn uitgevoerd in kleine aantallen dieren en mensen. Daarom zijn ook nu de beschikbare gegevens nog steeds erg beperkt. Bovendien zijn de studies niet onder Good Laboratory Practice (GLP) uitgevoerd, waardoor de kwaliteit niet objectief verifieerbaar is. Een oordeel kan dan ook alleen op basis van wetenschappelijke kwaliteit gevormd worden. Soms is er onduidelijkheid over de gebruikte concentraties van de onderzochte stoffen. Al deze studies samen geven een fragmentarisch beeld waarbij de studies onderling moeilijk te vergelijken zijn doordat er verschillende diersoorten, verschillende samenstellingen van oplossingen en verschillende studie designs worden gebruikt.

Toch is het mogelijk, ondanks deze beperkingen, op basis van al deze stukjes informatie een algemeen beeld te schetsen waaruit min of meer duidelijk wordt hoe Lipostabil werkt en wat de intrinsieke eigenschappen zijn die van belang kunnen zijn voor de veiligheid.

Aanvankelijk werd verondersteld dat de werkzaamheid terug te voeren was op vermeende lipolytische eigenschappen van PC. Pas nadat nadien onderzoek werd verricht in dieren en mensen naar het werkingsmechanisme is duidelijk geworden dat feitelijk DC, dat als hulpmiddel aan de PC oplossing was toegevoegd om PC in oplossing te houden, de actieve component van de oplossing is. DC heeft detergerende eigenschappen en kan daardoor de celmembraan destabiliseren en uiteindelijk leiden tot lysis van de cel. Dit proces heeft niets met lipolyse (enzymatische afbraak van vetten) te maken, maar kan beter als adipocytolyse worden omschreven. De cytolytische eigenschappen van DC zijn niet beperkt tot adipocyten. Uit *in vitro* onderzoek blijkt dat ook andere celtypen hiervoor gevoelig zijn, soms zelfs al bij lagere concentraties.

Sommige onderzoekers beweren dat de aanwezigheid van PC in de oplossing niet onverschillig is. PC zou een modifierend effect hebben waardoor er minder schade ontstaat. Deze visie wordt echter alleen ondersteund door één kwalitatief beschrijvende klinische studie. Experimenteel onderzoek *in vitro* en *in vivo* laat zien dat een dergelijk interfererend effect van PC misschien optreedt bij lage DC concentraties, maar bij de thans klinisch gebruikte concentraties wordt geen verschil gezien.

Recent is naar voren gebracht dat de cytolytische effecten van DC *in vivo* toch vooral tot vetweefsel beperkt zouden blijven omdat andere weefsels zoals spier en huid beschermende weeselfactoren zouden bezitten, in het bijzonder een hoger albuminegehalte en een hoger gehalte aan andere DC-bindende eiwitten, waardoor de vrije DC concentratie afneemt. Er is hiervoor wel enige evidentie, maar wederom bij lagere DC concentraties

dan die, die in Lipostabil aanwezig zijn. Of deze bevindingen relevant zijn voor Lipostabil is niet bekend.

Er is geen farmacokinetisch onderzoek bekend waarbij er gekeken is naar het lot van subcutaan geïnjecteerd Lipostabil. Eén studie in ratten, waarbij DC werd geïnjecteerd, suggereert dat DC vrij snel wordt geredistribueerd en vervolgens via de gal naar de feces wordt uitgescheiden. Hoewel deze gegevens erg beperkt zijn, suggereren deze dat de cytolytische werking van DC alleen kort na injectie optreedt.

Of in de praktijk ook ander weefsel wordt beschadigd zal vooral afhangen van de mogelijkheid dat DC dit weefsel in voldoende concentratie bereikt door lekkage vanuit het vetweefsel, bijvoorbeeld doordat de injectie te dicht bij ander weefsel heeft plaatsgevonden of een te hoge DC concentratie is gebruikt of een te groot volume is geïnjecteerd.

Na de acute cytolyse als gevolg van injectie van Lipostabil of een andere DC-bevattende oplossing treedt een veel langer aanhoudende reactie van het weefsel op. Dit is een reactie van het lichaam op de ontstane schade en wordt gekarakteriseerd door een plaatselijke ontsteking van het vetweefsel (panniculitis) en fibrose. Aanvankelijk is er sprake van een acute panniculitis met veel mononucleaire leukocyten en vetnecrose. Later domineren macrofagen die vaak veel lipidenvacuolen bevatten. Na enkele maanden is het ontstekingsproces doorgaans tot rust gekomen en is een deel van het vetweefsel door bindweefsel vervangen (fibrose).

De intensiteit en de duur van deze ontstekingsreactie zal min of meer een functie zijn van de omvang van de weefselschade. Maar ook andere factoren zoals co-morbiditeit en genetische factoren zullen medebepalend zijn. Op dit moment zijn er echter geen gegevens die de invloed van deze factoren beschrijven.

De belangrijkste conclusies uit dit literatuuronderzoek zijn:

- Natriumdeoxycholaat is de actieve component in Lipostabil, niet fosfatidylcholine.
- Subcutane injectie van Lipostabil in vetweefsel veroorzaakt adipocytolyse als gevolg van de cytolytische eigenschappen van natriumdeoxycholaat.
- Als gevolg van de hieruit voortvloeiende weefselschade ontstaat er een ontstekingsreactie (panniculitis) die na enige tijd leidt tot fibrose.
- De cytolytische eigenschappen van natriumdeoxycholaat zijn niet specifiek voor adipocyten, waardoor ook andere weefsels beschadigd en ontstoken kunnen raken wanneer natriumdeoxycholaat daar terecht komt.

5 Referenties

1. Bechara FG, Georgas D, Sand M, Tomi N, Altmeyer P, Hoffmann K. Encapsulated fat necrosis after lipolysis of the calf with phosphatidylcholine. *Dermatology* 2008; 216(2):180-181.
2. Bechara FG, Sand M, Hoffmann K, Sand D, Altmeyer P, Stucker M. Fat tissue after lipolysis of lipomas: a histopathological and immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 2007; 34(7):552-557.
3. Bechara FG, Skrygan M, Kreuter A, Altmeyer P, Gambichler T. Cytokine mRNA levels in human fat tissue after injection lipolysis with phosphatidylcholine and deoxycholate. *Arch Dermatol Res* 2008; 300(8):455-459.
4. Brown SA. The science of mesotherapy: chemical anarchy. *Aesthet Surg J* 2006; 26(1):95-98.
5. Duncan D, Rubin JP, Golitz L, Badylak S, Kesel L, Freund J *et al.* Refinement of technique in injection lipolysis based on scientific studies and clinical evaluation. *Clin Plast Surg* 2009; 36(2):195-1vi.
6. Gupta A, Lobocki C, Singh S, Robertson M, Akadiri OA, Malhotra G *et al.* Actions and comparative efficacy of phosphatidylcholine formulation and isolated sodium deoxycholate for different cell types. *Aesthetic Plast Surg* 2009; 33(3):346-352.
7. Hasengschwandtner F, Furtmueller F, Spanbauer M, Silye R, Linz WJ. Detailed documentation of one lipolysis treatment: blood values, histology, and ultrasound findings. *Aesthet Surg J* 2007; 27(2):204-211.
8. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Jordan J. Compounds used for 'injection lipolysis' destroy adipocytes and other cells found in adipose tissue. *Obes Facts* 2009; 2(1):36-39.
9. Kato M, Watanabe T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O. Mixed cell granulomatous panniculitis on the cheek due to injection of a solution containing phosphatidylcholine and deoxycholate. *Dermatol Surg* 2010; 36(11):1779-1781.
10. Klein SM, Schreml S, Nerlich M, Prantl L. *In vitro* studies investigating the effect of subcutaneous phosphatidylcholine injections in the 3T3-L1 adipocyte model: lipolysis or lipid dissolution? *Plast Reconstr Surg* 2009; 124(2):419-427.
11. Kopera D, Binder B, Toplak H, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic changes after intralesional application of phosphatidylcholine for lipoma reduction: Report of a case. *Am J Dermatopathol* 2006; 28(4):331-333.

12. Motolese P. Phospholipids do not have lipolytic activity. A critical review. *J Cosmet Laser Ther* 2008; 10(2):114-118.
13. Nabavi CB, Minckler DS, Tao JP. Histologic features of mesotherapy-induced orbital fat inflammation. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2009; 25(1):69-70.
14. Palumbo P, Melchiorre E, La Torre C, Miconi G, Cinque B, Marchesani G et al. Effects of phosphatidylcholine and sodium deoxycholate on human primary adipocytes and fresh human adipose tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23(2):481-489.
15. Rittes PG, Rittes JC, Carriel Amary MF. Injection of phosphatidylcholine in fat tissue: experimental study of local action in rabbits. *Aesthetic Plast Surg* 2006; 30(4):474-478.
16. Rose PT, Morgan M. Histological changes associated with mesotherapy for fat dissolution. *J Cosmet Laser Ther* 2005; 7(1):17-19.
17. Rotunda AM. Injectable treatments for adipose tissue: terminology, mechanism, and tissue interaction. *Lasers Surg Med* 2009; 41(10):714-720.
18. Rotunda AM, Suzuki H, Moy RL, Kolodney MS. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol Surg* 2004; 30(7):1001-1008.
19. Salles AG, Valler CS, Ferreira MC. Histologic response to injected phosphatidylcholine in fat tissue: Experimental study in a new rabbit model. *Aesthet Plast Surg* 2006; 30(4):479-484.
20. Schuller-Petrovic S, Wolkart G, Hofler G, Neuhold N, Freisinger F, Brunner F. Tissue-toxic effects of phosphatidylcholine/deoxycholate after subcutaneous injection for fat dissolution in rats and a human volunteer. *Dermatol Surg* 2008; 34(4):529-542.
21. Strahan JE, Cohen JL, Chorny JA. Granuloma annulare as a complication of mesotherapy: A case report. *Dermatol Surg* 2008; 34(6):836-838.
22. Thuangtong R, Bentow JJ, Knopp K, Mahmood NA, David NE, Kolodney MS. Tissue-selective effects of injected deoxycholate. *Dermatol Surg* 2010; 36(6):899-908.
23. Yagima Odo ME, Cuce LC, Odo LM, Natrielli A. Action of sodium deoxycholate on subcutaneous human tissue: local and systemic effects. *Dermatol Surg* 2007; 33(2):178-188.

Bijlage 1 Doseringsvoorschrift voor 'injectie lipolyse'

DOSERING EN COMPOUND VERHOUDINGEN.

GELAAT: alleen ZUIVERE PPC gebruiken.

ONDERSTE OOGID; 0,4 ml per punt x 3 = 1,2 ml per kant = totaal 2,4 ml
 ONDERKIN; 0,5 ml per punt x 3 = 1,5 ml per kant = totaal 3 ml
 NASOLABIAAL; 0,2 ml per punt x 3 = 0,6 ml per kant = totaal 1,2 ml
 KAAKRAND; 0,5 ml per punt x 5 = 2,5 ml per kant = totaal 5 ml

TOTAAL GELAAT; 10 ml PPC per sessie

BODY REGIONS.

0,4 – 0,5 ml per 1,5 cm inspuiten. Absoluut niet de spierfascie raken.

COMPOUND: maximaal is 10 ampullen à 5 ml PPC (100 ml Compound) per sessie.

LIPOSTABIL	NACL 0,9%	BUFLAMEDIL	POLYBION	TOTAAL
1 ampul= 5	5 ml	0,25 ml	0,1 ml	10 ml
2 ampul= 10	10 ml = 1 A	0,50 ml	0,2 ml	20 ml
3 ampul= 15	15 ml	0,75 ml	0,3 ml	31 ml
4 ampul= 20	20 ml= 2 A	1,00 ml	0,4 ml	41 ml
5 ampul= 25	25 ml	1,25 ml	0,5 ml	52 ml
6 ampul= 30	30 ml= 3 A	1,50 ml	0,6 ml	62 ml
7 ampul= 35	35 ml	1,75 ml	0,7 ml	73 ml
8 ampul= 40	40 ml= 4 A	2,00 ml	0,8 ml	83 ml
9 ampul= 45	45 ml	2,25 ml	0,9 ml	93 ml
10 ampul= 50	50 ml= 5 A	2,50 ml	1,0 ml	103 ml

LOKATIE	ML	LOKATIE	VLOEISTOF
Gyneacomastie	10	Per kant	Compound
Oksels	6	Voorkant	C
Oksels	10	Achterkant	C
Bovenarmen	20	Per kant	C
Maag	40		C
Onderbuik	60		C
rugplooien	10-20	Per plooi	C
lovehandles	20- 40	Per kant	C
Saddlebags	50	Per kant	C
Bovenbeen bk	10-30	Per kant	C
Knie bk	10	Per kant	C
Patella supra	10	Per kant	C
Cellulite	50	Per kant	C
Lipomen	2-10	Opvullen ter	PPC puur
		Grootte lipoom	

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl